



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS

AMANDA REGES DE SENA

OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE β -1,3-
GLUCANASE DE *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA* AIME-
PHILLIPS-MORA (SINGER)

FEIRA DE SANTANA-BA

2010

AMANDA REGES DE SENA

OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE β -
1,3-GLUCANASE DE *Moniliophthora perniciosa* AIME-
PHILLIPS-MORA (SINGER)

FEIRA DE SANTANA-BA

2010

AMANDA REGES DE SENA

OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE β -
1,3-GLUCANASE DE *Moniliophthora perniciosa* AIME-
PHILLIPS-MORA (SINGER)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: prof^a. Dr^a. Sandra A. Assis (UEFS)

FEIRA DE SANTANA-BA

2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Priminho Pirovani
UESC

Prof. Dr. Alex Gutterres Taranto
UFSJ

Prof^a Dr^a Sandra Aparecida Assis.
Orientadora e Presidente da Banca
UEFS

FEIRA DE SANTANA-BA
2010

Aos meus pais (Mário e Dilmar) por nunca permitirem faltar nada ao longo de toda a minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem o qual nada seria possível.

À minha família, pelo apoio incondicional e constante.

À Tonny, pela paciência e compreensão nos diversos momentos da ausência.

À professora Sandra, pela orientação e confiança para desenvolver este trabalho.

Ao grande amigo e companheiro Gildomar, por sempre estar ao meu lado em todos trabalhos desenvolvidos.

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica, em especial a Jenner e Sônia e ao seu Coordenador Prof. Dr. Alexsandro Branco.

À professora Miriam Moreira Mussi da Universidade Federal de Pelotas.

Aos amigos Toinho e Tiane, a Dra. Edna Dora e Msc. Jackson Prado (CEPLAC) pela ajuda e boa vontade.

Aos amigos do LAEN e a todos aqueles me ajudaram para a realização deste trabalho.

*A mente humana, uma vez ampliada por
uma nova idéia, nunca mais volta ao seu
tamanho original.*

Oliver Wendell Holmes

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Etapas de purificação de laminarinase de diferentes fontes. | 23 |
| Tabela 2: Características de algumas β -1,3-glucanases produzidas por diferentes fontes. | 27 |
| Tabela 3: Agentes de biocontrole de fungos patogênicos. | 30 |

CAPÍTULO 2

| | |
|--|----|
| Table 1: Doehlert Matriz used for the optimization of β -1,3-glucanase production from <i>M. pernicioso</i> . | 46 |
| Table 2: Analysis of variance for data presented in the table 1. | 48 |
| Table 3: Extraction and purification of β -1,3-glucanase. | 51 |

CAPÍTULO 3

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Valores codificados e não codificados para a aplicação na lise de <i>Pseudozyma</i> sp (CCMB 300 e 306) | 65 |
| Tabela 2: Estudo da lise de <i>Pseudozyma</i> sp. (CCMB 306), utilizando β -1,3-glucanase de <i>M. pernicioso</i> , através de planejamento experimental. | 68 |
| Tabela 3: Estudo da lise de <i>Pseudozyma</i> sp. (CCMB 300), utilizando β -1,3-glucanase de <i>M. pernicioso</i> , através de planejamento experimental. | 70 |

CAPÍTULO 4

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Efeito <i>in vitro</i> de extratos vegetais sobre o crescimento micelial do <i>M. pernicioso</i> . | 83 |
| Tabela 2: Efeito <i>in vitro</i> (% de inibição) de extratos de <i>Agave sisalana</i> sobre o crescimento micelial do <i>M. pernicioso</i> . | 84 |
| Tabela 3: Efeito <i>in vitro</i> (% de inibição) de extratos metanólicos do gênero <i>Marcetia</i> sobre o crescimento micelial do <i>M. pernicioso</i> . | 86 |
| Tabela 4: Efeito <i>in vitro</i> (% de inibição) de extratos aquosos e etanólicos, respectivamente, de diferentes partes de <i>X. cavanillesii</i> sobre o crescimento micelial do <i>M. pernicioso</i> . | 88 |

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1:** Ciclo de vida do fungo *Moniliophthora perniciosa*. 4
- Figura 2:** Imagens da infecção pelo fungo *M. perniciosa*. 5
- Figura 3:** Sintomas da vassoura-de-bruxa no cacauero. 6

CAPÍTULO 1

- Figura 1:** Hidrólise de β -1,3-glucano pela β -1,3-glucanase. 18

CAPÍTULO 2

- Figure 1:** Response surface for inductor concentration versus fermentation time. 49
- Figure 2:** Isoresponse contour plot of inductor concentration versus fermentation time for β -1,3-glucanase. 49
- Figure 3:** Purification of glucanase from *M. perniciosa* on Sephacryl S-200 column. 51
- Figure 4:** Optimum pH determination in the activity of β -1,3-glucanase. 52
- Figure 5:** Optimum temperature of β -1,3-glucanase. 53
- Figure 6:** Heat stability of β -1,3-glucanase at 60-90°C. 53
- Figure 7:** The effect of KCL on β -1,3-glucanase activity. 54
- Figure 8:** The effect of NaCl on β -1,3-glucanase activity. 54

CAPÍTULO 3

- Figura 1:** Representação da Matriz Doehlert para a otimização de duas variáveis. 66
- Figura 2:** Superfície de resposta para a lise de *Pseudozyma* sp. (CCMB 306) 69
- Figura 3:** Gráfico de Pareto para a lise de *Pseudozyma* sp. (CCMB 306). 69
- Figura 4:** Superfície de resposta para a atividade lítica sobre *Pseudozyma* sp (CCMB 300) como resposta para pH e temperatura. 71
- Figura 5:** Curvas de contorno para a atividade lítica sobre *Pseudozyma* sp (CCMB 300) como resposta para pH e temperatura. 71

CAPÍTULO 4

Figura 1: Atividade antifúngica de extratos de *Agave sisalana* sobre *M. pernicioso*. 85

Figura 2: Atividade antifúngica de extrato metanólico do gênero *Marsetia* sobre *M. pernicioso*. 87

Figura 3: Atividade antifúngica de extratos aquosos de *Xanthium cavanillesii* sobre *M. pernicioso*. 89

Figura 14: Atividade antifúngica de extratos etanólicos de *Xanthium cavanillesii* sobre *M. pernicioso*. 90

RESUMO

A lavoura cacaveira vem enfrentando uma redução em sua produção desde 1989 com a chegada da doença denominada vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*. Entre as enzimas envolvidas no metabolismo do fungo, há a β -1,3-glucanase, que apresenta atividade lisozímica assim como o grupo das quitinases, as quais degradam polissacarídeos como β -glucanos e a quitina, respectivamente. Neste sentido, objetivou-se produzir, purificar, caracterizar, determinar parâmetros cinéticos da β -1,3-glucanase e estudar inibidores do crescimento micelial do fungo. Para a otimização da produção de β -1,3-glucanase utilizou-se 5 níveis de concentração de extrato de levedura e 3 níveis de tempo de fermentação através da Matriz Doehlert. Os valores ótimos preditos de indutor e dias de fermentação foram 5,9 g/L e 13, respectivamente. Os resultados revelaram três diferentes isoformas (GLUI, GLUII e GLUIII) com fatores de purificação de 4,33, 1,86 e 3,03, respectivamente. A enzima exibiu uma atividade catalítica ótima a pH 5 e 40°C, sendo termoestável a 60°C. A atividade enzimática foi maior a 0,2 mol/L e 0,6 mol/L na presença de NaCl e KCl, respectivamente. O extrato enzimático obtido do ponto central do planejamento foi utilizado para verificar a sensibilidade de duas *Pseudozyma* sp. à lise. O delineamento experimental mostrou que as melhores condições para a lise de *Pseudozyma* sp. (CCMB 300) foram a pH 4 e 20°C e para *Pseudozyma* sp. (CCMB 306) a pH 5 e 40°C. Buscando uma alternativa para o controle da vassoura-de-bruxa foram testados extratos de sete espécies vegetais (*Marcetia latifolia*, *M. canescens*, *M. taxifolia*, *M. harley*, *M. formosa*, *Agave sisalana* e *Xanthium cavanillesii*) nas concentrações que variaram de 250 a 4000 μ g/mL. O extrato butanólico de *A. sisalana* e o extrato etanólico da folha de *X. cavanillesii* foram os mais ativos contra o fungo testado com poder de inibição de 100% a 4000 μ g/mL e 500 μ g/mL, respectivamente. Os resultados obtidos pela medida do CIM indicaram os valores de 500 μ g/mL e 2500 μ g/mL para o extrato da folha e caule de *Xanthium cavanillesii*, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: Enzima. Cromatografia de exclusão molecular. Características bioquímicas. Parâmetros cinéticos. Atividade antifúngica. Lise enzimática.

ABSTRACT

The fungus *Moniliophthora perniciosa* causes a great reduction in production of cocoa crop since 1989 because is the agent causative of the disease known as witch's broom. Among the enzymes involved in metabolism of the fungus, there is a β -1,3-glucanase, which has lysozyme activity and the group of chitinases, which degrade polysaccharides such as β -glucans and chitin, respectively. This work has the objective of purify, to characterize, determine the kinetic parameters and to study inhibitors on mycelial growth of *Moniliophthora perniciosus*. In the optimization of production of β -1,3-glucanase was used five levels of yeast extract and three levels of fermentation time by Doehlert matrix. The predicted optimum values of inductor and fermentation time were 5.9 g/L and 13 days, respectively. The results showed three different glucanases isoforms (GLUI, GLUII and GLUIII) with purification factors of 4.33, 1.86 and 3.03, respectively. The enzyme exhibited an optimum catalytic activity at pH 5 and 40 °C, and thermoestability at 60°C. The activity was increased to 0.2 mol/L and 0.6 mol/L in the presence of NaCl and KCl, respectively. The enzyme extract obtained from the central point of the planning was used to verify the susceptibility of two *Pseudozyma sp.* to lysis. The experiment design showed that the best conditions to *Pseudozyma sp.* (CCMB 300) lyses were pH 4 and 20°C and *Pseudozyma sp.* (CCMB 306) lysis were pH 5 and 40°C. Looking for an alternative to controlling the witch's broom, were tested extracts seven plant species (*Marcetia latifolia*, *M. canescens*, *M. taxifolia*, *M. harley*, *M. formosa*, *Agave sisalana* e *Xanthium cavanillesii*) at concentrations ranging from 250 to 4000 μ g/mL. The butanolic extract from *A. sisalana* and the ethanolic extract from *X. cavanillessi* leaf were the most active against fungus tested with significant inhibition of 100% to 4000 μ g/mL and 500 μ g/mL, respectively. Results obtained by the measurements of MIC, indicate that the values are, respectively, 500 μ g/mL for ethanol extract of the leaf and 2500 μ g/mL for ethanolic extract of stem of *X. cavanillessi*.

KEY-WORDS: Enzyme. Size exclusion chromatography. Biochemical characterization. Kinetic parameters. Antifungal activity. Enzymatic lysis.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE DE TABELAS | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ix |
| RESUMO..... | xi |
| ABSTRACT..... | xii |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 1 |
| CAPÍTULO 1: Produção, caracterização, purificação e aplicação industrial de β-1,3-glucanase (laminarinase): uma revisão | 13 |
| CAPÍTULO 2: Production, purification and characterization of an thermostable β-1,3-glucanase (laminarinase) produced by <i>Moniliophthora perniciosa</i> | 42 |
| RESUMO..... | 43 |
| ABSTRACT | 43 |
| INTRODUCTION | 44 |
| MATERIALS AND METHODS..... | 45 |
| RESULTS..... | 48 |
| DISCUSSION | 55 |
| REFERENCES | 56 |
| CAPÍTULO 3: Otimização da produção de β-1,3-glucanase por <i>Moniliophthora perniciosa</i> e sua aplicação na lise de leveduras utilizando metodologia de superfície de resposta | 60 |
| RESUMO..... | 61 |
| ABSTRACT | 61 |
| INTRODUÇÃO | 62 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 63 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 67 |
| CONCLUSÃO..... | 72 |
| REFERÊNCIAS..... | 73 |
| CAPÍTULO 4: Inibição do crescimento micelial de <i>Moniliophthora perniciosa</i> por extratos vegetais | 75 |
| RESUMO..... | 76 |
| ABSTRACT | 76 |
| INTRODUÇÃO | 77 |

| | |
|--------------------------------|-----------|
| MATERIAL E MÉTODOS | 79 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 82 |
| CONCLUSÃO..... | 91 |
| REFERÊNCIAS..... | 92 |
| CONCLUSÕES FINAIS | 97 |

INTRODUÇÃO GERAL

Segundo Mendes (2000), a cacauicultura na Bahia teve início a partir de 1776 quando algumas sementes de cacau foram levadas da Amazônia para o Sul da Bahia, de onde se espalharam e, progressivamente, se transformou em atividade agrícola significativamente importante pela posição representativa alcançada na economia nacional e estadual, culminando com o que se denominou de “civilização do cacau”.

O cacau é uma *commodity* importante já que mais de 20 milhões de pessoas dependem diretamente do mesmo para a sua subsistência. O interesse pelo seu cultivo está no aproveitamento para a produção de liquor e manteiga de cacau e chocolate em pó. Este último constitui ingrediente indispensável no preparo de diversas formas de alimentos, como bolos, sorvetes, etc. Suas sementes possuem alcalóides, incluindo, cafeína, teobromina e mais de 300 substâncias quimicamente ativas (PEREIRA; MONTEIRO; PIRES, 1999; PIROVANI et al., 2008).

Em 1984/85 o Brasil era o segundo maior produtor de cacau do mundo, obtendo uma produção em torno de 400.000 toneladas. Já em 2000, esta produção reduziu, chegando a 210.000 toneladas. Neste mesmo ano, a país importou 71.000 toneladas de amêndoas. O país, de grande exportador de amêndoas de cacau, passou a importador, para suprir as necessidades das indústrias de moagem nacionais. A diminuição da produção associada aos baixos preços do produto praticados no mercado internacional fez com que as divisas geradas com a cultura diminuíssem de US\$ 700 milhões/ano para cerca de US\$ 260 milhões (COMPANHIA DAS DOCAS DO ESTADO DA BAHIA, 2002; FAO, 2002; RESENDE et al., 2007).

Atualmente os países produtores de cacau são: Camarões, Costa do Marfim, República Dominicana, Gabão, Malásia, Nigéria, São Tomé e Príncipe, Togo e Brasil. Juntos, os países produzem 2,4 milhões de toneladas ao ano, sendo a Costa do Marfim responsável por 40 % da produção. O Brasil, com 6 %, ocupa a quinta posição do ranking mundial e reúne mais de 47 mil propriedades na Bahia, Pará, Rondônia e Espírito Santo (PAÍSES, 2009).

Segundo dados do IBGE/SIDRA/LSPA (2009), em 2008 o país produziu 216.749 toneladas, revelando uma taxa de variação em relação ao ano anterior

de 7,5 % (número maior que a taxa de crescimento para os últimos cinco anos – 0,98 %). O Estado do Pará apresenta a maior taxa de crescimento (5,1 %), seguido de Rondônia (2,2 %) e Espírito Santo com (0,7 %). A Bahia mantém-se estacionária, enquanto o Amazonas e Mato Grosso mostram taxas de crescimento negativas, (-0,4 % e -20,0 %), respectivamente.

O cacauero (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie perene, arbórea, monóica, cauliflora, tropical e cultivada na faixa equatorial entre os paralelos 20° de latitudes norte e sul. A planta é essencialmente alógama com taxa de autofecundação relativamente alta. Trata-se de uma angiosperma do grupo das dicotiledôneas, pertencentes à família Malvaceae. O gênero é dividido em seis seções e 22 espécies, distribuídas no continente americano. Todas as espécies são diplóides com $2n = 20$ cromossomos (BARRETO et al., 2008; PEREIRA; MONTEIRO; PIRES, 1999; COPE, 1984; CUATRECASAS, 1964; DAVIE, 1933).

O cacau, primeiramente domesticado pelas civilizações Maias e Astecas, é de origem neotropical, encontrado de forma espontânea nas planícies úmidas das Américas do Sul e Central (PEREIRA; MONTEIRO; PIRES, 1999). Segundo Cheesman, Allen e Lass (1944) seu centro de origem fica situado no curso superior do Amazonas, onde é verificada a maior diversidade da espécie, ficando a América Central como o centro secundário.

A diversidade genética na espécie *T. cacao* é muito grande, sendo encontrados alguns grupos, tais como o Forastero (do Alto e do Baixo Amazonas), o Criollo (da América Central e do Sul), o Trinitário (híbrido natural entre o Criollo e o Forastero) e o Catongo (mutante entre o grupo do Forastero). Essas raças diferenciaram-se de populações silvestres de cacau (PEREIRA; MONTEIRO; PIRES, 1999).

Apesar de toda diversidade encontrada, um dos principais problemas agrônômicos que demandam solução na cultura do cacau é a resistência a pragas e a diversas doenças (PEREIRA; MONTEIRO; PIRES, 1999).

A queda da produção nacional nos últimos anos pode ser explicada, em grande parte, pelo aparecimento do fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura-de-bruxa no cacauero, no Estado da Bahia, em 1989 (PEREIRA et al., 1990). A Bahia era responsável por mais de 80 % da produção nacional de cacau. Os danos à produção no estado da Bahia, devido a esta doença, foram de aproximadamente 105.000 toneladas nas safras de 1995/1996

e 1996/1997 (SANTOS FILHO et al., 1998). A partir de então, a maior limitação da produção de cacau no Brasil é causada pela vassoura-de-bruxa com perdas de até 90 % da produção (LUZ et al., 1997; RESENDE et al., 2007). Como conseqüências, são gerados impactos econômicos diretos devido a uma menor produção do fruto, além de venda de propriedades e danos ao meio ambiente (TREVIZAN, 1996).

Onde é cultivado, o cacauzeiro sempre foi alvo de várias doenças de grande importância econômica. A podridão-parda, causada por *Phytophthora* spp., é em termos mundiais, a principal delas, já que ocorre em todos os países produtores de cacau. Outras doenças como a monilíase causada por *Moniliophthora roreri* e a murcha-vascular-estriada, causada por *Oncobasidium theobromae*, bem como a vassoura-de-bruxa, causam perdas maiores que a podridão parda, porém são restritas a determinadas regiões do mundo (NETO et al., 2005).

O *Moniliophthora perniciososa* ataca principalmente os tecidos meristemáticos em crescimento, provocando sintomas característicos de desequilíbrio hormonal na interação planta-patógeno. As medidas recomendadas para o controle da doença estão inseridas no manejo integrado da mesma, adotando-se métodos de controle genético, cultural, químico e biológico (LUZ et al., 1997; COSTA et al., 2006).

Taxonomicamente, *M. perniciososa* é classificado na divisão Eumycota, subdivisão Basidimycotina, classe Basidiomycetes, subclasse Homobasidiomycetidae, ordem Agaricales e família Tricholomataceae (PURDY; SCHMIDT, 1996), produz basidiomas (basidiocarpos) pileados e estipitados, lignícolas, apresentando impressão de esporos de coloração branca. Os basidiósporos são as únicas estruturas, encontradas em condições de campo, capazes de infectar o cacauzeiro, sendo unicelulares, hialinos, com parede fina e medindo cerca de 12 µm x 6 µm (BAKER; CROWDY, 1943; PURDY; SCHMIDT, 1996). Sua disseminação se dá principalmente através do vento e chuva, sendo esta importante no avanço da doença tanto dentro de uma mesma planta quanto entre plantas vizinhas (ANDEBRHAN, 1987; COSTA, 1993).

Os basidiósporos liberados pelos basidiocarpos germinam e penetram, por meio de estômatos, ferimentos ou diretamente, nos tecidos da planta hospedeira (gemas vegetativas ou florais em expansão, ou em frutos jovens) induzindo os sintomas. Nessa fase a doença é caracterizada como parasítica (vassoura-verde,

com micélio monocariótico e intercelular e hifas intumescidas). Após o período de incubação as vassouras secam e morrem, tornando-se necróticas, ocorrendo a nova fase, a saprofítica (vassoura-seca, com micélio dicariótico e intracelular e hifas mais delgadas). (EVANS; BASTOS, 1979; SREENIVASAN; DABYDEEN, 1989; FRIAS et al., 1991; SILVA; MATSUOKA, 1999; COUTO, 2000; LANA, 2004; OLIVEIRA; LUZ, 2005).

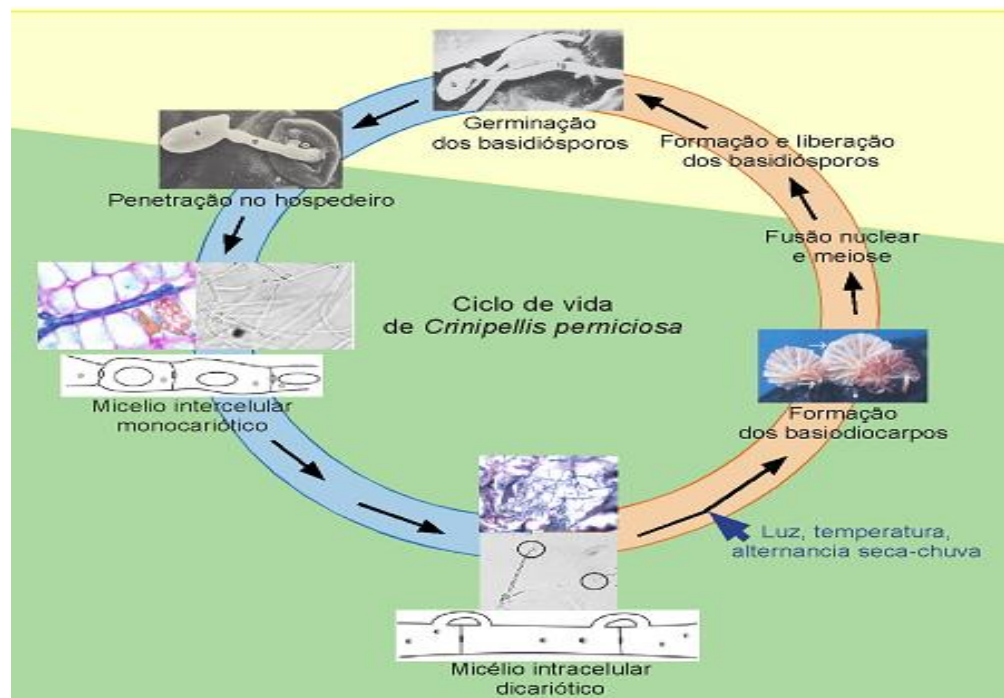


Figura 1: Ciclo de vida do fungo *Moniliophthora perniciosa*. Parte azul – fase biotrófica. Parte laranja – fase saprofítica. **Fonte:** SREENIVASAN; DABYDEEN, 1989; SILVA; MATSUOKA, 1999; SILVA et al., 2002; SCARPARI et al., 2005.



Figura 2: Infecção pelo fungo *M. pernicioso*. Em I, evidencia-se o estado saprofítico no cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.). Em II e III, o resultado da infecção nas folhas e frutos, respectivamente. **Fonte:** BOTANISCHER GARTEN, 2007.

Os sintomas da doença são caracterizados pelo superbrotamento (característico da doença) de lançamentos foliares, com proliferação de gemas laterais, e engrossamento (devido à hiperplasia) de tecidos infectados em crescimento. As almofadas florais infectadas podem produzir vassouras vegetativas, além de flores anormais, e os frutos produzidos em tais casos são, freqüentemente, partenocárpicos com formas diferentes da sua morfologia normal. Os danos internos em frutos são mais pronunciados que os da podridão-parda, com as amêndoas, geralmente, apresentando-se completamente danificadas e em fase mais avançada, com crescimento micelial do fungo na sua superfície. O fungo também infecta gemas apicais, em mudas, induzindo a proliferação de brotações laterais (vassouras terminais), podendo ainda, causar a formação de cancrios, tanto em mudas quanto em ramos (OLIVEIRA; LUZ, 2005).

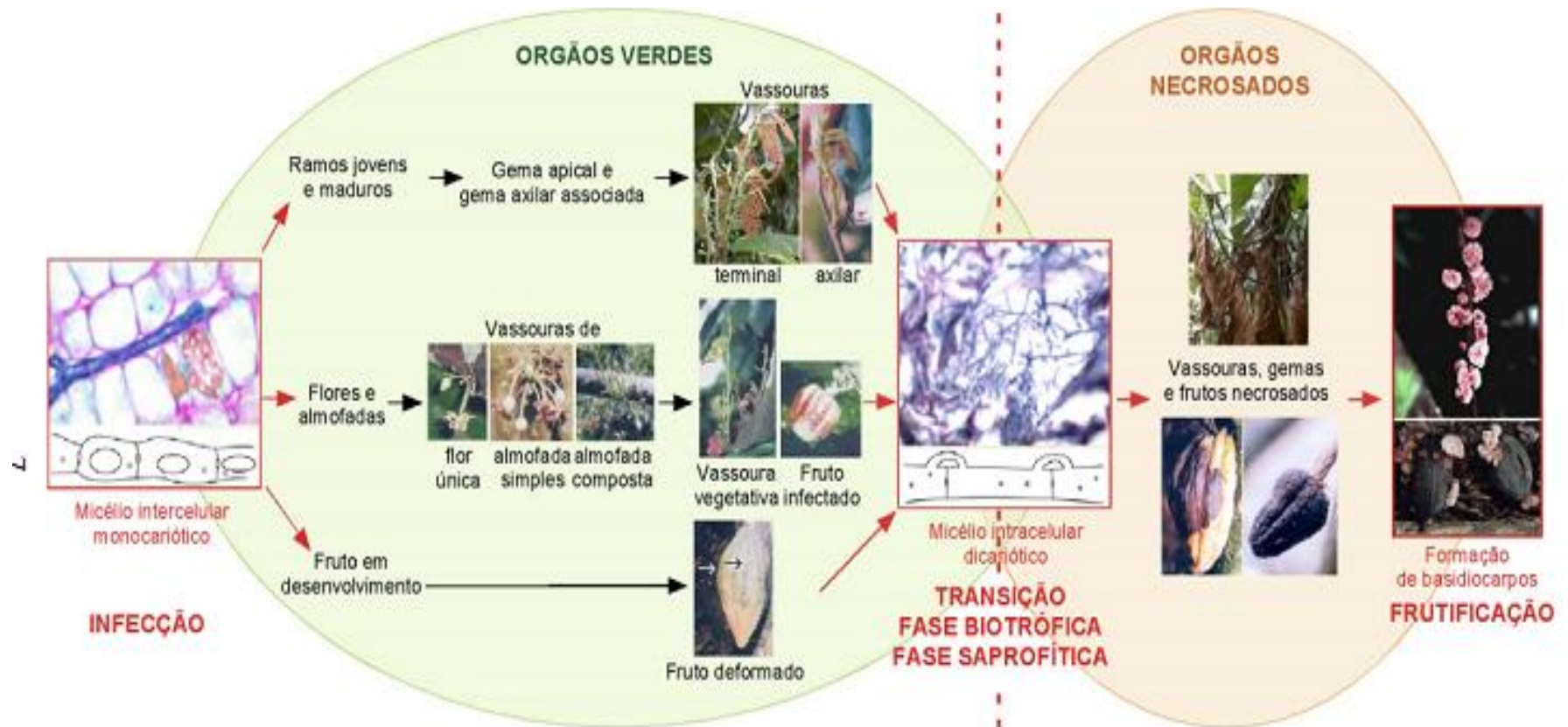


Figura 3: Sintomas da vassoura-de-bruxa no cacaueiro. Fonte: SILVA et al., 2002; SCARPARI et al., 2005.

Pensando nesta problemática, vários estudos têm sido desenvolvidos enfocando os mecanismos de defesa naturais do cacau contra o patógeno, controle genético, como o mapeamento do genoma do hospedeiro e do fungo, introdução de clones, controle químico (óxido cuproso), controle cultural (remoção de partes doentes da planta) e controle biológico (*Trichoderma stromaticum*). Em relação a este último, pesquisas recentes têm revelado a participação das enzimas na interação planta-patógeno, demonstrando uma indução significativa principalmente no grupo das quitinases e glucanases (FILADELFO et al., 2007; LOGUERCIO et al., 2009).

Vários compostos químicos vêm sendo testados com o objetivo de prevenir ou erradicar a vassoura-de-bruxa, no entanto, os resultados não têm sido satisfatórios devido ao rápido crescimento da superfície dos frutos durante os dois ou três meses de desenvolvimento faz com que o fungicida tenha que ser aplicado frequentemente. Além disso, esta aplicação é especialmente difícil em árvores muito altas (SOBERANIS et al, 1999). Inibidores da biossíntese da parede celular bacteriana como as penicilinas, têm apresentado bons resultados no controle de infecções bacterianas. Desta forma, a parede celular dos fungos é um bom alvo para o desenvolvimento de potentes antifúngicos (GRIFFITH; TRACY, 2003).

A parede celular do *M. pernicioso* é formada basicamente por quitina, estando envolvidas várias enzimas para a sua biossíntese. A enzima β -1,3-glucanase faz parte deste ciclo e o estudo de suas características e de sua estrutura, bem como inibição é de suma importância. Quando a síntese deste polímero é inibida, ocorre o extravasamento de componentes da célula, como resposta à alta pressão osmótica exercida sobre a membrana enfraquecida (KURTZ; DOUGLAS, 1997). As β -glucanases estão localizadas tanto no citoplasma das células fúngicas, como também ligadas à parede celular (SANTOS et al., 1979).

Muitos microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras são capazes de produzir β -1,3 glucanases (FLEURI; SATO, 2005). As β -1,3-glucanases são classificadas como exo-1,3- β -glucanase (1,3- β -glicano glicohidrolase) e endo-1,3- β -glucanase (1,3- β -glicano glicanohidrolase), pertencendo à família 16 glicosil hidrolase. As endoglucanases agem no interior da cadeia de glicanos mais ou menos de forma aleatória (randomicamente) resultando em oligossacarídeos de

maior peso molecular, enquanto as exoglucanases agem clivando o substrato a partir da extremidade não redutora liberando resíduos de glicose como único produto (FONTAINE et al., 1997; PLANAS, 2000).

A β -1,3-glucanase é uma enzima muito utilizada em estudos para entendimento da relação da planta com o fungo *M. pernicioso*. Ela também é largamente utilizada em indústrias juntamente com outras enzimas devido à sua alta atividade hidrolítica. Como por exemplo, para a produção de vinhos, que facilita em três aspectos: melhor maceração da casca, aumentando a extração de pigmentos; facilita a clarificação e a filtração do mosto; aumenta a qualidade e a estabilidade do vinho (BHAT, 2000; FÉRNANDEZ et al., 2000; TAKAYANAGI et al., 2001).

O estudo de novas glucanases microbianas que apresentem características diferenciadas pode dar origem a novos produtos comerciais além de ampliar as possibilidades de suas aplicações.

Assim, este trabalho tem como objetivos: obter, purificar e caracterizar bioquímica e cineticamente a enzima β -1,3-glucanase através de estrutura organizada laboratorial dotada de equipamentos e estudar possíveis inibidores da parede celular do fungo *M. pernicioso*.

REFERÊNCIAS

BAKER, R. E. D.; CROWDY, S. H. **Studies in the witches'broom disease of cocoa caused by *Marasmius perniciosus* Stahel: introduction, symptoms and etiology.** Port-of-Spain: ICTA, 1943. 28p.

BARRETO, T. R. et al. Population densities and genetic diversity of actinomycetes associated to the rhizosphere of *Theobroma cacao*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 464 - 470, 2008

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355 - 383, 2000.

BOTANISCHER GARTEN. 2007. **Theobroma cacao**. Disponível em <<http://www.botanik.uni-karlsruhe.de/garten/fotos-knoch/Theobroma%20cacao%20Echter%20Kakaobaum%207.jpg>>. Acesso em: 28 mar. 2009.

CHEESMAN, E. E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. **Tropical Agriculture**, v. 21, p. 144 - 159, 1944.

COMPANHIA DAS DOCAS DO ESTADO DA BAHIA. **Apresenta, em estatísticas, os principais produtos movimentados.** Disponível em: <<http://www.codeba.com.br/por-toilheus>>. Acesso em: 15 nov. 2008.

COPE, F. W. Cacao, *Theobroma cacao* (Sterculiaceae). In: Longman (eds.). **Evolution of crop plants.** Londres, 1984. p. 285-289.

COUTO, V. A. O território do cacau no contexto da mundialização. **Bahia Análise & Dados**, Salvador, v. 9, 2000. p. 38 - 52.

COSTA, J. C. **Progresso da vassoura-de-bruxa em órgãos vegetativos do cacau em Altamira e Tomé-Açú, Pa.** 1993. 1v. 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

COSTA, J. C. B. et al. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacau. In: Verson, M.; Paula Jr.; T.J.; Pallini, A. (eds.). **Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças.** Viçosa – MG: EPAMIG, 2006. p. 25 - 47.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allied. A taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions to the U.S. National Museum**, v. 35, p. 379-614, 1964.

DAVIE, J. H. Chromosome studies in the Malvaceae and certain related families – II. **Genetica**, v. 17, p. 5 - 6, 1933.

EVANS, H. C.; BASTOS, C. N. Uma reavaliação do ciclo de vida da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosus*) do cacau. **Fitopatologia Brasileira**, v. 4, p. 104, 1979.

FAO. PRODUCTION YEARBOOK, v.54, Rome, 2002.

FÉRNANDEZ, M.; ÚBEDA, J. F.; BRIONES, A. I. Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 29 - 36, 2000.

FILADELFO, C. R. et al. **Análise da atividade enzimática em tecidos de cacau resistente e susceptível, inoculadas com o fungo *moniliophthora perniciosa* (stahel) Aime & Phillips-Mora, comb. nov.** In: XIII Seminário de iniciação científica e IX Semana de pesquisa e pós-graduação, 2007, Ilhéus – BA.

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

FONTAINE, T. et al. Purification and characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus*. **European Journal Biochemical**, v. 243, p. 315-321, 1997.

FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. Infection biology of *Crinipellis perniciosa* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**, v. 75, p. 552-556, 1991.

GRIFFITH, G. W. et al. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. **Journal of Botany**, v. 41, p. 423 - 435, 2003.

IBGE/SIDRA/LSPA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 30 mar. 2009.

KURTZ, M. B.; DOUGLAS, C. M. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 35, p.79-86, 1997.

LANA, Taís Guimarães. **Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis perniciosa***. 2004. 1v. 106f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo.

LOGUERCIO, L. L. et al. Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control of witches' broom disease in cacao. **Biological Control**, v. 51, p. 130 - 139, 2009.

LUZ, E. D. M. N. et al. Doenças do cacauzeiro. In: RIBEIRO DO VALE, F. X.; ZAMBOLIM, L. (eds.). **Controle de doenças de plantas**. Brasília – DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. p. 611 - 656.

MENDES, F. A. T. A cacauicultura na Amazônia brasileira: potencialidades, abrangência e oportunidades de negócio. **Movendo Idéias**, v. 5, p.53 - 61, 2000.

NETO, A. D. et al. Caracterização de uma População de Cacauzeiro para Mapeamento de Genes de Resistência à Vassoura-de-Bruca e Podridão-Parda. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 380 - 386, 2005.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M.; N. **Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil**. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 2005. 132p.

PAÍSES produtores discutem políticas econômicas do cacau. Brasília, Disponível em: <[http:// http://extranet.agricultura.gov.br/pubacs_cons/lap_detalhe_noticia_cons_web?p_id_publicacao=15166](http://http://extranet.agricultura.gov.br/pubacs_cons/lap_detalhe_noticia_cons_web?p_id_publicacao=15166)>. Acesso em: 12 jun. 2009.

PEREIRA, J. L. et al. First occurrence of witches' broom disease in the principal cocoa-growing region of Brasil. **Tropical Agriculture**, v. 67, p.188 - 189, 1990.

PEREIRA, M. G.; MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L. Melhoramento do cacau. In: BORÉM, A. (Org.). **Melhoramento genético de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 1999. p. 160-188.

PIROVANI, C. P. et al. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**, v. 29, p. 2391 - 2401, 2008.

PLANAS, A. Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 361-382, 2000.

PURDY, L. H.; SHIMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 573 - 94, 1996.

RESENDE, M. L. V. et al. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 213 - 221, 2007.

SANTOS, T. et al. Derepression of β -1,3-glucanases in *Penicillium italicum*. Localisation of the various enzymes and correlation with cell wall mobilization and autolysis. **Journal of Bacteriology**, v.137, p. 6 - 12, 1979.

SANTOS FILHO, L.P.; FREIRE, E. S.; CARZOLA, I. M. Estimativas de perdas de produção de cacau causadas por vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) (Stahel) Singer na Bahia. **Agrotropica**, v. 10, p. 127-130, 1998.

SCARPARI, L. M. et al. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 1-13, 2005.

SILVA, S. D. V. M; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Crinipellis perniciosa* em cacaueiros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia brasileira**, v. 24, p. 54 - 59, 1999.

SILVA, S. D. V. M. et al. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cacaueiro. **Agrotropica**, v. 14, p. 1 - 24, 2002.

SREENIVASAN, T. N.; DABYDEEN, S. Modes of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis perniciosa*. **Plant Disease**, v. 73, p. 478 - 481, 1989.

SOBERANIS, W. et al. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao (*Theobroma cacao*) increases yield economically in eastern Peru. **Crop Protection**, v. 18, p. 677 - 685, 1999.

TAKAYANAGI, T.; UCHIBORI, T.; YOKUTSUKA, K. Characteristics of yeast polygalacturonases induced during fermentation on grapes skins. **American Journal of Enology & Viticulture**, v. 52, p. 41 - 44, 2001.

TREVIZIAN, S. D. P. Mudanças no Sul da Bahia associadas a vassoura-de-bruxa do cacao. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12. 1996. Salvador, **Proceedings**, Salvador: Cocoa Procedures Alliance, 1996, p. 1109 - 1116.

CAPÍTULO 1¹

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE β -1,3-GLUCANASE (LAMINARINASE): UMA REVISÃO

¹ Artigo será submetido à Revista Sitientibus – Revista da Universidade Estadual de Feira de Santana.

CAPÍTULO 1: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE β -1,3-GLUCANASE (LAMINARINASE): UMA REVISÃO

Resumo

As β -glucanases são enzimas, largamente distribuídas na natureza, as quais catalisam a hidrólise de β -glicano presente em muitos cereais e parede celular de fungos filamentosos e leveduras. A laminarinase catalisa preferencialmente ligações do tipo β -1,3 presentes na laminarina. Essa hidrolase é muito utilizada em uma variedade de processos industriais, incluindo biofungicidas no controle de fitopatógenos, enzimas exógenas na alimentação animal, na industrialização de vinhos e como enzimas líticas objetivando a obtenção de diversos produtos biotecnológicos. Novas pesquisas na busca de laminarinases podem dar origem a características diferenciadas das atuais e com isso novas aplicações e produtos biotecnológicos. Esta revisão apresenta os diversos aspectos relacionados com a produção, caracterização e aplicação industrial de β -1,3-glucanase.

Palavras-chave: enzima, β -glucanases, laminarinase, aplicação industrial.

Abstract

The β -glucanases are widely distributed enzymes in nature and catalyze the hydrolysis of β -glucan present in many cereals and cell wall of fungal and yeasts. The laminarinase catalyst preferably links β -1,3 present in the laminarin. This hydrolase is widely used in a variety of industrial processes, including the biological control of pathogens, exogenous enzymes in animal feed, the industrialization of wines and as lytic enzyme aiming to get various biotechnology products. New researchs in the search of laminarinases with different characteristics can lead to new applications and biotechnological products. This review presents the various aspects with respect to production, characterization and industrial application of β -1,3-glucanase.

Keywords: enzyme, β -glucanases, laminarinase, industrial application.

Introdução

As β -1,3- Glucanases são enzimas que hidrolisam β -1,3-glucanos, são largamente distribuídas na natureza e têm sido isoladas de muitos tipos de organismos, tais como plantas superiores (Cruz et al., 2002; Ko et al., 2003; Morohashi; Matsushima, 2000; Pitson et al., 1993), leveduras (Izgü et al., 2006), bactérias (Nagata, 1990; Pang et al., 2005), vírus (Sun et al., 2000), invertebrados marinhos (Kovalchuk et al., 2009; Kumagai; Ojima, 2009) e principalmente os fungos filamentosos (Boyce; Walsh, 2007; Fontaine et al., 1997; Li et al., 2007; Marco; Felix, 2007).

Os β -glucanos são pertencentes ao grupo de polissacarídeos naturais mais abundantes, principalmente devido à distribuição difundida da celulose, (1,4)- β -glucano. Entretanto, outros β -glucanos com ligações (1,3), (1,6) e (1,2) têm sido detectados em bactérias e plantas (Stone; Clarke, 1992), enquanto os (1,3) e (1,6)- β -glucano são sintetizados por muitos fungos, como componentes principais da parede celular, material de reserva ou como metabólito extracelular (Wessels; Sietsma, 1981).

Os β -glucanos com coexistência de ligações são importantes biopolímeros devido às suas atividades biológicas peculiares que podem incluir ação antitumoral, antiinflamatória e imuno-modulação (Wasser, 2002), como também ser responsável por mecanismos de resposta na interação planta-patógeno (Klarzynski et al., 2000).

Suas propriedades reológicas são estritamente relacionadas à composição dos monossacarídeos, grau de ramificação e conformação de seus constituintes na cadeia (Ramesh; Tharanathan, 2003), o que na sua aplicação industrial pode refletir na baixa solubilidade (Giese et al., 2006). Uma alternativa utilizada pela indústria para aumentar a solubilidade de β -glucanos em água é fragmentar a cadeia do polissacarídeo em cadeias menores, quimicamente ou enzimaticamente.

O uso de enzimas em processos industriais é de grande interesse, em especial devido à facilidade de obtenção (por biotecnologia) e às vantagens em relação aos catalisadores químicos, como maior especificidade, menor consumo energético e maior velocidade de reação. Além disso, a catálise enzimática tem outros benefícios, como o aumento da qualidade dos produtos, em relação à

catálise química; a redução dos custos de laboratório e de maquinário, graças à melhoria do processo; ou a fabricação controlada de pequenas quantidades (Mussatto; Fernandes; Milagres, 2007).

Em plantas, a expressão do gene para glucanase pode ser modulada em resposta a muitos processos fisiológicos na planta saudável, como germinação, microsporogênese e embriogênese (Neale et al., 1990; Simmons, 1994; Stiegilitz, 1977; Vögeli-Lange et al., 1994), mas também em resposta a estresses bióticos e abióticos (Simmons, 1994) e fitohormônios como o etileno (Boller; Vögeli, 1984).

Diferentes isoformas podem ser expressas nos diversos tipos de fontes. Nas plantas, por exemplo, podem ser conhecidas como proteínas relacionadas à patogenicidade, onde se diferenciam em atividade enzimática, propriedades estruturais, localização celular e padrão de regulação (Meins Jr et al. 1992; Simmons, 1994).

Em leveduras, estas hidrolases têm sido estudadas devido ao seu papel na germinação, esporulação e crescimento celular, sendo expressas de diferentes maneiras durante o crescimento vegetativo (McLeod et al., 2003). Em bactérias, que geralmente não possuem β -1,3-glucano, observa-se um papel nutricional (El-Katany et al., 2001).

O papel das β -1,3-glucanases fúngicas na natureza parece estar associado à morfogênese (Rapp, 1992), aos processos de sobrevivência, degradação de polissacarídeos (Noronha et al., 2000), patogenicidade (Vázquez-Garcidueñas et al. 1998), sendo que durante muito tempo se acreditou que a função original destas enzimas estaria relacionada à promoção do crescimento e divisão celular (McLeod et al., 2003).

Existem 3 tipos dessas enzimas, as quais são classificadas de acordo com os tipos de ligações β -glicosídicas que as mesmas clivam e o mecanismo de ataque ao substrato. Em relação ao substrato, as β -1,3-glucanases podem hidrolisar por dois possíveis mecanismos identificados pelos produtos de hidrólise: exo- β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.58), as quais hidrolisam o substrato pela clivagem seqüencial dos resíduos de glicose a partir da extremidade não redutora, originando glicose como único produto, e endo- β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.39), que clivam as β -1,3-ligações de forma aleatória ao longo da cadeia de polissacarídeo, dando origem a oligossacarídeos (Pitson et al., 2003). As 1,3(4)-

glucanase (EC 3.2.1.6) pertencem a um grupo capaz de hidrolisar tanto 1,3-1,4- β -glucanos quanto 1,3- β -glucanos (Planas, 2000).

O crescente interesse no estudo dessas hidrolases se concentra no seu potencial de aplicação industrial biotecnológica, considerando a sua ação hidrolítica sobre diversas substâncias naturais (Warren, 1996; Kirk et al., 2002). Como exemplos de utilização com este fim, pode-se citar a ração animal contendo as β -1,3-glucanases como aditivo biológico para melhorar a digestibilidade e o valor nutritivo das dietas formuladas com cereais (Carvalho et al., 2008; König et al., 2002), na indústria cervejeira para suplementar a atividade enzimática do malte ou como auxiliares ao processo de filtração (Bramforth; Quain, 1990; Pitson et al., 1993; Couri et al., 2008), na indústria de vinhos, onde atuam sobre os carboidratos poliméricos ramificados que surgem no mosto (Godfrey; West, 1996; Humbert-Goffard et al., 2004), no controle biológico, durante o ataque micoparasitário, como alternativa aos fungicidas (De la Cruz et al., 1995), na degradação da parede celular de leveduras para a extração de diversos produtos biotecnológicos (Fleuri; Sato, 2008) e no campo médico, reforçando o sistema imunitário (Karmali; Girão Bastos; Fernandes, 2006; Pang et al., 2005).

Esta revisão tem por objetivo reunir informações sobre produção, caracterização, purificação e aplicação industrial de β -1,3-glucanases.

O substrato: Laminarina (β -1,3-glucana)

A laminarina é um polissacarídeo de reserva encontrado em muitas algas pardas (Phaeophyceae) principalmente em *Laminaria digitata*. É formado a partir de várias unidades de glicoses, ligados entre si pelo carbono 1 da primeira glicose e o carbono 3 da glicose subsequente, sendo substrato da β -1,3-glucanase, que realiza a hidrólise entre os carbonos 1 e 3 de glicoses adjacentes, liberando moléculas de glicoses (Fig. 2) (Bohn; Bemiller, 2005). Além desse substrato, a enzima também pode hidrolisar paramylona (carboidrato de reserva da alga *Euglena gracilis*), pachyman (carboidrato de presente no micélio de *Poria cocos*) (Ding et al., 2001; Fleuri, 2006; Ivušić, 2007) e botriosferana (um exopolissacarídeo – EPS produzido por *Botryosphaeria rhodina*) (Giese et al., 2005; SILVA et al., 2008).

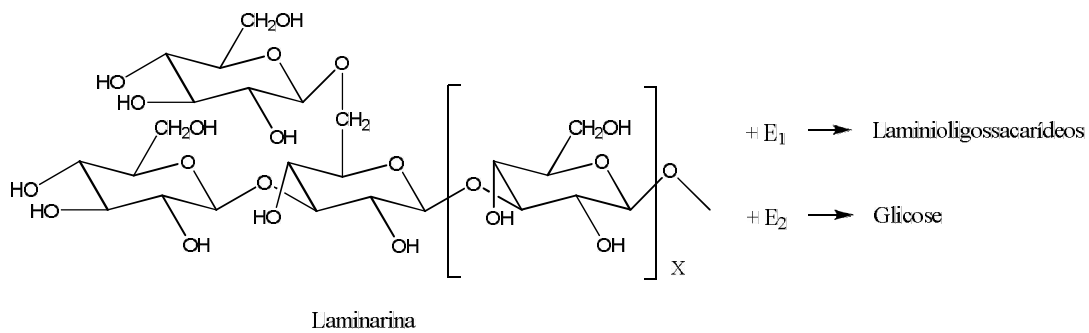


Figura 1: Hidrólise de β -1,3-glucano pela β -1,3 glucanase. E₁ (endo- β -1,3-glucanase) e E₂ (exo- β -1,3-glucanase). **Fonte:** Kovalchuk et al., 2009.

Produção de β -1,3-glucanases por microrganismos

Como explanado anteriormente, as β -1,3-glucanases têm sido encontradas em muitos procariotos e eucariotos e têm sido aplicadas em diferentes processos. Vários autores trabalharam com a produção destas hidrolases a partir de diversos microrganismos como *Aspergillus fumigatus* (Fontaine et al., 1997), *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* (Nagata et al., 1990), *Agaricus brasiliensis* (Shu; Xu; Lin, 2006), *Trichoderma harzianum* (Marco; Felix, 2007), *Bacillus subtilis* (Leelasuphakul; Siuanunsakul; Phongpaichit, 2006), *Pichia pastoris* (Xu; Shih; Poulton, 2006), *Williopsis saturnus* WC91-2 (Peng et al., 2009), entre outros.

Nagata et al. (1990) produziram 5 isoformas de β -1,3-glucanases a partir de *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* FA5-6, utilizando meio Luria-Bertani (pH 7,2) a 30 °C por 16 horas. O meio de cultivo consistiu de polipeptona, extrato de levedura e NaCl. Após este período o caldo de cultura foi transferido para um meio de cultura (pH 8,5) contendo levedura de pão como indutor de β -1,3-glucanase e incubados a 30 °C por 24, 48 e 62 horas. A síntese enzimática no extrato bruto atingiu uma atividade total de 125 U.

No estudo de produção de β -1,3-glucanase por *Agaricus brasiliensis* ATCC 76739, foi obtido um rendimento máximo (145,70 U) utilizando meio complexo, contendo glicose, peptona, extrato de levedura e de malte, vitamina B1 e nutrientes inorgânicos. O meio de cultivo foi mantido em pH 5,2 a 28 °C com uma

aeração de 0,2 vvm por 25 dias. A atividade da enzima aumentou com a biomassa micelial (Shu; Xu; Lin, 2006).

Rana et al. (2003) utilizaram *Trichoderma harzianum* NCIM 1185 para obtenção de β -1,3-glucanase através da utilização de planejamento experimental, onde o pH (3,48 a 6,4) e temperatura (41 a 69,14 °C) foram as variáveis independentes para a otimização. Foram utilizados dois meios, com os mesmos constituintes, para a produção da glucanase, um de crescimento e outro otimizado, este último com maior quantidade na sua composição. O meio consistiu de glicose, peptona, uréia, ácido cítrico e Tween-80. Os dois meios foram suplementados com nutrientes inorgânicos. Uma suspensão conidial foi inoculada em meio de crescimento e incubada a 160 rpm a 30 ± 1 °C por 36 horas. Uma suspensão micelial contendo aproximadamente 0,15 g de peso micelial seco foi inoculado no meio otimizado. Os autores observaram que um acréscimo de pH entre 3,6 e 6,0 diminuiu a atividade enzimática, quando a temperatura foi menor que 55 °C e acima de 55 °C. Uma variação na temperatura de 41 a 65 °C não teve efeito visível, mas a atividade enzimática foi obtida em uma temperatura menor que 41 °C. Uma atividade residual máxima de 0,479 U foi obtida a pH 3,6 e a 41 °C.

Marco e Felix (2007) também estudaram a produção de β -1,3-glucanase por *Trichoderma harzianum*, isolado 1051, utilizando 0,5 % de quitina como única fonte de carbono. O extrato enzimático foi produzido a partir da inoculação de esporos do fungo em meio líquido TLE, mantido a pH 5,5 e incubado entre 0 e 72 horas a 28 °C, com agitação de 250 rpm. A atividade enzimática presente no sobrenadante aumentou rapidamente após 24 horas e um nível maior foi detectado com 72 horas de crescimento.

A produção de β -1,3-glucanase por *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 utilizando quitina como indutor no meio de crescimento foi estudada por Leelasuphakul, Sivanunsakul e Phongpaichit (2006). O microrganismo foi crescido em caldo nutriente suplementado com solução de 0,3 % de quitina e 0,3 % de extrato de levedura, pH 7,0. O meio permaneceu a 30 °C por 5 dias a 170 rpm. A atividade enzimática aumentou gradativamente entre o 1º e 5º dia, chegando ao máximo ($60 < x < 70$ U/mL) neste último, e manteve-se constante até o 7º dia.

Uma β -1,3-glucanase termoestável foi produzida pelo fungo *Chaetomium thermophilum* em um meio contendo farelo de trigo, extrato de levedura e alguns

nutrientes inorgânicos. A incubação ocorreu a 50 °C e 120 rpm por 7 dias. A atividade total no extrato bruto foi de 1829 U (Li et al., 2007).

De acordo com os dados apresentados, pode-se observar diferenças entre as composições dos meios de cultivos utilizados e as condições para a produção enzimática.

Para o crescimento de microrganismos visando à produção de enzimas de interesse, algumas substâncias são requeridas para as suas necessidades nutricionais. A água, fontes de carbono e energia (ex.: glicose), nitrogênio (ex.: peptona) e oxigênio fazem parte dessas substâncias. Contudo, a metabolização dos compostos varia entre os microrganismos.

A glicose, por exemplo, apesar de ser a principal fonte de carbono e energia possui efeito repressor para diversas enzimas. A peptona também é uma fonte de fácil metabolismo, porém possui o mesmo efeito negativo. Se identificada a regulação, devem ser evitadas na formulação do meio de cultivo fontes repressoras e estimulado o uso de fontes não repressoras, como a uréia (fonte de nitrogênio) (Bon et al., 2008).

Outro ponto a ser ressaltado é a importância da matéria-prima, já que a mesma está diretamente relacionada ao custo da produção, assim como a agitação e aeração (fatores limitantes). Por exemplo, a utilização de farelo de trigo, bem como outros resíduos lignocelulósicos agroindustriais que podem ser utilizados, não consistiu em custo de produção direto no crescimento de *Chaetomium thermophilum*.

A maioria dos trabalhos empregou extrato de levedura no meio de cultivo, pois para a obtenção de maiores rendimentos de algumas enzimas, a presença de substrato é requerida para a indução da síntese da mesma.

Comparando o tempo de fermentação em horas, o baixo valor obtido da unidade enzimática para o *Trichoderma harzianum* NCIM 1185 pode ser atribuído à repressão tanto pela glicose quanto pela peptona, além de não utilizar um agente indutor. Em relação ao tempo de fermentação em dias, o valor encontrado para a atividade enzimática obtida de *Chaetomium thermophilum* foi devido à utilização de uma fonte de carbono e energia não repressoras, indutor e fermentação em menos dias. O crescimento de *Agaricus brasiliensis* ATCC 76739 pode ter sido regulado por glicose e nitrogênio, além de outros constituintes do meio. A baixa atividade enzimática encontrada pode ser atribuída também ao

tempo de fermentação prolongado, o que pode ocasionado a inibição da enzima de interesse pelo substrato, produto ou outros metabólitos.

Pré-purificação e Purificação de β -1,3-glucanases

Pré-purificação

Na pré-purificação, a metodologia empregada é a concentração. Este processo pode ser realizado a partir de evaporadores a vácuo, por precipitação ou por ultrafiltração. Para a concentração de extrato bruto contendo β -1,3-glucanase o mais utilizado é a precipitação por sulfato de amônio, uma técnica simples e rápida. No entanto, o processo é geralmente empregado em pequena escala, pois volumes grandes necessita de maior tempo de residência (Gerhartz, 1990)

Purificação

A purificação de biomoléculas tem o objetivo não só de aumentar a pureza, mas também a atividade biológica da proteína, elevando o rendimento desta ao máximo e eliminando-se as inativas. Normalmente os protocolos de purificação de enzimas extracelulares são separados em duas etapas: pré-purificação e purificação por métodos cromatográficos (Palekar et al., 2000).

A disponibilidade de diferentes técnicas cromatográficas com diferentes propriedades fornece combinação poderosa para a purificação de qualquer biomolécula (Pharmacia Biotech, 1999). A quantidade e tipo de técnicas usadas dependerão da natureza e das características das amostras, assim como do grau de pureza desejado no produto final (Pasechnik; Phls, 1995) e na sua escolha, comumente, são empregados os critérios de recuperação, resolução, velocidade e capacidade (Zuñiga et al., 2003).

Os extratos enzimáticos brutos são misturas aquosas complexas de células, produtos extracelulares solúveis, produtos intracelulares e componentes não convertidos durante a fermentação. A separação de um determinado produto depende não apenas da sua localização (extracelular ou intracelular), tamanho, carga, e solubilidade do produto, mas também do processo e o seu valor no mercado.

O interesse crescente pelos processos de purificação de biomoléculas deve-se principalmente ao desenvolvimento da biotecnologia e à demanda das indústrias farmacêutica e química por produtos com alto grau de pureza. A indústria de alimentos também apresentou aumento no uso de biomoléculas, como enzimas e proteínas, principalmente em cervejarias e em processos de fermentação (Zuñiga et al., 2003).

Nas pesquisas sobre a purificação de laminarinases têm sido empregados principalmente dois tipos de métodos cromatográficos: troca iônica e permeação em gel (exclusão molecular). Além destas, já foram também citadas na literatura colunas de interação hidrofóbica e colunas de bioafinidade. A tabela abaixo mostra as etapas de purificação de laminarinases.

Tabela 1. Etapas de purificação de β -1,3-glucanases (laminarinase) de diferentes fontes.

| Fonte | Métodos | Atividade específica (U/mg) | Recuperação (%) | Fator de purificação | Ref. |
|---|---|-----------------------------|------------------|----------------------|-------------------------|
| <i>Flavobacterium dormitator</i> var. <i>glucanolyticae</i> | Sulfato de amônio – 80 %; Exclusão molecular; Troca iônica | 8,3; 410; 1500 | 56; 13; 8,4 | - | NAGATA et al., 1990 |
| <i>Sclerospora graminicola</i> | Sulfato de amônio – 50 %; Troca iônica; Exclusão molecular | 6,66; 16,98; 41,33 | 34,2; 13,4; 6,05 | 1,5; 3,9; 9,5 | KINI et al., 2000 |
| <i>Pichia pastoris</i> | Sulfato de amônio – 75 %; Troca iônica; Exclusão molecular | 147; 804; 13.770 | 87; 42; 29 | 2; 12; 197 | XU; SHIH; POULTON, 2006 |
| <i>Agaricus brasiliensis</i> | Sulfato de amônio – 30-70 %; Cromatografia de interação hidrofóbica | 4,18; 48,50 | 93,6; 6,66 | 1,13; 13,1 | SHU; XU; LIN, 2006 |

Tabela 1 (Continuação) - Etapas de purificação de β -1,3-glucanases (laminarinase) de diferentes fontes.

| Fonte | Métodos | Atividade específica (U/mg) | Recuperação (%) | Fator de purificação | Ref. |
|---|--|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Chaetomium thermophilum</i> | Sulfato de amônio – 80 %; Interação hidrofóbica; Troca iônica; Exclusão molecular | 6,15; 9,40; 17,8; 45,4 | 48,1; 41,4; 26,2; 17,2 | 3,55; 5,43; 10,29; 26,24 | Li et al., 2007 |
| <i>Stichopus japonicus</i> | Sulfato de amônio – 80 %; Troca iônica; Interação hidrofobia; Exclusão molecular | 133,26; 846,56; 1120,68; 1762,50 | 84,99; 42,93; 8,40, 3,58 | - | ZHU et al., 2008 |
| <i>Haliotis discus hannai</i> | Sulfato de amônio – 20-60 %; Interação hidrofóbica; Troca iônica; Exclusão molecular | 1,9; 4,6; 14; 68 | 39; 36; 32; 17 | 10; 23; 72; 340 | KUMAGAI; OJIMA, 2009 |
| <i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Huinkul | Troca iônica; Cromatografia de afinidade | - | 1,44 (p/bioafinidade) | 6 (p/bioafinidade) | TÓNOM; DALEO; OLIVA, 2001 |

Analisando os três primeiros trabalhos, todos utilizaram as seguintes etapas: precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca aniônica e de exclusão molecular. O trabalho desenvolvido por Xu, Shih e Poulton (2006) obteve os melhores resultados nas condições testadas, já que um dos fatores mais importantes para a escolha da técnica (recuperação) teve o maior valor. Outro aspecto importante é o emprego da diálise. A pesquisa dos autores acima, comparada com os outros dois trabalhos, obteve vantagem já que não necessitou dialisar a amostra, o que representou economia de tempo, energia e principalmente a manutenção da atividade enzimática.

Entre os trabalhos que utilizaram além da cromatografia de troca iônica e exclusão molecular a interação hidrofóbica, o melhor foi o desenvolvido pelos autores Li et al. (2007), pois obtiveram os melhores rendimentos e também não dialisaram a amostra após precipitação.

Vale ressaltar que preparações enzimáticas parcialmente purificadas são suficientes para diversas aplicações industriais e etapas de purificação desnecessárias devem ser evitadas, pois são dispendiosas em termos de equipamento, mão-de-obra e perda da atividade enzimática (Uhlig 1998).

Caracterização de β -1,3-glucanase

Os melhores desempenhos e estabilidade catalíticos são características desejáveis de uma enzima. O desempenho catalítico é definido como a habilidade de uma enzima de catalisar um processo enquanto a estabilidade é avaliada pela atividade residual, que as enzimas possuem após um processo de desativação. A atividade e estabilidade são afetadas por certos parâmetros, os quais podem ser tanto físicos (temperatura e pH) ou químicos (a presença de inibidores ou ativadores, etc.) (Rana et al., 2003). Esses parâmetros são extremamente úteis quando o foco é a aplicação industrial de uma enzima.

Quando afastados das condições ótimas podem provocar a desnaturação protéica, através da mudança da estrutura tridimensional nativa, ocasionando a perda da sua atividade catalítica. Vários aspectos necessitam ser otimizados com vistas à obtenção de elevados rendimentos e produtividade: linhagem produtora, matéria-prima empregada, formulação do meio de cultivo e parâmetros operacionais (Bon et al., 2008).

Algumas características como temperatura ótima, pH ótimo, os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}), massa molecular e estabilidade térmica da β -1,3-glucanase já foram apresentadas na literatura para diferentes fontes.

Fontaine et al. (1997) caracterizaram a β -1,3-glucanase purificada obtida de *Aspergillus fumigatus* e verificaram que a mesma era uma proteína glicosilada de 74 KDa, apresentando um pH ótimo ao redor de 7,0 e temperatura ótima em 60 °C. A estabilidade da atividade enzimática foi boa até 55 °C, mas decresceu rapidamente após 60 °C. Após permanecer por 1 hora a 70 °C e pH 7,0, a atividade foi perdida. Em diferentes valores de pH por 1 hora a 37 °C, a atividade não foi estável em condições ácidas, mas na faixa de pH 8 a 10. Seus parâmetros cinéticos K_m e V_{max} , para a laminarina, foram 0,26 mg/mL e 46,2 μ mol glicose/min.mg proteína, respectivamente.

A β -1,3-glucanase purificada de *Trichoderma asperellum* foi estudada por Bara et al. (2003), onde verificaram um K_m de 0,087 mg/mL e V_{max} de 0,246 U/min, para a laminarina como substrato.

Isgü, Altinbay e Acun (2006) caracterizaram a enzima de *Pichia anomala* NCYC 432 e verificaram que a mesma apresentou atividade ótima em pH 4,5 e reteve 75 % de sua atividade em pH 2,5. Nenhuma perda significativa foi observada a 37 °C. Foram encontrados os valores de 0,3 mg/mL para K_m e 350 μ mol glicose/min.mg para a enzima purificada.

Bara et al. (2003), após a otimização da produção de β -1,3-glucanase extraída de *Trichoderma asperellum*, verificaram atividade ótima em pH 3,6 e temperatura de 41 °C. Na determinação de parâmetros cinéticos na presença e ausência de inibidores, eles verificaram um valor de K_m igual a 0,173 g/L e V_{max} igual a 0,113 g/L.h sem o acréscimo desses. Os cátions Cu^{2+} e NH_4^+ e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) agiram como inibidores da enzima.

Giese et al. (2006) caracterizaram a enzima obtida de *Trichoderma harzianum* quanto aos valores de pH e temperatura. Os valores máximos obtidos, com laminarina como substrato, ocorreram a 50 °C e pH 4,5.

Romero et al. (2008), estudaram a expressão de um gene *Vcgns 1*, uma β -1,3-glucanase Classe I, em uvas de mesa tintas (*Vitis vinifera* cv. Cardinal) em resposta a baixa temperatura e altos níveis de CO_2 (20 %). Usando expressão heteróloga do cDNA de *Vcgns* em *Escherichia coli*, os autores observaram que a proteína codificada com atividade de glucanase mostrou uma atividade ótima em

um pH e temperatura de 6 e 45 °C, respectivamente, e uma alta estabilidade térmica a 0 °C. O valor para o K_m aparente encontrado para a enzima recombinante foi 0,78 mg/ml. Seguem na Tabela 2 características bioquímicas de diferentes β -1,3-glucanases de alguns organismos.

Tabela 2. Características bioquímicas de diferentes β -1,3-glucanases produzidas por diferentes fontes.

| Organismos | Peso molecular (kDa) | pH ótimo | Temperatura ótima (°C) | Ref. |
|---|----------------------|----------|------------------------|---|
| Microrganismos | | | | |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | 36 | 5,0 | 50 | MARCO; FELIX, 2007 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | 74 | 7 | 60 | FONTAINE et al., 1997 |
| <i>Chaetomium thermophilum</i> | 76,3 | 6 | 60 | Li et al., 2007 |
| <i>Flavobacterium dormitator</i> var. <i>glucanolyticae</i> | 27 | 5,5 | 55 | NAGATA et al., 1990 |
| <i>Trichoderma asperellum</i> | - | 5,1 | 55 | BARA et al., 2003 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | - | 4,7 | 30 | THÉODORE; PANDA, 1995 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | - | 7,5 | 40 | LEELASUPHAKUL; SIUANUNSAKUL; PHONGPAICHIT, 2006 |
| <i>Agaricus brasiliensis</i> | - | 4,5 | 50 | SHU; XU; LIN, 2006 |
| <i>Pichia pastoris</i> | 47,0 | 6,0 | 45-55 | XU; SHIH; POULTON, 2006 |
| <i>Botryosphaeria rhodina</i> | - | 5,0 | 55 | GIESE et al., 2006 |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | 62,0 | 5,0 | 40 | VIJAYENDRA; KASHIWAGI, 2009 |

Tabela 2 (Continuação) – Características bioquímicas de diferentes β -1,3-glucanases produzidas por diferentes fontes.

| Organismos | Peso molecular (kDa) | pH ótimo | Temperatura ótima (°C) | Ref. |
|--------------------------------|----------------------|----------|------------------------|-----------------------------|
| Espécies de plantas | | | | |
| <i>Lycopersicum esculentum</i> | 35,0 | 5,5 | - | MOROHASHI; MATSUSHIMA, 2000 |
| <i>Pennisetum glaucum</i> | 20,5 | 5,2 | 37-70 | KINI et al., 2000 |
| <i>Cicer arietinum</i> | 34,0 | 5,2 | - | HANSELLE; BARZ, 2001 |
| Invertebrados marinhos | | | | |
| <i>Stichopus japonicus</i> | 37,5 | 5,5 | 40 | ZHU et al., 2008 |
| <i>Chlamys albidus</i> | 37,0 | 4,4 | 20 | KOVALCHUK et al., 2009 |
| <i>Haliotis discus hannai</i> | 33,0 | 6,0 | 50 | KUMAGAI; OJIMA, 2009 |
| <i>Williopsis saturnus</i> | 47,5 | 4,0 | 40 | PENG et al., 2009 |

Nos estudos, a enzima β -1,3-glucanase apresentou estabilidade em valores de pH entre 4,0 e 7,5 e temperaturas entre 20 e 70 °C, condições muito atrativas para a indústria, pois diminuem o risco de contaminação microbiana. A diversidade encontrada é uma fonte de Recursos Genéticos para obtenção de bioprodutos através do uso de tecnologia do DNA recombinante.

Sabe-se que as leveduras e fungos filamentosos são os maiores produtores de enzimas utilizadas em diversos processos biotecnológicos. Porém, estudos em busca de novas características bioquímicas são necessárias, principalmente em ambientes frios e salinos, já que são colonizados por diversos organismos extremófilos que podem secretar enzimas com características peculiares e únicas.

Mercado mundial de enzimas e aplicação de β -1,3-glucanase

A demanda global por enzimas industriais subirá 6,3 % anualmente até 2013 e tem três segmentos: enzimas técnicas, para alimentos e bebidas e para ração animal. O mercado mundial será recuperado de um momento difícil em 2009 e chegará a US\$ 7 bilhões em 2013, principalmente para enzimas utilizadas em ração animal, entre estas a β -1,3-glucanase, e produção de etanol (Mussatto; Fernandes; Milagres, 2007; Freedonia, 2009).

No Brasil, em 2005, o mercado externo de enzimas foi avaliado em US\$ 147,2 milhões (3,7 % do mercado internacional). As importações e exportações responderam por US\$ 126,6 milhões (86 %) e US\$ 20,6 milhões (14 %), respectivamente. O mercado brasileiro, embora ainda pouco representativo, revela grande potencial, devido à enorme geração de resíduos agroindustriais e ao dinamismo das indústrias de alimentos, medicamentos, tecidos e celulose/papel. A redução do custo de produção de enzimas é favorecida, no país, pela possibilidade de bioconversão de subprodutos agrícolas como farelo de trigo, farelo de algodão, casca de soja, entre outros. Acredita-se, por isso, em um rápido aumento do uso de enzimas e em particular em processos industriais, no país (Coelho et al., 2001; Mussatto; Fernandes; Milagres, 2007; Costa et al., 2008).

Controle biológico de fungos patogênicos

Muitas estratégias têm sido propostas para a redução da utilização de fungicidas no controle de fitopatologias, devido à resistência dos microrganismos envolvidos nas doenças e contaminação ambiental. Resultados promissores já foram relatados na literatura sobre o efeito de microrganismos antagônicos a vários fitopatógenos. O gênero *Trichoderma* é um dos mais conhecidos e bem descritos como agentes de biocontrole (Rey et al., 2001; Rocha-Ramírez et al., 2002). No entanto, vários microrganismos possuem a capacidade de desempenhar esta função.

Castoria et al. (1997) isolaram e testaram *Rhodotorula glutinis* (Fresen.) Harr. (isolado LS-11) e *Cryptococcus laurentii* (Kuff) Skinn. (isolado LS-28) na proteção de maçãs infectadas causadas por algumas espécies como *Penicillium*

expansum, *P. digitatum*, *P. italicum*, *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*. Ambos isolados de leveduras produziram altos níveis de β -1,3-glucanase extracelular no caldo de cultura na presença de parede celular de *Penicillium expansum*, como fonte de carbono, quando comparado com *B. cinerea*, sendo atribuídos os maiores níveis significativos ao isolado LS-28. No teste *in vitro* com as hifas dos patógenos, um halo de inibição insignificante foi observado para ambos os isolados testados contra os dois patógenos acima citados, quando comparado com a ação de *B. subtilis*. Além disso, culturas filtradas das leveduras não reduziram, *in vivo*, o número de maçãs infectadas.

A atividade enzimática de β -1,3-glucanase, em resposta ao ataque de *Alternaria alternata* em dois estádios de maturação em diferentes variedades de tomate (*Lycopersicon esculenta* Mill var. Sunpride, Charleston e Geronimo), foi avaliada por Cota et al. (2007). A indução enzimática foi verificada em todas as variedades, porém os maiores níveis (238,08 mM glicose/min mg proteína) foram observados na variedade Sunpride no estágio vermelho maduro. Os resultados mostraram que a variedade Geronimo demonstrou-se mais resistente e a Sunpride mais susceptível, para ambos os estádios de maturação. Os autores concluíram que diferenças na atividade ocorreram em função da variedade, estádios de maturação e infecção pelo patógeno. Outros exemplos serão apresentados na tabela 3:

Tabela 3 – Agentes de biocontrole de fungos patogênicos.

| Agentes de biocontrole | Fitopatógeno | Ref. |
|--|----------------------------------|---------------------|
| <i>Picchia membranifaciens</i> | <i>Botrytis cinérea</i> | MASIH; PAUL, 2002 |
| <i>Glomus mosseae</i> e <i>Glomus intraradices</i> | <i>Phytophthora parasitica</i> | POZO et al., 2002 |
| <i>Cryotococcus laurentii</i> | <i>Alternaria alternata</i> | TIAN et al., 2006 |
| <i>Trichoderma stromaticum</i> | <i>Moniliophthora perniciosa</i> | CARVALHO, 2006 |
| <i>Dicyma pulvinata</i> | <i>Microcyclus ulei</i> | AGUSTINHO, 2007 |
| <i>Trichoderma asperellum</i> | <i>Rhizoctonia solani</i> | MARCELLO, 2008 |
| <i>Dipodascus capitatus</i> e <i>Candida sp.</i> | <i>Moniliophthora perniciosa</i> | CABRAL et al., 2009 |

Nutrição animal

Matérias-primas usadas como alimentação animal contêm não somente carboidratos e proteínas que são nutricionalmente completos, mas também componentes ricos em fibras consistindo de celulose e hemicelulose e polissacarídeos não amiláceos (fatores antinutricionais), classificados como arabinoxilanas e β -glucanas. Devido à limitada digestão das fibras no trato gastrointestinal de animais monogástricos, o alimento não é utilizado completamente, diminuindo o valor nutricional e aumentando a viscosidade intestinal (Bedford, 1995; Uhlig, 1998; Costa et al., 2008). Os altos níveis dos fatores antinutricionais ocasionam pobres taxas de conversão do alimento, menor ganho de peso e excremento pegajoso por animais jovens (Bedford; Classen, 1992; Chesson, 1987; Galante et al., 1998). Estes problemas podem ser resolvidos pelo tratamento com β -1,3-glucanase, as quais também potencializam a ação das enzimas endógenas (proteases, amilases, fitases) (Campestrini; Silva; Appelt, 2005).

Indústria de vinhos

Enzimas desempenham um papel importante na produção de vinhos. Por meio da pré-fermentação, fermentação, pós-fermentação e envelhecimento, elas catalisam diversas reações de biotransformação. Muitos desses catalisadores biológicos são provenientes das uvas, microflora endógena ou leveduras e bactérias presente durante a vinificação (Humbert-Goffard et al., 2004).

Preparações de enzimas são aplicadas à vitivinicultura por vários motivos: melhorar a clarificação e filtrabilidade de vinhos jovens (Dubourdieu et al., 1981; Dubourdieu et al., 1985; Villetaz; Streiner; Trogus, 1984); liberação de aromas varietais de compostos precursores (Günata et al., 1988; Günata et al., 1990; Gueguen et al., 1996); e extração de compostos fenólicos (Ough; Noble; Temple, 1975; Whithman et al., 1997).

Glucanos impedem a sedimentação de partículas naturais do mosto e do vinho e podem causar turvamento. Agentes filtrantes, como betonita, ou o processo de centrifugação, os quais são utilizados para acelerar a resolução, geralmente são incapazes de superar estes efeitos. Estes tratamentos não

removem as glucanas e, portanto, os problemas na filtração permanecem (Humbert-Goffard et al., 2004).

Lise de leveduras

Uma infinidade de compostos de interesse tanto para a indústria quanto para a medicina são produzidos por microrganismos. As enzimas líticas, como a β -1,3-glucanase, têm diversas aplicações biotecnológicas: preparação de protoplastos, extração de pigmentos, no tratamento de massa celular de leveduras residual de indústrias de fermentação para preparação de ração animal, no estudo do mecanismo da síntese da parede celular para controle de leveduras patogênicas, aromas, proteínas, enzimas, polissacarídeos (Hunter; Asenjo, 1988; Fleuri; Sato, 2005, Uhlig, 1998).

A enzima β -1,3-glucanase age sinergicamente com proteases, β -1,6-glucanases, mananases e quitinases na degradação das duas camadas da parede celular das leveduras (mananaproteína e β -1,3-glucana) (Uhlig, 1998).

Essas enzimas são capazes de lisar a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp. e outros gêneros de leveduras, o que amplia o campo de utilização das mesmas, permitindo seletividade na liberação dos produtos, independente da escala e pode ser realizada em condições de pH e temperatura que não implicam na desnaturação de produtos celulares de interesse (Fleuri; Sato, 2005).

Podem ser citados como exemplos os trabalhos de Scott e Schekman (1980) onde verificaram a lise de *S. cerevisiae* X 2180-1B por *Oerskovia xanthineolytica*, Santos (2000) observou a lise de *Kluyveromyces marxianus* NCYC587, *Pachysolen tannophilus* NRRL 2460, *Saccharomyces capensis* NCYC 761, *S.cerevisiae* KL 88, *Candida glabrata* NCYC 388 e *Debaryomyces vanriji* NCYC 577 por *Cellomonas cartae* 191 e Fleuri e Sato (2008), onde estudaram o efeito de β -1,3-glucanase purificada da linhagem *C. cellulans* 191 sobre *Saccharomyces cerevisiae* KL-88, *Saccharomyces capensis*, *Debaromyces vanriji*, *Pachysolen tannophilus*, *Kluyveromyces drosophilum*, *Candida glabrata*, *Hansenula mrakii* e *Pichia membranaefaciens*. A enzima apresentou atividade lítica sobre todas as leveduras e foi capaz de formar protoplastos.

Conclusão

O crescente interesse no estudo das β -glucanases, provenientes de variadas fontes, concentra-se no seu potencial de aplicação industrial biotecnológica, considerando a sua ação hidrolítica sobre os β -glucanos, podendo ser utilizadas em ração animal para melhorar a digestibilidade, na indústria cervejeira, de vinhos, no controle biológico contra fitopatógenos, na degradação da parede celular de leveduras e no campo médico. Nas condições de produção encontradas foram observadas pH ótimo variando entre 4,0 e 7,5 e temperatura ótima entre 20 e 70 °C. O investimento em pesquisa buscando mais fontes bem como meios de produção mais eficientes para a excreção de β -1,3-glucanases, principalmente a partir de microrganismos marinhos, pode dar origem a novas hidrolases com características diferenciadas das atuais e com isso, novas aplicações industriais.

REFERÊNCIAS

- AGUSTINHO, Daniel Paiva. **Produção de hidrolases pelo fungo *Dycima pulvinata* e purificação de uma beta-glucanase do isolado CEN62**. 2007. 1v. 93f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – UNB, Brasília, Distrito Federal.
- BAMFORTH, C. W.; QUAIN, D. E. **Enzymes in brewing and distilling**. Aberdeen: University Press, 1990.
- Bara, Maria Teresa Freitas. **Purificação e caracterização de uma exo- β -1,3-glucanase produzida por um isolado de *Trichoderma asperellum***. 2003. 1v. 75f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos) – UNB, Brasília, Distrito Federal.
- 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 Microbiology Letters**, v. 219, p. 81 - 85, 2003.
- BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1-3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**. v. 28. p. 3 - 14, 2005.
- BOLLER, T.; VÖGELI, U. Vacuolar localization of ethylene-induced chitinase in bean leaves. **Plant Physiology**, v. 74, p. 442 - 444, 1984.
- BON, E. P. S. et al. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Ed.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência/UFRJ/CAPES/FAPERJ/FCT, 2008. p. 95 - 122.
- BOYCE, A.; WALSH, G. Production, purification and application-relevant characterization of an endo-1,3(4)- β -glucanase from *Rhizomucor miehei*. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 76, p. 835 - 841, 2007.
- BEDFORD, M. R. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. **Animal feed Science and Technology**, v. 53, p. 145 - 155, 1995.
- BEDFORD, M. R.; CLASSEN, H. L.; The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chicks. In: VISSER, J. et al. (Org.). **Xylan and xylanases, progress in biotechnology**, vol. 7. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 361 - 370.
- CABRAL, A. S. et al. Killer yeasts inhibit the growth of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 108 - 110, 2009.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, p. 259 - 272, 2005.

CARVALHO, Aírala Carvalho de. **Bioprospecção de isolados de *Trichoderma stromaticum* para controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauero**. 2006. 1v. 82f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – UESC, Ilhéus, Bahia.

CARVALHO, E. M. et al. Utilização de complexo enzimático em rações para leitões na creche. **Boletim da Indústria Animal**, v. 65, p. 21 - 26, 2008.

CASTORIA, R. et al. β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. **Postharvest Biology and Technology**, v. 12, p. 293 - 300, 1997.

CHESSON, A. Supplementary enzymes to improve the utilization of pigs and poultry diets. In: HARESIGN, W.; COLE, D. J. A. **Recent advances in animal nutrition**. London: Butterworths, 1987. p. 71 - 89.

COELHO, M. A. Z. et al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, p. 33 - 42, 2001.

COSTA, F. G. P. et al. Novos avanços na nutrição de aves. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, Fortaleza. **Anais...**Fortaleza: UFPB, 2008.

COTA, L. E. et al. Chitinase and β -1,3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 42 - 50, 2007.

COURI, S. et al. Enzimas na produção de alimentos e bebidas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Ed.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência/UFRJ/CAPES/FAPERJ/FCT, 2008. p. 153 - 177.

CRUZ, M. A. L. et al. Identification and partial characterization of a chitinase and β -1,3-glucanase from *Copernicia cerifera* wax. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 11 - 16, 2002.

DE LA CRUZ, J. et al. A novel endo- β -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 6937 - 6945, 1995.

DING, Q. et al. Solution properties of pachyman from *Poria cocos* mycelia in dimethyl sulfoxide. **Journal of Macromolecular Science, Part B Physics**, v. 40, p. 147 - 156, 2001.

DUBOURDIEU, D. et al. Dégradation enzymatique du glucane de *Botrytis cinerea*. **Application à l'amélioration de la clarification des vins issus de raisins pourris**. **Connaiss Vigne Vin**, v. 15, p. 161 - 177, 1981.

DUBOURDIEU, D. et al. Investigations of an industrial β -glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Carbohydrate Research**, v. 144, p. 277 - 287, 1985.

EL-KATANY, M. H. et al. Characterization of quitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 56, p. 137 - 143, 2001.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. β -1,3-glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1224 - 1231, 2008.

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

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. β -1,3-glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1224 - 1231, 2008.

FONTAINE, T. et al. Purification and characterisation of an endo- β -1,3-glucanase from *Aspergillus fumigatus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, p. 315 - 321, 1997.

Freedonia Group Inc. **World Enzymes**. Cleveland: Freedonia Focus, 2009. 392 p.

GALANTE, Y. M.; DE CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: HARMAN, G. F.; KUBICECK, C. P. *Trichoderma & Gliocadium – Enzymes, biological control and commercial applications*. Vol. 2. London: Taylor & Francis, 1998. p. 327 - 342.

GERHARTZ, W. In: AHELE, W. (Org.). **Enzymes in industry – Production and Applications**. New York: WILEY-VCH, 1990.

GIESE, E. C. et al. Botryosphaeran, a new substrate for production of β -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3783 - 3788, 2005.

GIESE, E. C. et al. Enzymatic hydrolysis of botryosphaeran and laminarin by β -1,3-glucanases produced by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1265 - 1271, 2006.

GODFREY, T., WEST, S. **Industrial Enzymology**. 2. ed. New York: MacMillan Publishers Ltd., 1996.

GUEGUEN, Y. et al. A very efficient β -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2336 - 2340, 1996.

GÜNATA, Y. et al. Sequential enzymatic hydrolysis of potential aromatic from grape. **Carbohydrate Research**, v. 184, p. 139 - 149, 1988.

GÜNATA, Y. et al. Hydrolysis of grape monoterpenyl β -glucosides by various β -glucosidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1232 - 1236, 1990.

HANSELLE, T.; BARZ, W. Purification and characterization of the extracellular PR-2b β -1,3-glucanase accumulating in different *Ascochyta rabiei*-infected chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. **Plant Science**, v. 161, p. 773 - 781, 2001.

HUMBERT-GOFFARD, A. et al. An assay for glucanase activity in wine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 537 - 543, 2004.

HUNTER, J. B, ASENJO, J. A. A structured mechanistic model of the kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 929 - 43, 1988.

IVUŠIĆ, Franjo. **Uzgoj alge *Euglena gracilis* u heterotrofnim uvjetima i dobivanje beta-1,3-glukana.** (Cultivation of alga *Euglena gracilis* in heterotrophic conditions and production of beta-1,3-glucan). 2007. 1v. 152f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

İZGÜ, F.; ALTINBAY, D.; TÜRELI, A. E. *In vitro* activity of panomycocin, a novel exo- β -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434, against dermatophytes. **Mycoses**, v. 50, p. 31 - 34, 2006.

KARMALI, A.; GIRÃO BASTOS, J.; FERNANDES, T. H. Tumores em animais de companhia: prevenção utilizando cogumelos. In: 10 CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA EM LÍNGUA PORTUGUESA, 2006, Ponta Delgada. **Anais...Ponta Delgada: Universidade Técnica de Lisboa, 2006.** p. 2.

KIRK, O.; BORCHET, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion Biotechnology**, v. 13, p. 345 - 351, 2002.

KINI, K. R. et al. Purification and properties of a major isoform of β -1,3-glucanase from pearl millet seedlings. **Plant Science**, v. 150, p. 139-145, 2000.

KLARZYNSKI, O. et al. Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1027 - 1037, 2000.

KO, TAE-SEOK; LEE, S.; SCHAEFER, S. C.; KORBAN, S. S. Characterization of a tissue-specific and developmentally regulated β -1,3-glucanase gene family in *Prunus persica*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 955 - 963, 2003.

KONIG, J. GRASSER, R.; PIKOR, H.; VOGEL, K. Determination of xylanase, β -glucanase and cellulose activity. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 374, p. 80 - 87, 2002.

KOVALCHUK, S. N. et al. An endo-(1,3)- β -D-glucanase from the scallop *Chlamys albidus*: catalytic properties, cDNA cloning and secondary-structure characterization. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 191 - 197, 2009.

KUMAGAI, Y.; OJIMA, T. Enzymatic properties and the primary structure of a β -1,3-glucanase from the digestive fluid of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 154, p. 113 - 120, 2009.

LEELASUPHAKUL, W.; SIVANUNSAKUL, P.; PHONGPAICHIT, S. Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 990 - 997, 2006.

LI, H. et al. Purification and partial characterization of β -1,3-glucanase from *Chaetomium thermophilum*. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 23, p. 1297 - 1303, 2007.

MARCELLO, Cesar Marcos. Avaliação da expressão e caracterização de uma exo- β -1,3-glucanase envolvida no mecanismo de micoparasitismo de *Trichoderma asperellum*. 2008. 1v. 89f Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – UNB, Brasília, DF.

MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Purification and characterization of a β -glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1. p. 21-29, 2007.

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**, 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**, v. 38, p. 250 - 263, 2003.

MEINS JR, F. et al. The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes. In: BOLLER, T.; MEINS JR, F. **Genes involved in plant defense**. Springer: Vienna, 1992. p. 245 - 282.

MOROHASHI, Y.; MATSUSHIMA, H. Development of β -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 1381 - 1387, 2000.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **Ciência hoje**, v. 41, p. 28 - 33, 2007.

NAGATA, S. et al. Purification and characterization of nonlytic endo- β -1,3-glucanase I from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 2107 - 2114, 1990.

NEALE, A. D et al. Chitinase, β -1,3-glucanase, osmotin and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. **Plant Cell**, v. 2, p. 673 - 684, 1990.

NORONHA, E. F. et al. Regulation of 36-kDa β -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, p. 19 - 22, 2000.

OUGH, C. S.; NOBLE, A. C.; TEMPLE, D. Pectic enzymes effects on red grapes. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 26, p. 195 - 200, 1975.

PALEKAR, A. A.; VASUDEVAN, P. T., YAN, S. Purification of Lipase: a Review. **Biocatalysis Biotransformation**, v. 18, p. 177 - 200, 2000.

PANG, Z. et al. Structure of β -glucan oligomer from laminarin and its effect on human monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, p. 853 - 858, 2005.

PASECHNIK, V. A.; PHLS, J. M. Large-scale extraction and purification of enzymes and other proteins. In: **Handbook of enzyme biotechnology**. New York: Wiseman, 1995. p. 31 - 82.

PENG, Y. et al. Purification and molecular characterization of exo- β -1,3-glucanases from the marine yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, p. 85 - 94, 2009.

PHARMACIA BIOTECH. **Protein purification handbook**. Sweden, 1999. 97 p.

PLANAS, A. Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, p. 361 - 382, 2000.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; MCDUGALL, B. M. Noncellulytic fungal β -glucanase: their physiology and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 178 - 192, 1993.

POZO, M. J. et al. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 525 - 534, 2002.

RAMESH, H. P.; THARANATHAN, R. N. Carbohydrates – The renewable raw materials of high biotechnological value. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, p. 149 - 173, 2003.

RANA, D. S. et al. Stability and kinetics of β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 149 - 155, 2003.

RAPP, P. Formation, separation and characterization of three β -1,3-glucanases from *Sclerotium glaucum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1117, p. 7 - 14, 1992.

REY, M.; DELGADO-JARANA, J.; BENÍTEZ, T. Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 604 - 608, 2001.

ROCHA-RAMÍREZ, V. et al. A. *Trichoderma atroviride* G-Protein α -Subunit gene Tga1 is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. **Eukaryotic Cell**, v. 1, p. 594 - 605, 2002.

ROMERO, I. et al. Anthocyanin, antioxidant activity and stress-induced gene expression in high CO₂ - treated table grapes stored at low temperature. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 522 - 530, 2008.

SANTOS, Luciana Ferracini. **Caracterização bioquímica da protease lítica produzida por *Cellulomonas cartae* 191 e estudo da lise enzimática de leveduras**. 2000. 1v. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

SCOTT, J. H.; SCHEKMAN, R. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. **Journal of Bacteriology**, v. 142, p. 414, 1980.

SHU, CHIN-HANG; XU, CHUN-JUN, LIN, EN-SHU. Production, purification and partial characterization of a novel endo- β -1,3-glucanase from *Agaricus brasiliensis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1229 - 1233, 2006.

SILVA, I. R. et al. Purificação e caracterização de uma gentioexase obtida de botriosferana por Hidrólise ácida parcial. **Química Nova**, v. 31, p. 1015 - 1019, 2008

SIMMONS, C. R. The physiology and molecular biology of plant 1,3- β -glucanase and 1,3;1,4- β -glucanase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, p. 325 - 387, 1994.

STONE, B. A.; CLARKE, A. E. **Chemistry and biology of (1-3)- β -glucans**. Australia: La Trobe University Press, 1992.

SUN, L. et al. Characterization of a β -1,3-glucanase encoded by chlorella virus PBCV-1. **Virology**, v. 276, p. 27 - 36, 2000.

THÉODORE, K.; PANDA, T. Application of response surface methodology to evaluate the influence of temperature and initial pH on the production of β -1,3-glucanase and carboxymethylcellulase from *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 1043 - 1049, 1995.

TIAN, S. et al. Induction of defense responses against *Alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 70, p. 729 - 734, 2006.

TONÓN, C.; DALEO, G.; OLIVA, C. An acidic β -1,3-glucanase from potato tubers appears to be patatin. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 39, p. 849 - 854, 2001.

UHLIG, H. **Industrial Enzymes and Their Applications**. New York: John Wiley & Sons, 1998. 454p.

VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS, S.; LEAL-MORALES, C. A.; HERRERA-ESTRELLA, A. Analysis of the β -1,3-glycanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 98, p. 1442 - 1446, 1998.

VIJAYENDRA, S. V. N.; KASHIWAGI, Y. Characterization of a new acid stable exo- β -1,3-glycanase of *Rhizoctonia solani* and its action on microbial polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, p. 92 - 97, 2009.

VILLETAZ, J. C.; STREINER, D.; TROGUS, H. The use of β -1,3-glycanase as an enzyme in wine clarification and filtration. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 35, p. 253 - 256, 1984.

VÖGELI-LANGE, R. et al. Evidence for a role of β -1,3-glycanase in dicot seed germination. **Plant Journal**, v. 5, p. 273 - 278, 1994.

WARREN, R. A. J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 50, p. 183 - 212, 1996.

WASSER, S. P. Medicinal mushrooms as a source of anti-tumor and immune-modulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 258 - 274, 2002.

WESSELS, J. G. H., AND SIETSMA, J. H. Fungal cell walls: A survey. In: TANNER, W.; LOEWUS, F. A. (Eds.). **Plant Carbohydrates II, Extracellular Carbohydrates**. Vol. 13 B. Berlin: Springer-Verlag, 1981. p. 352 - 394.

WHITHMAN, J. D. et al. Fermentation processing enzymes on anthocyanins and phenolic in Pinot noir and Cabernet sauvignon wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 48, p. 39 - 48, 1997.

XU, Z.; SHIH, MING-CHE.; POULTON, J. E. An extracellular exo- β -(1,3)-glycanase from *Pichia pastoris*: Purification, characterization, molecular cloning, and functional expression. **Protein Expression and Purification**, v. 47, p. 118 - 127, 2006,

ZHU, BEI-WEI et al. Purification and partial characterization of a novel β -1,3-glycanase from the gut sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1102 - 1106, 2008.

ZUÑIGA, A. D. G et al. Revisão: técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, p. 61 - 82, 2003.

CAPÍTULO 2

PRODUCTION, PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION
OF AN THERMOSTABLE β -1,3-GLUCANASE (LAMINARINASE) PRODUCED
BY *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA*²

² Artigo submetido aos Anais da Academia Brasileira de Ciência.

Production, partial purification and characterization of an thermostable β -
1,3-glucanase (laminarinase) produced by *Moniliophthora perniciosa*

RESUMO

A enzima glucanase de *Moniliophthora perniciosa* foi produzida em meio líquido e purificada. A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi utilizada objetivando obter as condições ótimas para a produção. A enzima bruta foi purificada por cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-200. A termoestabilidade, pH e temperatura ótima foram estudados. Os valores ótimos encontrados utilizando o modelo quadrático foram de 5,9 g L⁻¹ para a concentração de indutor e 13 dias de tempo de fermentação. Os resultados revelaram três diferentes isoformas (GLUI, GLUII e GLUIII) com fatores de purificação de 4,33, 1,86 e 3,03, respectivamente. A enzima no extrato parcialmente purificado apresentou pH ótimo em 5,0 e temperatura ótima de 40 °C. A atividade foi aumentada na presença KCl em todas as concentrações estudadas. Na presença de NaCl, a atividade foi maior a 0.2 M. A enzima mostrou uma alta termoestabilidade (perdeu 10,20 % de sua atividade específica após 40 minutos de incubação a 90 °C).

Palavras-chave: caracterização cinética, estabilidade térmica, glucanase, isoenzimas, *Moniliophthora perniciosa*, produção, purificação.

ABSTRACT

The enzyme glucanase from *Moniliophthora perniciosa* was produced in liquid medium and purified. The production used response surface methodology (RSM) to obtain the optimum conditions of production. The purification was by gel and filtration on Sephacryl S-200. The thermal stability, pH and optimum temperature were studied. The production of glucanase enzyme was higher in the concentration of 5,9 g L⁻¹ of yeast extract and 13 days fermentation time. The results showed three different glucanases isoforms (GLUI, GLUII and GLUIII) with purification factors of 4.33, 1.86 and 3.03, respectively. The enzyme Glucanase in the partially purified extract showed optimum pH at 5.0 and optimum temperature at 40 °C. The activity increased in the presence KCl at all concentrations studied. In the presence of NaCl, the activity was higher in 0.2M. The enzyme showed high thermal stability (lost 10.20 % of its specific activity after 40 min of incubation at 90 °C). The results showed that enzyme glucanase from *M. perniciosa* have characteristics promising in industrial applications.

Keywords: glucanase, heat stability, kinetic characterization, isoenzymes, *Moniliophthora perniciosa*, production, purification.

1. Introduction

The hemibiotrophic basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* (Aime and Phillips-Mora, 2005), the causative agent of the witches' broom disease in *Theobroma cacao*, is responsible for major crop losses in South American and Caribbean islands cocoa plantations (Kilaru and Hasenstein, 2005).

The disease shows two distinct stages: a biotrophic (intercellular monokaryotic mycelium) and a necrotrophic/saprotrophic phase (intracellular dikaryotic mycelium). The biotrophic phase mycelium depends on the host tissue for nutrients to sustain its growth and development.

A typical fungal cell wall is composed of chitin, glucans and proteins and can be degraded by chitinases and glucanases (Lin et al. 2007, Perez et al. 2002, Schirmbock et al. 1994). These enzymes are widely distributed among fungi and some of them have been purified (Donzelli and Harman, 2001).

The β -glucan, a kind of linear polysaccharides, is a principal cell wall component of the main cereal crop (barley, rye, rice and wheat) and most microorganisms, where it has multiple functions (e.g. nutritional role). Structurally, β -glucans are comprised of β -1,3, 1,6 and β -1,4 linked D-glucopyranosyl units (Planas, 2000, Parrish et al. 1960). The β -1,3-glucanase is an enzyme with a strict cleavage specificity for β -1,3-linkages (Planas, 2000).

The β -1,3-glucanases are classified as exo- β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.58) and endo- β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.39) according to their mode of hydrolyzing action. β -1,3-linkages are cleaved at random sites along the polysaccharide chain, releasing short oligosaccharides. Exo- β -1,3-glucanases remove glucose units from β -1,3-D-glucan by hydrolyzing terminal β -1,3-D linkages in a consecutive manner, producing D-glucose as the sole product (Pitson et al. 1993).

Enzymes that catalyze depolymerization or selective modification of cereal β -glucans are of biotechnological and biomedical importance, because they have shown an immense potential application in malting and brewing processes (Konig et al. 2002; Mannonen et al. 1997), biological control of plant pathogens (De La Cruz et al. 1995), fungal and yeast cell wall degradation (Pitson et al. 1993), animal feed (Konig et al. 2002), and medical fields (Pang et al. 2005) (Li et al. 2007).

In this study, we describe the production, isolation, purification and characterization of β -1,3-glucanase (laminarinase) from *Moniliophthora perniciosa* in saprotrophic phase mycelium.

3. Materials and Methods

Chemicals

Laminarin and bovine serum albumin were purchased from Sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). All the other chemicals used were of high-quality analytical grade.

Microorganism and Enzyme Production.

Moniliophthora perniciosa (CCMB 0257) was obtained from the Collection of Cultures of Microorganisms of Bahia (CCMB), Feira de Santana, Brazil.

Culture conditions of *Moniliophthora perniciosa*

Moniliophthora perniciosa was grown on potato dextrose agar for 10 days to its use for inoculum development for β -1,3-glucanase production. Fungal mycelium with 1 cm of diameter disc was transferred to erlenmeyer flasks with 100 mL liquid medium containing the following (g L⁻¹): wheat bran, 40.0; yeast extract ranging from, 3 to 9; K₂HPO₄ 3H₂O, 1.0; MgSO₄ 7H₂O, 0.2; KCl, 0.2; dissolved in distilled water. The incubation was carried out at 28°C for 7 to 21 days and 120 rev min⁻¹ in a rotary shaker. The culture fluid was filtered and centrifuged at 8,000 g for 15 min at 4°C, and the supernatant was used as a crude enzyme extract preparation (Hua et al. 2007).

Doehlert experimental design for enzyme production

Among the most important parameters that affect the production of enzymes are time of fermentation and concentration of the inducer (Giese et al. 2005) and in this case the inducer was used for yeast. In order to predict production of enzymes under any conditions of fermentation time and concentration of the inducer in the experimental domain, response surface methodology was used. The Doehlert experimental design, with two variables (concentration of inducer and fermentation time) and three replicates at the centre

of the domain leading to a total of 9 experiments (Table 1) was used to obtain the knowledge of the effect of time of fermentation and concentration of the inducer on the production of enzyme β -1,3-glucanase. Thus, concentration of inducer was studied in five levels (3 to 9 g/L) and fermentation time was studied in three levels (7 to 21 days). The experimental errors were evaluated from replication of central point. The experimental data were processed by using the STATISTICA software. All the experiments in this step were carried out in random order.

The Statistica version 7.0 was used to estimate the lack of fit of the model to the experimental data through analysis of variance (ANOVA).

Table 1 - Doehlert matrix used for the optimization of 1,3-glucanase production from *Moniliophthora perniciosa*.

| Experiment | Inducer concentration (g/L) | Time (days) | Enzyme activity (μ mol glucose/mL/min) |
|------------|-----------------------------|-------------|---|
| 1 | 3 (-1) | 14 (0) | 0.1873 |
| 2 | 4.5 (-0.5) | 7 (-0.866) | 0.1875 |
| 3 (C) | 6 (0) | 14 (0) | 0.2026 |
| 4 (C) | 6 (0) | 14 (0) | 0.2013 |
| 5 (C) | 6 (0) | 14 (0) | 0.2007 |
| 6 | 7.5 (0.5) | 7 (-0.866) | 0.1750 |
| 7 | 9 (1) | 14 (0) | 0.1913 |
| 8 | 4.5 (-0.5) | 21 (0.866) | 0.1722 |
| 9 | 7.5 (0.5) | 21 (0.866) | 0.1766 |

(C): central point; coded values are presented in the parenthesis

Desalting

Crude extract was concentrated by ultrafiltration using an Amicon membrane with a PM-10 (10 kDa cut-off) membrane.

Chromatographic separation

Sephacryl S-200 chromatography

Fractions containing β -1,3-glucanase activity were applied to a Sephacryl S-200 (Amersham Bioscience, USA) column (48 x 1.2 cm) previously equilibrated

with 0.05 mol L⁻¹ sodium phosphate buffer, pH 7.0, which was also used to elute the column. Fractions of 1.5 mL were collected and assayed for glucanase activity.

Protein determination and enzyme analysis

Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as a standard. The enzyme activity of the purified β -1,3-glucanase was measured with laminarin (from *Laminaria digitata*, Sigma) as substrate. Laminarin was dissolved in 0.05 mol L⁻¹ citrate buffer (pH 6.2). The reaction mixture containing 100 μ L of 0.1 % laminarin and 100 μ L of enzyme solution was incubated at 50 °C for 15 min. The reaction was stopped by addition of 200 μ L of 1 % 3,5-dinitrosalicylic acid reagent and boiled for 15 min. The amount of reducing saccharides released from laminarin was measured spectrophotometrically at 540 nm according to (Miller, 1959). One unit (U) of β -1,3-glucanase activity was defined as the amount of the enzyme that released reducing saccharides equivalent to um microgram glucose per minute under the above conditions.

Optimum pH

The pH optimum of the β -1,3-glucanase was assayed at pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0, in 0.05 mol L⁻¹ appropriate buffers: citrate (5.0-6.0), phosphate (7.0) and Tris-HCl (8.0-9.0). Blanks lacking glucanase were made for each determination.

Optimum temperature

The optimum temperature of the β -1,3-glucanase was tested under standard assay within the temperature range of 60-90 °C in 0.05 mol L⁻¹ citrate buffer (pH 6.2). The temperatures were controlled by means of a circulating water bath. Blanks without the enzyme were made for each determination.

Heat stability

Samples of β -1,3-glucanase in test tubes (selected to be equal in weight, volume and size) were incubated in water at different temperatures (50, 60, 70, 80 e 90 °C) and for various times (0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min), without substrate. After the heating process the tubes were cooled in melting ice and the

residual activity measurement was carried out at pH 6.2 and at a temperature of 50 °C for 30 min.

Effect of cations

The effect of Na⁺ and K⁺ on β-1,3-glucanase activity was studied. The concentrations used were: NaCl (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 mol L⁻¹), KCl (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 mol L⁻¹). The β-1,3-glucanase activity was determined by the standard assay as described previously.

Replications and statistical analysis

The extractions and chromatographic isolations were repeated at least three times. Significant differences between sample means were tested.

4. Results

Production of β-1,3-glucanase

A Doehlert matrix for two variables was applied to find the optimum conditions for the β-1,3-glucanase production from *Moniliophthora perniciosa*. The experimental results obtained with the Doehlert design for these variables together with the coded and real values for the variables studied are shown in the Table 2.

Table 2 - Analysis of variance for data presented in the table 1.

| | SS | df | MS | F | Tabulated F |
|--------------------|------------|----|-------------------------|-------|-------------|
| Regression | 0.00112757 | 5 | 2.26 x 10 ⁻⁴ | 24.65 | 9.01 |
| Residual | 0.00002745 | 3 | 9.15 x 10 ⁻⁶ | | |
| Lack of Fit | 0.00002440 | 1 | 2.44 x 10 ⁻⁵ | 16.02 | 18.51 |
| Pure Error | 0.00000305 | 2 | 1.52 x 10 ⁻⁶ | | |
| Total SS | 0.00115502 | 8 | | | |

SS: sum of squares; df: degrees of freedom; MS: mean square

The equation 1 below illustrates the relationship of these two variables and the response R, where R is the enzyme activity, IC is the inducer concentration and T is the fermentation time:

$$R = 0,108 (\pm 0,008) + 0,011 IC (\pm 0,002) - 0,0014 IC^2 (\pm 0,0001) + 0,0091 T (\pm 0,0006) - 0,00043 T^2 (\pm 0,00002) + 0,00040 IC * T (\pm 0,00006) \quad (1)$$

The corresponding surface response and level curves graphics for this equation is shown in Figure 1 and 2.

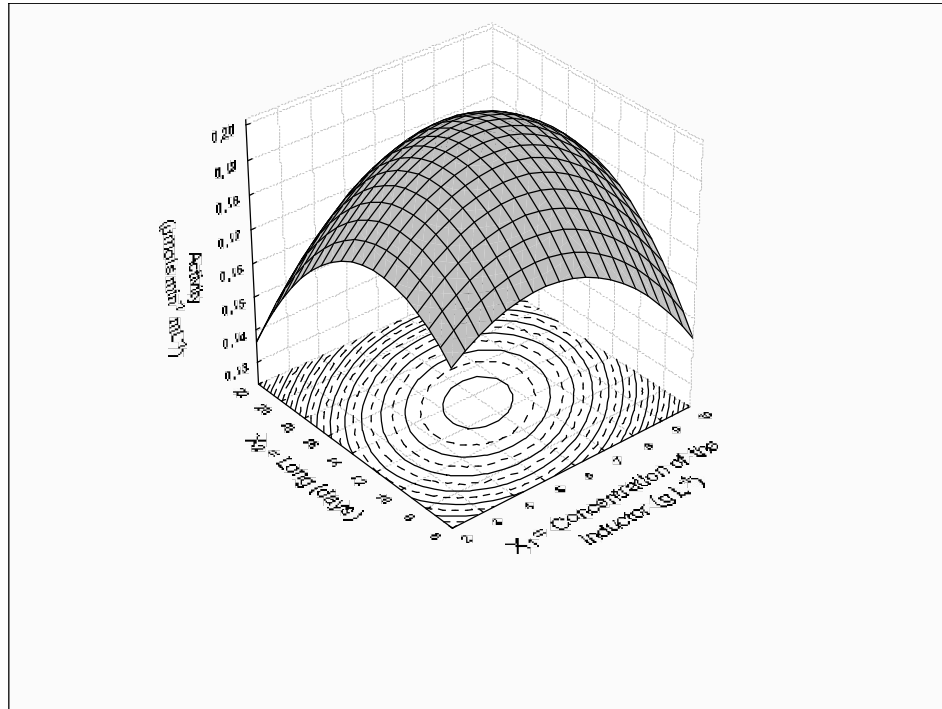


Figure 1 - Response surface for inducer concentration versus incubation time.

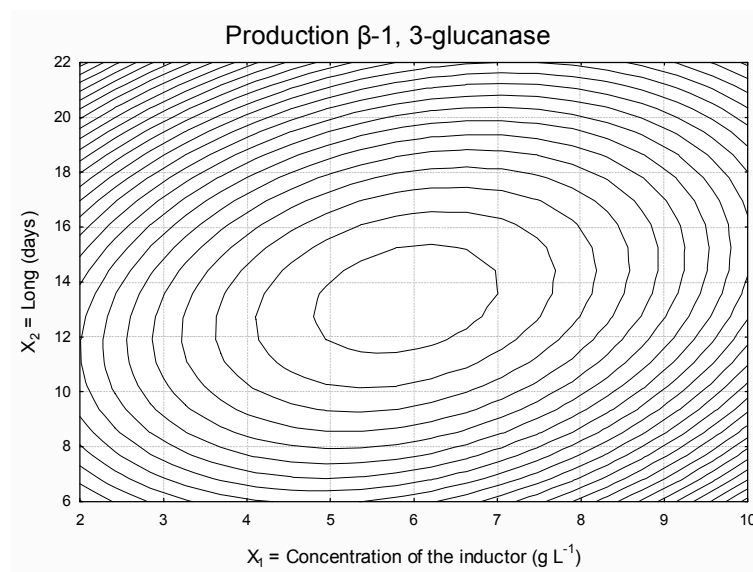


Figure 2 - Isoresponse contour plot of inducer concentration versus fermentation time for β -1,3-glucanase.

Analysis of variance has been applied in the experimental data to evaluate the quadratic model fitted. Test based on Fisher distribution (F test) has indicated that the fitted equation is statistically significant ($F=24.65 > 9.01$). Lack of fit test ($F=16.02 < 18.51$) indicates that there is a good agreement between the model's predicted response and the experimental values studied for each variable. Lagranje criterion applied to this equation indicates that the critical point is characterized as a maximum. The derivatization of this general equation as (δIC) and (δT) results in two new equations:

$$\delta R = 0,011 - 0.0028 IC + 0.00040 T = 0 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\delta R = 0.0091 - 0.00086 T + 0,00040 IC = 0 \quad (\text{Eq. 3})$$

The results showed that fermentations times over 18 days and below than 7 days causes reduction in the β -1,3-glucanase produced by *M. pernicioso*. Concentrations of yeast extract, over 9 g L^{-1} and below de 3 g L causes decrease in production of β -1,3-glucanase. Concentrations of yeast extract, from 4 to 8 g L^{-1} and fermentation time from 8 to 17 days showed the higher values of β -1,3-glucanase. The optimum value of activity was $0.2 \mu\text{mols min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ and produced within the concentration of $5,9 \text{ g L}^{-1}$ of yeast extract and 13 days fermentation time (Figure 1 and 2).

Purification of β -1,3glucanase

β -1,3-glucanase was extracted from *M. pernicioso* as described in Materials and Methods. The purification of β -1,3-glucanase 70 % saturation of ammonium sulfate and separation on Sephacryl S-200 resulted in three β -1,3-glucanase isoforms, named GLUI, GLUII and GLUIII, with purification factors of 4.33 , 1.86 and 3.03 , respectively (Table 3 and Fig. 3).

Table 3 - Extraction and purification of β -1,3-glucanase

| Purification Step | Activity Units (AU) | Protein (mg mL ⁻¹) | Specific Activity (AU mg ⁻¹ protein) | Purification factor |
|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|--|------------------------|
| Ammonium sulfate precipitation | 0.088 | 6.0×10^{-2} | 1.47 | 1 |
| Sephacryl S-200 - Glul | 0.035 | 5.5×10^{-3} | 6.36 | 4.33 |
| Sephacryl S-200 - Glull | 0.041 | 1.5×10^{-2} | 2.73 | 1.86 |
| Sephacryl S-200 - Glulll | 0.025 | 5.6×10^{-3} | 4.46 | 3.03 |

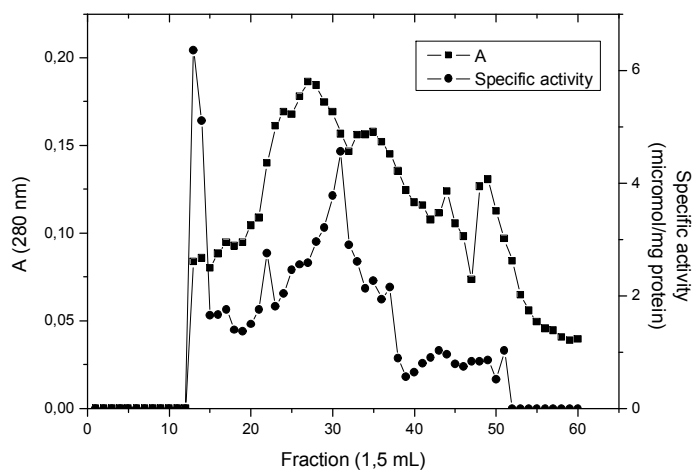


Figure 3 - Purification of β -1,3-glucanase from *M. pernicioso* on Sephadryl S-200 column: (■) β -1,3-glucanase activity; (●) protein content.

Optimum pH

The β -1,3-glucanase from *M. pernicioso* was active in pH ranges of 5-9 with maximum specific activity at pH 5.0 (Fig. 4).

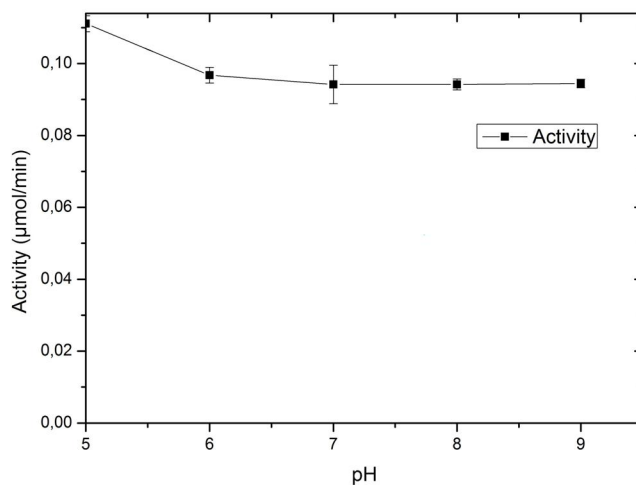


Figure 4 - Optimum pH determination in the activity of β -1,3-glucanases. All reactions were carried out in 0.05 mol L^{-1} appropriate buffer at 50°C for 15 min. The pH values were with the following buffers systems: citrate (5.0-6.0), phosphate (7.0) and Tris-HCl (8.0-9.0)

Optimum temperature

The effect of temperature on specific activity of laminarinase is shown in Fig. 5. The activity was optimum at 40°C .

Heat stability

The effect of temperature on the residual specific activity of glucanase is shown in Fig. 5. β -1,3-glucanase retained 99.01, 95.61 and 92.38 % of original activity after 50 min of incubation at 60, 70 and 80°C , respectively, and lost 10.20 % of its specific activity after 40 min of incubation at 90°C (Fig. 6).

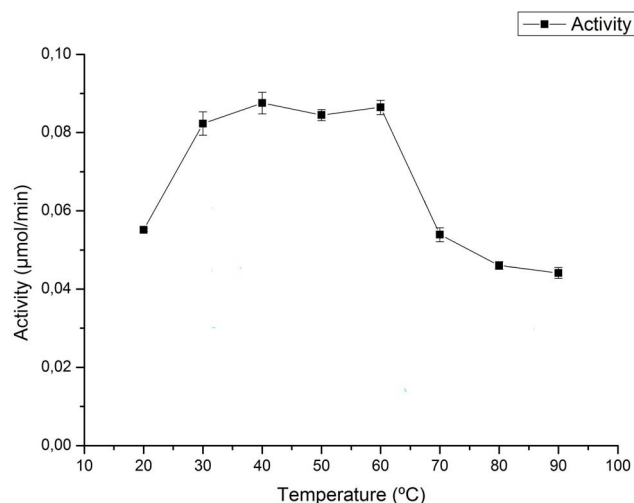


Figure 5 - Optimum temperature determination in the activity of β -1,3-glucanases. All reactions were carried out in 0.05 mol L^{-1} citrate buffer (pH 6.2) for 15 min. The temperature tested ranged from 30-90 °C.

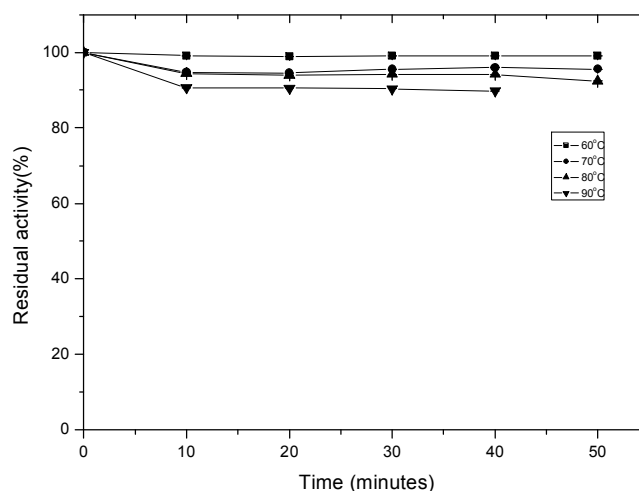


Figure 6 - Heat stability determination in the activity of β -1,3-glucanases at 60-90°C. All reactions were carried out in 0.05 mol L^{-1} citrate buffer (pH 6.2) in the range of 60-90 °C for 15 min and then determining the percentage of residual β -1,3-glucanase activity under standard assay conditions.

Effect of metal ions

The effects of Na^+ and K^+ ions on glucanase activity are shown in Fig. 7 and 8. In the presence of KCl the activity was higher in 0.40 mol L^{-1} solution, with 25 %

of increaser (Figure 7). In the presence of NaCl the activity was higher in 0.2 mol L⁻¹ with 8.83 % of increaser (Figure 8).

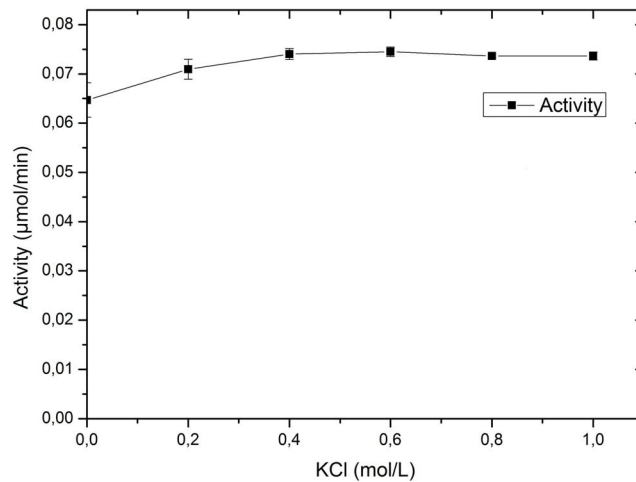


Figure 7 - The effect of KCl on β -1,3-glucanase activity in the range of 0,2 - 1 mol L⁻¹. All reactions were carried out in 0.05 mol L⁻¹ citrate buffer (pH 6.2) at 50 °C for 15 min.

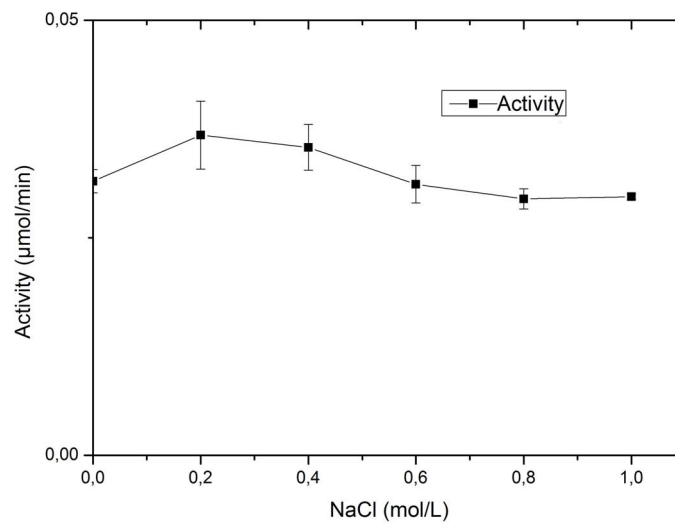


Figure 8 - The effect of NaCl on β -1,3-glucanase activity in the range of 0,2-1 mol L⁻¹. All reactions were carried out in 0.05 mol L⁻¹ citrate buffer (pH 6.2) at 50 °C for 15 min.

5. Discussion

No previous literature reports could be found which describe the purification or characterization of a β -glucan degrading enzyme from *M. pernicioso*. The extracellular β -1,3-glucanases in the supernatant of cell culture of the *M. pernicioso* was partially purified and obtained three isoforms, where the optimal pH and temperature were 4.0 and 40 °C, respectively. The isozymes showed high thermal stability (lost 10.20 % of its specific activity after 40 min of incubation at 90 °C).

β -1,3-glucanase is one of the most important cell wall lytic enzymes and has been purified from a number of fungal species where the enzyme differs in physiological properties, molecular structure, and molecular weight (McQuilken and Gemmell, 2004). The anti-fungal activity of β -1,3-glucanase varies between different plant pathogenic fungi, and it was suggested that the activity of β -1,3-glucanase depends on the presence of β -1,3-glucan in cell walls of the target organisms. It was also speculated that the activity of the enzyme may vary in response to the β -glucan structure and the type of linkage (Vazquez-Garciduenas et al. 1998).

Murray et al (2001) obtained a purification fold of 23.00 when purified glucanase from *Talaromyces emersonii* by gel filtration, HIC, and anion exchange. Boyce and Walsh (2007) obtained a purification fold of 9.0 when purified glucanase using various purification steps. The β -1,3-glucanase from *Periconia byssoides* was purified by HiTrap Q XL, resulting in an purification fold of 4.5.

The pH profiles shown here was similar to those of the β -glucanases of other fungi as *Trichoderma harzianum* (Marco and Felix, 2007), and *Trichoderma asperellum* (Bara et al. 2003).

Optimum temperatures of 55–60 °C, 45 °C, and 65 °C were reported for β -glucanases from *Bacillus polymyxa* (Gosalbes et al. 1991), *B. pumilis* (Suzuki; Kancho, 1976) and *B. brevis* (Louw et al. 1993), respectively. Murray et al. (2001) also pointed out that the thermal stability of the *T. emersonii* enzyme was noteworthy: estimated $t_{1/2}$ values at 70 °C and 80 °C were 136 min and 25 min, respectively while 15 % of the original activity remained after 15 min at 100 °C in the absence of substrate.

In summary, in this work was studied the β -1,3-glucanase from *M. pernicioso*, which contains three isoforms. The β -1,3-glucanases showed high thermostability and increases in activity in the presence of KCl (in concentrations varying 0.1 to 1.0 M). More studies are necessary to investigate the production of glucanases from *M. pernicioso* and explore the possibility of molecular target as control of disease for witches' broom and to apply this enzyme in industrial process.

Acknowledgments

This work was supported by FINEP, CAPES, CNPq and FAPESB.

6. References

1. ASSIS SA, LIMA DC AND FARIA OLIVEIRA OMM. 2000. Acerola's pectin methylesterase: studies of heat inactivation. *Food Chem* 71: 465-467.
2. BARA MTF, LUNA AL AND ULHOA CJ. 2003. Purification and characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters* 129: 81-85.
3. BOYCE A AND WALSH G. 2007. Production, purification and application-relevant characterization of an endo-1,3(4)- β -glucanase from *Rhizomucor miehei*. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 835-841.
4. BRADFORD MM. 1976 A rapid and sensitive method for the quantification of microorganisms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
5. DE LA CRUZ J, PINTOR-TORO JA, BENÍTEZ T, LLOBELL A AND ROMERO LC. 1995. A novel endo- β -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J Bacteriol* 177: 6937-6945.
6. DONZELLI BG AND HARMAN GE. 2001. Interaction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Appl Environ Microbiol* 67: 5643-5647.
7. GIESE E C, COVIZZI LG, BORSATO D, DEKKER RFH, SILVA MLD AND BARBOSA AM. 2005. Botryosphaeran, a new substrate for production of β -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. *Proc Biochem* 40: 3783-3788.

8. GOSALBES MJ, PEREZGONZALES JA, GONZALES R AND NAVARRO A. 1991. 2 β -Glycanase genes are clustered in *Bacillus polymyxa* – Molecular cloning, expression and sequence analysis of genes encoding xylanase and an endo- β -(1,3)-(1,4)-glucanase. *Journal Bacteriol* 173: 7705-7710.
9. HUA LI, JING CHEN, ANNA LI, AND DUO-CHUAN LI. 2007. Purification and partial characterization of β -1,3-glucanase from *Chaetomium thermophilum*. *World J Microbiol Biotechnol* 23:1297–1303.
10. KILARU A AND HASENSTEIN KA. 2005. Development and Pathogenicity of the Fungus *Crinipellis perniciososa* on Interaction with Cacao Leaves Biochemistry and cell Biology. *Phytopathology* 95: 101-107.
11. KONIG J, GRASSER R, PIKOR H AND VOGEL K. 2002. Determination of xylanase, β -1,3-glucanase and cellulase activity. *Anal Bioanal Chem* 374:80-87.
12. LEROUX P. 2003. Modes of action of agrochemicals against plant pathogenic organisms. *C R Biol* 326: 9-21.
13. LI DC, CHEN S AND JING LU. 2005. Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus*. *Mycopathologia* 159: 223-229.
14. LIN C, YANG J, SUN H, HUANG X, WANG R AND ZHANG K. 2007. Purification and characterization of a β -1,3-glucanase from the novel mycoparasite *Periconia byssoides*. *Biotechnol Lett* 29: 617-622.
15. LIU JZ., WENG LP AND ZHANG QL. 2003. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* in a benchtop bioreactor using response surface methodology. *World J. Microbiol. Biotechnol* 19, 317–323.
16. LOUW ME, REID SJ AND WATSON TG. 1993. Characterization, cloning and sequencing of a thermostable endo-(1,3-1,4)- β -glucanase-encoding gene from an alkalophilic *Bacillus brevis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 507-513.
17. MANNONEN L, RITALA A, NUUTILA A M, KURTEN U, ASPEGREN K, TEERI TH, AIKASALO R TAMMISOLA J AND KAUPPINEN V. 1997. Thermotolerant fungal glucanase in malting barley. In: *Proceedings 26th Congress European Brewery Convention, Maastricht*, pp 91–100.
18. MARCO JLM AND FELIX CR. (2007). Purification and characterization of a β -glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showin biocontrol potencial. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 1: 21-29.

19. McCLEARY BV, SHAMEER I AND GLENNIE-HOLMES M. 1988. Measurement of 1,3-1,4- β -D-glucan. *Meth enzymol* 160: 545-551.
20. McQUILKEN MP AND GEMMELL J. 2004. Enzyme production by the mycoparasite *Verticillium biguttatum* against *Rhizoctonia solan*. *Mycopathology* 157: 201-205
21. MILLER GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 3: 426-428
22. MURALIDHAR RV, CHIRUMAMILA RR AND MARCHANT R., 2001. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochem Eng J* 9: 17-23.
23. MURRAY PG, ALICE GA, LAFFEY CD, CUFFEB MM, HIGGINSB T, SAVAGEB AV, PLANASC A AND TUOHY MG. 2001. Isolation and characterization of a thermostable endo- β -glucanase active on 1,3-1,4- β -D-glucans from the aerobic fungus *Talaromyces emersonii* CBS 814.70. *Enz Microbial Technol* 29: 90-98.
24. PANG Z, OTAKA K, MAOKA T, HIDAKA K, ISHIJIMA S, ODA M AND OHNISHI M. 2005. Structure of β -glucan oligomer from laminarin and its effect on human monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 553-85.
25. PARRISH FW, PERLIN AS AND REESE ET. 1960. Selective enzymolysis of poly- β -D-glucan and structure of the polymers. *Can J Chem* 38: 2094-2104.
26. PEREZ LM, BESOAIN X, REYES M, PARDO G AND MONTEALEGRE J. 2002. The expression of extracellular fungal cell wall hydrolytic enzymes in different *Trichoderma harzianum* isolates correlates with their ability to control *Pyrenochaeta lycopersici*. *Biol Res* 35: 401-410.
27. PITSON S, SEVIOUR R AND MCDUGALL B. 1993. Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. *Enz Microbial Technol* 15:178-192.
28. PLANAS A. 2000. Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica el Biophysica* 1534: 361-382.
29. SCHIRMBOCK M, LORITO M, WANG YL, HAYES CK, ARISAN- ATAC I, SCALA F, HARMAN GE AND KUBICEK CP. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular

- mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. Appl Environ Microbiol 60: 4364-4370.
30. SUZUKI H AND KANCHO T. 1976. Degradation of barley glucan and lichenin by a *Bacillus pumilis* enzyme. Agri Biol Chem 40: 577-586.
 31. VAZQUEZ-GARCIDUENAS S, LEAL-MORALES CA AND HERRERA-ESTRELLA A. 1998. Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl Environ Microbiol 64: 1442-1446.

CAPÍTULO 3³

APLICAÇÃO DE β -1,3-GLUCANASE E QUITINASE NA LISE DE LEVEDURAS UTILIZANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

³ Artigo será submetido à Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA).

Aplicação de β -1,3-glucanase e quitinase na lise de leveduras utilizando Metodologia de Superfície de Resposta

RESUMO

As enzimas líticas podem ser utilizadas para a obtenção de vários produtos biotecnológicos a partir de leveduras. Este trabalho apresenta a aplicação do extrato enzimático na lise de leveduras utilizando Metodologia de Superfície de Resposta. Os Modelos matemáticos foram aplicados para os dados obtidos e demonstraram que, a função quadrática foi mais adequada para explicar o seu comportamento dentro do campo experimental estudado. As leveduras mostraram-se sensíveis à enzima lítica β -1,3-glucanase, com unidade lítica celular média de 22,1 U/mL para *Pseudozima* sp. (CCMB 306) e de 16,7 U/mL para *Pseudozima* sp. (CCMB 300). As enzimas líticas podem ser utilizadas para a obtenção de vários produtos biotecnológicos a partir de leveduras.

Palavras-chave: β -1,3-glucanase. Otimização multivariada. Matriz Doehlert.

ABSTRACT

The lytics enzymes can be used to obtain several biotechnology products from yeast. This paper presents the application of the enzyme extract in the yeast cell lysis Response Surface Methodology. The mathematical models were applied to the data obtained and proved that the quadratic function, is more appropriate for explain its behavior inside studied experimental field. *Pseudozima* sp. (CCMB 306) and *Pseudozima* sp. (CCMB 300) were sensitive to lytic enzymes β -1,3-glucanase and chitinase, with lytic unit cell average of 22.1 U/mL and 16.7 U/mL, respectively. The lytics enzymes can be used to obtain several biotechnology products from yeast.

Key-words: β -1,3-glucanase. Multivariate optimization. Doehlert Matrix design.

INTRODUÇÃO

A parede celular de leveduras é basicamente formada por duas camadas: glucana e mananaproteína. Usualmente, para ocorrer a sua remoção, são necessárias enzimas líticas, entre as quais quitinases, proteases e β -1,3-glucanases. São inúmeras as aplicações biotecnológicas: na preparação de protoplastos, na extração de pigmentos, no tratamento de massa celular de leveduras residual de indústrias de fermentação para preparação de ração animal, no estudo do mecanismo da síntese da parede celular para controle de leveduras patogênicas, etc. (HUNTER; ASENJO, 1988; FLEURI; SATO, 2005).

Essas enzimas são capazes de lisar a parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* sp. e outros gêneros de leveduras, o que amplia o campo de utilização das mesmas, permitindo seletividade na liberação dos produtos, independente da escala e podendo ser realizada em condições de pH e temperatura que não implicam na desnaturação de produtos celulares de interesse (FLEURI; SATO, 2005).

Modelos matemáticos têm sido cada vez mais utilizados para ajudar a explicar respostas de reações bioquímicas. A metodologia de superfície de resposta (MSR), a qual é constituída de duas etapas (modelagem e deslocamento), projeta, constrói modelos, avalia os efeitos dos fatores e busca a condição ótima dentre uma faixa específica das condições das variáveis estudadas. A modelagem geralmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos no planejamento experimental, já o deslocamento ocorre sempre ao longo do caminho de ascensão máxima de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (BOX et al. 1978).

Essa técnica é freqüentemente utilizada para a otimização e/ou verificação da influência dos componentes do meio de cultivo ou parâmetros para a produção enzimática (FLEURI; SATO, 2008). O processo de otimização, aplicando esta metodologia, envolve o estudo da resposta das combinações estatisticamente, a estimação dos coeficientes através da adaptação a um modelo matemático que melhor explique as condições experimentais, predizendo a resposta do modelo ajustado e verificando a adequação ao mesmo (BOX et al. 1978).

A produção otimizada e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados sempre, pois as condições ótimas variam entre os diferentes microrganismos, assim como para diferentes enzimas (BRAVO et al. 2000). Em muitos casos, a interação de parâmetros que influenciam processos fermentativos pode ser avaliada com um número reduzido de ensaios através de um planejamento experimental (THÉODORES; PANDA, 1995).

O objetivo deste trabalho foi utilizar o extrato enzimático bruto contendo enzimas líticas obtido após fermentação submersa usando como agente o fungo *Moniliophthora perniciosa*. A Metodologia do planejamento experimental e análise de Superfície de Resposta foram empregadas para verificar a influência do pH e temperatura (variáveis independentes) na lise de *Pseudozima* sp. (CCMB 300 e 306) (variável dependente ou resposta).

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo e manutenção

Moniliophthora perniciosa

As amostras de *M. perniciosa* (CCMB 0257) foram obtidas da Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB). O fungo é mantido no laboratório em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA - HiMedia) a 28 °C em estufa IGO 150 Cell Life - Jouan.

Pseudozima sp. (CCMB 300 e 306)

As amostras foram obtidas da Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB). As leveduras foram mantidas em meio YM (extrato de levedura 3g/L, extrato de malte 3 g/L, peptona 5 g/L, glicose 10 g/L e agar 20 g/L) a 28 °C em estufa IGO 150 Cell Life - Jouan.

Reagentes

Laminarina e quitina foram obtidas da Sigma (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Todos os outros reagentes utilizados foram de alto grau analítico.

Meio de indução

O meio base usado para a fermentação de *Moniliophthora pernicioso* foi composto por (g L⁻¹): farelo de trigo (40 g), sulfato de magnésio (0,2 g), cloreto de potássio (0,2 g), monohidrogenofosfato de potássio (1,0 g) e 1000 mL de água destilada. A esse meio foram adicionadas diferentes concentrações de extrato de levedura como indutor, conforme o planejamento experimental. A concentração do indutor foi estudada em cinco níveis (3; 4,5; 6; 7,5 e 9 g/L) e o tempo de fermentação em três níveis (7, 14 e 21 dias). O pH do meio foi ajustado para 6,8. O meio para o crescimento da levedura era composto de extrato de levedura 3g/L, extrato de malte 3 g/L, peptona 5 g/L, glicose 10 g/L e agar 20 g/L dissolvidos em água destilada, pH 6,8.

Inoculação e fermentação

Para a produção de enzimas líticas dois discos de micélio do *M. pernicioso* de 1,0 cm de diâmetro foram inoculados assepticamente para frascos de 250 mL contendo 100 mL do meio de indução. A fermentação ocorreu a 120 rpm em Shaker (TECNAL TE-424) a 28 °C. Os frascos foram incubados em diferentes tempos de fermentação, conforme o planejamento experimental. Após o período de incubação, o meio foi centrifugado (Centrifuga 5804R - eppendorf) a 8000 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante utilizado como fonte de enzima para a lise da levedura.

Preparo da suspensão de *Pseudozyma sp.* (CCMB 300 e 306)

Para a obtenção de células de leveduras, uma alçada das culturas crescidas em placas de meio YM, foi transferida para frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio YM líquido. Os frascos foram incubados em Shaker (TECNAL TE-424) 28 °C por 36 h, com agitação a 98 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 10.000 g por 10 min a 4 °C e estas então ressuspendidas em tampão citrato-fosfato 0,1 M em pH de acordo com o planejamento experimental até obter uma suspensão com densidade ótica igual a 0,60 a 660 nm. As suspensões de células de leveduras foram utilizadas para o teste de lise enzimática da parede celular.

Delimitação experimental – Lise de leveduras

Uma matriz Doehlert, com três repetições no ponto central levando a um total de 9 experimentos, para duas variáveis (pH e temperatura), foi aplicada para encontrar as melhores condições para a lise das leveduras. O pH foi estudado em cinco níveis (3, 4, 5, 6 e 7) e a temperatura em três níveis (20, 40 e 60 °C). O extrato enzimático bruto com resultado mais próximo dos valores ótimos para a atividade de β -1,3-glucanase foi empregado. Utilizou-se 0,71 U/mL de β -1,3-glucanase e 1,25 U/mL de quitinase. A tabela 1 apresenta os valores codificados e não codificados para o planejamento.

Tabela 1 – Valores codificados e não codificados para a aplicação na lise de *Pseudozyma sp.* (CCMB 300 e 306).

| Variáveis | | Valores codificados | | | | | | |
|------------------|----------------|---------------------|--------|------|----|-----|-------|---|
| | | -1 | -0,866 | -0,5 | 0 | 0,5 | 0,886 | 1 |
| pH | X ₁ | 3 | | 4 | 5 | 6 | | 7 |
| Temperatura (°C) | X ₂ | | 20 | | 40 | | 60 | |

Para as duas variáveis, a Matriz de Doehlert é representada por um hexágono regular com um ponto central (Figura 1). Coordenadas de cada vértice

estabelece diferentes condições experimentais, as quais devem ser realizadas para a modelagem. O erro foi avaliado pela repetição do ponto central. Os dados experimentais foram processados utilizando o software STATISTICA 7.0. Todos os experimentos nesta etapa foram realizados em ordem aleatória.

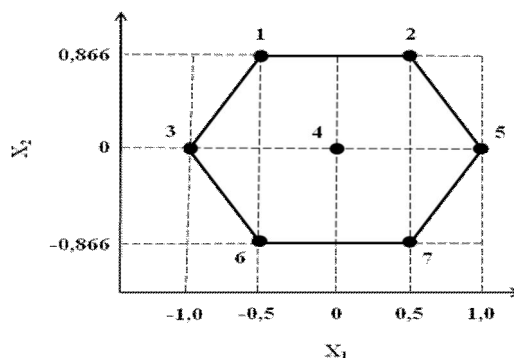


Figura 1 Representação da Matriz de Doehlert para a otimização de duas variáveis.

Determinação da atividade de β -1,3-glucanase

Para a determinação da atividade enzimática, a laminarina foi dissolvida em tampão citrato (0,05 mol/L, pH 6,2). O meio reacional consistiu de 100 μ L of laminarina a 0,1 % e 100 μ L solução enzimática. As amostras foram incubadas a 50 °C por 15 minutos e a reação interrompida pela adição de 200 μ L de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a 1 % e aquecimento a 98 °C por 15 minutos. Os açúcares redutores liberados na reação foram determinados espectrofotometricamente (espectrofotômetro – Varian Cary) a 540 nm pelo método de Miller (1959), utilizando solução de glicose como padrão. Uma unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar açúcares redutores equivalente a 1 μ mol de glicose por minuto nas condições acima citadas. Todos os testes para o ensaio de atividade foram realizados em triplicatas.

Determinação da atividade de quitinase

A atividade de quitinase foi determinada pela quantificação de açúcares redutores liberados durante a reação (MILLER, 1959). Uma alíquota de 500 μ L do

extrato enzimático foi adicionado a 500 µL de solução de quitina 1 % em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, e incubados por 30 minutos a 50 °C. Após esse período foram adicionados 1000 µL de DNS e incubado a 95 °C por 15 minutos. Após resfriar a temperatura ambiente, foi adicionado 10 mL de água destilada, e a leitura da absorbância foi feita num comprimento de onda de 540nm.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar açúcares redutores equivalente a 1 µmol de glicose por minuto nas condições acima citadas. Todos os testes para o ensaio de atividade foram realizados em triplicatas.

Determinação da atividade lítica

O extrato enzimático (0,71 U/mL β-1,3-glucanase e 1,25 U/mL de quitinase) e a suspensão permaneceram em contato por 1 h sob agitação em temperaturas que seguiram o planejamento experimental. Como referência, foi preparada uma suspensão e no lugar da solução enzimática foi acrescentado o tampão citrato-fosfato 0,1 M. Uma unidade de lise celular foi definida como a diminuição de 0,1 unidades de absorbância nas condições de ensaio a 660 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foi realizado um planejamento experimental para avaliar a influência das variáveis independentes pH e temperatura na lise de *Pseudozima* SP (CCMB 300 e CC<B 306). Foram realizados 6 ensaios e 3 repetições no ponto central, totalizando 9 experimentos. Os efeitos dos dois fatores foram modelados e a atividade lítica, variável dependente, obtida são listados nas tabelas 2 e 3.

Em relação à aplicação do extrato enzimático na lise de *Pseudozima* sp. (CCMB 306), a tabela 2 indica que as maiores atividades líticas foram obtidas no ponto central.

Tabela 2 – Estudo da lise de *Pseudozyma* sp. (CCMB 306), utilizando β -1,3-glucanase de *M. pernicioso*, através de planejamento experimental.

| Ensaio | Temperatura (°C) | pH | Unidade lítica (U/mL) |
|--------|------------------|----|-----------------------|
| 1 | 60 | 4 | 13,5 |
| 2 | 60 | 6 | 11,3 |
| 3 | 40 | 3 | 18,0 |
| 4 | 40 | 5 | 23,09 |
| 5 | 40 | 5 | 21,2 |
| 6 | 40 | 5 | 22,0 |
| 7 | 40 | 7 | 18,4 |
| 8 | 20 | 4 | 17,1 |
| 9 | 20 | 6 | 15,8 |

Na análise dos efeitos das variáveis independentes o pH linear e quadrático apresentaram efeitos positivo (19,85) e negativo (-1,95), respectivamente. A variável temperatura apresentou seu termo linear positivo (2,58) e o quadrático negativo (-0,033). A interação das variáveis provocou um efeito positivo (0,021) na lise da levedura pelo extrato enzimático.

A validade do modelo foi verificada pela ANOVA. O coeficiente múltiplo de determinação (R^2) encontrado foi 0,96, implicando que 96 % da variação total na atividade residual foi explicado pelo modelo ajustado. O teste baseado na distribuição de Fisher (Teste F) indicou que a equação aproximada é estatisticamente significativa ($F = 16,03255 > 9,01$). O teste de falta de ajuste ($F = 2,70 < 18,51$) indicou que existe uma boa concordância entre os valores experimentais estudados e o modelo de resposta predito. Os critérios de Lagrange aplicados indicaram que o ponto onde foi obtido maior atividade de lise da levedura *Pseudozyma* sp. CCMB 306 foi caracterizado como um máximo, sendo encontrados os valores de 5 e 40 °C, para o pH e temperatura, respectivamente, obtendo-se uma unidade lítica celular média de 22,1 U/mL.

Obteve-se o modelo quadrático que representa o comportamento da atividade lítica da β -1,3-glucanase sobre a levedura *Pseudozyma* sp (CCMB 306) e que descreve superfície de resposta e as curvas de contorno (Equação 1 e Figuras 2 e 3):

$$\text{Atividade Lítica} = - 25,9254 + 9,9247X_1 - 0,9736X_1^2 + 1,2912 X_2 - 0,0167 X_2^2 - 0,01055 X_1 * X_2 \quad (1)$$

Os valores ótimos obtidos para as variáveis independentes do planejamento efetuado coincidem com a atividade catalítica ótima da β -1,3-glucanase obtida do fungo *Moniliophthora perniciosa*.

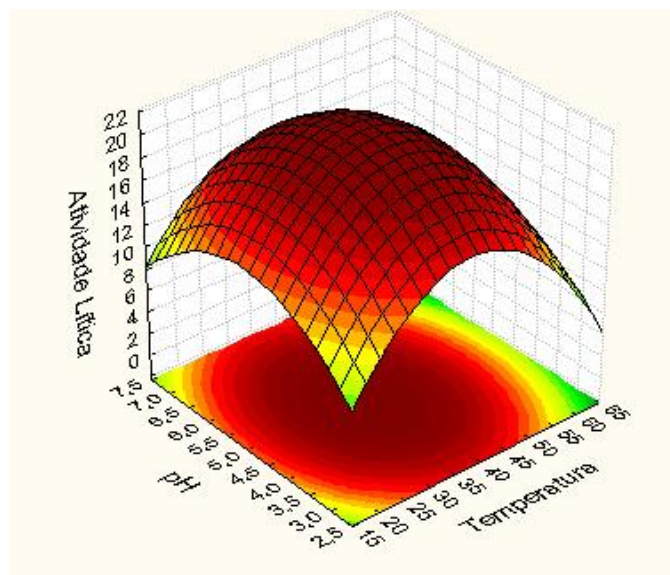


Figura 2. Superfície de resposta para a lise de *Pseudozyma* sp. (CCMB 306).

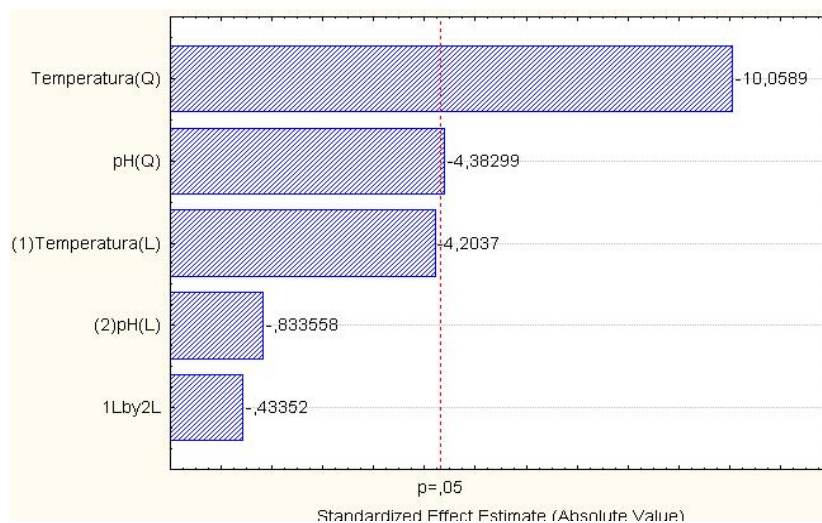


Figura 3: Gráfico de Pareto para a lise de *Pseudozyma* sp. (CCMB 306).

Quando a levedura *Pseudozyma* sp (CCMB 300) foi submetida à ação do extrato enzimático foram obtidos os seguintes resultados (Tabela 3):

Tabela 3 – Estudo da lise de *Pseudozyma* sp. (CCMB 300), utilizando β -1,3-glucanase de *M. pernicioso*, através de planejamento experimental.

| Ensaio | Temperatura (°C) | pH | Unidade lítica (U/mL) |
|--------|------------------|----|-----------------------|
| 1 | 60 | 4 | 13,6 |
| 2 | 60 | 6 | 3,9 |
| 3 | 40 | 3 | 15,9 |
| 4 | 40 | 5 | 14,0 |
| 5 | 40 | 5 | 14,0 |
| 6 | 40 | 5 | 13,7 |
| 7 | 40 | 7 | 2,9 |
| 8 | 20 | 4 | 16,7 |
| 9 | 20 | 6 | 12,5 |

A maior atividade lítica foi obtida no ensaio 8 (pH 4 e 20 °C). Na análise dos efeitos das variáveis independentes, o pH linear e quadrático apresentaram efeitos positivo (1,82) e negativo (-0,41), respectivamente. A variável temperatura apresentou seu termo linear positivo (1,94) e o quadrático negativo (-0,019). A interação das variáveis provocou um efeito positivo na lise da levedura pelo extrato enzimático.

A validade do modelo foi verificada pela ANOVA. O valor do coeficiente de determinação obtido foi de 0,99. O valor do teste-F indicou que o modelo de segunda ordem foi estatisticamente significativo (769,156 > 9,01). A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático que representa o comportamento da atividade lítica da β -1,3-glucanase sobre a levedura *Pseudozyma* sp (CCMB 300) e que descreve superfície de resposta e as curvas de contorno (Equação 2 e Figuras 4 e 5):

$$\text{Atividade Lítica} = - 13,7218 + 0,9097 X_1 - 0,2068 X_1^2 + 0,9721 X_2 - 0,0096 X_2^2 + 0,233 X_1 * X_2 \quad (2)$$

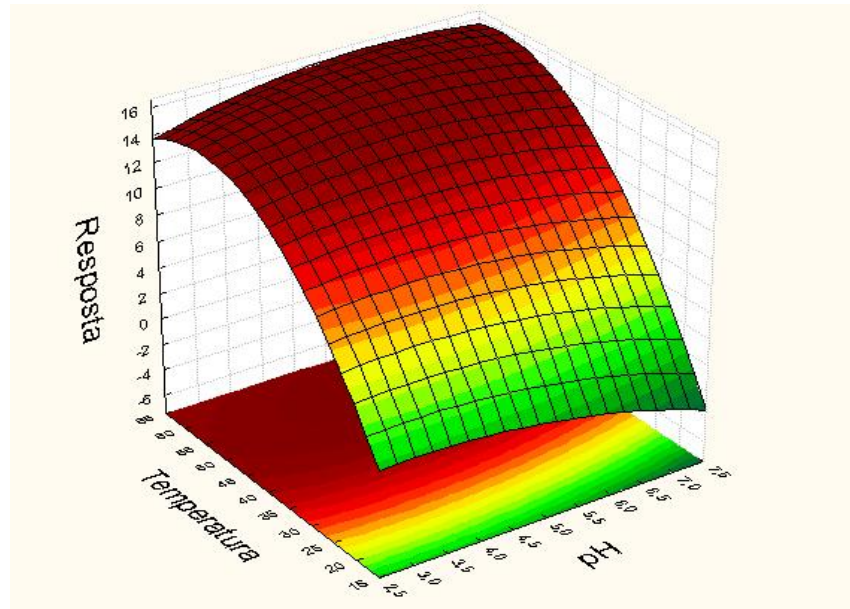


Figura 4 – Superfície de resposta para a atividade lática sobre *Pseudozyma* sp (CCMB 300) como resposta para pH e temperatura.

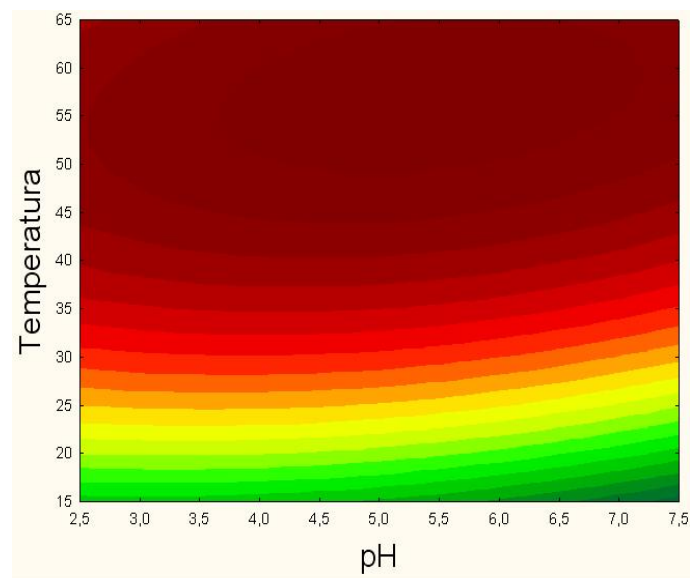


Figura 5 – Curvas de contorno para a atividade lática sobre *Pseudozyma* sp (CCMB 300) como resposta para pH e temperatura.

Os valores ótimos preditos de pH e temperatura obtidos através da diferenciação da equação 2 foram iguais a 5,44 e 57,3 °C, respectivamente.

Outros trabalhos foram encontrados na literatura, principalmente devido à importância no controle biológico e obtenção de produtos biotecnológicos, porém foi o primeiro mostrando a aplicação de β -1,3-glucanase de *M. pernicioso* em outro microrganismo.

A levedura *Oerskovia xanthineolytica* foi utilizada contra *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1B em pH e temperatura de 7,5 e 30 °C, respectivamente. O microrganismo só conseguiu lisar a parede na presença de protease alcalina (Scott; Schekman, 1980). Fleuri e Sato (2008) produziram β -1,3-glucanase de *Cellulomonas cellulans* 191 e aplicaram na lise de *Saccharomyces cerevisiae* KL-88 e extração de enzimas intracelulares. No planejamento experimental eles utilizaram como variáveis independentes a temperatura e pH da lise bem como tempo e agitação para o cultivo da levedura. A maior lise foi encontrada no pH 6,5 e temperatura de 35 °C, sendo igual a 7,08 U/mL. Comparando os resultados obtidos neste trabalho com o anterior, a atividade lítica foi três vezes maior e com poucas variáveis sendo analisadas.

Neste trabalho a β -1,3-glucanase de *M. pernicioso* atuou diferentemente na lise das duas linhagens de *Pseudozyma* sp. Provavelmente devido à diferença na composição da parede celular das mesmas.

CONCLUSÃO

O uso da Metodologia de Superfície de Resposta permitiu a avaliação do efeito simultâneo das variáveis pH e temperatura na lise enzimática. Através do experimento pôde-se observar que as leveduras *Pseudozyma* sp (CCMB 306 e 300) mostraram-se sensíveis à preparação enzimática bruta contendo β -1,3-glucanase e quitinase obtidas do fungo *Moniliophthora pernicioso*, sendo obtida uma atividade lítica média de 22,1 U/mL a pH 5 e 40 °C e 16,7 U/mL a pH 4 e 20 °C, respectivamente. Conclui-se que as enzimas líticas podem ser utilizadas para a obtenção de vários produtos biotecnológicos, entre estes, os pigmentos encontrados nas leveduras estudadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESB, CNPq e CAPES pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S. **Statistic for Exoerimenters: Na introduction to Design, data analysis and model building**. Wiley: New York, 1978.

BRAVO et al. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência Agrotecnologia**, v. 24, p.137 - 152, 2000.

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

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. β -1,3-glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1224 - 1231, 2008.

HUNTER, J., B.; ASENJO, J. A. A structured mechanistic model of the kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 929 - 943, 1988.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylate acid reagent for the determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426 - 428, 1959.

SCOTT, J. H.; SCHEKMAN, R. Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. **Journal of Bacteriology**, v. 142, p. 414, 1980.

THÉODORE, K.; PANDA, T. Application of response surface methodology to evaluate the influence of temperature and initial pH on the production of β -1,3-

glucanase and carboxymethylcellulase from *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 1043, 1995.

CAPÍTULO 4⁴

INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Moniliophthora perniciosa* POR EXTRATOS VEGETAIS

⁴ Artigo será submetido para a Revista Scientia Agricola.

Inibição do crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa* por extratos vegetais

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar *in vitro* o efeito de extratos das espécies *Agave sisalana*, *Xanthium cavanillesii* e cinco espécies do gênero *Marcetia*, em diferentes concentrações (250, 500, 1000, 2000 e 4000 µg/mL), sobre o crescimento micelial do fungo *Moniliophthora perniciosa*. Os extratos mais efetivos, os quais inibiram 100 % do crescimento, foram os extratos butanólico de *A. sisalana*, na concentração de 4000 µg/mL e etanólico da folha de *Xanthium cavanillesii* a partir de 500 µg/mL. Os estudos de concentração inibitória mínima (CIM) mostraram os valores de 500 µg/mL e 2500 µg/mL para o extrato da folha e caule de *Xanthium cavanillesii*, respectivamente. Com os resultados obtidos conclui-se que os mesmos podem ser utilizados como alternativas para o controle da vassoura-de-bruxa.

Palavras-chave: Vassoura-de-bruxa. *Theobroma cacao*. Controle. Avaliação *in vitro*. Crescimento micelial. Inibição.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate *in vitro* the effect of the extracts of five species of the genus *Marcetia*, species *Agave sisalana* and *Xanthium cavanillesii*, in different concentrations (250, 500, 1000, 2000 and 4000 µg/mL), on the mycelial growth of the fungus *Moniliophthora perniciosa*. The most effective extract, which inhibited 100 % growth was the butanolic extract of *A. sisalana*, in the concentration of 4000 µg/mL and etanolic extract of *X. cavanillesii* at 500 ppm. The studies of minimum inhibitory concentration (MIC) showed that the values are, respectively, 500 µg/mL for leaf etanólico extract and 2500 µg/mL for stem etanólico extract of *Xanthium cavanillesii*. With the results it is concluded that they may be used as alternatives to control Witche's broom disease.

Keywords: Witche's broom disease. *Theobroma cacao*. Control. Evaluation *in vitro*. Mycelial development. Inhibition.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o cultivo do cacau tem origem na região Amazônica e, somente no século XVIII é que foi introduzido na Bahia, no município de Canavieiras, sendo as primeiras variedades do tipo forasteiro. Até meados de 1890 a atividade econômica predominante era a cana-de-açúcar em função do elevado preço desse produto no mercado, atraindo, nessa época, o capital agrícola para essa atividade, especialmente no Nordeste brasileiro. Com a crise da atividade açucareira no Nordeste, no final do século XIX, o capital migrou para o sul da Bahia, em função das condições edafoclimáticas favoráveis, estimulando assim a rápida expansão dos cacauais nessa região (MARINHO, 2001).

Contudo, a partir de 1989 os plantios de cacau foram severamente atacados pela doença conhecida como vassoura-de-bruxa, cujo agente etiológico é o fungo *Moniliophthora perniciosa*. É uma enfermidade com grande importância no Brasil, principalmente, na região do Sul da Bahia, onde foi responsável por reduzir de maneira significativa a produção de cacau, resultando numa crise econômica, na qual esta localidade era fortemente dependente da exportação das sementes de cacau para fabricação de chocolate (COUTO, 2000; OLIVEIRA; LUZ, 2005).

Os mecanismos bioquímicos e fisiológicos de resistência do cacau ao *M. perniciosa* são praticamente desconhecidos (NOJOSA et al., 2003) e atualmente as medidas de controle se baseiam no uso de produtos químicos, principalmente o óxido cuproso, no controle genético e tratos culturais. Atualmente, estudos também vêm sendo desenvolvidos em busca de microrganismos antagônicos ao fungo, por exemplo, o *Trichoderma stromaticum* agente no biofungicida Tricovab desenvolvido pela CEPLAC/CEPEC (BASTOS, 2000).

Além de pesquisas relacionada à aplicação de extratos vegetais *in vitro*, já foram relatados também na literatura vários trabalhos envolvendo a inibição ou resistência ao *M. perniciosa* como, por exemplo a atividade antifúngica de derivados de azol tanto *in vitro* quanto *in loco* (Mota; Barros; Castilho, 2009), leveduras micocinogênicas (Cabral et al., 2009) e extratos aquosos de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) com sintomas de vassoura-de-bruxa induziram proteção de mudas de cacauais contra a mesma doença em nível

estatisticamente similar à proteção conferida pelo acibenzolar-S-metil (ASM), um indutor de resistência sistêmica adquirida (SAR) liberado para uso comercial (Resende et al., 2007). São estudos inovadores e que podem trazer soluções para o problema na cacauicultura.

O controle das doenças e pragas na agricultura tem se intensificado, sendo realizados basicamente através do emprego de produtos sintéticos, com elevados custos, riscos ambientais e toxicológicos (SOUZA et al., 2007). Com o avanço do sistema de produção orgânica, há interesse na busca de novas práticas agrícolas que substituam os métodos convencionais de controle de doenças e, portanto uma atenção maior tem sido voltada para a utilização de métodos alternativos aos fungicidas tradicionais, que sejam eficientes com o mínimo de impacto ambiental e perigo aos consumidores (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

Apesar de apenas 20 % das plantas do mundo terem sido submetidas a testes farmacológicos ou biológicos, pode-se inferir que produtos naturais de origem vegetal e seus análogos são importantes fontes para descobrir novas oportunidades com importância farmacêutica e econômica e grandes possibilidades de serem desenvolvidas como drogas, corantes, fragrâncias, pesticidas, etc (HAMBURGER; HOSTETTMAN, 1991; SILVA; BASTOS, 2007). Dentre esses produtos, os extratos vegetais, são amplamente testados em fitopatógenos, enquadrando-se como estratégia de controle biológico e potencial alternativa ecológica (FRANCO; BETTIOL, 2000).

A literatura tem registrado a eficiência de extratos, obtidos de uma enorme variedade de espécies botânicas, em promover a inibição do desenvolvimento de diversos fitopatógenos devido à presença de diversos compostos ativos (taninos, saponinas, flavonoides, etc.) (KURITA et al., 1981; WILSON et al., 1997). Dentre as hipóteses sobre os mecanismos de defesas da ação antifúngica, destaca-se a inibição de enzimas, a modificação do metabolismo celular pela atuação nas membranas e a complexação com íons metálicos com conseqüente diminuição da sua disponibilidade para o metabolismo dos microrganismos (MELLO; SANTOS, 2002).

Vários extratos e óleos essenciais já foram testados sobre fungos fitopatógenos em diversos trabalhos. Como exemplo, a ação inibitória de óleos essenciais extraídos de espécies do gênero *Piper* (Piperaceae) contra a *M. perniciosa* foi relatada por Bastos (1997), utilizando óleo essencial de *P.*

aduncum. Bastos e Silva (2002) também conseguiram inibição utilizando óleos essenciais de *P. aduncum* e *P. marginatum*. Silva e Bastos (2007) encontraram inibição de 100 % a partir de concentração de 750 µg/mL do óleo de *Piper callosum* e na concentração de 1000 µg/mL do óleo de *P. marginatum* var. *anisatum*. Foi também relatada a ação do extrato de bulbo de alho, sobre o crescimento micelial e germinação dos esporos do mesmo fungo (BASTOS, 1992).

A flora brasileira é rica em espécies com princípios ativos responsáveis por propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais, portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade fungitóxica de extratos obtidos com solventes orgânicos de diferentes polaridades das espécies *Marsetia canescens*, *M. latifolia*, *M. taxifolia*, *M. Harley*, *M. formosa* (Melastomataceae), *Agave sisalana* (Agavaceae) e *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) sobre o crescimento micelial, como uma possível alternativa para o controle da vassoura-de-bruxa, visto que estes não foram encontradas referências bibliográficas sobre suas atividades sobre fungos fitopatogênicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O efeito dos extratos vegetais sobre o crescimento do fungo *M. perniciosa*, *in vitro*, foi investigado no Laboratório de Enzimologia (LAEN), localizado na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana/Bahia.

Microrganismo

As amostras de *M. perniciosa* (CCMB 0257) foram gentilmente cedidas pela Coleção de Culturas de Microrganismos da Bahia (CCMB). O fungo é mantido no laboratório através de repiques constantes em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA - HiMedia) a 28 °C em estufa IGO 150 Cell Life - Jouan.

Obtenção e preparação de extratos vegetais

Todo o material vegetal utilizado foi preparado no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Saúde da UEFS.

Marcetia

As partes aéreas das espécies *Marcetia canescens*, *M. latifolia* e *M. taxifolia* foram coletadas nos municípios de Morro-do-Chapéu e Rio-de Contas, as espécies *M. harley* e *M. formosa* em Mucugê (Chapada Diamantina-BA). As espécies identificadas foram identificadas pelas botânicas Dr^a Tânia Regina dos Santos Silva e Msc. Andrea Karla Almeida Santos. Uma exsicata de cada espécie foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) com os respectivos números: 119470, 119472, 99625, 120344 e 120364.

Todas as espécies foram secas e pulverizadas em moinho de facas (Solab[®]), separadamente. Os constituintes químicos foram extraídos por maceração (48 horas) com metanol (MeOH) a temperatura ambiente e em recipiente fechado. Posteriormente estes extratos foram concentrados em aparelho rotaevaporador.

Agave sisalana

O resíduo do sisal foi obtido da Associação de Desenvolvimento Sustentável e Solidário da Região Sisaleira (APAEB) no município de Valente, Bahia. A preparação dos extratos foi desenvolvida a partir da metodologia adaptada de Pizarro et al. (1999). O resíduo do desfibramento do sisal foi extraído com água destilada (1:1, v/v), a 90 °C, por uma hora. Após este procedimento, o líquido extrator foi filtrado com o auxílio de um funil com algodão por duas vezes e desidratado em estufa com temperatura controlada (60 °C), obtendo o extrato bruto concentrado. A este foi adicionada solução hidroalcoólica 80 % (1:2, v/v), fornecendo, após 18 horas, um precipitado que foi separado do sobrenadante por filtração. Ao sobrenadante foi adicionado acetato de etila (1:4, v/v; 3x), resultando na formação de duas fases, permanecendo em repouso por 12 horas. A fase acetato de etila (AcOEt) foi concentrada em rotaevaporador para fornecer o extrato acetato de etila. A fase hidroalcoólica foi diluída em água destilada e em seguida sofreu partição com *isobutanol* (1:0.3, v/v; 3x). A fase butanólica foi concentrada, em estufa a 50 °C, para fornecer o extrato butanólico (BuOH). A fase aquosa foi concentrada fornecendo o extrato aquoso (H₂O).

Xanthium cavanillesii

A identificação foi feita no Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e uma exsicata do material foi depositada no herbário sob o número de registro HUEFS 139439. Os frutos, caule, folhas e raiz de *Xanthium cavanillesii* foram secos em estufa com ventilação forçada a 45-55 °C por 72h e, posteriormente, moídos em macromoinho de facas (Solab[®]). O material pulverizado obtido das partes da planta foi macerado por um período de 72 horas, separadamente, em etanol (EtOH) e água. Os extratos obtidos foram concentrados utilizando-se rotaevaporador e posteriormente à temperatura ambiente até máxima evaporação dos solventes.

Instalação do ensaio

Os experimentos foram conduzidos em placas de Petri de 6 cm contendo meio BDA (HiMedia). A atividade contra o fungo testado foi realizada pelo método de diluição em agar (taxa de crescimento radial). Os extratos foram dissolvidos nos solventes (água, etanol, butanol, acetato de etila e metanol), filtrados em membrana filtrante com porosidade de 0,22 µm e então incorporados ao meio BDA fundente, de modo a se obter concentrações entre 250 µg/mL a 4000 µg/mL (Zambonelli et al., 1996). Cada concentração de todos os extratos analisados representou um tratamento. Placas contendo BDA e os solventes serviram como controle.

A partir de colônias com 21 dias de idade, crescidas em placas com BDA, foram obtidos discos de 0,5 cm de diâmetro. Estes discos, individualmente, foram transferidos para o centro de cada uma das placas componentes de cada tratamento. A incubação foi realizada em estufa (IGO 150 Cell Life - Jouan) a uma temperatura de 28 °C, na ausência de luz.

Avaliação

A eficácia do tratamento foi avaliada após 11 dias. A avaliação do efeito dos extratos sobre o crescimento micelial foi feita através de medições do crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais (média das duas medidas

diametricamente opostas) tendo como referência o desenvolvimento da placa controle, sendo posteriormente calculada uma média. O esquema adotado foi com cinco tratamentos e três repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os valores foram expressos em termos de porcentagens de inibição comparados ao controle (Pandey et al., 1982).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os valores do CIM foram determinados pelo método de diluição em meio sólido. As diluições dos extratos foram feitas no meio de cultura com intervalos de 250 a 500 µg/mL para o extrato etanólico da folha e de 2000 a 4000 µg/mL para o do caule de *Xanthium cavanillesii*. O CIM foi determinado como a concentração sem crescimento visível.

Análise estatística

Após obtenção dos resultados, os mesmos foram analisados através do programa SISVAR – Sistema de Análise de Variância (Ferreira, 2000), realizando-se a análise de variância e a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados na tabela 1, pôde-se observar que os extratos testados apresentaram índices variáveis de inibição no desenvolvimento micelial do fungo estudado quando comparados com o controle.

A partir da Tabela 2 e Figura 1, observa-se que o extrato BuOH de *A. sisalana* apresentou propriedade fungitóxica em todas as concentrações testadas, ocorrendo taxas de inibição, em ordem crescente de concentração de 47,73, 72,73, 78,41, 89,77 e 100 % em relação ao controle. Os resultados demonstraram uma tendência de aumento nos índices de inibição proporcional ao aumento das concentrações testadas. Em relação ao extrato AcOEt, todas as concentrações também foram ativas, ocorrendo inibição de 94,44 % a 4000 µg/mL. Os extratos aquoso e bruto apresentaram menores atividades, ocorrendo inibição de 22,73 a

68,18 % e 16,85 a 71,55 %, respectivamente. No entanto, para esses extratos, entre as concentrações de 250 e 500 µg/mL observou-se que não houve diferença significativa em relação ao controle.

Tabela 1. Diâmetros (cm) do crescimento micelial de *M. pernicioso*.

| | Controle | Concentração (µg/mL) | | | | |
|--|----------|----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 250 | 500 | 1000 | 2000 | 4000 |
| Ext. BuOH <i>A. sisalana</i> | 4,43 a | 2,38 b | 1,23 c | 0,93 d | 0,45 e | 0,00 f |
| Ext. H ₂ O <i>A. sisalana</i> | 4,43 a | 4,55 a | 4,42 a | 3,37 b | 1,73 c | 1,47 c |
| Ext. AcOEt <i>A. sisalana</i> | 5,40 a | 3,07 b | 1,22 c | 0,87 d | 0,80 d | 0,30 e |
| Ext. Bruto <i>A. sisalana</i> | 4,57 a | 4,47 a | 3,80 b | 3,25 b | 1,93 c | 1,30 c |
| Ext. MeOH <i>M. latifolia</i> | 4,70 a | 4,07 b | 4,83 a | 4,03 b | 2,13 c | 1,03 d |
| Ext. MeOH <i>M. canescens</i> | 4,70 a | 4,18 b | 3,30 c | 3,18 c | 1,72 d | 0,9 e |
| Ext. MeOH <i>M. taxifolia</i> | 5,40 a | 4,02 b | 3,97 b | 3,17 b | 3,15 b | 3,48 b |
| Ext. MeOH <i>M. harley</i> | 4,57 b | 5,50 a | 5,50 a | 4,50 b | 4,00 c | 2,00 d |
| Ext. MeOH <i>M. formosa</i> | 4,57 a | 3,22 b | 3,37 b | 3,30 b | 3,03 c | 1,70 d |
| Ext. H ₂ O da folha de <i>X. cavanillesii</i> | 5,00 a | 4,77 a | 4,70 a | 4,75 a | 4,57 a | 4,75 a |
| Ext. H ₂ O da raiz de <i>X. cavanillesii</i> | 5,00 a | 5,43 a | 5,23 a | 5,30 a | 5,27 a | 5,20 a |
| Ext. H ₂ O do caule de <i>X. cavanillesii</i> | 4,20 b | 5,30 a | 4,73 b | 5,23 a | 5,33 a | 5,20 a |
| Ext. H ₂ O do fruto de <i>X. cavanillesii</i> | 4,20 b | 5,20 a | 5,13 a | 5,50 a | 5,07 a | 4,53 b |
| Ext. EtOH da folha de <i>X. cavanillesii</i> | 4,93 a | 3,35 b | 0,00 c | 0,00 c | 0,00 c | 0,00 c |
| Ext. EtOH da raiz de <i>X. cavanillesii</i> | 4,20 a | 4,05 a | 3,97 a | 4,05 a | 3,87 a | 2,50 b |
| Ext. EtOH do caule de <i>X. cavanillesii</i> | 4,93 a | 4,57 b | 4,03 c | 4,07 c | 3,10 d | 0,00 e |
| Ext. EtOH do fruto de <i>X. cavanillesii</i> | 4,93 a | 3,85 b | 3,90 b | 3,90 b | 3,02 c | 0,95 d |

Médias seguidas por letras distintas na horizontal diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo Teste de Scott-Knott.

Tabela 2. Efeito *in vitro* (% de inibição) de extratos de *Agave sisalana* sobre o crescimento micelial do *M. perniciosus*.

| Concentração (µg/mL) | Inibição do crescimento micelial (%) |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Butanólico | |
| 250 | 47,73 |
| 500 | 72,73 |
| 1000 | 78,41 |
| 2000 | 89,77 |
| 4000 | 100 |
| Aquoso | |
| 250 | - |
| 500 | - |
| 1000 | 22,73 |
| 2000 | 56,82 |
| 4000 | 68,18 |
| Acetato de etila | |
| 250 | 43,15 |
| 500 | 77,40 |
| 1000 | 83,89 |
| 2000 | 85,19 |
| 4000 | 94,44 |
| Bruto | |
| 250 | - |
| 500 | 16,85 |
| 1000 | 28,88 |
| 2000 | 57,77 |
| 4000 | 71,55 |

-: inativo

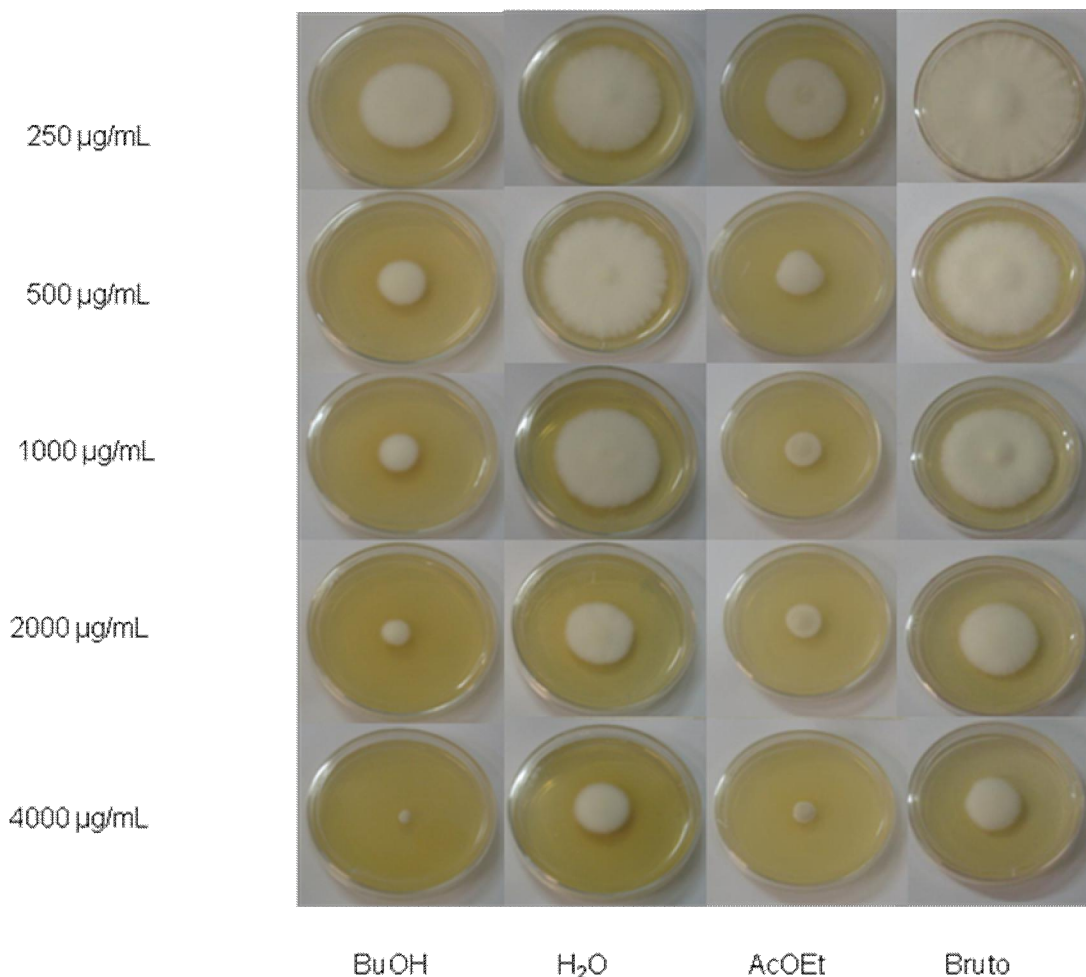


Figura 1: Atividade antifúngica de extratos de *A. sisalana* sobre *M. perniciosa*.

Santos et al. (2009) analisaram a atividade antimicrobiana e antifúngica de extratos hidroetanólico e metanólico das folhas e resíduo do sisal contra três cepas de *S. aureus*, duas cepas de *E. coli*, *B. cereus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleausuis* e *C. albicans*. Os resultados demonstraram atividade contra somente *C. albicans* com os dois extratos testados. Verastegui et al. (2008) também verificou a atividade biológica de extratos metanólicos das folhas de *A. lecheguilla*, *A. picta*, *A. scabra* e *A. lophanta*, as quais demonstraram ação contra *Cryptococcus neoformans*.

Estudos relatam que o sisal possui na sua composição as saponinas, as quais se caracterizam por complexar com esteróides da membrana, o que pode explicar sua ação antifúngica (Cunha; Roque, 2005). No entanto, o mecanismo exato ainda não foi totalmente esclarecido (Osbourne; Morrissey, 1999).

Todas as espécies testadas do gênero *Marcetia* apresentaram atividade contra *M. perniciosa*, sendo os melhores resultados relacionados com a espécie *M. canescens*, apresentando inibição de 80,85 % a 4000 µg/mL contra 78,09 % de *M. latifolia*, 62,80 % de *M. formosa*, 56,24 % de *M. harley* e 35,55 % de *M. taxifolia*, na mesma concentração (Tabela 3 e Figura 2). Leite (2009) verificou atividade antimicrobiana do extrato hexânico das partes aéreas de *M. canescens*, *M. latifolia*, *M. taxifolia* e *M. macrophylla* contra duas cepas de *S. aureus* e *Candida parapsilosis*. Foi verificada atividade também, a partir do extrato acetato de etila e metanol das mesmas espécies, contra *P. aeruginosa*, *S. choleraesius* e *Candida albicans*.

Tabela 3 – Efeito *in vitro* (% de inibição) de extratos metanólicos do gênero *Marcetia* sobre o crescimento micelial do *M. perniciosa*.

| Concentração (µg/mL) | Inibição do crescimento micelial (%) |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Marcetia canescens</i> | |
| 250 | 11,06 |
| 500 | 29,79 |
| 1000 | 32,34 |
| 2000 | 63,40 |
| 4000 | 80,85 |
| <i>Marcetia taxifolia</i> | |
| 250 | 25,5 |
| 500 | 26,48 |
| 1000 | 41,30 |
| 2000 | 41,67 |
| 4000 | 35,55 |
| <i>Marcetia formosa</i> | |
| 250 | 29,54 |
| 500 | 26,25 |
| 1000 | 27,79 |
| 2000 | 33,70 |
| 4000 | 62,80 |
| <i>Marcetia harley</i> | |
| 250 | - |
| 500 | - |
| 1000 | - |
| 2000 | 12,47 |
| 4000 | 56,24 |
| <i>Marcetia latifolia</i> | |
| 250 | 13,40 |
| 500 | - |
| 1000 | 14,26 |
| 2000 | 54,68 |
| 4000 | 78,09 |

-: inativo

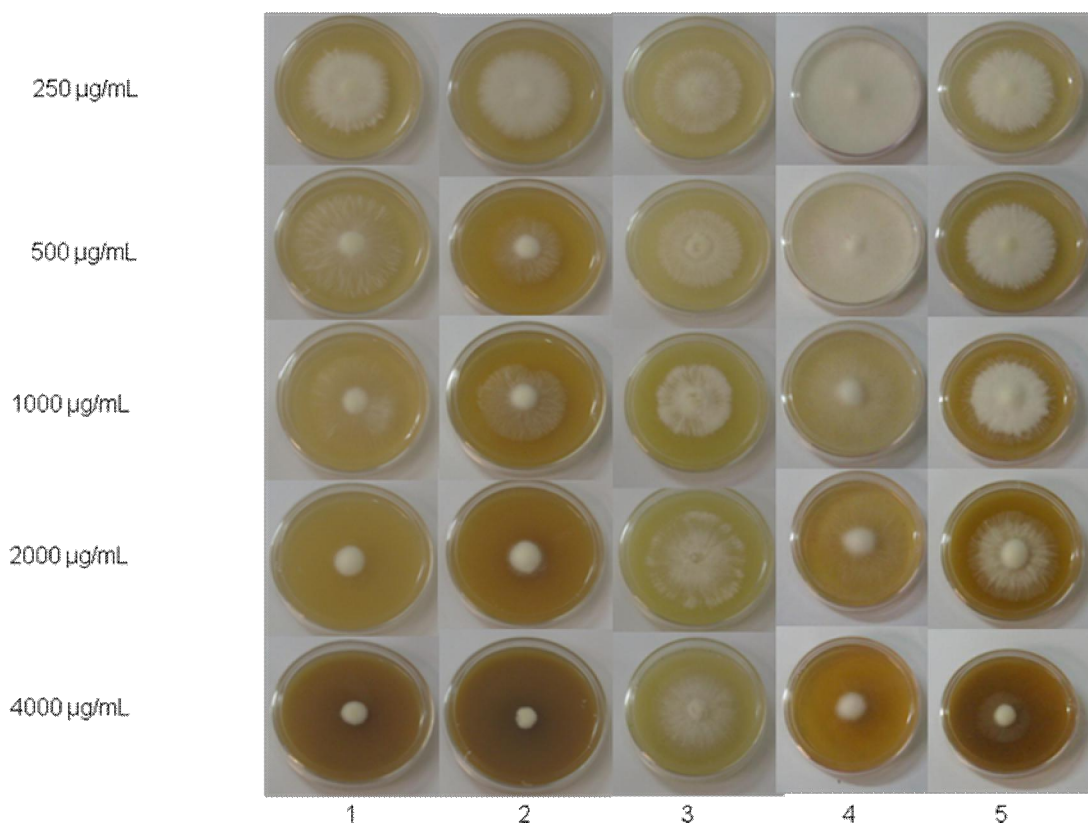


Figura 2: Atividade antifúngica de extrato metanólico do gênero *Marsetia* sobre *M. perniciosus*. 1 - *M. latifolia*; 2 - *M. canescens*; 3 - *M. taxifolia*; 4 - *M. harley*; 5 - *M. formosa*.

Diversas classes de substâncias químicas têm sido isoladas da família Melastomataceae como ácidos graxos (Salatino et al., 1998; Veneziani et al., 2006), terpenóides (Veneziani et al., 2006), flavonóides (Bonfim-Patricio et al., 2001; Lowry, 1976) e taninos (Yoshida et al., 2005). A atividade encontrada no trabalho de Leite (2009) pode ser atribuída aos flavonóides encontrados em todas as espécies analisadas.

Analisando as Tabelas 1 e 4, os resultados demonstraram que, embora algumas concentrações testadas do extrato aquoso das diferentes partes de *X. cavanillesii* tenham apresentado diferença estatística do controle, não foram suficientes para a inibição, alteração ou diminuição do crescimento micelial do fungo e sim a estimulação de seu crescimento. O extrato mais eficiente na inibição do fungo em relação à concentração foi o extrato etanólico da folha de *X. cavanillesii*, onde ocorreu inibição de 100 % entre 500 e 4000 µg/mL. As figuras 3 e 4 demonstram as placas referentes aos testes.

Tabela 4 – Efeito *in vitro* (% de inibição) de extratos aquosos e etanólicos, respectivamente, de diferentes partes de *X. cavanillesii* sobre o crescimento micelial do *M. pernicioso*.

| Concentração (µg/mL) | Inibição do crescimento micelial (%) |
|----------------------|--------------------------------------|
| Folha | |
| 250 | - |
| 500 | - |
| 1000 | - |
| 2000 | - |
| 4000 | - |
| Raiz | |
| 250 | - |
| 500 | - |
| 1000 | - |
| 2000 | - |
| 4000 | - |
| Caule | |
| 250 | - |
| 500 | - |
| 1000 | - |
| 2000 | - |
| 4000 | - |
| Fruto | |
| 250 | - |
| 500 | - |
| 1000 | - |
| 2000 | - |
| 4000 | - |
| Folha | |
| 250 | 32,05 |
| 500 | 100 |
| 1000 | 100 |
| 2000 | 100 |
| 4000 | 100 |
| Raiz | |
| 250 | - |
| 500 | - |
| 1000 | - |
| 2000 | - |
| 4000 | 40,48 |

-: inativo

Continuação (tabela 4) – Efeito *in vitro* (% de inibição) de extratos aquosos e etanólicos, respectivamente, de diferentes partes de *X. cavanillesii* sobre o crescimento micelial do *M. pernicioso*.

| Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | Inibição do crescimento micelial (%) |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Caule | |
| 250 | 7,30 |
| 500 | 18,26 |
| 1000 | 17,44 |
| 2000 | 37,12 |
| 4000 | 100 |
| Fruto | |
| 250 | 21,91 |
| 500 | 20,89 |
| 1000 | 20,89 |
| 2000 | 38,74 |
| 4000 | 80,73 |

-: inativo

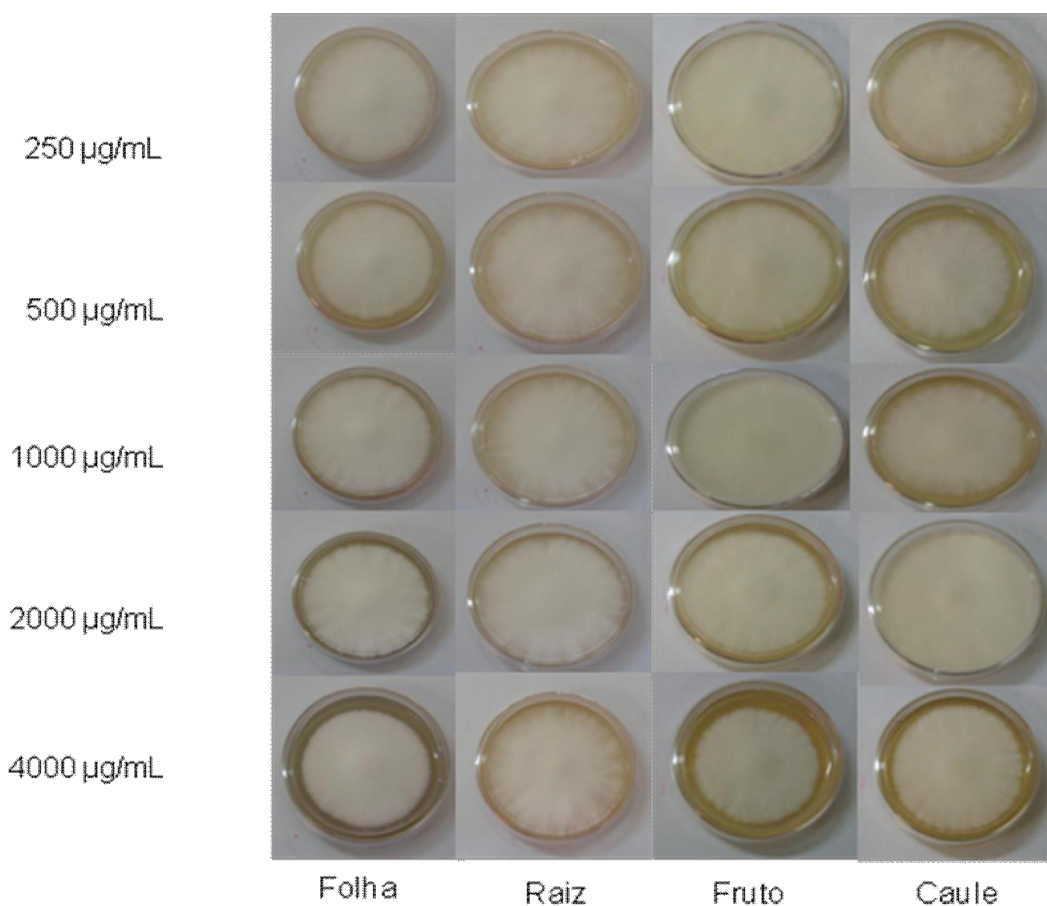


Figura 3: Atividade antifúngica de extratos aquosos de *X. cavanillesii* sobre *M. pernicioso*.

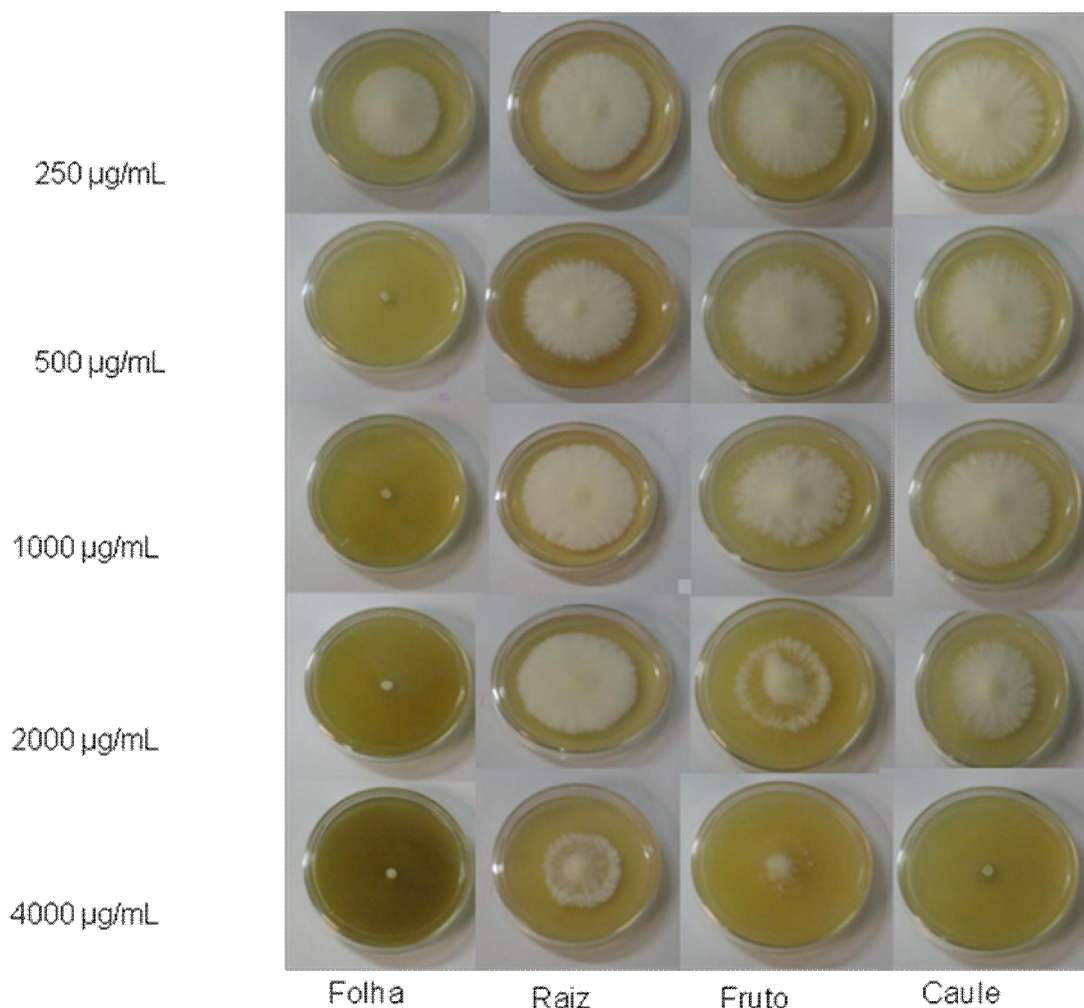


Figura 4: Atividade antifúngica de extratos etanólicos de *X. cavanillesii* sobre *M. perniciosus*.

Estudos entre as espécies de *Xanthium* mostraram uma variedade de compostos fitoquímicos extraídos de algumas partes da planta. Em relação a *Xanthium cavanillesii*, já foi isolado glicosídeo triterpenóide carboxiatractilosídeo (CAT) presente em brotação dicotiledônea e frutos (Ammar; Fournier; Shabana, 1992; Loretto et al., 1999) e das partes aéreas foram isolados monoterpenos, sesquiterpenos e outros óleos essenciais como limoneno (Ammar; Fournier; Shabana, 1992; Ha, 1985), α -pineno, α -terpineol, carvona, p-cimeno, citronela, citronelol e linalol (Ha, 1985).

Diferentes extratos de *Xanthium cavanillesii* demonstraram atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans* (Cerdeiras et al., 2007). Outras espécies também demonstraram atividade antimicrobiana e

antifúngica, como *Xanthium spinosum* que mostrou atividade contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Colletotrichum gloesporoides* e *Trichothecium roseum* e *Xanthium strumarium* contra *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens* (Ginesia-Peris; Garcia-Breijo; Primo-Yúfera, 1994; Scherer et al., 2009).

Os resultados obtidos pelo método de diluição em agar seguido pela medida do CIM indicaram os seguintes valores para o extrato da folha e caule de *Xanthium cavanillesii*, 500 µg/mL e 2500 µg/mL, respectivamente.

Todos os dados obtidos neste trabalho estão consistentes com pesquisas anteriormente relatadas, indicando boas perspectivas para uso experimental em condições de casa-de-vegetação e em campo.

CONCLUSÃO

Os extratos obtidos do resíduo do sisal tiveram atividade fungitóxica significativa contra *M. pernicioso*, destacando-se o extrato BuOH com 100 % de inibição a 4000 µg/mL. Dentre as espécies do gênero *Marsetia*, constatou-se que a *M. canescens* apresentou maior espectro de inibição contra o fitopatógeno, porém todas as espécies apresentaram maior atividade fungistática que fungicida. O ótimo desempenho do extrato etanólico da folha de *Xanthium cavanillesii* sobre o crescimento do fungo confirma a sua eficiência fungicida.

Os resultados demonstraram que os extratos das espécies testadas neste trabalho tiveram atividade fungitóxica e/ou fungistática significativa contra o *M. pernicioso*, concluindo-se que os mesmos podem ser utilizados como alternativas para o controle da vassoura-de-bruxa. Entretanto, estudos adicionais devem ser conduzidos, como a identificação e teste dos compostos separados, com ação fungicida e/ou fungistática, com o intuito de entender melhor a ação deste sobre o comportamento do fungo, além de testes *in vivo* (avaliar a vassoura seca e esporulação do fungo), visando possibilitar a recomendação de uso em massa como defensivo agrícola, já que alterações no metabolismo energético do fungo ao longo de seu desenvolvimento podem causar diferenças nas observações.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio concedido através das bolsas de pesquisa.

REFERÊNCIAS

AMMAR, N; FOURNIER, G. G; SHABANA, WASSEL M. A study of the volatile oil content of *Xanthium pungens*, compositae. **Journal of Islamic Academy of Sciences**, v. 5, p. 79 - 80, 1992.

BASTOS, C. N. Inibição do crescimento micelial e germinação de esporos de *Crinipellis perniciosa* e *Phytophthora palmivora* por extratos de bulbo de alho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 454 - 457, 1992.

BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 441 - 443, 1997.

BASTOS, C. N. Retrospectiva e avanços no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero. (Supl.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 305-306, 2000.

BASTOS, C. N.; SILVA, D. M. H. Inibição micelial de fungos fitopatogênicos através de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *P. marginatum*. (Supl.). **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, 2002.

BONFIM-PATRICIO, M. C. et al. Flavonoids of Lavoisiera, Microlicia and Trembleya (Melastomataceae) and their taxonomic meaning. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 711 - 726, 2001.

CABRAL, A. S. et al. Killer yeasts inhibit the growth of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 108 - 110, 2009.

CERDEIRAS, M. P. et al. Antimicrobial Activity of *Xanthium cavanillesii* extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, p. 251 - 254, 2007.

COUTO, V. A. O território do cacau no contexto da mundialização. **Bahia Análise & Dados**, Salvador, v. 9, p. 38 - 52, 2000.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. Esteróis e triterpenos: ácidos biliares, precursores da vitamina D e fitosteróides, cardiotônicos, hormonas esteróides, matérias-primas de núcleo esteróide usadas em sínteses parciais e saponósidos. In: CUNHA, A. P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 432 - 482.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45. 2000. São Carlos, **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000, p. 255 - 258.

FRANCO, D. A.; BETTIOL, W. Controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita de citros com produtos alternativos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 602 - 606, 2000.

GINESTA-PERIS, E.; GARCIA-BREIJO, F. J.; PRIMO-YUFERA, E. Antimicrobial activity of xanthatin from *Xanthium spinosum* L. **Letters in Applied Microbiology**, v.18, p. 206 - 208, 1994.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMAN, K. Bioactive an plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864 - 3874, 1991.

KURITA, N. et al. Antifungal activity of components of essencial oils. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, p. 945 - 952, 1981.

LEITE, Tonny Cley Campos. **Avaliação da atividade antimicrobiana e estudo químico de espécies do gênero *Marcetia* (Melastomataceae)**. 2009. 1v. 131p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – UEFS, Feira de Santana, Bahia.

LORETTI A. P. et al. Intoxicação experimental pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, p. 71 - 78, 1999.

LOWRY, J. B. Anthocyanins of the Melastomataceae, Myrtaceae and some allied families. **Phytochemistry**, v. 15, p. 523 - 516, 1976.

MARINHO, P. L. O Estado e a Economia Cacaueira da Bahia. In: Congresso Brasileiro de História Econômica, 3. 2001. São Paulo, **Anais...** São Paulo: IPE/USP, 2001.

MELLO, C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: Editora Universitária/UFRGS/Ed. da UFSC, 2002. p. 517 - 544.

MOTA, S. G. R.; BARROS, T. F.; CASTILHO, M. S. In vitro screening and chemometrics analysis on a series of azole derivatives with fungicide activity against *Moniliophthora perniciosa*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 510 - 519, 2010.

NIÑO, J. et al. Antibacterial, antifungal and citotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from Colombian biodiversity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 566 - 570, 2006.

NOJOSA, G. B. A. et al. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis perniciosa*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 148 - 154, 2003.

OLIVEIRA, M. L.; LUZ, E. D. M.; N. **Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacaueiro no Brasil**. Ilhéus: CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 2005. 132p.

OSBOURNE, A. E.; MORRISSEY, J. P. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 708 - 724, 1999.

PANDEY, D. K., TRIPATHI, N. N., TRIPATHI, R. D., DIXIT, S. N. Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptis suaveolens*. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v. 89, p. 344 - 349, 1982

RESENDE, M. L. V. et al. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 213 - 221, 2007.

SANTOS, J. D. G. et al. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 6181 - 6184, 2009.

SALATINO, M. L. F. et al. Alkanes from foliar epicuticular waxes of *Huberia* species: taxonomic implications. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 581 - 588, 1998.

SCHERER, R. et al. *Xanthium strumarium* L. Antimicrobial activity and carboxyatractyloside analysis through electrospray ionization mass spectrometry. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais de Botucatu**, v. 11, p. 159 - 163, 2009.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 143 - 145, 2007.

SOUZA, A. E. F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L. C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 465 - 471, 2007.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p. 554 - 556, 2003.

TAHER, H. A.; UBIERGO, G. O.; TALENTI, E. C. J. Constituents of the Essential Oil of *Xanthium cavanillesii*. **Journal of Natural Products**, v. 45, p. 857, 1985.

VENEZIANI, R. C. S et al. Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution by gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 827 - 830, 2006.

VERASTEGU, A. et al. Species of Agave with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1249 - 1252, 2008.

WILSON, C. L. et al. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v. 81, p. 204 - 210, 1997.

YOSHIDA, T; ITO, H; ISAZA, J. H. Pentameric ellagitannin oligomers in melastomataceous plants-chemotaxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1972 - 1983, 2005.

ZAMBONELLI, A., ZECHINI D'AULERIO, A., BIANCHI, A., ALBASINI, A. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, v. 144, p. 491 - 496, 1996.

CONCLUSÕES FINAIS

A partir da otimização de meio de cultivo em meio líquido para a produção de β -1,3-glucanase, considerando as variáveis independentes (concentração de indutor e tempo de fermentação) foi possível purificar a laminarinase de *Moniliophthora perniciosa* através de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de exclusão molecular. A máxima produção de β -1,3-glucanase ocorreu após 13 dias de fermentação e $5,9 \text{ g L}^{-1}$ de indutor. A fração purificada continha três isoformas com fatores de purificação iguais a 4,33, 1,86 e 3,03 para GLUI, GLUII e GLUIII, respectivamente. Nas condições estudadas, a β -1,3-glucanase do fungo testado em extrato parcialmente purificado apresentou maior atividade em pH 5 e temperatura de 40°C . A fração mostrou-se altamente estável a 90°C por 40 minutos.

O fitopatogênico *M. perniciosa* pode ser considerado um fungo potente quanto à produção de enzimas que podem atuar na lise de leveduras. *Pseudozyma* sp. (CCMB 300 e 306) foram sensíveis ao extrato enzimático apresentando maior atividade lítica utilizando pH 4 e 20°C e pH 5 e 40°C , respectivamente.

Considerando a necessidade de produtos ecologicamente corretos a serem aplicados na natureza, foi feita uma triagem de extratos capazes de inibir enzimas relacionadas ao crescimento micelial do fungo *M. perniciosa*. Os extratos de diferentes polaridades dos gêneros *Marcetia* (Melastomataceae), *Agave sisalana* (Agavaceae) e *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) foram testados. O extrato etanólico de *Marcetia canescens* foi o mais efetivo contra o fitopatógeno. Todos os extratos testados deste gênero foram fungistáticos. O extrato mais efetivo de *A. sisalana* foi o butanólico, ocorrendo 100 % de inibição. Todos os outros extratos de diferentes polaridades foram fungicidas. Os extratos etanólicos do caule e das folhas de *X. cavanillesii* tiveram maior espectro de atividade antifúngica e nenhuma atividade fungicida e/ou fungistática foi encontrada com os extratos aquosos de todas as partes testadas da mesma espécie.

Os estudos realizados neste trabalho fornecem dados inéditos para o conhecimento do fungo *M. perniciosa*, das leveduras e das espécies vegetais analisadas.