



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

PRODUÇÃO DE β -GLUCANASES POR *Trichoderma reesei* E *Trichoderma harzianum* E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE β -GLUCANAS

ANDRÉIA APARECIDA JACOMASSI CARNEIRO



Rio Claro, SP
Fevereiro/2012

ANDRÉIA APARECIDA JACOMASSI CARNEIRO

PRODUÇÃO DE β -GLUCANASES POR *Trichoderma reesei* E *Trichoderma harzianum* E APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DE β -GLUCANAS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

Rio Claro, SP

Fevereiro/2012

547.758 Carneiro, Andréia Aparecida Jacomassi
C289p Produção de beta-glucanases por *Trichoderma reesei* e
Trichoderma harzianum e aplicação na hidrólise de
beta-glucanas / Andréia Aparecida Jacomassi Carneiro. - Rio
Claro : [s.n.], 2012

188 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Roberto da Silva

1. Enzimas. 2. *Agaricus blazei*. 3. Glucooligossacarídeos.
4. Laminarina. 5. Prebiótico. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

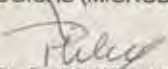
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PRODUÇÃO DE GLUCOLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DE HIDRÓLISE DE β -GLUCANAS DE *Agaricus blazei* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PREBIÓTICA DE GLUCANAS

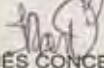
AUTORA: ANDREIA APARECIDA JACOMASSI CARNEIRO

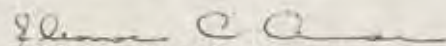
ORIENTADOR: Prof. Dr. ROBERTO DA SILVA

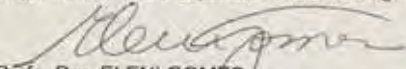
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ROBERTO DA SILVA
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto / UNESP


Prof. Dr. ADALBERTO PESSOA JUNIOR
Depto. de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica / Universidade de São Paulo


Profa. Dra. INES CONCEIÇÃO ROBERTO
Escola de Engenharia de Lorena EEL - USP


Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro / UNESP


Profa. Dra. ELENI GOMES
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - UNESP

Data da realização: 23 de fevereiro de 2012.

Aos meus pais e meus irmãos pelo amor, paciência e companheirismo...

"Nenhum sucesso na vida compensa o fracasso no Lar"

- David O. McKay -

Agradecimentos

Ao Professor e orientador Roberto da Silva, pela amizade, dedicação, incentivo, paciência e confiança.

À Professora Célia Maria Landi Franco pela amizade e colaboração durante a execução deste trabalho.

À Professora Aneli de Melo Barbosa pelas sugestões e colaboração.

À Professora Eleni Gomes pela amizade, sugestões e incentivo.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Laboratório de Cereais, Microbiologia de Alimentos e Análise Físico-química.

Aos amigos mestres, doutores, e professores concursados.....Alexandre, Aline, Ana Flávia, André, Bárbara, Carolina, Cristiane, Ellen Giese, Ellen Lago, Daniela, Érica, Fabiana, Gisele, Hamilton, Heloisa, Larissa, Livia, Marcelo, Mila, Natália, Paula, Ricardo, Rodolfo, Rodrigo, Ruan, Tiago e Tony, pelos inesquecíveis momentos de descontração.

À Ellen Cristine Giese pela amizade, dedicação, incentivo e sugestões durante todo o doutorado.

À Thais, Raquel e Larissa do Laboratório de Cereais pela amizade e ajuda constante.

À Marcia Maria de Souza Moretti pela amizade e pela paciência nas nossas viagens para Rio Claro.

À Maria Luiza Silva Fazio pela amizade, incentivo e apoio.

Aos estagiários Guilherme e Thamires pelo auxílio.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada e do laboratório de Análise Físico-Química, Amanda, Ana Lúcia, Ariane, Bárbara, Bruno, Caroline, Fernanda, Gisele, Marcia, Rafaela, Tássia, Janaina, Josiane, Tiago, Ticiane, Pedro e Marcos.

À UNESP de São José do Rio Preto e de Rio Claro, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À FAPESP, pela concessão de bolsa de doutorado.

À CAPES-Fundação Carolina pela concessão de bolsa de doutorado sanduíche.

À Universidade de Salamanca-Faculdade de Farmácia/Espanha, e ao Instituto Politécnico de Bragança, Portugal, pela oportunidade de realização do estágio.

Ao Professor Dr. Celestino Santos-Buelga e a Dra. Montserrat Dueñas da Universidade de Salamanca, Espanha, e a professora Dra. Isabel C.F.R. Ferreira e a Dra. Lillian Barros do Instituto politécnico de Bragança, Portugal, pela oportunidade, orientação, auxílio e sugestões.

Um dia as coisas acontecem...

Vivendo com incertezas
Não sabendo ao certo que caminho trilhar
Não tendo firmeza nas decisões
Mas pensando bem
Que graça teria se tudo fosse feito de certezas
Sem medo e insegurança
Esses são nossos termômetros
Que nos deixam seguir ou nos freiam
Os caminhos existem para que escolhamos
A questão é: "de que forma trilharemos?"
Um dia as coisas acontecem...

((Djavan Antério))

RESUMO

As glucanas fúngicas têm sido muito estudadas por apresentarem respostas biológicas benéficas à saúde. O *Agaricus blazei*, conhecido popularmente como cogumelo do sol, é um basidiomiceto que apresenta propriedades funcionais devido às β -glucanas. Os fungos *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma reesei* foram capazes de se desenvolverem em *Agaricus blazei* em pó como única fonte de carbono produzindo β -1,3-glucanases, analisadas por superfície de resposta. As enzimas hidrolisaram β -glucanas de *A. blazei* e produziu glucose e diferentes glucooligossacarídeos. As enzimas brutas do *T. harzianum* e *T. reesei* hidrolisaram menos de 15 % de glucana e em torno de 40 % de laminarina (β -1,3 glucana comercial), após 60 minutos, respectivamente. Utilizando a β -1,3-glucanase bruta de *T. harzianum* foram detectados gentiobiose e laminaritriose nos hidrolisados enzimáticos de β -glucana e laminarina, enquanto a laminaritetraose, celotetraose e celotriose foram identificados e quantificados apenas nos hidrolisados de β -glucana de *A. blazei*. A ação da β -1,3-glucanase bruta de *T. reesei* sobre a laminarina e glucana de *A. blazei* resultou em glucose e gentiobiose. O que sugere uma possível diferença na ação catalítica das duas enzimas. As enzimas parcialmente purificadas do *T. harzianum* e *T. reesei* hidrolisaram 47 e 85 % de laminarina, respectivamente. A β -1,3-glucanase purificada de *T. harzianum* não degradou a glucana de *A. blazei*, e a enzima purificada de *T. reesei* degradou 2,6 % de glucana, após 60 minutos, no entanto, gentiobiose e laminaritriose foram detectados no hidrolisado de laminarina. Utilizando a enzima parcialmente purificada de *T. reesei* gentiobiose foi detectado no hidrolisado de glucana e de laminarina, e celotriose e laminaritriose foram detectados apenas no hidrolisado de laminarina. A fim de conhecer melhor a ação destas enzimas em outras β -glucanas foi também analisada suas ações sobre a β -glucana extraída de aveia e outras glucanas de *A. blazei* obtidas por outras técnicas de extração. As enzimas brutas do *T. harzianum* e do *T. reesei* hidrolisaram 41 e 50 % de glucana de *A. blazei*, respectivamente, após 480 minutos. A enzima bruta de *T. harzianum* hidrolisou 49 % de glucana de aveia após 480 minutos. Não houve degradação da glucana de aveia utilizando a β -1,3-glucanase de *T. reesei*. As diferenças nos resultados de hidrólise de laminarina, glucana de *A. blazei* e de glucana de aveia podem ser, provavelmente, explicadas pelas diferenças no grau de polimerização, conformação e ramificação de cada polissacarídeo. *Agaricus blazei* e suas glucanas não inibiram o crescimento das bactérias probióticas, que são classificadas por apresentarem 10^8 colônias, tais como o *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus*, demonstrando o seu potencial prebiótico.

ABSTRACT

Fungal glucans have been studied extensively because of their biological responses, which have been shown to possess health benefits. *Agaricus blazei*, commonly known as "mushroom of the sun," is a basidiomycete that has functional properties because of its β -glucans. The fungi *Trichoderma harzinaum* and *Trichoderma reesei* were able to develop in a powdered form of *A. blazei*, which served as the only carbon source. The result was the production of β -1,3-glucanases, which were analyzed using response surface methodology. The enzymes hydrolyzed the β -glucans of *A. blazei*, and produced glucose and different glucooligosaccharides. The crude enzymes of *T. harzianum* and *T. reesei* hydrolyzed less than 15% of glucan and approximately 40% of laminarin after 60 minutes, respectively. Using crude β -1,3-glucanase from *T. harzianum*, gentiobiose and laminaritriose were detected in enzymatic hydrolysates of β -glucan and laminarin, while laminaritetraose, celotriose and celotetraose were identified and quantified only in the hydrolysates of the β -glucan of *A. blazei*. The action of the crude β -1,3-glucanase of *T. reesei* on the laminarin and glucan of *A. blazei* resulted in glucose and gentiobiose. These results suggest a possible difference in the catalytic action of the two enzymes. The partially purified enzymes of *T. harzianum* and *T. reesei* hydrolyzed 47% and 85% of laminarin, respectively. The purified β -1,3-glucanase from *T. harzianum* did not degrade the glucan of *A. blazei*, and the purified enzyme from *T. reesei* degraded 2.6% of the glucan after 60 minutes; however, gentiobiose and laminaritriose were detected in the hydrolyzates of laminarin. Using partially purified enzymes from *T. reesei*, gentiobiose was detected in the hydrolyzates of both glucan and laminarin, and laminaritriose and celotriose and were detected only in the hydrolyzates of laminarin. In order to better understand the action of these enzymes on other β -glucans, the actions of these enzymes on other β -glucans, which were extracted from oats, were also analyzed, along with other glucans from *A. blazei*, which were obtained using other extraction techniques. After 480 minutes, the crude enzymes of *T. harzianum* and *T. reesei* hydrolyzed 41% and 50% of glucan from *A. blazei*, respectively. The crude enzyme of *T. harzianum* hydrolyzed 49% of the glucan from oats after 480 minutes. There was no degradation of the glucan from oats when the β -1,3-glucanase from *T. reesei* was used. The differences in the hydrolyses of laminarin, glucan from *A. blazei*, and glucan from oats can likely be explained by the differences in the degrees of polymerization, branching, and conformation of each polysaccharide. Neither *Agaricus blazei* nor its glucans inhibited the growth of probiotic bacteria (which are classified by their presentation of 10^8 colonies), such as *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus*. The presence of these bacteria reveal the mushroom's prebiotic potential.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Figura 1.</i> | <i>Agaricus blazei</i> em diferentes estágios de corpo de frutificação: I=Imaturo (píleo fechado), II= Maduro (píleo aberto moderadamente) com esporos imaturos e III= Maduro (píleo aberto completamente) com esporos maduros, apresentando β -glucana (mg^{-1} peso seco)..... | 23 |
| <i>Figura 2.</i> | Cultivo de <i>Agaricus blazei</i> | 23 |
| <i>Figura 3.</i> | Estrutura química da β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6)-glucanas de <i>Agaricus blazei</i> , que consiste de cadeia principal com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 6) e duas unidades glucosilas β -(1 \rightarrow 3) ligada a cada três unidades de glucose..... | 25 |
| <i>Figura 4.</i> | Partes de um grão de aveia (A); e seus componentes (B)..... | 27 |
| <i>Figura 5.</i> | Hidrólise da β -1,3 glucana pela β -1,3-glucanase..... | 32 |
| <i>Figura 6.</i> | Mecanismo de atuação dos prebióticos e probióticos. Fonte adaptada de German et al. (1999)..... | 40 |
| <i>Figura 7.</i> | Esquema da extração de glucana pela β -1,3-glucanase..... | 47 |
| <i>Figura 8.</i> | Esquema da extração alcalina de glucana de aveia..... | 49 |
| <i>Figura 9.</i> | Simulação de uma Jarra de anaerobiose..... | 51 |
| <i>Figura 10.</i> | Gráfico de pareto para a otimização da produção de β -1,3-glucanases pelo <i>T. reesei</i> cultivado em extrato de <i>Agaricus blazei</i> como única fonte de carbono..... | 52 |
| <i>Figura 11.</i> | Gráfico de níveis para a produção de β -1,3-glucanases pelo <i>Trichoderma reesei</i> em função do tempo de cultivo (x_1) x concentração de <i>Agaricus blazei</i> (x_2)..... | 54 |
| <i>Figura 12.</i> | Gráfico de pareto para a otimização da produção de β -1,3-glucanases pelo <i>T. harzianum</i> cultivado em extrato de <i>Agaricus blazei</i> como única fonte de carbono.. | 55 |
| <i>Figura 13.</i> | Gráfico de níveis para a produção de β -1,3-glucanases pelo <i>Trichoderma harzianum</i> em função do tempo de cultivo (x_1) x concentração de <i>Agaricus blazei</i> (x_2)..... | 57 |
| <i>Figura 14.</i> | Perfil de crescimento para produção de β -1,3-glucanase pelo <i>Trichoderma harzianum</i> sobre 3g/L de extrato de <i>Agaricus blazei</i> | 59 |
| <i>Figura 15.</i> | Perfil de crescimento para produção de β -1,3-glucanase pelo <i>Trichoderma harzianum</i> sobre 1g/L de extrato de <i>Agaricus blazei</i> | 59 |
| <i>Figura 16.</i> | Perfil de crescimento para produção de β -1,3-glucanase pelo <i>Trichoderma harzianum</i> sobre 2g/L de extrato de <i>Agaricus blazei</i> | 60 |
| <i>Figura 17.</i> | Perfil de crescimento para produção de β -1,3-glucanase pelo <i>Trichoderma reesei</i> | |

| | | |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| | sobre 3g/L extrato de <i>Agaricus blazei</i> | |
| Figura 18. | Perfil de crescimento para produção de β -1,3-glucanase pelo <i>Trichoderma reesei</i> sobre 1g/L extrato de <i>Agaricus blazei</i> | 61 |
| Figura 19. | Perfil de crescimento para produção de β -1,3-glucanase pelo <i>Trichoderma reesei</i> sobre sobre 2g/L extrato de <i>Agaricus blazei</i> | 61 |
| Figura 20. | Efeito do pH ótimo sobre a atividade da β -1,3-glucanase bruta com laminarina como substrato. Os valores de pH foram ajustados com os seguintes tampões: acetato 0,1 M (pH 3,0-5,5) e fosfato 0,1 M (pH 6,0-8,0)..... | 62 |
| Figura 21. | Efeito da temperatura ótima sobre a estabilidade da β -1,3-glucanase bruta com laminarina como substrato. A reação enzimática foi realizada em tampão acetato 0,1 M (pH 4,5)..... | 63 |
| Figura 22. | Efeito do pH de estabilidade sobre a atividade da β -1,3-glucanase bruta com laminarina como substrato. Os valores de pH foram ajustados com os seguintes tampões: acetato 0,1M (pH 3,0-5,5) e fosfato 0,1 M (pH 6,0-8,0)..... | 64 |
| Figura 23. | Efeito da temperatura sobre a estabilidade da β -1,3-glucanase bruta com laminarina como substrato. Os valores de pH foram ajustados com os seguintes tampões: acetato 0,1 M (pH 3,0-5,5) e fosfato 0,1 M (pH 6,0-8,0)..... | 64 |
| Figura 24. | Perfil de eluição da β -1,3-glucanase de <i>Trichoderma reesei</i> em gel filtração..... | 67 |
| Figura 25. | Perfil de eluição da β -1,3-glucanase de <i>Trichoderma harzianum</i> em gel Filtração.. | 68 |
| Figura 26. | SDS-PAGE de β -1,3-glucanase produzida pelo <i>Trichoderma reesei</i> . Linha 1, Marcador molecular em kDa; Linha 2, Extrato bruto; Linha 3-7, Frações coletadas da cromatografia de filtração em gel com atividade de β -1,3-glucanase.. | 69 |
| Figura 27. | SDS-PAGE de β -1,3-glucanase produzida pelo <i>Trichoderma harzianum</i> . Linha 1, Marcador molecular em kDa; Linha 2, Extrato bruto; Linha 3-7, Frações coletadas da cromatografia de filtração em gel com atividade de β -1,3-glucanase.. | 69 |
| Figura 28. | Efeito do pH ótimo sobre a atividade da β -1,3-glucanase com laminarina como substrato. Os valores de pH foram ajustados com os seguintes tampões: acetato 0,1 M (pH 3,0-5,5) e fosfato 0,1 M (pH 6,0-8,0)..... | 70 |
| Figura 29. | Efeito da temperatura ótima sobre a atividade e estabilidade da β -1,3-glucanase com laminarina como substrato. A reação enzimática foi realizada em tampão acetato 0,1 M (pH 5,0)..... | 70 |
| Figura 30. | Efeito do pH de estabilidade sobre a atividade da β -1,3-glucanase com laminarina | |

| | | |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| | como substrato. Os valores de pH foram ajustados com os seguintes tampões: acetato 0,1 M (pH 3,0-5,5) e fosfato 0,1 M (pH 6,0-8,0)..... | 71 |
| <i>Figura 31.</i> | Efeito da temperatura de estabilidade sobre a atividade e estabilidade da β -1,3-glucanase com laminarina como substrato. A reação enzimática foi realizada em tampão acetato 0,1 M (pH 5,0)..... | 72 |
| <i>Figura 32.</i> | Hidrólise dos polissacarídeos laminarina e glucana de <i>Agaricus blazei</i> pela atuação da β -1,3-glucanase bruta de <i>Trichoderma reesei</i> . (\ominus) β -1,3-glucanase + laminarina; (\ominus) β -1,3-glucanase + glucana; Controles: (\ominus) Laminarina (\ominus) β -1,3-glucanase + glucana; (\times) Glucana..... | 73 |
| <i>Figura 33.</i> | Hidrólise dos polissacarídeos laminarina e glucana de <i>Agaricus blazei</i> pela atuação da β -1,3-glucanase bruta de <i>Trichoderma harzianum</i> . (\ominus) β -1,3-glucanase + laminarina; (\ominus) β -1,3-glucanase + glucana; (\ominus) Laminarina; (\times) Glucana..... | 74 |
| <i>Figura 34.</i> | Hidrólise dos polissacarídeos laminarina e glucana de <i>Agaricus blazei</i> pela atuação da β -1,3-glucanase parcialmente purificada de <i>Trichoderma reesei</i> . (\ominus) β -1,3-glucanase + laminarina; (\ominus) β -1,3-glucanase + glucana; Controles: (\ominus) Laminarina; (\times) Glucana..... | 75 |
| <i>Figura 35.</i> | Hidrólise dos polissacarídeos laminarina e glucana de <i>Agaricus blazei</i> pela atuação da β -1,3-glucanase parcialmente purificada de <i>Trichoderma harzianum</i> . (\ominus) β -1,3-glucanase + laminarina; (\ominus) β -1,3-glucanase + glucana (\ominus) Laminarina; (\times) Glucana..... | 75 |
| <i>Figura 36.</i> | HPAEC/PAD análise dos produtos de hidrólise de glucana e laminarina usando β -glucanase bruta de <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Trichoderma harzianum</i> | 81 |
| <i>Figura 37.</i> | HPAEC/PAD análise dos produtos de hidrólise de glucana usando β -glucanase parcialmente purificada de <i>Trichoderma reesei</i> | 82 |
| <i>Figura 38.</i> | HPAEC/PAD análise dos produtos de hidrólise de laminarina usando β -glucanase parcialmente purificada de <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Trichoderma harzianum</i> | 82 |
| <i>Figura 39.</i> | Hidrólise do polissacarídeo glucana de <i>Agaricus blazei</i> pela β -1,3-glucanase bruta <i>Trichoderma harzianum</i> . (\ominus) β -1,3-glucanase + glucana; (\ominus) Controle: glucana. Utilizando a metodologia de extração de polissacarídeos de baixo peso molecular de POLI et al. (2009)..... | 84 |

- Figura 40.* Hidrólise do polissacarídeo glucana de *Agaricus blazei* pela β -1,3-glucanase bruta *Trichoderma reesei*. (●) β -1,3-glucanase + glucana; (○) Controle: glucana..... 85
- Figura 41.* Hidrólise do polissacarídeo glucana de *Agaricus blazei* pela β -1,3-glucanase bruta *Trichoderma harzianum*. (●) β -1,3-glucanase + glucana; (○) Controle: glucana..... 86
- Figura 42.* Hidrólise do polissacarídeo glucana de aveia pela β -1,3-glucanase bruta de *Trichoderma harzianum*. (●) β -1,3-glucanase + glucana; (○) Controle: Glucana..... 86

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Tabela 1.</i> | Composição do cogumelo <i>Agaricus blazei</i> : (1) 100g de amostra em base seca; (2) 100g de amostra desidratada, conforme disponibilizada para comercialização..... | 22 |
| <i>Tabela 2.</i> | Conteúdo de β -glucana em diferentes cogumelos comestíveis | 24 |
| <i>Tabela 3.</i> | Diferentes fontes e métodos de extrações de β -glucanas..... | 26 |
| <i>Tabela 4.</i> | Composição centesimal de cariopses de aveia, cultivar UPF18 ¹ : (1) Médias de duas determinações; (2) Calculados por diferença..... | 28 |
| <i>Tabela 5.</i> | Composição dos meios utilizados para produção de β -1,3-glucanase, destacando-se as fontes de carbono..... | 31 |
| <i>Tabela 6.</i> | Propriedades Bioquímica e físico-química de algumas β -1,3-glucanases..... | 33 |
| <i>Tabela 7.</i> | Oligossacarídeos não digeríveis com funções bifidogênicas..... | 38 |
| <i>Tabela 8.</i> | Delineamento estatístico dos experimentos para duas variáveis para o <i>Trichoderma reesei</i> | 42 |
| <i>Tabela 9.</i> | Delineamento estatístico dos experimentos para duas variáveis para o <i>Trichoderma harzianum</i> | 43 |
| <i>Tabela 10.</i> | Análise dos fatores e suas interações na produção de β -1,3-glucanases pelo <i>T. reesei</i> cultivado em extrato de <i>Agaricus blazei</i> como única fonte de carbono..... | 52 |
| <i>Tabela 11.</i> | Análise de variância (ANOVA) para a produção de β -1,3-glucanases pelo <i>T. reesei</i> cultivado em extrato de <i>Agaricus blazei</i> como única fonte de carbono..... | 53 |
| <i>Tabela 12.</i> | Valores experimentais e preditos para a produção de β -1,3-glucanases pelo <i>T. reesei</i> cultivado em extrato de <i>Agaricus blazei</i> como única fonte de carbono..... | 53 |
| <i>Tabela 13.</i> | Análise dos fatores e suas interações na produção de β -1,3-glucanases pelo <i>T. harzianum</i> cultivado em extrato de <i>Agaricus blazei</i> como única fonte de carbono..... | 55 |
| <i>Tabela 14.</i> | Análise de variância (ANOVA) para a produção de β -1,3-glucanases pelo <i>T. harzianum</i> cultivado em extrato de <i>Agaricus blazei</i> como única fonte de carbono..... | 56 |
| <i>Tabela 15.</i> | Valores experimentais e preditos para a produção de β -1,3-glucanases pelo <i>Trichoderma harzianum</i> em extrato de <i>Agaricus blazei</i> como única fonte de carbono..... | 56 |
| <i>Tabela 16.</i> | Síntese do processo de purificação parcial da β -1,3-glucanase produzida pelo | 65 |

| | | |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| | <i>Trichoderma reesei</i> | |
| Tabela 17. | Síntese do processo de purificação parcial da β -1,3-glucanase produzida pelo <i>Trichoderma harzianum</i> | 66 |
| Tabela 18. | Açúcar redutor liberado da hidrólise enzimática de glucana usando β -1,3-glucanase bruta de <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Trichoderma harzianum</i> | 76 |
| Tabela 19. | Hidrólise enzimática de laminarina usando β -1,3-glucanase bruta e parcialmente purificada de <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Trichoderma harzianum</i> | 77 |
| Tabela 20. | Análise do hidrolisado enzimático de glucana e laminarina usando β -1,3-glucanase bruta e parcialmente purificada a partir do <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Trichoderma harzianum</i> | 80 |
| Tabela 21. | Diferentes processos de extração de glucana e de polissacarídeos de <i>Agaricus blazei</i> e de aveia..... | 84 |
| Tabela 22. | Apresentação do efeito inibidor (-) e do efeito não inibidor (+) das bactérias probióticas | 88 |
| Tabela 23. | Crescimento dos microrganismos probióticos usando diferentes fontes de carbono após 72h de cultivo..... | 89 |

APRESENTAÇÃO

Esta tese está apresentada por uma introdução geral, objetivos, pela revisão bibliográfica, materiais e métodos e resultados e discussão. Alguns dos resultados foram organizados em três capítulos, dos quais um foi publicado e os demais serão submetidos à publicação.

O primeiro capítulo consta do artigo intitulado "*Agaricus blazei* as a Substrate for the Production of β -1,3-Glucanase by *Trichoderma harzianum* Rifai", publicado na *Food Technology and Biotechnology*.

O segundo capítulo é o artigo intitulado "Glucooligosaccharides produced from *Agaricus blazei* β -glucan hydrolysis using β -(1 \rightarrow 3) glucanases produced by *Trichoderma harzianum* Rifai".

O terceiro capítulo é o artigo intitulado "Production of β -1,3 glucanase by *Trichoderma reesei* QM 9414 on *Agaricus blazei* as a substrate and the application of enzymes in hydrolysis of β -glucan from *Agaricus blazei* to glucooligosaccharides obtainment".

O quarto capítulo é o artigo "Contribuição nutricional e nutracêutica de formulações em pó de *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes*" como resultado do estágio realizado na Universidade de Salamanca, Espanha, sob supervisão do Professor Dr. Celestino Santos-Buelga, em colaboração com a Professora Dra. Isabel C.F.R. Ferreira do Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

SÚMARIO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE FIGURAS..... | VIII |
| LISTA DE TABELAS..... | XII |
| RESUMO..... | VI |
| ABSTRACT..... | VIII |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 2. Objetivos..... | 20 |
| 3. Revisão da literatura..... | 21 |
| 3.1. <i>Agaricus blazei</i> | 21 |
| 3.2. Aveia..... | 27 |
| 3.3. Produção de β -1,3-glucanases por microrganismos..... | 29 |
| 3.3.1 β -1,3-glucanases fúngicas..... | 32 |
| 3.3.2 Caracterização de β -1,3-glucanases microbianas..... | 35 |
| 3.4. Hidrólise enzimática para obtenção de oligossacarídeos..... | 36 |
| 3.5. Probióticos e Prebióticos..... | 39 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 41 |
| 4.1. Amostras..... | 41 |
| 4.2. Padrões..... | 41 |
| 4.1. Microrganismos..... | 41 |
| 4.2. Otimização da produção de β -1,3-glucanases pelo <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414 e <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai..... | 41 |
| 4.3. Delineamento fatorial e análises estatísticas..... | 42 |

| | | |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4. | Métodos analíticos..... | 43 |
| 4.5. | Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de β -1,3-glucanase..... | 44 |
| 4.6. | Purificação parcial do complexo de β -glucanases..... | 44 |
| 4.7. | Eletroforese em gel desnaturante..... | 44 |
| 4.8. | Extração de glucanas de <i>Agaricus blazei</i> | 45 |
| 4.9. | Hidrólise enzimática de laminarina e glucanas de <i>Agaricus blazei</i> | 45 |
| 4.10. | Cromatografia Líquida de Alta pressão em Cromatógrafo de Íons (HPAEC/PAD)-análise dos produtos de hidrólises..... | 46 |
| 4.11. | Outros métodos de extração aquosa de polissacarídeos de <i>Agaricus blazei</i> | 46 |
| 4.11.1 | Extração de polissacarídeos de <i>Agaricus blazei</i> de baixo e alto peso molecular..... | 46 |
| 4.12. | Extração de glucana de Aveia..... | 47 |
| 4.13. | Hidrólise enzimática de glucana de <i>Agaricus blazei</i> e Aveia..... | 50 |
| 4.14. | Estudo “in vitro” da ação dos componentes prebióticos em microrganismos probióticos | 50 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 51 |
| 5.1. | Estudo do efeito da fonte de carbono e o tempo de cultivo na produção de β -1,3-glucanases pelo <i>Trichoderma reesei</i> | 51 |
| 5.2. | Estudo do efeito da fonte de carbono e o tempo de cultivo na produção de β -1,3-glucanase pelo <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai..... | 54 |
| 5.3. | Caracterização de β -1,3-glucanases brutas..... | 62 |
| 5.4. | Purificação parcial de β -1,3-glucanases..... | 65 |
| 5.5. | Caracterização de β -1,3-glucanases parcialmente purificada..... | 70 |
| 5.6. | Hidrólise Enzimática..... | 73 |
| 5.7. | Cromatografia líquida de alta pressão em cromatógrafo de íons (HPAEC/PAD)-Análises dos produtos de hidrólise enzimática..... | 78 |

| | | |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.8. | Extrações da glucana de <i>Agaricus blazei</i> e aveia..... | 83 |
| 5.9. | Hidrólise enzimática de glucana de <i>Agaricus blazei</i> e aveia..... | 84 |
| 5.10. | Atividade prebiótica..... | 87 |
| 5.10.1 | Estudo “in vitro” da ação dos componentes prebióticos utilizando microrganismos probióticos..... | 87 |
| 6. | CONCLUSÕES..... | 90 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 91 |

Anexo

| | | |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Capítulo I | <i>Agaricus blazei</i> as a Substrate for the Production of β -1,3-Glucanase by <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai..... | 102 |
| Capítulo II | Glucooligosaccharides produced from <i>Agaricus blazei</i> β -glucan hydrolysis using β -1,3-Glucanases produced by <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai.... | 109 |
| Capítulo III | Production of β -1,3 glucanase by <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414 on <i>Agaricus blazei</i> as a substrate and the application of enzymes in hydrolysis of β -glucan from <i>Agaricus blazei</i> to glucooligosaccharides obtainment..... | 132 |
| Capítulo IV | Contribuição nutricional e nutracêutica de formulações em pó de <i>Agaricus blazei</i> e <i>Lentinus edodes</i> | 164 |

1. Introdução

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, proporcionam uma flora intestinal benéfica ao hospedeiro (SAAD, 2006). Os prebióticos são substâncias alimentícias não digeríveis pelo hospedeiro que possuem propriedades de estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade potencial das bactérias intestinais benéficas (SANGEETHA et al., 2005). Os prebióticos não devem ser absorvidos na parte superior do trato intestinal, precisam ser substratos seletivos para um número limitado de microrganismos benéficos naturais do cólon, colaborando para tornar mais saudável essa microbiota.

Os alimentos funcionais contendo compostos prebióticos e bactérias probióticas têm um grande potencial para a indústria agro-alimentícia, para os consumidores e à saúde pública (ANADÓN et al. 2010). Eles se apresentam geralmente na forma de alimentos comuns, e devem ser consumidos como parte da dieta para promover os efeitos benéficos à saúde, tais como a redução de risco de doenças (diabetes, hipercolesterolemia) e melhora do sistema imunológico, proporcionando o bem-estar físico e mental do consumidor. Os nutracêuticos são alimentos ou parte de alimentos que apresentam benefícios à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças, tais como os nutrientes isolados e suplementos dietéticos (MORAES; COLLA, 2006).

Alguns carboidratos, tais como oligossacarídeos e polissacarídeos provenientes de fontes naturais têm sido utilizados como prebióticos em diversos produtos alimentícios, tais como laticínios; cereais; biscoitos; bolos; doces; sobremesas; sopas; molhos e temperos de saladas (FERREIRA, 2001; GIBSON, 2004).

Entre os cogumelos comestíveis o *Agaricus blazei* é considerado o mais atrativo para exploração de suas propriedades funcionais e como fonte para o desenvolvimento de drogas e nutracêuticos (FAN et al., 2007). Ele é usado há muito tempo pelos orientais, pois não oferece risco à saúde. De acordo com Lee et al. (2008) seu consumo tem aumentado no Japão, cerca de 300 toneladas anualmente. Essas características provavelmente estão relacionadas com a sua composição em β -glucanas (CAMELINI et al., 2005a).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de se desenvolverem em β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucanas como única fonte de carbono produzindo β -glucanases específicas para este substrato. A produção de β -(1 \rightarrow 3) glucanase específica pelo fungo *Trichoderma harzianum* ocorreu quando o mesmo se desenvolveu no exopolissacarídeo botriosferana, como única fonte de carbono (GIESE et al., 2005). O fungo *Trichoderma viride* também é

produtor em potencial de várias enzimas glucanólíticas, incluindo as β -(1 \rightarrow 3) e as β -(1 \rightarrow 6)-glucanases (NOBE et al., 2003).

A hidrólise enzimática de β -glucanas por β -glucanases específicas pode auxiliar na caracterização estrutural e reológica destes polímeros. Também pode contribuir para fornecer substâncias com propriedades farmacológicas ou com maior atividade biológica (GIESE et al., 2003). As inúmeras aplicações dos oligossacarídeos na agroindústria, na cosmetologia e na indústria alimentícia, e particularmente suas aplicações na área de saúde, justificam o desenvolvimento de processos eficientes para a produção destas biomoléculas em escala industrial (MONSAN; PAUL, 1995).

Apesar da informação científica obtida neste estudo, sua contribuição para o desenvolvimento de uma tecnologia enzimática viável para obtenção de glucooligossacarídeos deverá ser considerada. Atualmente, esses oligossacarídeos têm sido estudados em ordem de verificar sua ação como prebióticos e produtos nutracêuticos para aplicação industrial. O tema prebiótico é um assunto que causa muita polêmica, apesar do alimento funcional ter sido introduzido no Japão na década de 1980, e dos vários estudos relatados na literatura, provavelmente por causa da carência de resultados conclusivos, alguns estudos relacionados poderão ser encontrados na revisão da literatura a seguir.

Na tentativa, de contribuir com os estudos relacionados aos prebióticos, um dos principais objetivos deste trabalho foi estudar a hidrólise enzimática das β -1,3-glucanases produzidas pelo *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum*, com o intuito de conhecer sua potencialidade para produção desses glucooligossacarídeos. Os hidrolisados foram analisados em cromatografia líquida de alta resolução em cromatógrafo de íons acoplado a um detector de amperometria pulsada (HPAEC/PAD). Além disso, foi determinada a atividade prebiótica de *Agaricus blazei*, glucanas de *A. blazei* e de aveia.

2. Objetivos

- Produzir β -1,3-glucanases pelos fungos *Trichoderma reesei* QM 9414 e *Trichoderma harzianum* Rifai utilizando o *Agaricus blazei* em pó como única fonte de carbono, aplicando a ferramenta de metodologia de superfície de resposta.
- Caracterizar parcialmente as β -1,3-glucanases.
- Purificar as β -1,3-glucanases utilizando a cromatografia líquida de exclusão molecular.
- Caracterizar parcialmente as enzimas purificadas parcialmente.
- Extração de glucanas de *Agaricus blazei*.

- Hidrólise de glucanas de *Agaricus blazei* e de laminarina utilizando as glucanases brutas e parcialmente purificadas de *Trichoderma reesei* QM 9414 e *Trichoderma harzianum* Rifai.
- Analisar os hidrolisados utilizando a cromatografia líquida de alta pressão em cromatógrafo de íons-HPAEC/PAD.
- Verificar o crescimento de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus plantarum* utilizando diferentes fontes de carbono tais como a glicose, *Agaricus blazei* e suas glucanas de alto e baixo peso molecular, com a finalidade de avaliar o potencial prebiótico das glucanas e do cogumelo.

3. Revisão da literatura

3.1 *Agaricus blazei*

Agaricus blazei é um cogumelo comestível que pertence a classe dos fungos basidiomicetos, e seu consumo tem aumentado consideravelmente no Brasil, Japão, China, Coréia, Canadá e Estados Unidos (LEE et al., 2008). Ele é constituído pela alta concentração de proteínas e baixa concentração de lipídeos, e essas características poderão justificar sua inclusão na dieta alimentar, Tabela 1 (MONTEIRO et al., 2005). Também, em sua composição ele apresenta aminoácidos essenciais, entre eles arginina é o mais abundante, seguido pela isoleucina, metionina e leucina. Alguns carboidratos também estão presentes como a manose, glicose e xilose (MIN-YOUNG et al. 2009), também o glicogênio, manitol e trealose (KALÁČ, 2009), incluindo o biopolímero β -glucana que constitui parte da parede celular (ANGELI et al., 2009).

Tabela 1: Composição do cogumelo *Agaricus blazei*: (1) 100 g de amostra em base seca; (2) 100 g de amostra desidratada, conforme disponibilizada para comercialização.

| Compostos ¹ | Quantidade |
|------------------------|------------|
| Umidade ² | 13,69 g |
| Cinzas | 7,05 g |
| Fibra alimentar | 20,59 g |
| Lipídios | 2,17 g |
| Proteína | 31,36 g |
| Carboidratos | 59,42 g |
| Cálcio | 0,06 g |
| Potássio | 2,16 g |
| Magnésio | 0,08 g |
| Sódio | 0,04 g |
| Fósforo | 0,56 g |
| Cobre | 4,23 mg |
| Ferro | 6,03 mg |
| Manganês | 0,50 mg |
| Zinco | 10,58 mg |

Os cogumelos tem se tornado um atrativo como ingredientes funcionais e constitui uma fonte de compostos bioativos (VAZ et al., 2011). Os cogumelos *Agaricus blazei* (*Agaricus brasiliensis*) tem ganhado importância em diversos países especialmente por causa de suas propriedades nutracêuticas e medicinais, ressaltando a sua composição em β -glucanas (CAMELINI et al., 2005a). Assim, outras propriedades de *A. blazei* em sido estudadas, como a atividade antioxidante (SOARES et al., 2009), antitumor (YU et al., 2009a), antigenotóxica (ANGELI et al., 2009) e anti-diabética (KIM et al., 2005).

Os nutracêuticos contendo β -glucanas são geralmente produtos reconhecidos como seguros (GRAS) pelo Food and Drug Administration (FDA), e comercializados na forma de extratos, cápsulas e tabletes (CAMELINI et al., 2005a). Segundo o informe técnico nº 6, 31 de janeiro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cogumelos como *Agaricus blazei*, nas formas dessecadas inteiras ou fragmentadas e em conserva são considerados alimentos e dispensados da obrigatoriedade de registro (BRASIL, 2003).

A qualidade deste produto como nutracêutico, depende da sua composição química, do corpo de frutificação do cogumelo (Figura 1), e principalmente, do seu conteúdo de β -glucanas (CAMELINI et al. 2005b). Esses mesmos autores verificaram que a concentração de β -D-glucanas de *Agaricus blazei*, aumentou com o estágio de maturação, atingindo o máximo no imaturo (estágio II), seguido de um declínio no final da maturação dos esporos (estágio III). A figura 2 apresenta o cultivo de *Agaricus blazei* em estufa na chácara Valemar localizada na cidade de São José do Rio Preto-SP.

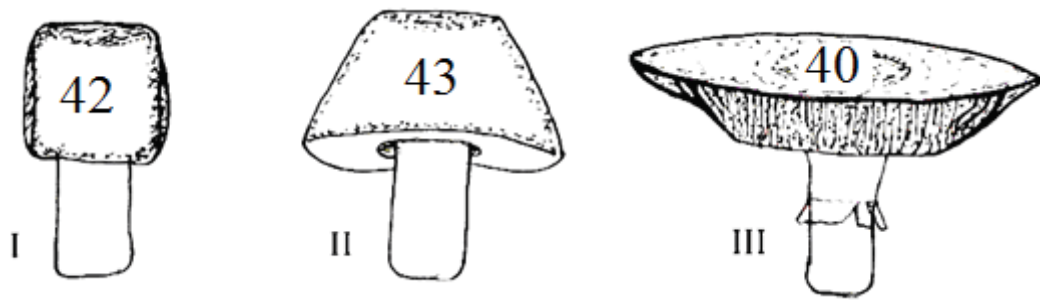


Figura 1. *Agaricus blazei* em diferentes estágios de corpo de frutificação: I= Imaturo (píleo fechado), II= Maduro (píleo aberto moderadamente) com esporos imaturos e III= Maduro (píleo aberto completamente) com esporos maduros. Os números representam a concentração de β -glucana (mg g^{-1} peso seco).



Figura 2. *Agaricus blazei* cultivado na chácara Valemar, São José do Rio Preto, SP.

A concentração de β -glucanas em *Agaricus blazei* varia significativamente de acordo com a sua forma de cultivo. Em estufa apresentou menor concentração $8,4 \pm 0,9$ g/100 g do cogumelo seco em relação ao cultivo no campo aberto $10,1 \pm 0,9$ g/100 g, provavelmente devido à variação na qualidade do composto empregado para o cultivo do cogumelo (PARK et al., 2003). Na tabela 2, são apresentados os teores de β -glucanas presentes em diferentes cogumelos relatados por MANZI; PIZZOFERRATO (2000).

Tabela 2: Conteúdo de β -glucana em diferentes cogumelos comestíveis.

| Cogumelos | β -glucana (g/100 g de cogumelo seco) |
|------------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Pleurotus ostreatus</i> SMR 125 | 0,38 |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> SMR 127 | 0,24 |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> SMR 138 | 0,29 |
| <i>Pleurotus eryngii</i> SMR 172 | 0,38 |
| <i>Pleurotus eryngii</i> SMR 126 | 0,29 |
| <i>Pleurotus eryngii</i> SMR 90 | 0,22 |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | 0,53 |
| <i>Lentinula edodes</i> | 0,22 |

Diferentes estruturas de glucanas foram encontradas em *Agaricus blazei* tais como β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6)-glucanas (CAMELINI et al., 2005a; DONG et al., 2002; OHNO et al., 2001), α -(1 \rightarrow 4)-glucanas (GONZAGA et al., 2005) e um complexo β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6)-glucana-proteína encontrado na massa micelial obtido por fermentação submersa (MIZUNO et al., 1999) todas extraídas em água a 100 °C, e precipitadas em etanol. Dong et al. (2002) relataram que a estrutura da glucana é composta principalmente por glucose, apresentando cadeia principal com ligações β -(1 \rightarrow 6) e duas unidades glucosilas β -(1 \rightarrow 3) ligada a cada três unidades de D-glucose, Figura 5. β -glucana de *Agaricus blazei* é altamente ramificada com 19,2 % de resíduo glucosil terminal (DONG et al., 2002). Elas apresentam peso molecular superior a 1.000.000 kDa (CAMELINI, 2005).

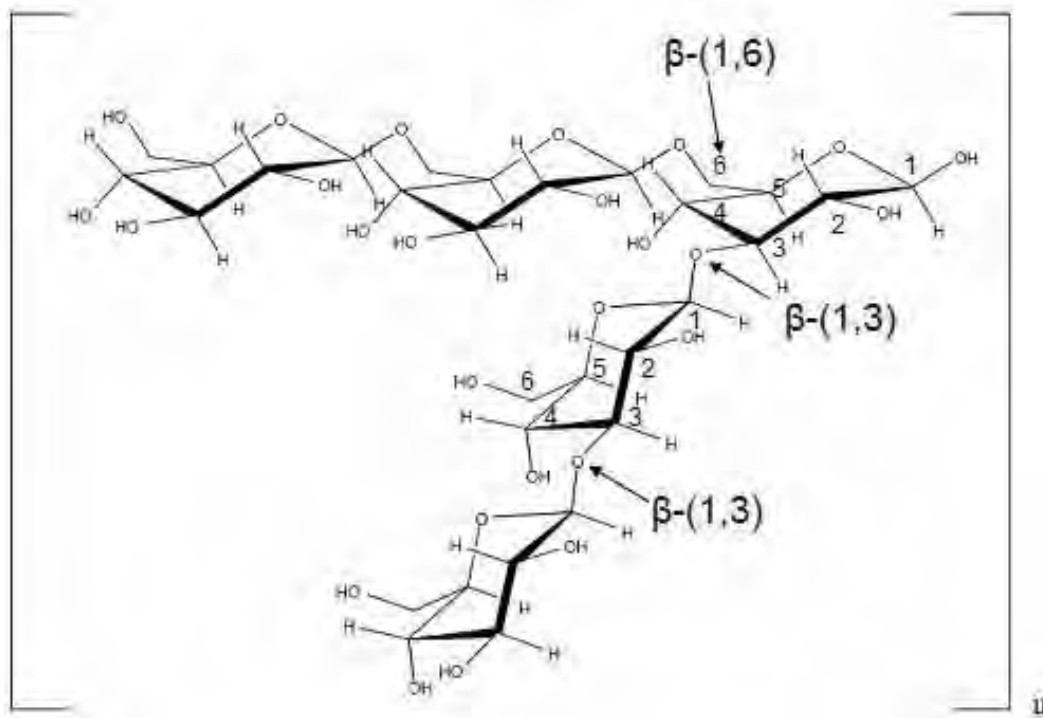


Figura 3. Estrutura química da β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6)-glucanas de *Agaricus blazei*, que consiste de cadeia principal com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 6) e duas unidades glucosilas β -(1 \rightarrow 3) ligada a cada três unidades de D-glucose, proposta por Dong et al. (2002) e citado por Camelini (2005b).

Os efeitos benéficos dos cogumelos são muito abrangentes e incluem aumento da imunidade, redução dos níveis sanguíneos de colesterol e lipídeos e redução da pressão sanguínea (SOARES, 2007). β -1,3 e β -1,6-glucanas extraídas em água a 100 °C, das frutificações de *Agaricus blazei* apresentaram um aumento de 30,4 % no número de vasos sanguíneos em embriões de galinha e conseqüente, aumento no seu crescimento (CAMELINI et al. 2005a).

A tabela 3 mostra os diferentes métodos de extração de glucanas e técnicas utilizadas para determinar o tipo de glucana, utilizando diversas fontes:

Tabela 3: Diferentes fontes, métodos de extração e técnicas utilizadas para caracterização de β -glucanas.

| Fontes | Extração | Técnica utilizada | Glucana | Obtenção das amostras | Referências |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Aveia | Alcalina, enzimática e química | Kit de determinação enzimática e IR | β | Ayub Agricultural Research Institute, Faisalabad, Paquistão | Ahmad et al. (2010) |
| Cevada | Aquosa | Kit de determinação enzimática | β | Instituto Tecnológico Agrário de Castilla y León; Valladolid, Espanha | Benito-Román; Alonso; Lucas (2011) |
| Trigo | Alcalina | Método enzimático específico | β | (Woodbridge, Ont., Canadá) | Li; Cui; Kakuda (2006) |
| <i>Pleurotus florida</i> | Aquosa | RMN, HPSEC, Análise de metilação e degradação de Smith | $\alpha\beta$ | Makoto Yamashita Company (Miriam Harumi Yamashita), localizado em São José dos Pinhais, Paraná | Santos-Neves et al. (2008) |
| <i>Pleurotus eryngii</i> <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> | Água quente | RMN, Análise de metilação Degradação de Smith somente para o <i>Pleurotus eryngii</i> | β -1,3 | - | Carbonero et al. (2006) |
| <i>Inonotus obliquus</i> | Alcalina e digestão enzimática | Método enzimático | β | (Hanarim Co., Korea). | Rhee et al. (2008) |
| <i>Termitomyces eurhizus</i> | Alcalina quente | CGL, Análise de metilação, FTIR, RMN | β -1,3 | Em florestas locais localizadas na Índia | Chakraborty et al. (2006) |
| <i>Geastrum saccatum</i> | Água a 100 °C | RMN H^1 E C^{13} | β | Produzido na reserva da Mata da Estrela-RN | Dore et al. (2007). |

IR, Espectrometria de infravermelho; RMN, Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear; HPSEC, Cromatografia de exclusão estérica de alta performance CGL, Cromatografia líquida gasosa; FTIR, Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.

3.2 Aveia

Os benefícios que uma alimentação saudável pode oferecer para melhorar a qualidade de vida da população têm despertado o interesse da indústria de alimentos na elaboração de novos produtos alimentícios. Para este propósito é necessário a identificação de novas fontes botânicas, com desejáveis características funcionais. Aveia e cevada são identificadas como tais fontes e podem ser boa base para formulação de produtos alimentícios funcionais (LAMBO; ÖSTE; NYMAN, 2005).

O grão de aveia é constituído principalmente por três frações como o farelo, endosperma e o germe. O farelo é constituído por diversas camadas de tecidos, e células de aleurona localizada nas partes mais externas dos grãos. O endosperma representa aproximadamente 55 a 80 % do grão, ele é composto por amido, lipídeos e β -glucanas (Figura 4). O conteúdo de β -glucanas varia entre 1,8 a 7,5 % em base seca, esta fibra ajuda a reduzir o nível colesterol sanguíneo e normaliza o nível de glicose no sangue. O grão também é constituído por vitaminas e antioxidantes. Os antioxidantes de farinha de aveia podem ser usados para estabilizar leites e produtos cárneos sensíveis a oxidação de gorduras durante o seu armazenamento (SARDI, 2004).

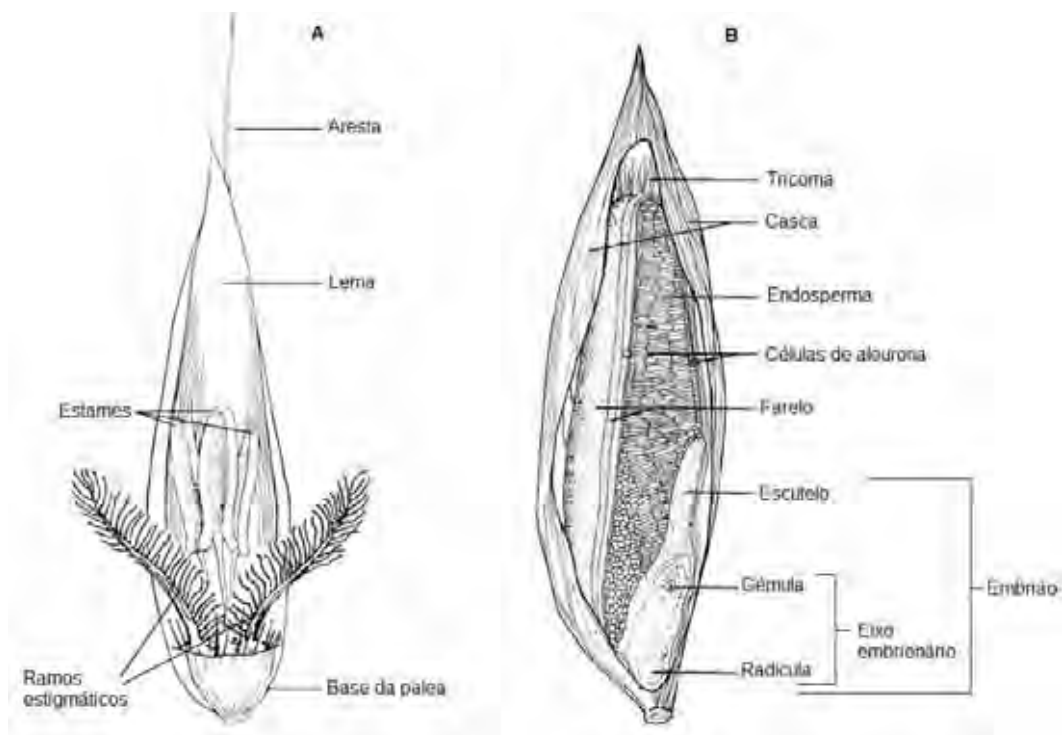


Figura 4. Partes de um grão de aveia (A); e seus componentes (B), Sardi, 2004.

Weber; Gutkoski; Elias (2002) determinaram a composição química de cariopse (farinha) de aveia, apresentada na tabela 4. Os autores concluíram que o conteúdo de fibra alimentar total, também conhecida como fibras dietéticas encontra-se dentro dos padrões, ao contrário do baixo valor encontrado para o amido. Segundo Kedia; Vásquez; Pandiella (2008) as fibras dietéticas são classificadas como fibras solúveis e insolúveis. As fibras solúveis dissolvem na água e podem formar um meio viscoso que reduz a taxa de digestão no intestino. Já as fibras insolúveis em água não afetam a taxa de digestão. As fibras que não são degradadas pelas bactérias da flora intestinal e a água associada a elas servem para aumentar o bolo fecal e poderão ter um efeito positivo na redução de câncer de cólon e síndrome do intestino irritado.

Tabela 4: Composição centesimal de cariopses de aveia, cultivar UPF18¹: (1) Médias de duas determinações; (2) Calculados por diferença.

| Compostos | Quantidade (%) |
|---------------------------|-----------------------|
| Umidade | 11,89 |
| Cinzas | 1,95 |
| Fibra alimentar total | 13,32 |
| Fibra alimentar solúvel | 5,59 |
| Fibra alimentar insolúvel | 7,73 |
| Lipídios totais | 7,04 |
| Proteína bruta | 15,07 |
| Carboidratos ² | 50,73 |
| Amido | 41,00 |

Os produtos contendo aveia (*Avena sativa* L.) embutem excelentes fontes de fibras dietéticas, tais como β -D-(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucana, arabinoxilana e celulose (DONGOWSKI et al., 2005). β -glucana de cereais são homopolissacarídeos lineares ligados consecutivamente por resíduos β -D-(1 \rightarrow 4) glucosil que são separados por ligações β -D-(1 \rightarrow 3) (LAZARIDOU; BILIADERIS, 2007).

O processo de extração de β -glucana requer cuidados, pois o mesmo poderá afetar as propriedades físico-químicas e funcionais da β -glucana extraída. De acordo com AHMAD et al. (2010) Os processos alcalinos e enzimáticos foram as melhores técnicas empregadas na obtenção deste polissacarídeo (AHMAD et al., 2010).

O processo de extração de β -glucanas de cereais envolve basicamente três etapas: a inativação das enzimas endógenas, a extração de β -glucanas e a sua precipitação. Em extração de β -glucanas de cevada geralmente a inativação enzimática ocorre por refluxo em etanol aquoso ou por tratamento da farinha de cevada em etanol aquoso diluído em temperatura

acima de 60 °C. Além disso, o amido pode ser co-extraído juntamente com a β -glucana em temperatura acima de 60 °C (temperatura de gelatinização), cuidados deverão ser tomados para remoção do amido (BRENNAN; CLEARY, 2005).

3.3 Produção de β -1,3-glucanases por microrganismos

As β -1,3-glucanases podem ser produzidas por diferentes microrganismos e em diferentes condições de cultivo. Fleury; Sato (2008) estudaram a produção da β -1,3-glucanase pela bactéria *Cellulosimicrobium cellulans* 191. As condições de cultivo otimizadas através do planejamento fatorial foram efeito do pH inicial, temperatura e agitação dos frascos. Após otimização a maior produção foi 0,64 U/mL no meio de cultivo composto por 10 g/L de parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Prodeza), pH inicial 8,5, após 24 h de cultivo a 33 °C e 200 rpm. O pH exerceu o maior efeito na resposta, seguida pela agitação, enquanto a temperatura não apresentou efeito.

Tang et al. (2004) otimizaram os componentes do meio de cultivo para a produção de β -1,3-glucanase por *Bacillus subtilis* ZJF-1A5, utilizando a metodologia de superfície de resposta através do planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} . A concentração de farinha de cevada, farinha de milho e farinha de soja no meio foram fatores significativos. A atividade enzimática aumentou de 164,7 para 250,7 U/mL e o tempo de cultivo diminuiu de 72 para 48 h, com a utilização da farinha de cevada e farinha de milho, comparado ao meio original.

Beshay et al. (2003) produziram β -1,3-glucanase a partir do *Bacillus* sp. usando uma *Escherichia coli* recombinante. A produção enzimática aumentou quando utilizou meio de cultura otimizado composto por lactose como indutor da enzima. A produção foi menor (495 U/mL) em fermentador de 3 L, após 15 h de cultivo, comparado com a produção em frascos agitados 510 U/mL, após 28 h de cultivo.

Masih et al. (2002) encontraram maior atividade de endo e exo- β -1,3-glucanases pela *Pichia membranifaciens*, quando parede celular de *Botrytis cinerea* foi utilizada como única fonte de carbono, comparado ao meio contendo somente glicose ou laminarina. Bar-Shimon et al. (2004) encontraram baixa atividade de exo- β -(1 \rightarrow 3) glucanases pela *Candida oleophila* utilizando-se fragmentos de parede celular de *Penicillium digitatum* em meio de cultivo como única fonte de carbono, comparada ao meio contendo apenas glicose. No entanto, a combinação de ambas as fontes de carbono induziram a maior atividade de exo- β -(1 \rightarrow 3) glucanase, sugerindo que o microrganismo requer uma fonte de carbono suplementar para manter o nível de atividade enzimática induzida pela glicose.

Jayus et al. (2005) avaliaram que a produção de β -1,3 glucanase pelo *Acremonium* sp. IMI 383068 foi marcadamente afetada pela tensão de oxigênio dissolvido (TOD), utilizando pustulana (β -1,6-glucana) como única fonte de carbono. A máxima atividade específica de β -1,3-glucanase foi obtida a uma TOD de 20 % de saturação. No entanto, a máxima atividade específica de β -1,3-glucanase com escleroglucana (β -1,3-1,6-D-glucana) foi aproximadamente o dobro (40 % de saturação), sugerindo que 40 % pode representar uma boa estratégia para aumentar a produtividade de β -1,3-glucanase.

Celestino et al. (2006) encontraram maior atividade de β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 4) glucanases (8 U/mL) pelo *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* quando cultivado em fermentação submersa, contendo quitina como única fonte de carbono, em 24 h de cultivo, 120 rpm a 40 °C. A celulose e a xilana também foi utilizada como indutores, porém foram baixos os níveis de enzimas secretadas.

Noronha; Ulhoa (2000) detectaram maior atividade de β -1,3-glucanases pelo *Trichoderma harzianum* TC utilizando-se parede celular de *Pythium* sp., como única fonte de carbono, sugerindo que a regulação de β -1,3-glucanases foi influenciada pelo conteúdo de β -glucana presente no substrato.

Mucha et al. (2006) constataram que o micélio de fungos saprofíticos, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma virens* foram os melhores substratos para a indução de β -1,3-glucanases por fungos ectomicorrízicos, indicando que os fungos saprofíticos têm certo nível de produção constitutiva dessas enzimas, porém eles também são induzidos na presença de substratos apropriados.

Marcello et al. (2010) estudaram o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de exo- β -1,3-glucanase a partir do *Trichoderma asperellum*. A atividade foi detectada em todas as fontes de carbono, mas a maior produção foi encontrada com o amido e parede celular purificada de *Rhizoctonia solani*. Análises da expressão por reação da transcriptase reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia (RT-PCR) do RNA total, sugerem que a síntese de exo- β -1,3-glucanase foi controlada por repressão catabólica.

Um resumo dos meios utilizados para a produção de β -1,3-glucanase produzidas por diferentes microrganismos estão listados na tabela 5.

Tabela 5: Composição dos meios utilizados para produção de β -1,3-gluconase, destacando-se as fontes de carbono.

| Linagem | Meio | Referências |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Trichoderma harzianum</i> 1051 | Bactopeptona , 0,1 %; uréia, 0,03 %; KH_2PO_4 , 0,2 %; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,14 %; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 %; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,03 %; solução de elementos traços, 0,01 % (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , e Co^{2+}), glicose , 0,02 %, pH 5,5 contendo quitina 0,5 %. | DeMARCO; FÉLIX, (2007) |
| <i>Trichoderma harzianum</i> NCIM 1185 | <u>Meio otimizado</u> : Glicose , 8,634 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,79 g/L; KH_2PO_4 , 2,0 g/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15,13 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g/L; ácido cítrico, 18,23 g/L; peptona , 1,0 g/L; uréia, 0,6 g/L; Tween-80, 0,2 g/L. Suplementado com os seguintes minerais: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,0 mg/mL; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,6 mg/mL; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4 mg/mL; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,0 mg/mL. | RANA et al. (2003) |
| <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai | Meio Mínimo de Sais de Vogel; botriosferana (Exopolissacarídeo), 2 g/L. | GIESE et al. (2005) |
| <i>Botryosphaeria rhodina</i> | Meio Mínimo de Sais de Vogel; botriosferana , 2 g/L e glicose, 1 g/L | |
| <i>Trichoderma harzianum</i> IMI206040 | Parede celular fúngica , 0,2 %: <i>Mucor rouxii</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , polissacarídeos comerciais, 0,2 %: laminarina , pustulana , ou pululana , ou glicose 2 % como única fonte de carbono. | VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS et al. (1998) |
| <i>Chaetomium thermophilum</i> | Farelo de trigo , 40,0 g/L; extrato de levedura , 6,7 g/L; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L; KCl, 0,2 g/L; dissolvido em água destilada e água de torneira (3:1). | LI et al. (2007) |
| <i>Stachybotrys elegans</i> | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L; K_2HPO_4 , 0,9 g/L; KCl, 0,2 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g/L; MnSO_4 , 0,002 g/L; e ZnSO_4 , 0,002 g/L; suplementado com fragmentos de parede celular de <i>Rhizoctonia solani</i> , laminarina , quitina , sacarose ou glicose e fonte de nitrogênio apropriado (1 mg ml^{-1}). | TWEDDELL et al. (1994) |
| <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> 191 | <u>Meio otimizado</u> : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L e 10 g/L de parede celular de levedura utilizada como indutor, em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,5. | FLEURY; SATO, (2008) |
| <i>Bacillus subtilis</i> ZJF-1 A 5 | <u>Meio otimizado</u> : Farinha de cevada , 63,5 g/L; farinha de milho , 44,8 g/L; KH_2PO_4 , 1,0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L; CaCl_2 , 0,1 g/L. | TANG et al. (2004) |

3.3.1 β -1,3-Glucanases fúngicas

A β -1,3-glucanase (E.C. 3.2.1.39) ou 1,3- β -D-glucana glucanohidrolase, também denominada de glucana-endo-1,3- β -D-glicosidase, catalisa a reação de hidrólise das ligações β -D-glicosídicas da β -1,3 glucana. Atua sobre laminarina, paramylona e pachyman (polissacarídeo composto de unidades de β -1,3 glucose), quando utilizadas como substrato (Figura 5) (FLEURY; SATO, 2005). A laminarina é ramificada ao redor de 10 % de unidades de glucose ao longo da cadeia de β -1,3-glucana, apresentando GP 25 (READ; CURRIE; BACIC, 1996). Muitas das β -1,3-glucanases têm sido purificadas e caracterizadas (ZHU et al., 2008; MONTEIRO; ULHOA, 2006; LI et al., 2007).

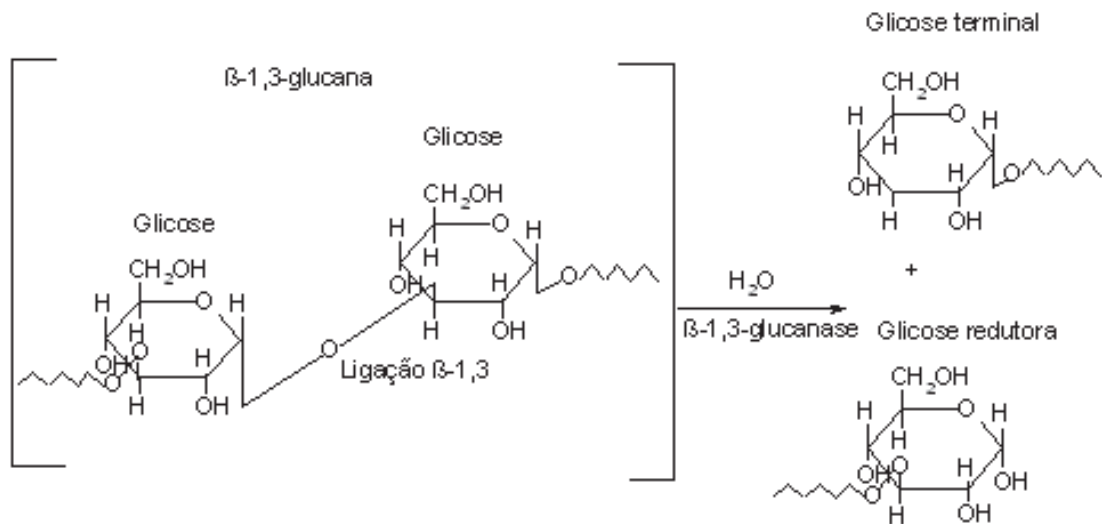


Figura 5. Hidrólise da β -1,3-glucana pela β -1,3-glucanase.

As β -1,3-glucanases podem ser classificadas em dois tipos principais, dependendo do seu modo de ação: endo- β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39) e exo- β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.58). As endo- β -1,3-glucanases clivam aleatoriamente ligações β -1,3 internas ao longo da cadeia de polissacarídeo, liberando pequenos oligossacarídeos. Exo- β -1,3-glucanases liberam unidades de glucose da extremidade não redutora da β -1,3-D-glucana de modo consecutivo, produzindo D-glucose como único produto (PITSON et al., 1993; LI et al., 2007).

Endo-1,3-glucanases produzidas de diferentes fontes microbianas diferem umas das outras em suas propriedades físico-química e biológica e seu modo de ação. A Tabela 6 resume as propriedades de endoglucanases obtidas de várias fontes.

As Endo-1,3-glucanases são amplamente distribuídas entre os microrganismos. Elas têm sido relatadas em várias espécies fúngicas, incluindo *Trichoderma longibrachiatum*

(TANGARONE; ROYER; NAKAS, 1989), *Trichoderma harzianum* (RAMOT; COHEN-KUPIEC; CHET, 2000) *Acremonium blochii* linhagem BGN3.3 (MARTIN et al., 2006).

As exo-1,3-glucanases têm sido reportadas em *Trichoderma asperellum* (MARCELLO et al., 2010), *Trichoderma viride* (KULMINSKAYA et al., 2001) *Acremonium blochii* linhagem BGN3.2 e BGN3.4 (MARTIN et al., 2006), *Pichia membranifaciens* (MASIH et al., 2002) e *Candida oleophila* (BAR-SHIMON et al., 2004).

Tabela 6: Propriedades bioquímicas e físico-químicas de algumas β -1,3-glucanases de diferentes microorganismos.

| Fontes das Glucanases | Natureza | Massa Mol. (kDa) | pI | Ativ Esp (U/mg) | Km (mg/mL) | Temp ótima (°C) | pH ótimo | Temperatura estab. (°C) | pH estab | Ref. |
|-----------------------------------------|----------|------------------|-----|-----------------|------------|-----------------|----------|-------------------------|----------|------------------------------|
| <i>Trichoderma viride</i> TP09 | - | 54,6 | - | 342,9 | - | 50 | 5,0 | 30-70 | 3,0-5,0 | Yi et al., (2008) |
| <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai T 24 | Endo | 74 | - | - | - | 50-60 | 4,5 | 30 | - | El-Katatny et al., (2001) |
| <i>Chaetomium thermophilum</i> | Exo | 76,3 | - | 45,4 | - | 60 | 6,0 | 50 | - | Li et al., (2007) |
| <i>Agaricus brasiliensis</i> | Endo | 33 | - | 48,50 | - | 45 | 4,5 | 50 | 3,5-6,0 | Shu; Xu; Lin., (2006) |
| <i>Trichoderma konningi</i> | Endo | 75 | - | 409,5 | 0,15 | 50 | 4,6 | 45 | - | Monteiro; Ulhoa., (2006) |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | Exo | 62 | 4,5 | 0,26 | 0,78 | 40 | 5,0 | - | 3,0-7,0 | Vijayendra; Kashiwagi (2009) |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | Endo | 29 | - | 340 | 1,72 | 50 | 4,4 | 45 | - | Noronha ; Ulhoa., (2000) |
| <i>Paenibacillus</i> sp | Endo | 44 | - | - | 1,1 | 55 | 5,0 | - | - | Hong; Meng., (2003) |
| <i>Perna viridis</i> | Endo | 33 | - | - | 0,3 | 45 | 4-6,5 | 45-50 | - | Zakharenko al., (2008) |

Diferentes métodos de purificação de β -1,3-glucanases têm sido relatados. A exo- β -1,3-glucanase de *Gaeumannomyces graminis* foi purificada por Yu et al. (2009b) apresentando um fator de purificação de 9,37 vezes e um rendimento de 9,03 %. O extrato enzimático bruto foi submetido à precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 60 % de saturação, dialisado e posteriormente realizou-se uma cromatografia de interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose, de exclusão aniônica em DEAE-Sepharose e em seguida realizaram uma cromatografia de exclusão por tamanho em Superdex 200.

Vijayendra; Kashiwagi (2009) obtiveram um rendimento de 30,4 % e um fator de purificação de 152 vezes na purificação de β -1,3-glucanase do fungo *Rhizoctonia solani*. O processo de purificação foi realizado em quatro etapas: primeiramente a enzima foi precipitada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 50 % de saturação, dializada e em seguida aplicada em cromatografia de troca iônica em DEAE-Toyopearl e CM-Toyopearl e, posteriormente, realizaram uma cromatografia de permeação em gel em Sephacryl S-200.

Uma exo- β -1,3-glucanase produzida pelo fungo *Chaetomium thermophilum* apresentou um rendimento de 17,2 % e um fator de purificação de 26,24 vezes (Li et al., 2007). Esses autores precipitaram a enzima com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 80% de saturação, dializaram e posteriormente aplicaram em Phenyl-Sepharose, DEAE-Sepharose, sendo que 2 mL da amostra coletada foi concentrada e posteriormente realizaram uma gel filtração em Sephacryl S-100.

Bara; Lima; Ulhoa (2003) purificaram uma β -1,3-glucanase de *Trichoderma asperellum* em três etapas, a enzima concentrada foi aplicada em Sephacryl S-100 e posteriormente realizaram uma cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose, a etapa de gel filtração resultou em dois picos de proteína com atividade de β -1,3-glucanase, sendo o primeiro pico submetido a Q-Sepharose. A enzima foi purificada 35 vezes com rendimento de 9,5 %.

Noronha; Ulhoa (2000) purificaram uma β -1,3-glucanase de *Trichoderma harzianum* TC em três etapas, concentraram a enzima e, posteriormente, realizaram uma cromatografia em Sephacryl S-200, Phenyl-Sepharose e CM-Sepharose. Apresentou um fator de purificação de 65 vezes e um rendimento de 0,32 %.

El-Katatny et al. (2001) purificaram uma β -1,3-glucanase de *Trichoderma harzianum* Rifai T24 com um fator de purificação de 91 vezes. Os autores precipitaram a enzima com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 75% de saturação, posteriormente, realizaram uma cromatografia em Phenyl-Sepharose e em Superdex 75.

Shu; Xu; Lin (2006) purificaram uma β -1,3-glucanase de *Agaricus brasiliensis*, em duas etapas, precipitaram a enzima em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com 70 % de saturação e, posteriormente, realizaram uma cromatografia em DEAE-Sepharose, esta purificação resultou na separação de um pico de atividade de β -1,3-glucanase, com fator de purificação de 13,1 vezes e rendimento de 6,7 %.

Yi et al. (2008) purificaram uma β -1,3-glucanase de *Trichoderma viride* TP09; a enzima foi precipitada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com 70 % de saturação, dializada e concentrada com

polietileno glicol, seguindo uma cromatografia em DEAE-Sepharose, obtendo-se um rendimento de 45,2 % e um fator de purificação de 28,7 vezes.

Uma β -1,3-glucanase produzida pelo *Trichoderma koningii* foi purificada por Monteiro; Ulhoa (2006). Eles concentraram a amostra e aplicaram em Sephacryl S-200 e posteriormente em Phenyl-Sepharose, obtendo um fator de purificação de 105 vezes e um rendimento de 13,4 %.

Fleuri; Sato (2007) purificaram uma β -1,3-glucanase produzida pela bactéria *Cellulosimicrobium cellulans* 191, em apenas uma etapa. O extrato enzimático bruto foi aplicado diretamente em coluna de troca iônica de DEAE-Sephadex A50. A β -1,3-glucanase foi obtida em um pico com fator de purificação de 11,92 vezes e rendimento de 25 %.

Hong; Meng (2003) purificaram uma endo- β -1,3-glucanase de *Paenibacillus* sp. apresentando um fator de purificação de 28 vezes e um rendimento de 31%. Inicialmente a enzima foi concentrada em ultrafiltração, e posteriormente, foi realizada uma cromatografia em Q Sepharose, seguida de precipitação $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e submetida à cromatografia em Phenyl-Sepharose.

3.4. Caracterização de β -1,3-glucanases microbianas

Monteiro; Ulhoa (2006) purificaram e caracterizaram uma β -1,3-glucanase produzida pelo fungo *Trichoderma koningii*. A enzima apresentou melhor atividade em pH 4,6 e uma temperatura ótima de 50 °C. A enzima reteve 50 % de sua atividade original quando incubada a 45 °C. A enzima mostrou-se estável em uma faixa de 40-60 °C, diminuindo sua atividade drasticamente após 60 °C.

Yi et al. (2008) caracterizaram uma β -1,3-glucanase purificada do fungo *Trichoderma viride* TP09. Os valores encontrados pelos autores para pH e temperatura ótima foram 5,0 e 50 °C, respectivamente. A enzima reteve sua atividade original em uma faixa de pH 3,0-5,0 e mostrou nenhuma ou pouca perda de atividade entre 30, 40 e 50 °C durante 2 horas de incubação. No entanto, uma perda significativa foi observada entre 60 e 70 °C.

Noronha; Ulhoa (2000) caracterizaram uma β -1,3-glucanase purificada do fungo *Trichoderma harzianum*, a enzima apresentou pH e temperatura ótima de 4,4 e 50 °C, respectivamente, e perdeu 68 e 100 % de sua atividade original após incubação por 45 minutos a 45 e 50 °C, respectivamente.

Shu; Xu; Lin (2006) produziram, purificaram e caracterizaram uma β -1,3-glucanase do fungo *Agaricus brasiliensis*. A enzima apresentou melhor atividade em pH 4,5 e uma

temperatura ótima de 45 °C. A enzima mostrou estabilidade em uma ampla faixa de pH entre 3,0-6,0 e termoestabilidade a 50 °C, e apresentou meia-vida de 30 minutos a 55 °C.

A β -1,3-glucanase produzida por *Rhizoctonia solani* foi purificada e caracterizada por Vijayendra; Kashiwagi (2009). A enzima apresentou melhor atividade a uma temperatura de 40 °C em pH 5,0, mantendo-se estável em uma faixa de pH que variou entre 3,0-7,0.

Xu; Shih; Poulton (2006) caracterizaram uma β -1,3-glucanase purificada da levedura *Pichia pastoris*; a enzima apresentou pH ótimo e temperatura ótima de 6,0 e 45-55 °C, respectivamente.

β -1,3-glucanase do fungo *Aspergillus fumigatus* foi purificada e caracterizada por Fontaine et al. (1997); a enzima apresentou melhor atividade em pH 7,0 a 80 °C, mantendo-se estável em uma faixa de pH que variou 8-10 após 1 h a 37 °C. A atividade da enzima diminuiu rapidamente após 60 °C sendo inativada quando incubada a 70 °C por 1 h.

3.5 Hidrólise enzimática para obtenção de oligossacarídeos com propriedades biológicas

Os oligossacarídeos podem ser extraídos de fontes naturais, ou produzidos por processo químico, hidrolisando polissacarídeos, ou pela síntese enzimática ou química a partir de dissacarídeos (MUSSATTO; MANCILHA, 2006). A hidrólise enzimática de β -glucanas por β -glucanases específicas pode auxiliar na caracterização estrutural e reológica destes polímeros. Também pode contribuir para fornecer substâncias com propriedades farmacológicas ou com maior atividade biológica (GIESE et al., 2003). β -glucana de *Agaricus blazei* purificada e uma endo β -(1,6)-glucanase de *Bacillus megaterium* foi utilizada por KIM et al. (2005) para obtenção de oligossacarídeos, di- e trissacarídeos os quais foram os principais produtos encontrados.

A ação de β -1,3-glucanases na hidrólise de laminarina têm sido relatada por diferentes microrganismos, como do *Trichoderma harzianum* Rifai e *Botryosphaeria rhodina* (GIESE et al., 2006); *Trichoderma viride* AZ36 (KULMINSKAYA et al., 2001); *Rhizoctonia solani* (VIJAYENDRA; KASHIWAGI, 2009); *Bacillus clausii* NM1 (MIYANISHI et al., 2003); *Chaetomium thermophilum* (LI et al., 2007); *Paenibacillus* sp. (HONG; MENG, 2003); *Agaricus blazei* (SHU; XU; LIN, 2006); *Acremonium persicinum* (PITSON et al., 1993). Há poucos relatos na literatura quanto a aplicação de β -glucanas extraídas do corpo de frutificação de cogumelos comestíveis na hidrólise de glucanases, tais como o *Flammulina velutipes* (FUKUDA et al., 2008) e *Agaricus blazei* (KIM et al., 2005).

GIESE et al. (2006) utilizaram botriosferana (β -1,3-1,6-glucana) produzida pelo *Botryosphaeria rhodina* e laminarina. Esses substratos foram hidrolisados pela β -(1,3)-glucanase bruta produzida pelo *T. harzianum* e *B. rhodina*. Os principais produtos de hidrólise de laminarina foram glicose e gentiobiose, e pequenas quantidades de laminaribiose e oligossacarídeos com GP entre 3-4. No entanto, a Botriosferana produziu glicose e gentiobiose quando hidrolisado pela β -(1,3)-glucanase de *T. harzianum* e apenas glicose quando se usou a do *B. rhodina*. A β -(1,3)-glucanase de *Trichoderma harzianum* também foi utilizada por Grandpierre et al. (2008). Estes autores utilizaram curdlana (β -1,3-glucana) como substrato na hidrólise enzimática, para obtenção de oligossacarídeos. Os principais produtos foram os gluco-oligossacarídeos com GP < 6.

Oligossacarídeos também têm sido obtidos a partir de β -(1,3),(1,4)-glucanas de aveia através da ação de β -(1,3),(1,4)-glucanases purificadas de *Talaromyces emersonii* (McCARTHY et al. 2005) e de celulase e liquenase obtida de *Bacillus subtilis* (EC 3.2.1.73) e *Trichoderma* sp (EC 3.2.1.4), respectivamente.

Os resíduos agroindustriais também têm sido utilizados como substratos para produção de oligossacarídeos com potencial biotecnológico. MOURA et al. (2007) verificaram que os xilo-oligossacarídeos (XOs) de baixo peso molecular obtido a partir da hidrólise de sabugo de milho apresentaram capacidade bifidogênica similar aos XOs comerciais. A partir do hidrolisado bruto foi utilizada filtração em gel na separação dos oligossacarídeos. As linhagens de *B. adolescentis* e *L. brevis* apresentaram o maior crescimento e consumo dos XOs, enquanto para as espécies de *B. longum* e *L. fermentum* o crescimento foi menor.

Os gentio-oligossacarídeos apresentam atividade bifidogênica (RYCROFT et al., 2001; SANZ et al., 2006). Por sua vez, os laminari-oligossacarídeos além de estimularem a proliferação de bifidobactérias do ceco (primeira porção do intestino grosso) apresentam atividade biológica. A laminariheptose e a laminarihexose, por exemplo, são capazes de interagir com as células humanas e modular a resposta imune (SHIMIZU et al., 2001; BLAND et al., 2004). A atividade imunomoduladora dos oligossacarídeos e o reconhecimento destes pelos receptores no corpo humano tem sido associada às ligações glicosídicas β -(1,3)- e β -(1,6) conservadas nestas moléculas (HERRE et al., 2004).

MENEZES (2007) estudou o potencial prebiótico dos hidrolisados lignocelulolíticos. O crescimento das culturas probióticas de *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. reuteri* e *B. bifidum* foi significativo comparando-se com os FOs comerciais, ao contrário, os

hidrolisados testados não foram capazes de estimular o crescimento de culturas enteropatogênicas de *E. coli* e *Salmonella enteritidis*.

A tecnologia para produção de oligossacarídeos é limitada a extração a partir de fontes botânicas, hidrólise ácida ou enzimática de polissacarídeos ou síntese pela reação de transglicosilação. Os glucooligossacarídeos com propriedades prebióticas também podem ser produzidos durante o processo fermentativo do *Leuconostoc mesenteroides* B-742 restringindo o tamanho do polímero pela adição de maltose (CHUNG; DAY, 2002).

Grimoud et al. (2010) verificaram que glucooligossacarídeos comerciais foram capazes de estimular o crescimento de probióticos, especialmente bifidobacteria, quando cultivado em microplacas, demonstrando características prebióticas.

Smaali et al. (2004) encontraram gentiobiose, celotriose e celotetraose pela reação de transglicosilação de celobiose utilizando β -glucosidade de *Sclerotinia sclerotiorum* e uma comercial de *Aspergillus niger*.

Alguns oligossacarídeos como oligofrutoses e polióis não fermentescíveis são fontes de energia para a microflora benéfica do organismo e estimulam seletivamente o crescimento de um número limitado de bactérias do trato intestinal (PRZEMYSŁAW; PIOTR, 2003). A Tabela 7 resume os principais carboidratos prebióticos disponíveis comercialmente.

Tabela 7: Oligossacarídeos não digeríveis com funções bifidogênicas.

| Compostos | Representação Química* |
|------------------------------|-------------------------------|
| Ciclodextrinas | (Glu) _n |
| Fruto-oligossacarídeos | (Fru) _n - Glu |
| Galacto-oligossacarídeos | (Gal) _n -Glu |
| Gentio-oligossacarídeos | (Glu) _n |
| Glicosilsacarose | (Glu) _n -Fru |
| Isomalto-oligossacarídeos | (Glu) _n |
| Isomaltulose (ou palatinose) | (Glu-Fru) _n |
| Lactosacarose | Gal-Glu-Fru |
| Lactulose | Gal-Fru |
| Malto-oligossacarídeos | (Glu) _n |
| Rafinose | Gal-Glu-Fru |
| Oligossacarídeos de soja | (Gal) _n -Glu-Fru |
| Xilo-oligossacarídeos | (Xil) _n |

*Gal, galactose; Glu, glucose; Fru, frutose; Xil, xilose (SAKO et al., 1999).

3.6 Probióticos e Prebióticos

O mecanismo de atuação dos microrganismos probióticos no trato intestinal pode ser explicado pelos seguintes mecanismos (FULLER; GIBSON, 1997):

a) Antagonismo direto: através da produção e secreção de agentes antimicrobianos, ou pela produção de ácidos orgânicos capazes de eliminar linhagens patogênicas e controlar o desenvolvimento da flora benéfica ao hospedeiro.

b) Competição por nutrientes: através da competição entre os microrganismos por um nutriente essencial à sobrevivência da flora intestinal.

c) Competição por receptores intestinais para adesão: devido a maior resistência aos movimentos peristálticos, agrega-se com maior facilidade à mucosa intestinal, ocupando o lugar de certos agentes patogênicos.

d) Estimulação da imunidade: atuam promovendo o aumento da atividade macrofágica (diminuição da relação superfície/volume das hemácias), o aumento do número de linfócitos e fagócitos, os quais são responsáveis pelo sistema imune, oferecendo assim proteção contra agentes patogênicos.

O modo de ação das espécies probióticas presentes na microbiota do intestino depende de certa forma na sua habilidade em sobreviver e de se multiplicar no intestino delgado. Os prebióticos e probióticos inibem bactérias patogênicas em várias regiões tais como o *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica e a *Salmonella* sp e *Clostridium* sp. no intestino, Figura 6a. Os ingredientes múltiplos alteram a taxa da digestão dos nutrientes, Figura 6b. A forma e a atividade dos componentes presentes nos alimentos funcionais influenciam na absorção dos nutrientes, Figura 6c. Prebióticos e probióticos modificam as funções das barreiras do epitélio intestinal, Figura 6d. Nutrientes, vitaminas, minerais e probióticos, interagem e melhoram as funções das células imunes gastrintestinais, Figura 6e. Prebióticos e probióticos modulam toda a microflora gastrintestinal, Figura 6f. Além dos produtos de fermentação das fibras e oligossacarídeos não digeríveis e outros componentes da microflora nutrir o intestino, também melhoram a diferenciação, maturação e a saúde geral das células colônicas, Figura 6g (GERMAN et al.,1999).

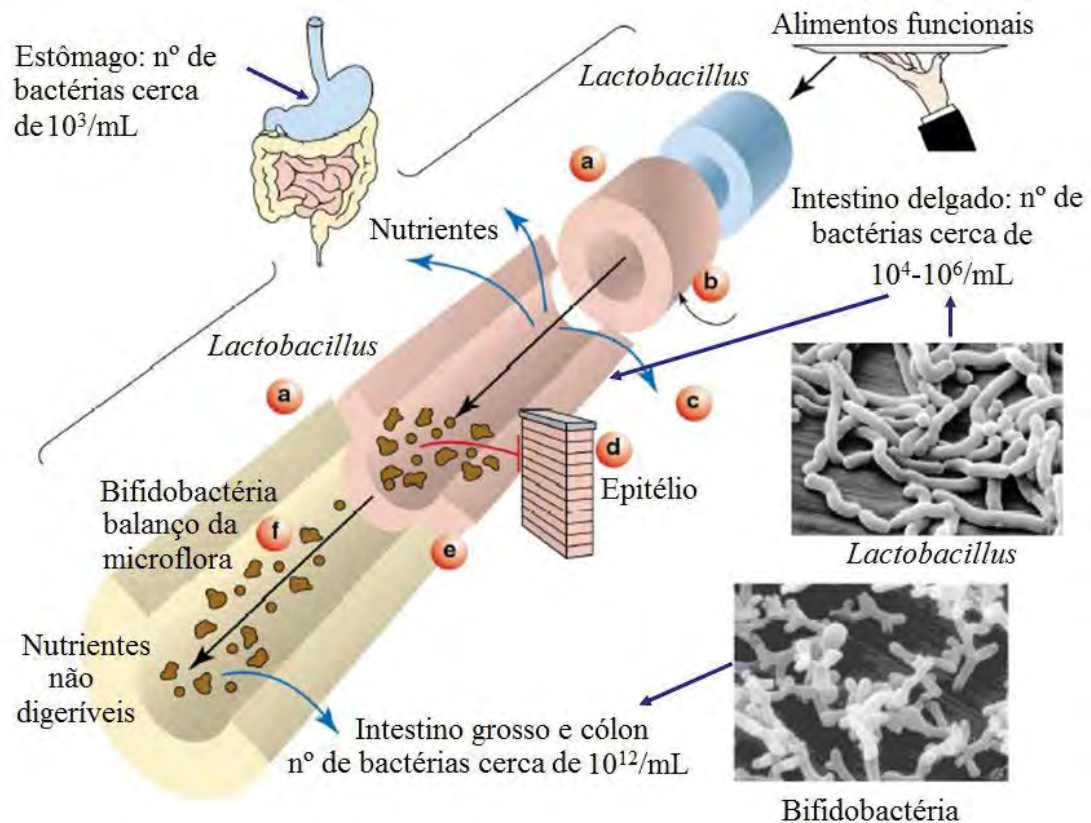


Figura 6abcdefg. Mecanismo de atuação dos prebióticos e probióticos. Fonte adaptada de German et al. (1999).

O gênero *Lactobacillus* está amplamente distribuído no meio ambiente, principalmente em produtos lácteos (e vegetais) e são comumente encontrados no intestino delgado de humanos. Apresentam-se na forma de bastonetes regulares, caracterizados como anaeróbios facultativos, às vezes microaerófilos. Produzem vários compostos como ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas durante a fermentação láctica (SOLDATI, 2006). De acordo com Quigley (2010), a predominância de anaeróbios no cólon reflete o fato de que concentrações de oxigênio são muito baixas, e o microrganismo tem que se adaptar para sobreviver neste ambiente hostil.

Os cogumelos parecem ser fontes potenciais de prebióticos, devido seu conteúdo em carboidratos tais como quitina, hemicelulose, β e α -glucanas, mananas e galactanas (AIDA et al., 2009). Synytsya et al. (2009) verificaram que extratos líquidos de cogumelo do gênero *Pleurotus* estimularam o crescimento de probióticos, atuando como prebióticos. Os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* apresentaram diferentes características de crescimento dependendo do tipo de extrato utilizado (extrato aquoso ou alcalino) e da especificidade da espécie, provavelmente devido à presença de diferentes componentes estruturais. O extrato

aquoso é constituído de β -1,3-1,6-D-glucana ramificada e o extrato alcalino de α -D-glucana linear como os principais componentes polissacarídeos.

4. Materiais e métodos

4.1. Amostras

Agaricus blazei em pó (disponível em cápsulas) foi adquirido do comércio de Produtos naturais Ltda, Uruguaiana, Brasil. A aveia em flocos da Quaker® foi adquirida do comércio varejista de São José do Rio Preto, SP.

4.2. Padrões

Amostras padrões de açúcares tais como a glucose, gentiobiose, celobiose, celotriose, celotetraose, laminaritriose e laminaritetraose foram adquiridas da Sigma-Aldrich. O substrato laminarina (β -1,3-1,6-glucana produzida pela alga *Laminaria digitata*) utilizado na determinação de atividade de β -1,3-glucanase e nas hidrólises também foi adquirido da Sigma-Aldrich.

4.3 Microrganismos

No presente trabalho, foram utilizados os fungos *Trichoderma harzianum* Rifai isolado de *Aspidosperma* sp. (Peroba) por Barbosa (1992) e o fungo *Trichoderma reesei* QM 9414 adquirido da coleção de cultura da fundação André Tosello (Campinas-SP). Os probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus pentosus* também foram adquiridos da fundação André Tosello.

4.4 Otimização da produção de β -1,3-glucanases pelo *Trichoderma reesei* QM9414 e *Trichoderma harzianum* Rifai

Para o preparo do inóculo, os fungos foram repicados em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de xilose-agar incorporado ao meio mínimo de sais de Vogel (MMSV), permanecendo incubado durante 5 dias a 28 °C. Os cultivos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de MMSV descrito por Vogel (1956) e extrato de *Agaricus blazei* como única fonte de carbono. Cada frasco foi inoculado com uma suspensão contendo 10^7 esporos. Os frascos foram mantidos sob agitação constante a 180 rpm em 28 °C. O efeito da fonte de carbono e o tempo de cultivo para a produção de β -1,3-glucanases pelo

Trichoderma reesei e *Trichoderma harzianum* foram usadas como variáveis em um planejamento experimental apresentado na seção 3.3.

4.5 Delineamento fatorial e análises estatísticas

A concentração de *Agaricus blazei* e o tempo de cultivo para a produção de β -glucanases pelo *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum* foram otimizadas utilizando-se da metodologia de superfície de resposta através do planejamento fatorial 2^2 -central composto, com cinco repetições no ponto central, totalizando 13 experimentos, realizados em duplicata (Tabelas 8 e 9). O planejamento para ambos os fungos foi escolhido de acordo com o perfil de crescimento obtido antes da otimização. As variáveis independentes estudadas para a otimização da produção de β -glucanases ($Y_1 = U/mL$) foram: $x_1 =$ tempo de cultivo em dias e $x_2 =$ *Agaricus blazei* em g/L. Também foram realizadas as análises de variância (ANOVA) e análises de regressão múltipla utilizando-se o software STATISTICA versão 6.0 (www.statsoft.com) StatSoft Inc., 2001.

Tabela 8: Delineamento estatístico dos experimentos para duas variáveis para o *Trichoderma reesei*.

| Experimento | Tempo (x_1) | Agaricus blazei (x_2) | |
|---------------------------------------|--------------------|---------------------------|-----|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | -1 | +1 | +1 |
| 3 | +1 | -1 | -1 |
| 4 | +1 | +1 | +1 |
| 5 | -1 | 0 | 0 |
| 6 | +1 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | -1 | -1 |
| 8 | 0 | +1 | +1 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 |
| Variáveis originais independentes | Níveis de Variação | | |
| | -1 | 0 | +1 |
| x_1 , tempo de cultivo em dias | 3 | 5 | 7 |
| x_2 , <i>Agaricus blazei</i> em g/L | 1,0 | 2,0 | 3,0 |

Tabela 9: Delineamento estatístico dos experimentos para duas variáveis para o *Trichoderma harzianum*.

| Experimento | Tempo (x_1) | Agaricus blazei (x_2) | |
|-------------|-----------------|---------------------------|----|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | -1 | +1 | +1 |
| 3 | +1 | -1 | -1 |
| 4 | +1 | +1 | +1 |
| 5 | -1 | 0 | 0 |
| 6 | +1 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | -1 | -1 |
| 8 | 0 | +1 | +1 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 |

| Variáveis originais independentes | Níveis de Variação | | |
|---------------------------------------|--------------------|-----|-----|
| | -1 | 0 | +1 |
| x_1 , tempo de cultivo em dias | 1 | 2 | 3 |
| x_2 , <i>Agaricus blazei</i> em g/L | 1,0 | 2,0 | 3,0 |

4.6 Métodos Analíticos

A medida da atividade de β -1,3-glucanase foi realizada pela quantificação dos açúcares redutores liberados da hidrólise do substrato laminarina (β -1,3-1,6-glucana produzida pela alga *Laminaria digitata*, Sigma), pelo método descrito por Giese et al. (2005). O volume final do ensaio foi igual a 0,5 mL, o qual foi constituído por laminarina (4 mg/mL), e das soluções tampão acetato 25 mM, no pH ótimo de atividade para as preparações enzimáticas de *T. reesei* (pH 5,0) e *T. harzianum* Rifai (pH 4,5), a 50 °C durante 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 50 μ L de NaOH 1,0 M. Para quantificação dos açúcares redutores liberados, foi utilizado o método do cuproarsenato descrito por Somogyi (1945) e Nelson (1944). A unidade de atividade enzimática foi definida como o número de micromoles de açúcar redutor liberado por minuto por mL de extrato

enzimático nas condições de ensaio estabelecidas. Os açúcares totais foram determinados pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois (1956). A determinação de proteína foi determinada pelo método de Hartree-Lowry, 1972.

4.7 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade de β -1,3-glucanase

Para medida do pH ótimo, a atividade foi determinada a 50 °C em diferentes valores de pH incubando-se a enzima e laminarina 0,2 % em tampões a 0,1 M: acetato (3,0-5,5) e fosfato de sódio (pH 6,0-8,0). A temperatura ótima foi medida pela mistura da reação em diferentes temperaturas entre 25-75 °C, com intervalos de 5 °C, e medida a atividade no pH ótimo.

Para medida do pH de estabilidade, a enzima foi diluída (1:1) nas soluções tampões: acetato (3,0-5,5) e fosfato de sódio (pH 6,0-8,0) sem substrato, mantido a 25 °C por 24 h. Após incubação a atividade residual de β -1,3-glucanase foi quantificada nas condições ótimas de pH e temperatura. A termoestabilidade foi medida pela incubação da enzima sem substrato em diferentes temperaturas entre 25-75 °C, com intervalos de 5 °C, por 1 h. Após incubação a atividade residual de β -1,3-glucanase foi quantificada nas condições ótimas de pH e temperatura. A atividade máxima foi definida como 100%.

4.8 Purificação parcial do complexo de β -glucanases

As enzimas concentradas foram submetidas à cromatografia de filtração em gel, em coluna aberta, utilizando-se a resina Sephadex-G100, equilibrada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 com 50 mM de NaCl. A enzima foi eluída com o mesmo tampão, a um fluxo de 0,4 mL/min. Amostras de 4,5 mL do eluente foram coletadas, em tubos, utilizando o coletor de frações (Gilson). As proteínas presentes em cada fração foram monitoradas através da absorção em 280 nm. A atividade enzimática foi mensurada como descrito anteriormente. As amostras que apresentaram atividade enzimática para endo- β -1,3-glucanases foram concentradas e armazenadas para posteriormente utilizá-las na caracterização e na produção dos gluco-oligossacarídeos.

4.9 Eletroforese em gel desnaturante

O teor de purificação parcial das amostras foi analisado através de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970). As proteínas submetidas à eletroforese foram aquecidas em ebulição por 3 minutos

em tampão tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, contendo mercaptoetanol 2 %, SDS 0,2 %, glicerol 10 % e azul de bromofenol 0,001 M. O gel fracionador foi preparado na concentração de 10 % e o gel concentrador a 5 % como indicado em Sambrook e Russel (2001). Como marcador de peso molecular foi utilizado um kit nos quais estavam proteínas que variaram de 18,4 a 180 kDa (Sigma- Aldrich). Para a revelação do gel foi utilizado o método com reagente de prata de acordo com Blum et al. (1987).

4.10 Extração de glucanas de *Agaricus blazei*

As β -glucanas de *Agaricus blazei* foram extraídas de acordo com a metodologia de Mizuno et al., (1990), com algumas modificações. Amostras secas do corpo de frutificação de *A. blazei* comercial (20 g) foram maceradas, lavadas com 120 mL de etanol 85 % (v/v), agitadas em agitador magnético, e filtradas a vácuo. O resíduo foi lavado com 350 mL de etanol 85 % (v/v) aquecido a 80 °C por 3 h e filtrado a vácuo, separando-se e descartando-se a fase líquida, este procedimento foi realizado 3 vezes consecutivas. Os polissacarídeos foram extraídos sucessivamente por três vezes com 350 mL de H₂O destilada, aquecido a 100 °C, por 3 h, e filtrado a vácuo. As frações aquosas foram coletadas por filtração, seguida pela adição de 4 vol. de etanol a 95 % (v/v) e deixado precipitar overnight, a 4 °C. A fração líquida foi coletada e concentrada 1:9 em evaporador rotativo reduzindo-se o volume a aproximadamente 150 mL, e mantido no gelo. Esta etapa foi repetida 3 vezes. Reunidos os 3 volumes (409 mL), reduziu-se o volume a 80 mL, em evaporador rotativo. Este volume foi dialisado em membrana de celulose de corte de 12.000 kDa, durante 3 dias, com troca diária de H₂O destilada, estas frações foram submetidas à liofilização e pesada para posteriores aplicações.

4.11 Hidrólise enzimática de laminarina e glucana de *Agaricus blazei*

A hidrólise dos polissacarídeos laminarina e glucana de *Agaricus blazei* foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 100 mL contendo 1,0 g/L de cada substrato, separadamente, em 10 mL de tampão acetato 0,1 M no pH ótimo de cada enzima. A hidrólise foi realizada com a enzima bruta e parcialmente purificada com atividade enzimática de 4 U totais, obtida do cultivo de *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum*. Os frascos foram mantidos sob agitação a temperatura de estabilidade de cada enzima. Aliquotas das amostras (1 mL) foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60 minutos) e aquecidas por 10 min/100 °C para inativação das enzimas. Os produtos de

hidrólise foram analisados através do método de Somogyi (1945) e Nelson (1944), e os açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois (1956). Posteriormente foram monitorados pela cromatografia líquida de alta pressão em cromatógrafo de íons (HPAEC).

4.12 Cromatografia líquida de alta pressão em cromatógrafo de íons (HPAEC/PAD)-análises dos produtos de hidrólise

Os hidrolisados foram precipitados com etanol, centrifugados, evaporados e dissolvidos em 0,4 mL de água destilada. As amostras de 60 minutos foram injetadas em um HPAEC-PAD (ICS 3000 Dionex Corporation, EUA) equipado em um amostrador automático AS40. Os oligossacarídeos foram separados usando um gradiente de acetato de sódio em uma coluna analítica CarboPac PA 100 (4 x 250 mm) a um fluxo de 1,0 mL por minuto. As condições de eluição foram realizadas usando soluções de tampão acetado de sódio 500 mM pH 5,0 e NaOH 100 mM (GIESE et al. 2006). Eluição isocrática de 0-15 minutos em NaOH 0,1 M (97 %) e acetato de sódio 0,5 M (3%). Após 15 minutos de eluição foi gradiente até 70 min em NaOH 0,1 M (100 %) e após 70 min em NaOH 0,1 M e acetato de sódio 0,5 M (50 %). O volume de amostra aplicado foi de 0,5 ml, contendo 10-100 µg de açúcares totais. A identificação e quantificação dos açúcares foram realizadas de acordo com suas curvas de calibração correspondente, considerando o tempo de retenção.

*4.13 Outros métodos de extração aquosa de polissacarídeos de *Agaricus blazei**

4.13.1 Extrações de polissacarídeos de baixo e alto peso molecular

Os polissacarídeos de *Agaricus blazei* foram extraídos de acordo com a metodologia de Poli et al., (2009), com algumas modificações. O *A. blazei* (3 g) foi macerado, infundido em 27 mL de água a 100 °C até atingir a temperatura ambiente, e filtrado a vácuo. Para obtenção de polissacarídeos de baixo peso molecular, o material filtrado foi submetido à precipitação com etanol na proporção de 1:5 em repouso por 2 h, e centrifugado a 7000 g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com etanol e acetona para remoção de sais insolúveis, proteínas não digeridas e fibras insolúveis, e o excesso de solventes evaporado em estufa a 40 °C. O resíduo sólido obtido da filtração foi utilizado para a obtenção de polissacarídeos de alto peso molecular, aquecido em H₂O destilada por 3 h, e filtrado a vácuo. O filtrado foi submetido ao mesmo processo de extração dos polissacarídeos de baixo peso molecular, posteriormente o material foi seco em estufa a 40 °C, e pesado para posteriores aplicações, Figura 7.

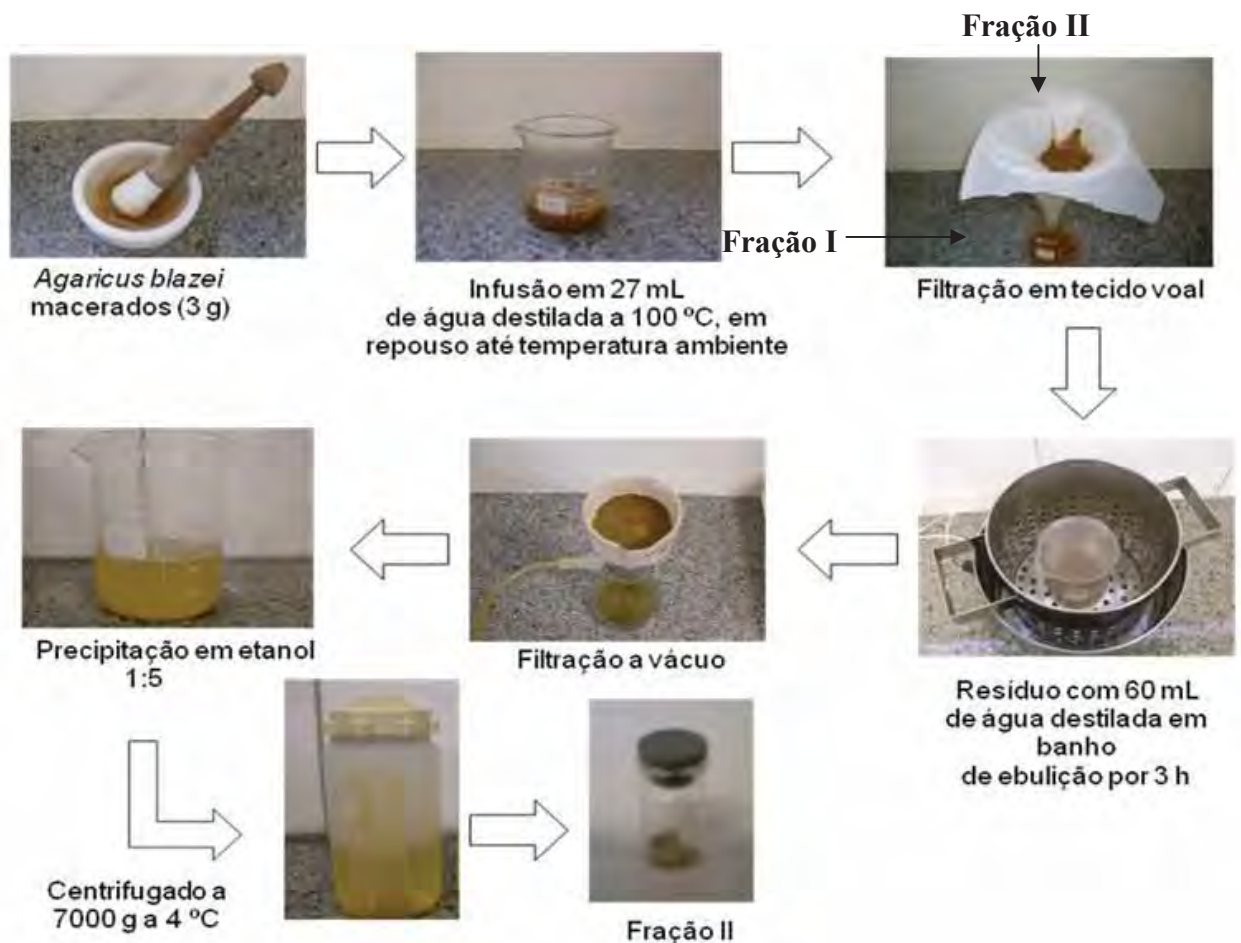


Figura 7. Esquema da extração de glucana de baixo e de alto peso molecular de *A. blazei*.

4.14. Extração de glucana de Aveia

A β -glucana de aveia foi extraída de acordo com a metodologia de Ahmad et al., (2010), com algumas modificações. Aveia em flocos (100 g) foi imersa em 800 mL de etanol 80 % em banho de ebulição por 6 h, filtrada e centrifugada a 10000 g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspensionado em água destilada, e adicionou NaOH 1 M na proporção de 1:7, respectivamente, sob agitação em agitador magnético por 90 minutos a 45 °C. A amostra foi então centrifugada a 15000 g por 15 minutos a 20 °C. Para remoção de impurezas foi adicionado ao sobrenadante Na_2CO_3 1 M, centrifugado a 22000 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para precipitação das glucanas com etanol 80 % na proporção de 1:2, aquecido por 15 minutos, A amostra foi centrifugada a 3500 g a 4 °C, o material foi seco em estufa a 40 °C, e pesado para posteriores aplicações, Figura 8.

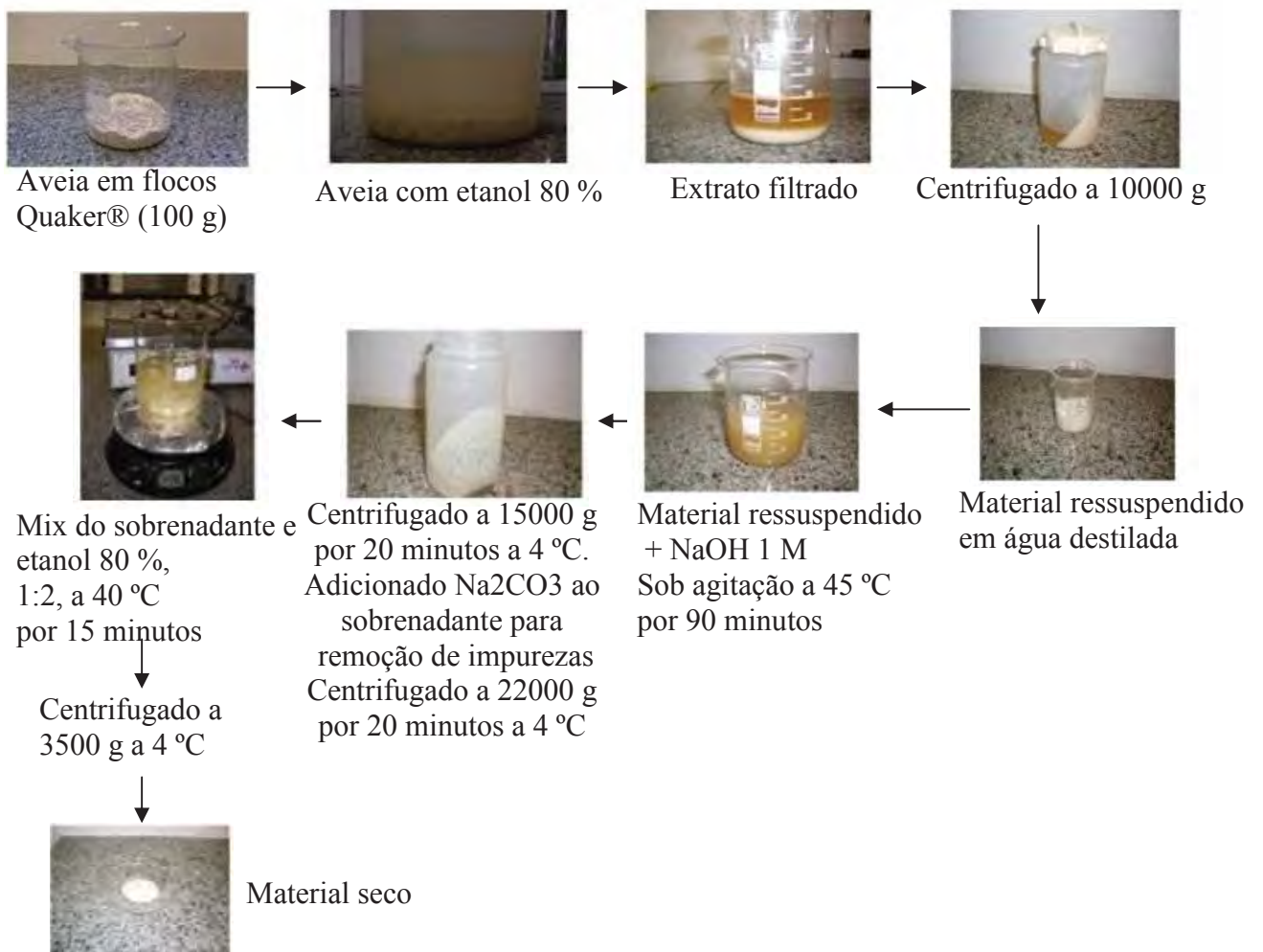


Figura 8. Esquema da extração alcalina de glucana de aveia.

4.15 Hidrólise enzimática de glucana de *Agaricus blazei* e Aveia

A hidrólise das glucanas de *Agaricus blazei* e da Aveia foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 100 mL contendo 1,0 g/L de cada substrato, separadamente, que foi hidrolisado pela β -1,3-glucanase obtida do cultivo de *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum* com atividade enzimática de 4 U totais em tampão acetato pH 4,5 0,1 M com volume final de 10 mL. Os frascos foram mantidos sob agitação a temperatura de estabilidade de cada enzima, para o *Trichoderma reesei* 40 °C e para o *Trichoderma harzianum* 35 °C. Aliquotas das amostras (1 mL) foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60 minutos) e (0, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 e 540 minutos) e aquecidas por 10 min/100 °C para inativação das enzimas. Os produtos de hidrólise foram analisados através do método de Somogyi (1945) e Nelson (1944), e os açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois (1956).

4.16 Estudo “in vitro” da ação dos componentes prebióticos em microrganismos probióticos

O Caldo De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) foi preparado de acordo com a composição descrita anteriormente (IDF, 1999), para ativação das culturas probióticas que estavam em glicerol 20 % armazenadas em freezer -80 °C. Este pré-inóculo foi incubado em anaerobiose por 24 h e em seguida realizada as diluições seriadas.

Os substratos utilizados (1% p/v) para o crescimento das bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus pentosus* foram: glucanas de *Agaricus blazei*, tanto a de baixo quanto a de alto peso molecular, glucana de aveia, *Agaricus blazei* e a glicose utilizada como controle positivo. Os cultivos dos microrganismos probióticos foram realizados em placas de Petri (60 x 15 mm) contendo meio MRS com modificações, substituindo a fonte de glicose pelos substratos citados acima, e também redução na sua concentração em 50 %. A técnica utilizada para inoculação foi por superfície, onde as culturas foram diluídas em água destilada até as concentrações desejadas. Nas placas correspondentes aos substratos foram inoculados 30 μ l de cada suspensão e em seguida foi espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski, posteriormente incubadas em anaerobiose (Figura 9), a 37 °C, exceto o *L. pentosus* a 30 °C, por 72 h. O crescimento foi avaliado a cada 24 h, durante 72 h.



Figura 9. Simulação de uma Jarra de anaerobiose para os cultivos das bactérias probióticas.

5. Resultados e discussão

5.1 Estudo do efeito da fonte de carbono e o tempo de cultivo na produção de β -1,3-glucanases pelo *Trichoderma reesei*

Para otimizar a produção de β -glucanases pelo *T. reesei* foi utilizada a metodologia de superfície de resposta através do planejamento fatorial 2^2 -central composto, totalizando 13 experimentos. Através da análise da regressão múltipla dos dados experimentais, uma equação polinomial de segunda ordem foi obtida para a produção de β -1,3-glucanases (Equação 1).

$$\hat{Y}_1 = 3,310690 + 1,855000 x_2 \quad (1)$$

Os termos lineares para a variável x_1 , e os termos quadráticos para as variáveis x_1 e x_2 foram descartados por não serem significativos. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, o intercepto foi significativo indicando que o ponto central (5 dias de cultivo e *Agaricus blazei* igual a 2 g/L) foram escolhidos adequadamente.

Tabela 10: Análise dos fatores e suas interações na produção de β -1,3-glucanases pelo *T. reesei* cultivado em *Agaricus blazei* como única fonte de carbono.

| Fatores | Coefficientes | DP ^a | T | P |
|--------------|---------------|-----------------|----------|----------|
| Intercepto | 3,310690 | 0,157887 | 20,86870 | 0,000000 |
| x_2 linear | 1,855000 | 0,310467 | 5,97487 | 0,000008 |

^a Desvio padrão; $x_2 = \text{Agaricus blazei}$

De acordo com a Figura 10, a variável mais importante para a produção de β -1,3-glucanases pelo *T. reesei* foi o *Agaricus blazei*. A análise de variância para a superfície de resposta da Equação 1 (Tabela 11) mostra que a regressão foi significativa ($p < 0,05$) e que a falta de ajuste não foi significativa, indicando que o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

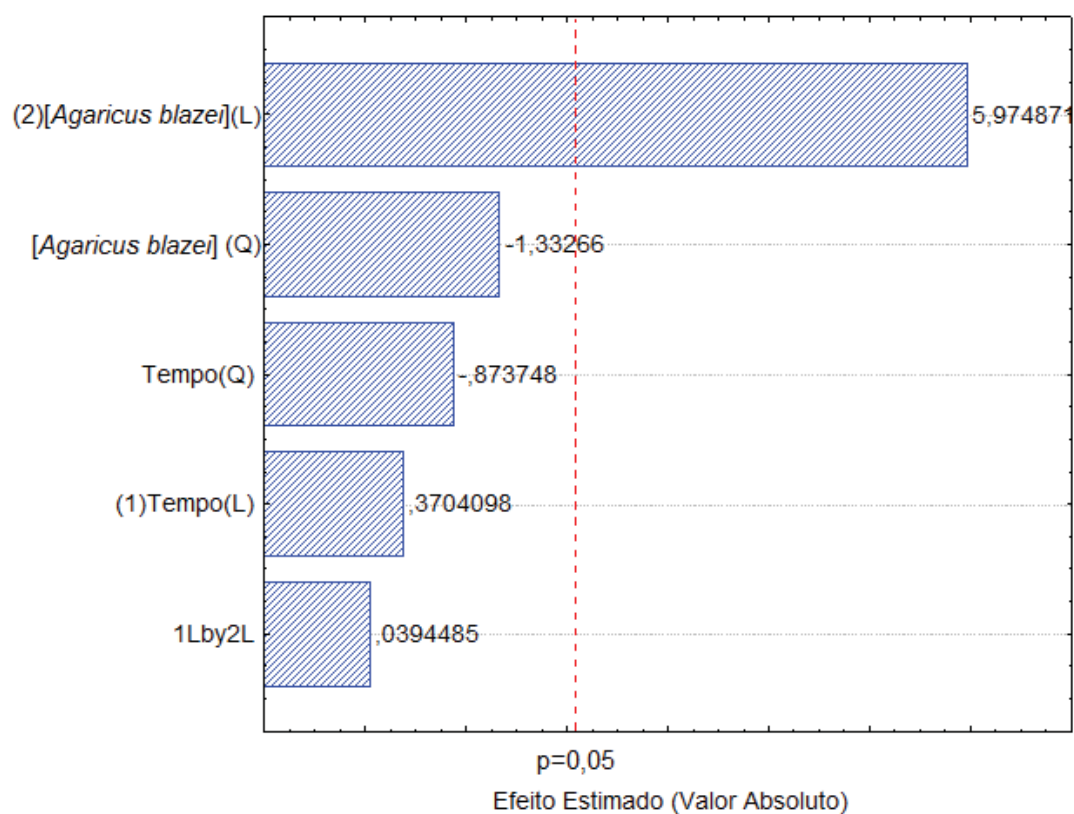


Figura 10. Gráfico de Pareto para a otimização da produção de β -1,3-glucanases pelo *T. reesei* cultivado em *Agaricus blazei* como única fonte de carbono.

Tabela 11: Análise de variância (ANOVA) para a produção de β -1,3-glicanases pelo *T. reesei* cultivado em *Agaricus blazei* como única fonte de carbono.

| Fonte de Variação | Soma dos Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F^a | p^b |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|----------|----------|
| Regressão | 10,36275 | 2 | 5,181375 | 17,16450 | 0,000027 |
| Residual | 6,94291 | 23 | 0,301866 | | |
| Erro Padrão | 5,78338 | 20 | 0,28917 | | |
| Total | 17,30566 | 25 | | | |

^a F – relação (regressão/residual); ^b p – relação (desvio da regressão/erro padrão)

Os resultados experimentais e as atividades previstas para β -1,3-glicanase, utilizando-se a Equação 1, estão apresentados na Tabela 12. A maior atividade de β -1,3-glicanase (4,36 U/mL) foi observada em 5 dias de cultivo e *Agaricus blazei* igual a 3 g/L.

Tabela 12: Valores experimentais e previstos para a produção de β -1,3-glicanases pelo *T. reesei* cultivado em *Agaricus blazei* como única fonte de carbono.

| Experimento | Atividade de β -1,3-glicanase (U/mL) | | |
|-------------|--------------------------------------------|-------------------|------|
| | Experimental (Y_1) | Predito (Y_1) | |
| 1 | 2,16 | 1,78 | 1,82 |
| 2 | 3,67 | 3,56 | 3,67 |
| 3 | 2,35 | 1,43 | 1,93 |
| 4 | 4,30 | 2,83 | 3,79 |
| 5 | 3,17 | 2,76 | 3,05 |
| 6 | 3,59 | 3,29 | 3,17 |
| 7 | 2,60 | 1,35 | 2,08 |
| 8 | 4,36 | 4,08 | 3,93 |
| 9 | 3,53 | 3,81 | 3,31 |
| 10 | 3,65 | 4,00 | 3,31 |
| 11 | 3,87 | 2,91 | 3,31 |
| 12 | 2,62 | 2,64 | 3,31 |
| 13 | 3,00 | 2,71 | 3,31 |

Pelo valor de R^2 , pode-se observar que 66 % da variação das respostas podem ser explicadas pelo modelo, ou seja, pelos fatores experimentais e suas interações. O erro padrão

baixo indica a boa reprodutibilidade dos dados experimentais. De acordo com os resultados obtidos, foi possível obter a máxima produção de β -1,3-glucanase pelo fungo *T. reesei* em 5 dias de cultivo em *Agaricus blazei* 3 g/L (Figura 11).

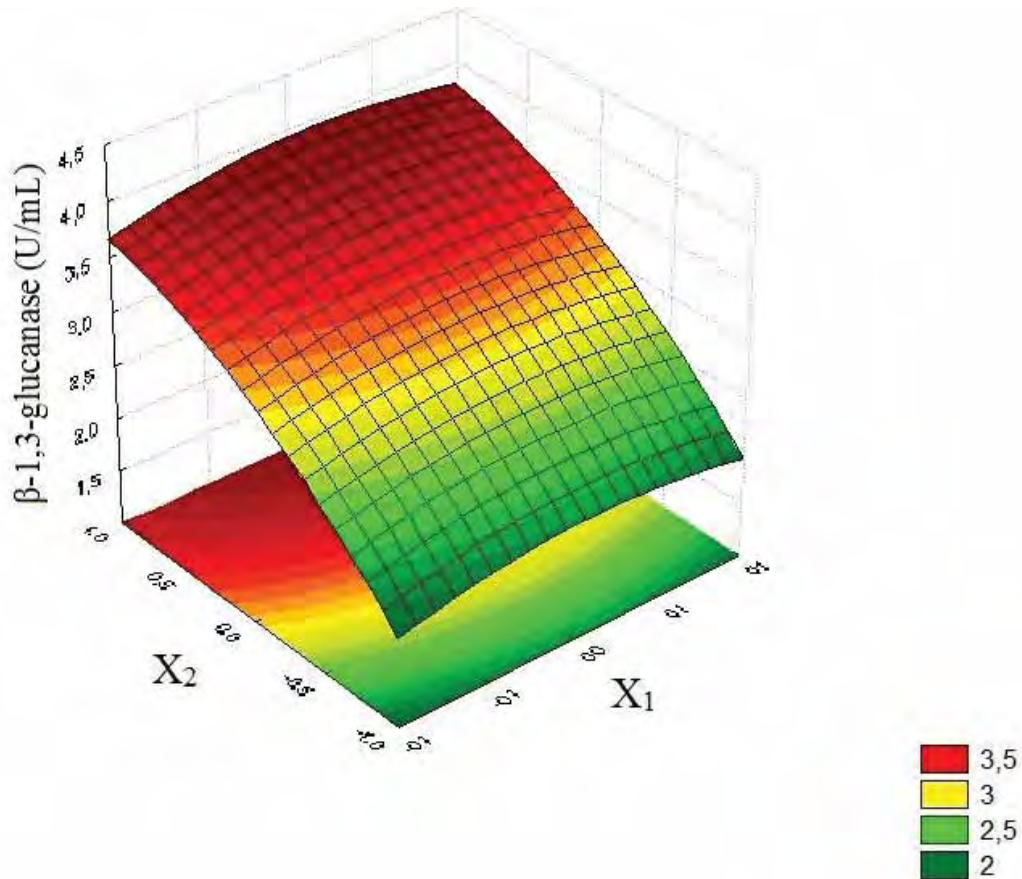


Figura 11. Gráfico de níveis para a produção de β -1,3-glucanases pelo *Trichoderma reesei* em função do tempo de cultivo (x_1) x *Agaricus blazei* (x_2).

5.2 Estudo do efeito da fonte de carbono e o tempo de cultivo na produção de β -1,3-glucanases pelo *Trichoderma harzianum* Rifai

Através da análise da regressão múltipla dos dados experimentais, uma equação polinomial de segunda ordem foi obtida para a produção de β -1,3-glucanases (Equação 2).

$$\hat{Y}_1 = 0,228276 - 0,123333x_1 - 0,033966x_1^2 + 0,179167x_2 + 0,113534x_2^2 - 0,107500x_1x_2 \quad (2)$$

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 13, o intercepto foi significativo indicando que o ponto central (2 dias de cultivo e *Agaricus blazei* igual a 2 g/L) foram escolhidos adequadamente.

Tabela 13: Análise dos fatores e suas interações na produção de β -1,3-glucanases pelo *T. harzianum* cultivado em *Agaricus blazei* como única fonte de carbono.

| Fatores | Coefficientes | DP ^a | T | P |
|------------------|---------------|-----------------|----------|----------|
| Intercepto | 0,228276 | 0,008277 | 27,5795 | 0,000000 |
| x_1 linear | -0,123333 | 0,008138 | -15,1554 | 0,000000 |
| x_1 quadrático | -0,033966 | 0,011995 | -2,8317 | 0,011509 |
| x_2 linear | 0,179167 | 0,008138 | 22,0163 | 0,000000 |
| x_2 quadrático | 0,113534 | 0,011995 | 9,4655 | 0,000000 |
| $x_1 \cdot x_2$ | -0,107500 | 0,009967 | -10,7857 | 0,000000 |

^a Desvio padrão; x_1 = tempo de cultivo; x_2 = *Agaricus blazei*

De acordo com a Figura 12, a variável mais importante para a produção de β -1,3-glucanases pelo *T. harzianum* foi o *Agaricus blazei*, seguido pelo tempo de cultivo. A análise de variância para a superfície de resposta da Equação 2 (Tabela 14) mostra que a regressão foi significativa ($p < 0,05$) e que a falta de ajuste não foi significativa, indicando que o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

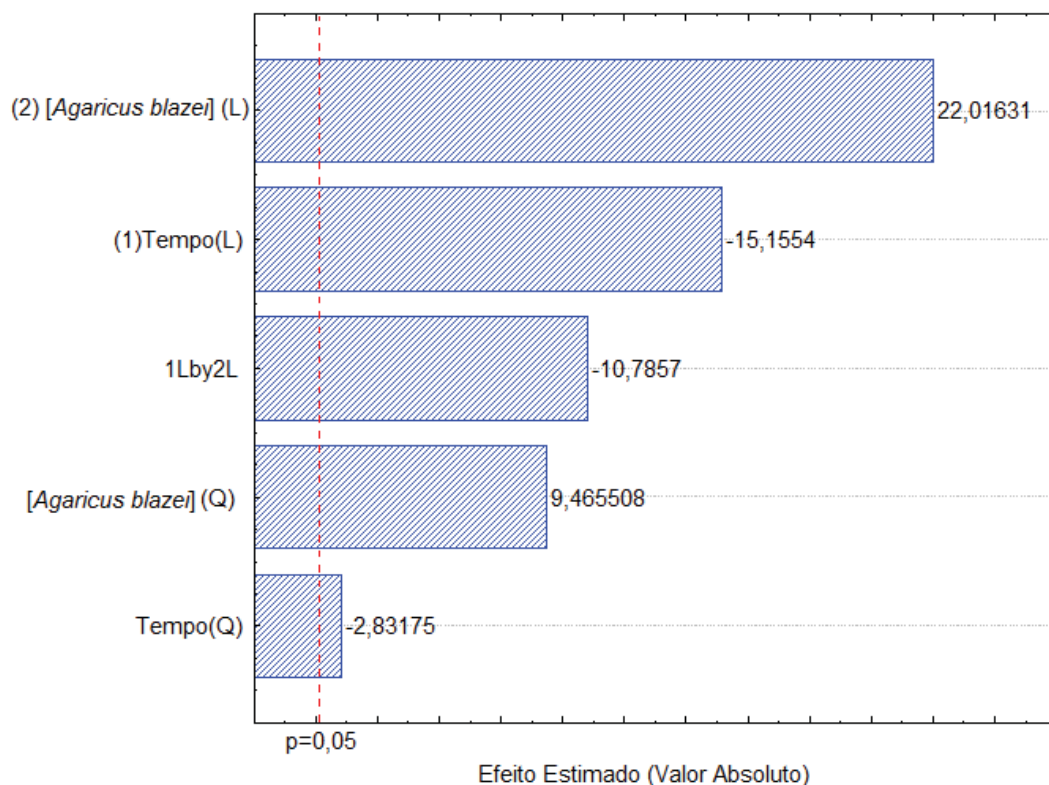


Figura 12. Gráfico de Pareto para a otimização da produção de β -1,3-glucanases pelo *T. harzianum* cultivado em *Agaricus blazei* como única fonte de carbono.

Tabela 14: Análise de variância (ANOVA) para a produção de β -1,3-gluconases pelo *T. harzianum* cultivado em *Agaricus blazei* como única fonte de carbono.

| Fonte de Variação | Soma dos Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado Médio | F^a | P^b |
|-------------------|--------------------|--------------------|----------------|----------|----------|
| Regressão | 0,567742 | 2 | 0,283871 | 33,29297 | 0,000000 |
| Residual | 0,196108 | 23 | 0,008526 | | |
| Erro Padrão | 0,013510 | 17 | 0,000795 | | |
| Total | 0,763850 | 25 | | | |

^a F – relação (regressão/residual); ^b p – relação (desvio da regressão/erro padrão)

Os resultados experimentais e as atividades preditas para β -1,3-gluconase, utilizando-se a Equação 2, estão apresentados na Tabela 15. A maior atividade de β -1,3-gluconase (0,77 U/mL) foi observada em 1 dia de cultivo e *Agaricus blazei* igual a 3 g/L.

Tabela 15: Valores experimentais e preditos para a produção de β -1,3-gluconases pelo *T. harzianum* cultivado em *Agaricus blazei* como única fonte de carbono.

| Experimento | Atividade de β -1,3-gluconase (U/ml) | | |
|-------------|--------------------------------------------|------|-------------------|
| | Experimental (Y_1) | | Predito (Y_1) |
| 1 | 0,14 | 0,15 | 0,14 |
| 2 | 0,77 | 0,72 | 0,71 |
| 3 | 0,09 | 0,05 | 0,11 |
| 4 | 0,26 | 0,22 | 0,25 |
| 5 | 0,24 | 0,34 | 0,32 |
| 6 | 0,12 | 0,14 | 0,07 |
| 7 | 0,22 | 0,19 | 0,16 |
| 8 | 0,50 | 0,52 | 0,52 |
| 9 | 0,20 | 0,21 | 0,23 |
| 10 | 0,25 | 0,24 | 0,23 |
| 11 | 0,25 | 0,21 | 0,23 |
| 12 | 0,22 | 0,22 | 0,23 |
| 13 | 0,18 | 0,24 | 0,23 |

Pelo valor de R^2 , pode-se observar que 96 % da variação das respostas podem ser explicadas pelo modelo, ou seja, pelos fatores experimentais e suas interações. O erro padrão baixo indica a boa reprodutibilidade dos dados experimentais. De acordo com os resultados

obtidos, foi possível obter a máxima produção de β -1,3-glucanase pelo fungo *T. harzianum* em 1 dia de cultivo em *Agaricus blazei* de 3 g/L (Figura 13).

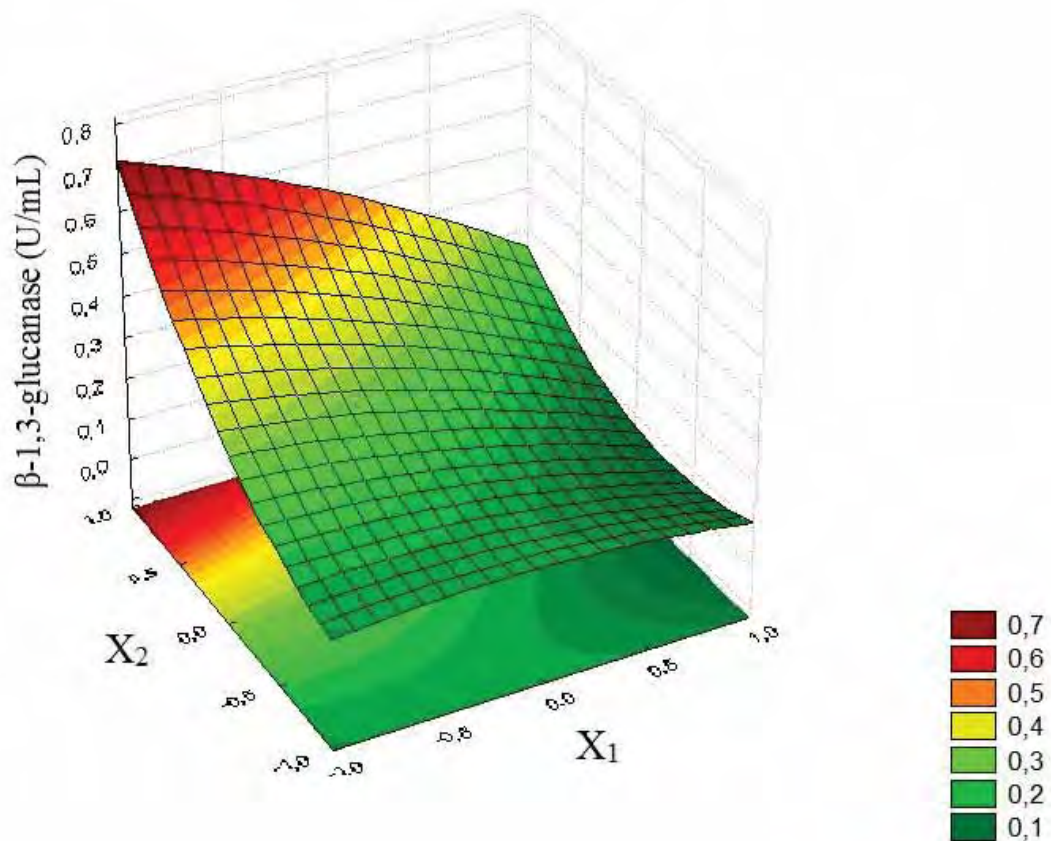


Figura 13. Gráfico de níveis para a produção de β -1,3-glucanases pelo *Trichoderma harzianum* em função do tempo de cultivo (x_1) x *Agaricus blazei* (x_2).

Em estudos relacionados, GIESE et al. (2005) otimizaram a concentração do exopolissacarídeo botriosferana e o tempo de cultivo utilizando-se a metodologia de superfície de resposta. A maior atividade de β -1,3-glucanase (1,2 U/mL) pelo *Trichoderma harzianum* foi obtida utilizando botriosferana 1,5 g/L como única fonte de carbono, após 5 dias de cultivo, sugerindo que a produção de β -1,3-glucanase dependeu da concentração do exopolissacarídeo, que foi baixa devido a baixa solubilidade do exopolissacarídeo.

A metodologia de superfície de resposta também foi empregada por Theodore; Panda (1995) para otimizar a temperatura e pH inicial para produção de β -1,3-glucanase pelo *Trichoderma harzianum* NCIM 1185, em fermentação submersa utilizando a glicose como única fonte de carbono. As melhores condições para produção de β -1,3-glucanase foi 30 °C e pH 4,7, com atividade máxima de 0,40 U/mL.

A combinação otimizada de fatores foi estudada por Donzelli et al. (2005) para a produção de β -1,3-glucanase pelo *Trichoderma atroviride* P1, anteriormente denominado de *Trichoderma harzianum*, utilizando-se a metodologia de superfície de resposta. A maior produção de β -1,3-glucanase (45,5 U/mL) foi obtida utilizando-se a glicose 0,1 %, quitina 0,8 % e escleroglucana (β -1,3; β -1,6 glucana de *Sclerotium gluconicum*) 0,2 %, como fontes de carbono, após 5 dias de cultivo.

A atividade de β -1,3-glucanase pelo *Trichoderma harzianum* CECT 2413 aumentou com o aumento da concentração de pustulana (β -1,6 glucana) e quitina. A atividade também foi modulada pela glicose, diminuindo com o aumento de sua concentração, sugerindo que a regulação da enzima pode estar sujeita a indução pelo substrato e repressão catabólica (DE LA CRUZ et al., 1993).

Noronha et al. (2000) encontraram maior atividade de β -1,3-glucanase pelo *Trichoderma harzianum* TC, quando cresceram em laminarina (4,0 U/mL), parede celular purificada de *Sclerotium rolfii* (4,61 U/mL), *Rhizoctonia solani* (7,91 U/mL) e *Pythium* sp (10,8 U/mL) como única fonte de carbono, após 3 dias de cultivo. Monteiro; Ulhoa (2006) também encontraram maior atividade de β -1,3-glucanase (1,4 U/mL) pelo *Trichoderma koningii* quando utilizou parede celular de *R. solani* como fonte de carbono. Ambos os autores sugerem que a indução de β -1,3-glucanases foi influenciada pelo substrato contendo β -glucana.

De Marco et al. (2003) encontraram maior atividade de β -1,3-glucanases (2,8 U/mL) pelo *Trichoderma harzianum* 1051 utilizando-se quitina, amido de batata, celulose microcristalina ou caseína, como substratos, após 3 dias de cultivo. A atividade foi muito baixa ou nenhuma atividade hidrolítica foi produzida na ausência dos substratos.

Kaur et al. (2005) constataram que β -glucanases obtidas a partir de ambos os isolados de *Trichoderma atroviride* e *Coniothyrium minitans* parecem ter sido induzida de forma inespecífica, porque alguma atividade foi encontrada em cultivo contendo sacarose, carboximetilcelulose e quitina. Ao contrário, a laminarina induziu a formação de β -1,3-glucanases em *Trichoderma atroviride*, mas não em *Coniothyrium minitans*, indicando que a indução dessa enzima é específica em *Coniothyrium minitans*.

A maior produção de biomassa pelo fungo *Trichoderma harzianum* em 3 g/L de extrato de *Agaricus blazei* foi 2,2 g/L, depois de 24 h de cultivo, Figura 14. A maior produção de biomassa observada em 1 e 2 g/L de extrato de *Agaricus blazei* foi 1 e 1,7 g/L depois de 48 e 24 h, respectivamente, figura 15 e 16. Giese (2011) também avaliou a produção da biomassa

pelo *Trichoderma harzianum* sobre diferentes fontes de carbono e observou 7,17 g/L sobre micélio de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 como fonte de carbono. A maior produção de biomassa pelo fungo *Trichoderma reesei* em 3 g/L de *Agaricus blazei* foi 3,22 g/L, depois de 168 h de cultivo, Figura 17. A maior produção de biomassa observada em 1 e 2 g/L de *Agaricus blazei* foi 1,79 e 3,1 g/L depois de 168 h de cultivo, Figura 18 e 19.

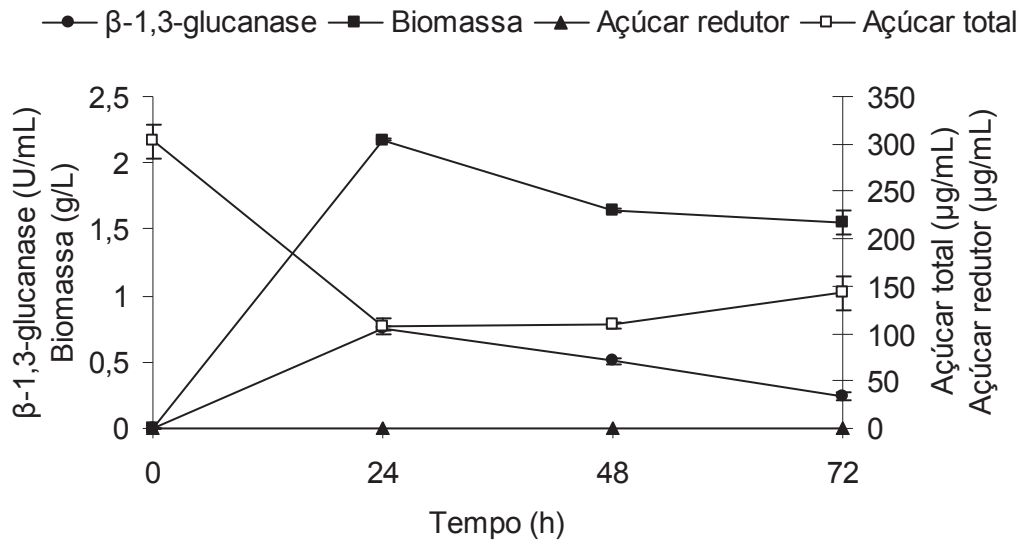


Figura 14. Perfil de crescimento para produção de β-1,3-glucanase pelo *Trichoderma harzianum* sobre 3 g/L de extrato de *Agaricus blazei*.

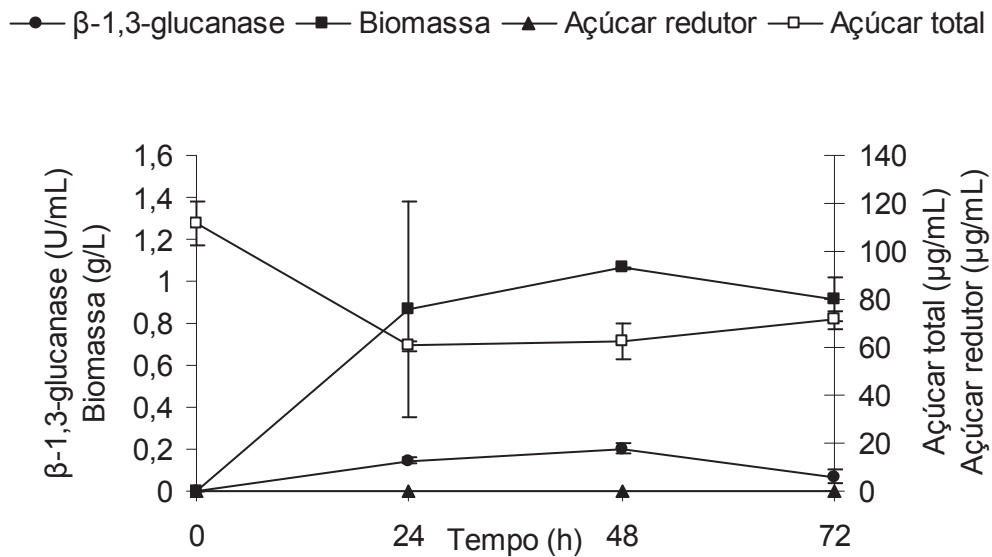


Figura 15. Perfil de crescimento para produção de β-1,3-glucanase pelo *Trichoderma harzianum* sobre 1 g/L de *Agaricus blazei*.

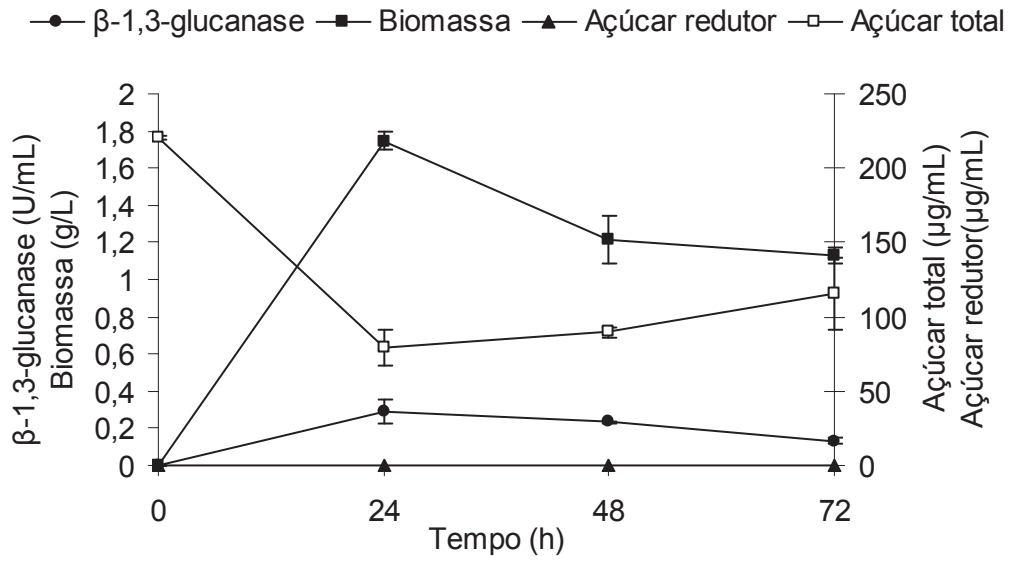


Figura 16. Perfil de crescimento para produção de β -1,3-glucanase pelo *Trichoderma harzianum* sobre 2g/L de *Agaricus blazei*.

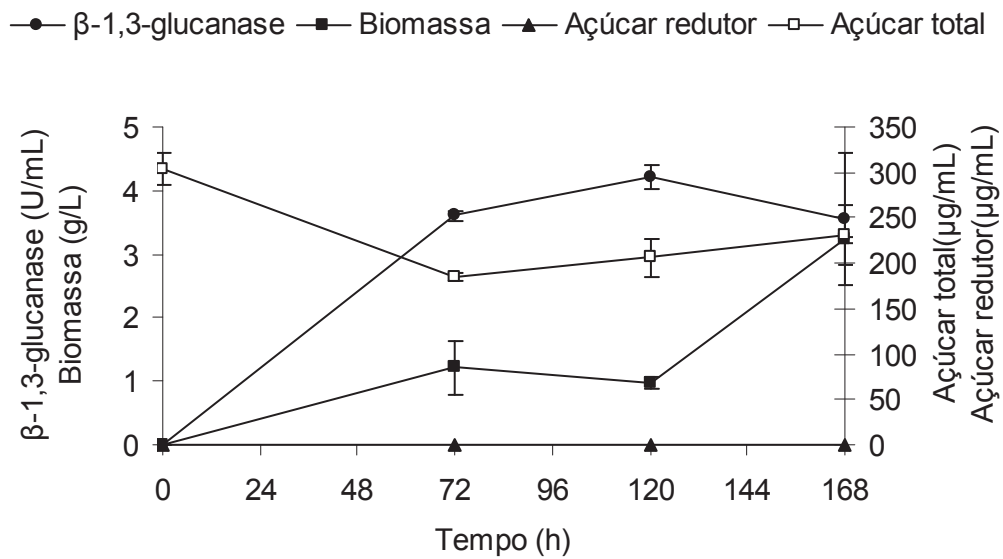


Figura 17. Perfil de crescimento para produção de β -1,3-glucanase pelo *Trichoderma reesei* sobre 3g/L de *Agaricus blazei*.

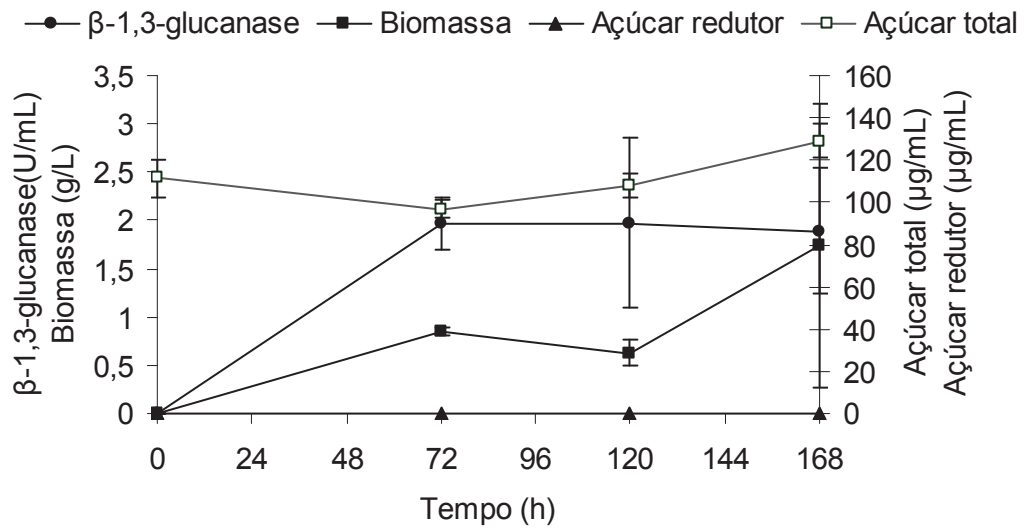


Figura 18. Perfil de crescimento para produção de β -1,3-glucanase pelo *Trichoderma reesei* sobre 1g/L de *Agaricus blazei*.

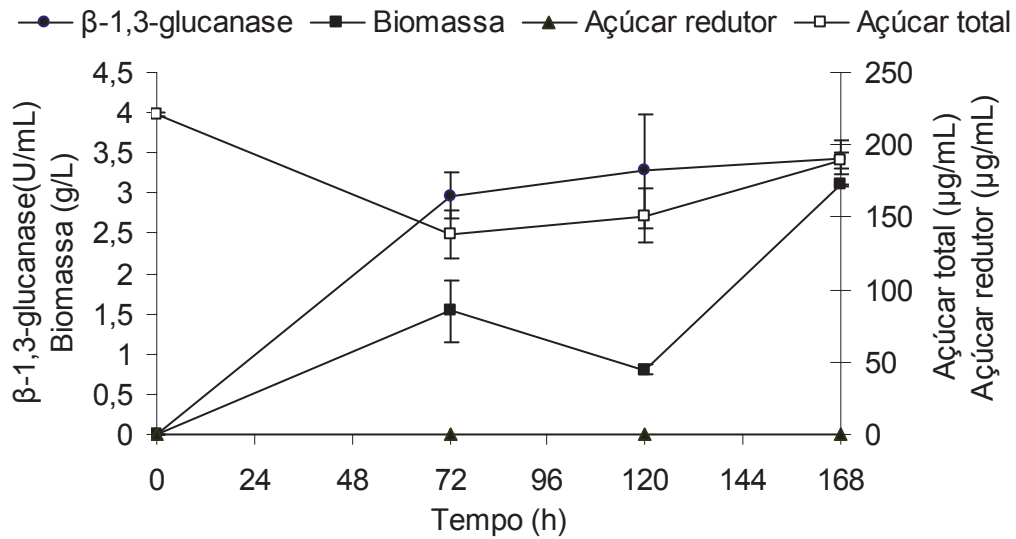


Figura 19. Perfil de crescimento para produção de β -1,3-glucanase pelo *Trichoderma reesei* sobre 2g/L de *Agaricus blazei*.

5.3 Caracterização de β -1,3-glicanases brutas

A produção da β -1,3-glicanase para determinação do efeito do pH e temperatura foi realizada nas condições otimizadas. A β -1,3-glicanase produzida pelo *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum*, apresentaram pH ótimo entre 3,5-5,0, e 4,5, e uma temperatura ótima a 60 e 50 °C, respectivamente (Figuras 20 e 21).

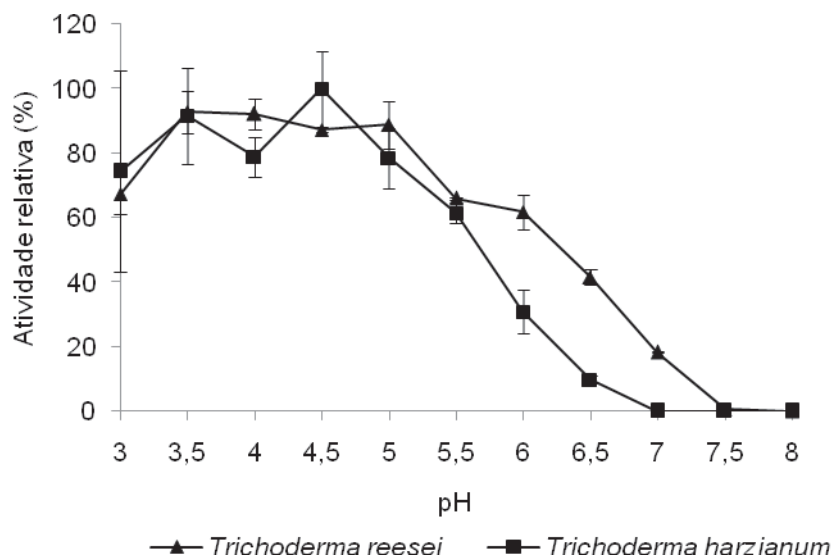


Figura 20. Efeito do pH sobre a atividade da β -1,3-glicanase bruta com laminarina como substrato. Os valores de pH foram ajustados com os seguintes tampões: acetato de Na 0,1 M (pH 3,0-5,5) e fosfato de Na 0,1 M (pH 6,0-8,0).

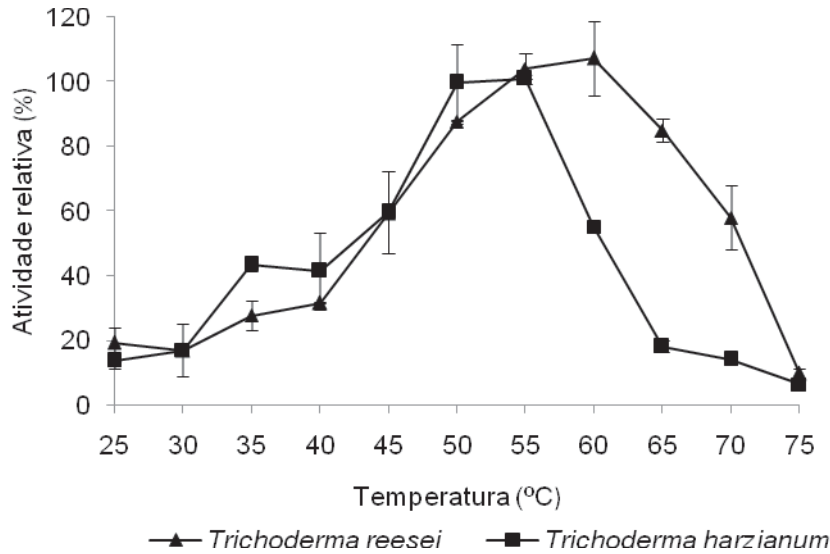


Figura 21. Efeito da temperatura sobre a atividade da β -1,3-glucanase bruta com laminarina como substrato. A reação enzimática foi realizada em tampão acetato de Na 0,1 M (pH 4,5).

A β -1,3-glucanase produzida pelo *Trichoderma reesei* demonstrou estabilidade em uma faixa de pH de 3,5-5,0 e manteve 80 % de sua atividade após 1 h a 40 °C. A enzima produzida pelo *Trichoderma harzianum* demonstrou estabilidade em uma faixa de 3,0-5,0 e manteve 43 % de sua atividade após 1 h a 35 °C (Figuras 22 e 23). A enzima produzida pelo *Trichoderma reesei* demonstrou características similares a β -1,3-glucanase purificada de *Trichoderma viride* que apresentou maior atividade em pH 4,5 a 55°C, a enzima manteve-se estável entre pH 3,5-7,5 e a estabilidade diminuiu após 60°C (KULMINSKAYA et al. 2001).

As β -1,3-glucanases produzidas por diferentes espécies de *Trichoderma* geralmente apresentam pH ótimo na faixa de 4,5-5,0 e temperatura ótima de 50 °C (YI et al. 2008; MONTEIRO; ULHOA, 2006; NORONHA; ULHOA, 2000). No entanto, variações de temperatura ótima, como 40 °C foi observada para β -1,3-glucanases de *Rhizoctonia solani* (Vijayendra; Kashiwagi, 2009) e animais marinhos (Zhu et al. 2008), assim como 60 °C para a de *Trichoderma harzianum* (RAMOT; COHEN-KUPIEC; CHET, 2000).

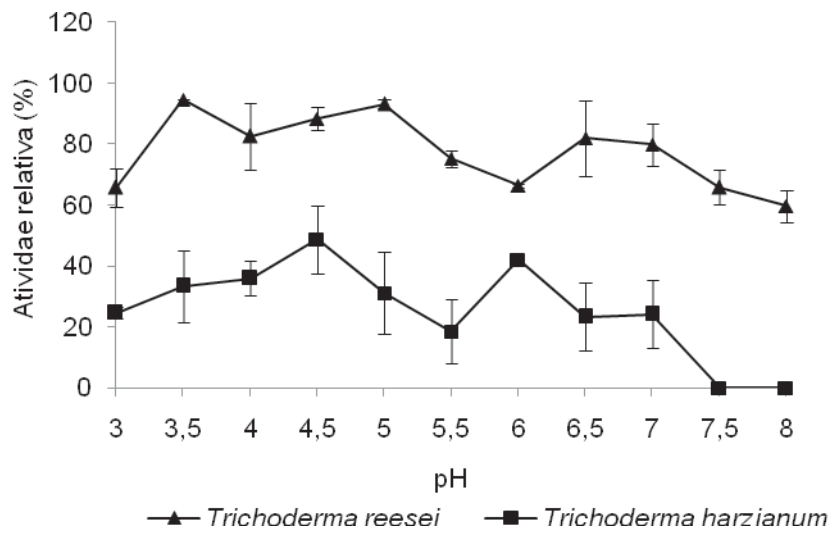


Figura 22. Efeito do pH de estabilidade sobre a atividade da β -1,3-glicanase bruta com laminarina como substrato. Os valores de pH foi ajustado com os tampões: acetato de Na 0,1M (pH 3,0-5,5) e fosfato de Na 0,1 M (pH 6,0-8,0).

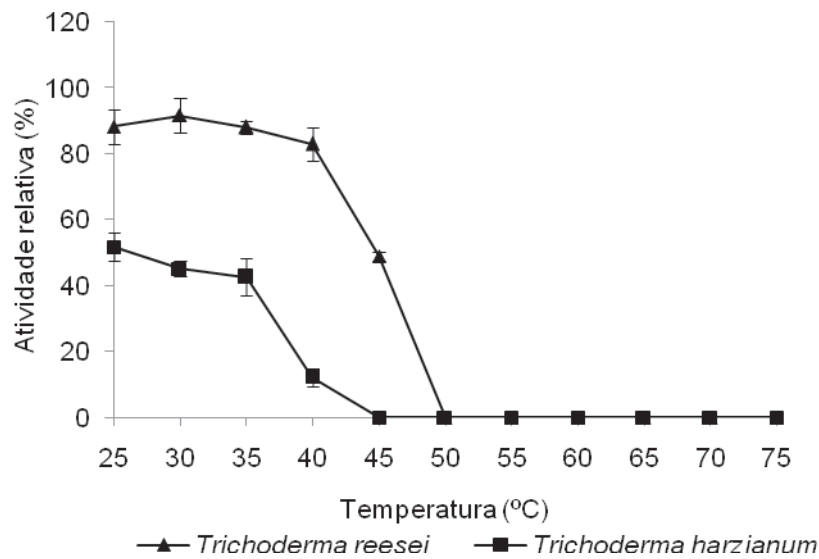


Figura 23. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da β -1,3-glicanase bruta com laminarina como substrato. Os valores de pH foram ajustados com os seguintes tampões: acetato de Na 0,1 M (pH 3,0-5,5) e fosfato de Na 0,1 M (pH 6,0-8,0).

5.4 Purificação parcial de β -1,3-glucanases

A purificação parcial de β -1,3-glucanases pelo *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum* foram acompanhadas de três etapas. As etapas de purificação parcial e as proteínas de cada passo estão sintetizadas nas Tabelas 16 e 17. Os extratos brutos foram concentrados através do sistema Quixstand™ Benchtop da Amersham Bioscience e em seguida pelo sistema Amicon®, ambos com uma membrana de corte limite de 10 kDa de massa molar. O extrato concentrado foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100, mostrando uma fração de atividade de β -1,3-glucanase (Figuras 24 e 25). As frações coletadas no volume de eluição que apresentaram atividade enzimática foram unidas e concentradas, este concentrado sendo utilizado nas análises subseqüentes. O processo de purificação parcial apresentou um rendimento final de 27,8 % e 16,78 % e um fator de purificação de 95,9 e 95,7 vezes, respectivamente para as amostras finais do *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum* (Tabelas 16 e 17). Houve um aumento da atividade total, praticamente o dobro, na β -1,3-glucanase de *Trichoderma reesei* concentrada pelo sistema Quixstand™, provavelmente por causa da remoção do inibidor.

O uso de β -1,3-glucanase parcialmente purificada teve como objetivo evitar a presença de outras enzimas, tais como as enzimas do complexo glucanólítico, as quais poderiam interferir na obtenção dos produtos de hidrólise de interesse.

Tabela 16: Síntese do processo de purificação parcial da β -1,3-glucanase produzida por *Trichoderma reesei*.

| <i>Etapas</i> | <i>Volume Total</i> | <i>Atividade β-1,3-glucanase (U/mL)</i> | <i>Atividade Total (U)</i> | <i>Proteína (mg/mL)</i> | <i>Proteína Total (mg)</i> | <i>Atividade Específica (U/mg)</i> | <i>Rendimento (%)</i> | <i>Fator de Purif.</i> |
|-----------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| <i>β-1,3-glucanase bruta</i> | 828 | 0,37 | 306,36 | 0,10 | 82,8 | 3,70 | 100 | 1 |
| <i>Ultrafiltração Quixstand™ 10 kDa</i> | 100 | 6,01 | 601 | 0,26 | 26 | 23,11 | 196,17 | 6,24 |
| <i>Ultrafiltração Amicon 10 kDa</i> | 8 | 63,13 | 505,04 | 1,33 | 10,64 | 47,47 | 164,97 | 12,83 |
| <i>Sephadex G-100</i> | 20 | 4,26 | 85,2 | 0,012 | 0,24 | 355 | 27,81 | 95,95 |

Tabela 17: Síntese do processo de purificação parcial da β -1,3-glucanase produzida pelo *Trichoderma harzianum*.

| <i>Etapas</i> | <i>Volume Total</i> | <i>Atividade β-1,3-glucanase (U/mL)</i> | <i>Atividade Total (U)</i> | <i>Proteína (mg/mL)</i> | <i>Proteína Total (mg)</i> | <i>Atividade Específica (U/mg)</i> | <i>Rendimento (%)</i> | <i>Fator de Purif.</i> |
|-----------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| <i>β-1,3-glucanase bruta</i> | 1000 | 0,27 | 270 | 0,08 | 80 | 3,37 | 100 | 1 |
| <i>Ultrafiltração Quixstand TM 10 kDa</i> | 120 | 2,38 | 285,6 | 0,27 | 32,4 | 8,81 | 105,77 | 2,61 |
| <i>Ultrafiltração Amicon 10 kDa</i> | 15 | 13 | 195 | 1,24 | 18,6 | 10,48 | 72,22 | 3,11 |
| <i>Ultrafiltração Amicon 10 kDa</i> | 6,65 | 20 | 133 | 1,24 | 8,25 | 16,13 | 49,26 | 4,79 |
| <i>Sephadex G-100</i> | 35 | 1,29 | 45,15 | 0,004 | 0,14 | 322,5 | 16,78 | 95,7 |

Os resultados de purificação parcial obtidos no presente trabalho apresentaram um considerável rendimento e um excelente fator de purificação, comparados a trabalhos anteriores.

Yi et al. (2008) purificaram uma β -1,3-glucanase de *Trichoderma viride* TP09, apresentando um rendimento de 45,2 % e um fator de purificação de 28,7 vezes, com apenas duas etapas de purificação. Kulminskaya et al. (2001) purificaram uma exo- β -1,3-glucanase de *Trichoderma viride*, após a realização de cinco etapas de purificação, os autores relatam um rendimento de 40 % e um fator de purificação de 25,2 vezes. Monteiro; Ulhoa (2006) purificaram uma β -1,3-glucanase de *Trichoderma koningii*, com um rendimento de 13,4 % e um fator de purificação de 105 vezes, com três etapas de purificação.

A endo- β -1,3-glucanase de *Agaricus brasiliensis* ATCC 76739 foi purificada com um rendimento de 6,66 % e um fator de purificação de 13,1 vezes. O extrato enzimático bruto foi submetido à precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e depois a uma cromatografia de troca iônica, DEAE-Phenyl-Sepharose (SHU et al. 2006). Exo- β -1,3-glucanase de *Rhizoctonia solani* foi purificada com um rendimento de 30,4 % e um fator de purificação de 152 vezes. A enzima foi submetida á quatro etapas de purificação, precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, DEAE-Toyopearl, CM-Toyopearl e Sephacryl S-200 (VIJAYENDRA; KASHIWAGI, 2009). Uma β -1,3-glucanase produzida

pelo fungo *Trichoderma harzianum* apresentou um rendimento de 0,32 % e um fator de purificação de 65,38 vezes. As amostras concentradas foram submetidas à Sephacryl S-200, Phenyl-Sepharose e CM-Sepharose (NORONHA; ULHOA, 2000). Hong; Meng (2003) purificaram uma endo- β -1,3-glucanase de *Paenibacillus* sp. com um fator de purificação de 28 vezes e um rendimento de 31 % após quatro etapas de purificação.

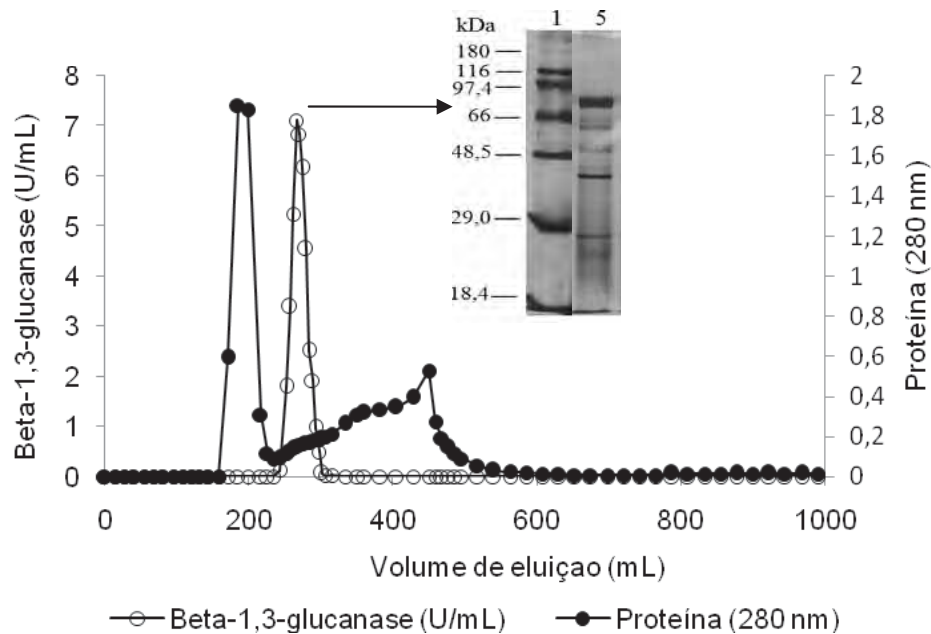


Figura 24. Perfil de eluição da β -1,3-glucanase de *Trichoderma reesei* em filtração em gel.

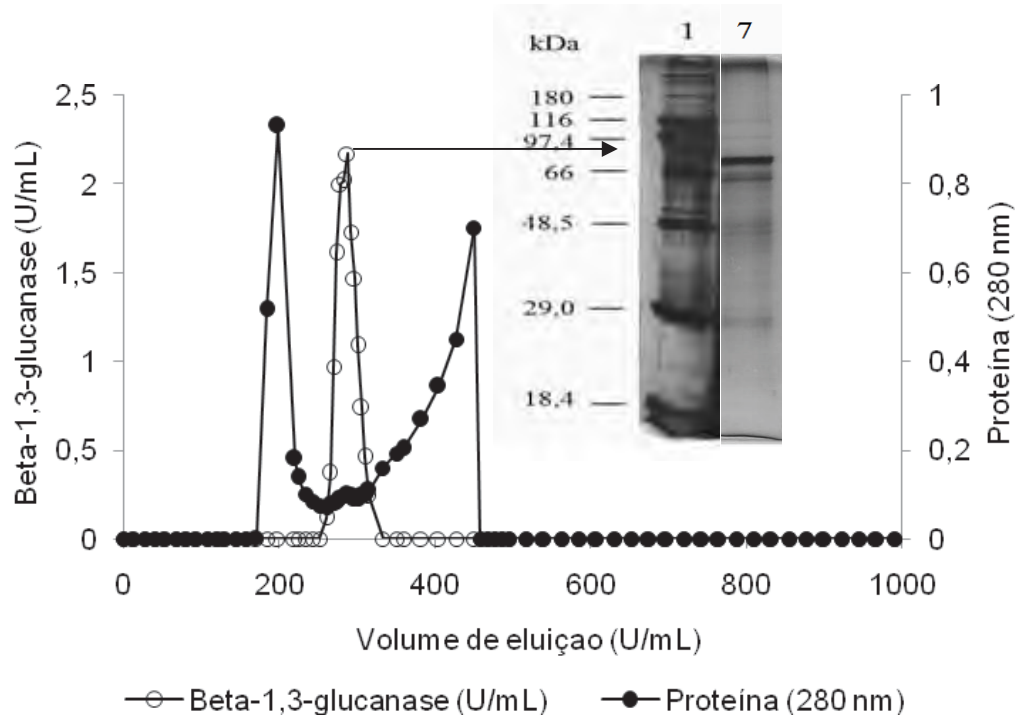


Figura 25. Perfil de eluição da β -1,3-glicocianase de *Trichoderma harzianum* em filtração em gel.

Análises realizadas por eletroforese (SDS-PAGE) após a cromatografia de exclusão molecular possibilitaram a observação de quatro bandas protéicas fortes para β -1,3-glicocianase de *Trichoderma reesei* e apenas uma banda forte para *Trichoderma harzianum*. Apenas com o gel não foi possível determinar a massa molecular da β -1,3-glicocianase de *Trichoderma reesei*. Um zimograma, gel de atividade, poderia identificar a banda com atividade. No entanto, a β -1,3-glicocianase de *Trichoderma harzianum* possivelmente é a banda mais forte, cuja massa molar é próxima de 96 kDa (Figuras 26 e 27). Entretanto, este resultado não é conclusivo e novas etapas de purificação deverão ser realizadas para obter um resultado mais confiável.

O pico de eluição da β -1,3-glicocianase de *Trichoderma reesei* em filtração em gel está representado pela linha 5 do gel, figura 24 e 26. Enquanto, o pico de eluição da β -1,3-glicocianase de *Trichoderma harzianum* está representado pela linha 7 do gel, figura 25 e 27.

A enzima purificada por Yi et al. (2008), do *Trichoderma viride* TP09, apresentou massa molar de 54,6 kDa. Kulminskaya et al. (2001) purificaram β -1,3-glicocianase de *Trichoderma viride* AZ36, apresentando massa molar de 61 kDa. Monteiro; Ulhoa (2006) purificaram β -1,3-glicocianase de *Trichoderma koningii* com massa molar de 75 kDa.

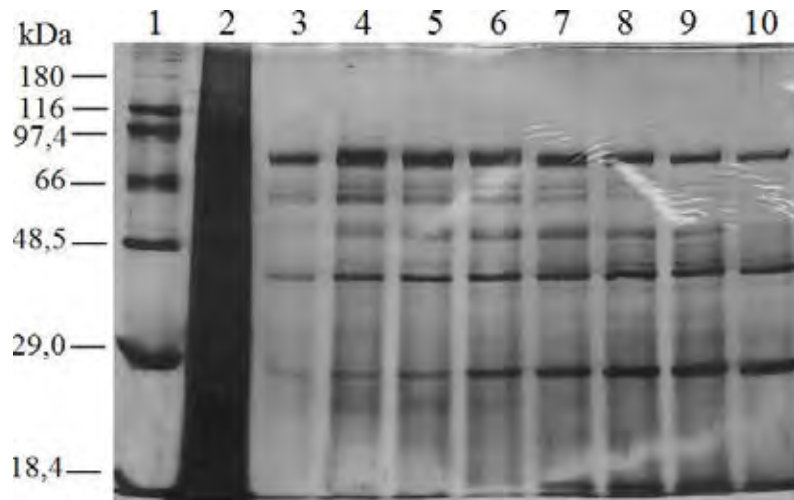


Figura 26. SDS-PAGE de β -1,3-glucanase produzida pelo *Trichoderma reesei*. Linha 1, Marcador molecular em kDa; Linha 2, Extrato bruto; Linha 3-7, Frações coletadas da cromatografia de filtração em gel com atividade de β -1,3-glucanase. As frações representadas pelas linhas 8-10 não foram unidas.

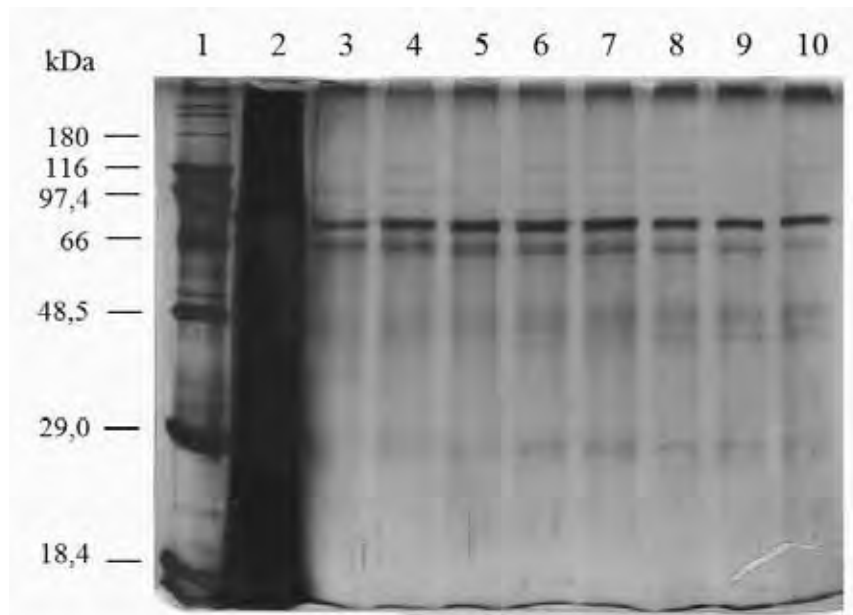


Figura 27. SDS-PAGE de β -1,3-glucanase produzida pelo *Trichoderma harzianum*. Linha 1, Marcador molecular em kDa; Linha 2, Extrato bruto; Linha 3-10, todas as frações coletadas da cromatografia de filtração em gel com atividade de β -1,3-glucanase foram unidas.

5.5 Caracterização das β -1,3-glicanases parcialmente purificadas

As β -1,3-glicanases parcialmente purificadas produzidas pelos microrganismos *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum*, apresentaram pH ótimo entre 4,5-5,5, e temperatura ótima a 55 °C para o *Trichoderma harzianum* e 55-65 °C para o *Trichoderma reesei*, valores próximos aos encontrados para a enzima bruta. Em relação à temperatura ótima foi observado um decréscimo de 5 °C em relação a temperatura ótima da enzima bruta do microrganismo *Trichoderma reesei* (Figuras 28 e 29).

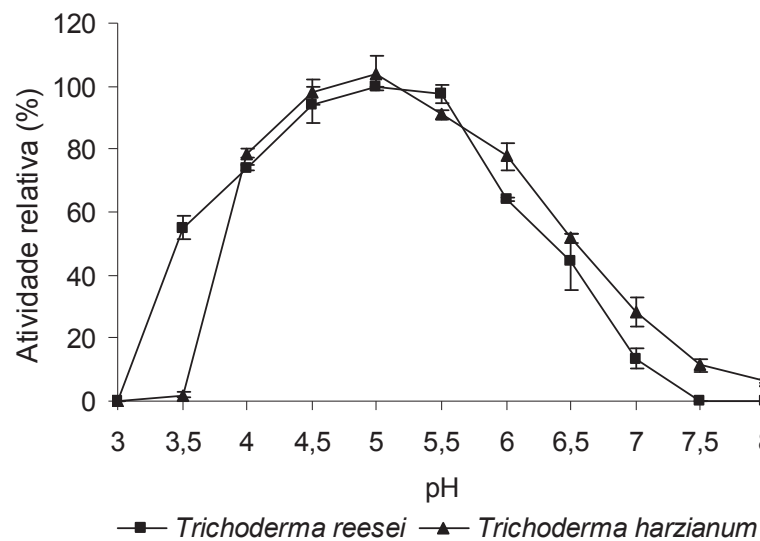


Figura 28. Efeito do pH sobre a atividade da β -1,3-glicanase com laminarina como substrato. Os valores de pH foram ajustados com os seguintes tampões: acetato de Na 0,1 M (pH 3,0-5,5) e fosfato de Na 0,1 M (pH 6,0-8,0).

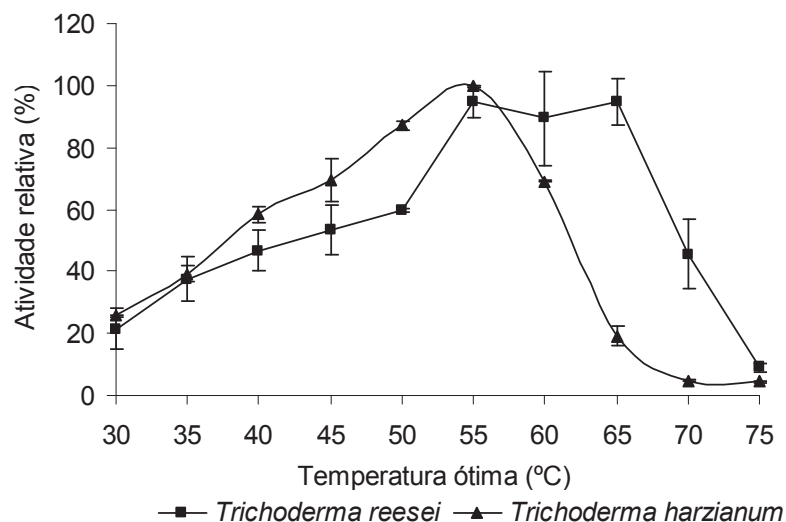


Figura 29. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da β -1,3-glicanase com laminarina como substrato. A reação enzimática foi realizada em tampão acetato de Na 0,1 M (pH 5,0).

A β -1,3-glucanase purificada parcialmente pelo *Trichoderma reesei* mostrou diferença na estabilidade da enzima bruta, demonstrou estabilidade em um faixa de 4,5-6,5, e quanto à termoestabilidade, apresentou maior estabilidade que a bruta, apresentado 100 % de atividade após 1 h entre 50-60 °C. A β -1,3-glucanase produzida pelo *Trichoderma harzianum*, apresentou diferentes características observadas na enzima bruta, demonstrou estabilidade em uma faixa de 4-5,5 e manteve 100 % de sua atividade após 1 h a 35 °C (Figuras 30 e 31).

Em trabalhos anteriores, Vijayendra; kashiwagi (2009); caracterizaram uma exo- β -1,3-glucanase de *Rhizoctonia solani*, a enzima manteve-se estável em uma faixa de pH 3-7 e reteve 90 % de sua atividade após 20 h de incubação a 25 °C. Esta enzima manteve-se estável durante 1 h entre 30 e 40 °C, e tornou-se completamente inativa após 60 °C.

Kulminskaya et al. (2001) purificaram e caracterizaram uma exo- β -1,3-glucanase de *Trichoderma viride*, o pH e a temperatura ótima obtidos foram 4,5 e 55 °C; os autores relatam que a enzima manteve-se estável após 24 h a temperatura ambiente em uma ampla faixa de pH 3,5-7,5, e a atividade diminuiu em temperatura acima de 60 °C.

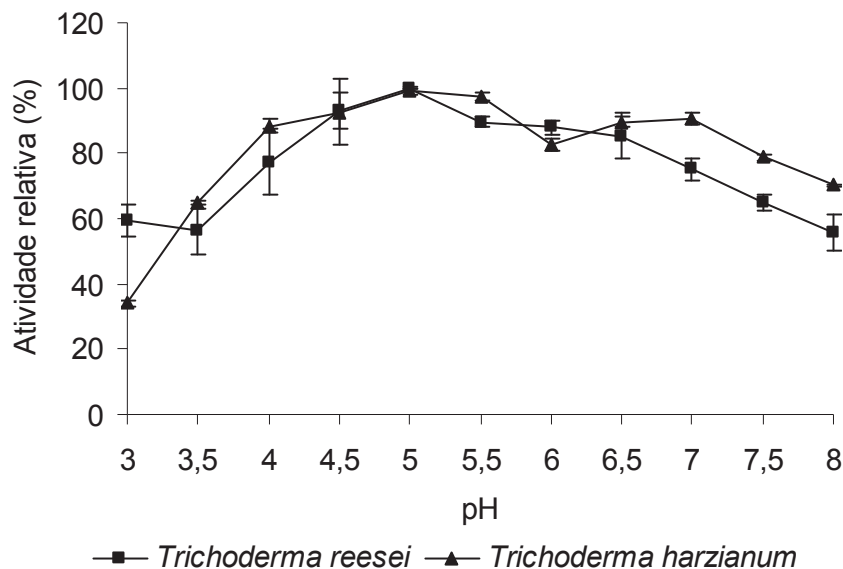


Figura 30. Efeito do pH de estabilidade sobre a atividade da β -1,3-glucanase com laminarina como substrato. Os valores de pH foram ajustados com os seguintes tampões: acetato de Na 0,1 M (pH 3,0-5,5) e fosfato de Na 0,1 M (pH 6,0-8,0).

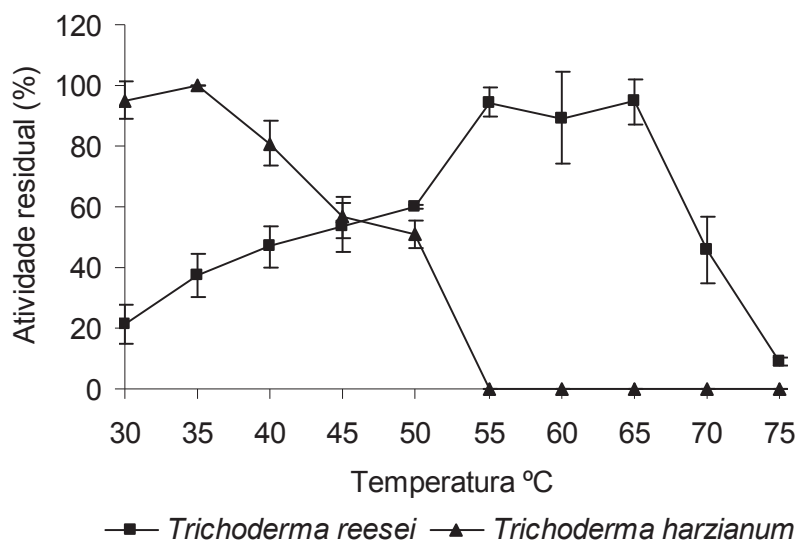


Figura 31. Efeito da temperatura de estabilidade sobre a atividade e estabilidade da β -1,3-glucanase com laminarina como substrato. A reação enzimática foi realizada em tampão acetato de Na 0,1 M (pH 5,0).

Os ensaios de caracterização realizados com as enzimas parcialmente purificadas confirmam a maior estabilidade da enzima produzida pelo microrganismo *Trichoderma reesei*. Há vários relatos na literatura quanto à perda da estabilidade da β -1,3-glucanase acima de 60 °C, obtida a partir de diferentes microrganismos. Trabalhos anteriores apresentam diferentes espécies de *Trichoderma* com o mesmo perfil de caracterização enzimática, com valores próximos aos obtidos no presente trabalho.

A β -1,3-glucanase purificada pelo *Trichoderma harzianum* Rifai T24, por El-katatny et al. (2001) foi bastante estável abaixo de 50 °C. No entanto, ela perdeu 40 % da atividade inicial após 30 minutos de incubação a 50 °C, e mais de 70 % a 60 °C após o mesmo período. Monteiro; Ulhoa (2006) purificaram e caracterizaram uma β -1,3-glucanase a partir do *Trichoderma koningii*, o pH e a temperatura ótimas obtidos foram 4,6 e 50 °C, respectivamente, a enzima reteve 50 % de atividade máxima a 45 °C e a estabilidade diminuiu drasticamente depois de 60 °C. Em estudo realizado por Yi et al. (2008) a β -1,3-glucanase purificada obtida pelo *Trichoderma viride* TP09, apresentou pH e a temperatura ótimas de 5 e 50 °C, respectivamente. A enzima mostrou maior estabilidade em uma faixa de pH 3,0-5,0 e termoestabilidade entre 30 e 70 °C. Noronha; Ulhoa (2000) purificaram e caracterizaram uma β -1,3-glucanase produzida pelo fungo *Trichoderma harzianum*. A enzima apresentou pH ótimo de 4,4 a 50 °C. Ela reteve 68 e 100 % de sua atividade original após 45 minutos de incubação a 45 e 50 °C, respectivamente.

A caracterização das β -1,3-glucanases também tem sido encontrada por outros microrganismos, tais como *Chaetomium thermophilum*, *Perna viridis* e *Agaricus blazei* (Li et al. 2007; Zakharenko et al. 2009; Shu; Xu; Lin, 2006, respectivamente). Shu; Xu; Lin (2006) purificaram e caracterizaram uma endo- β -1,3-glucanase de *Agaricus blazei*. O pH e a temperatura ótima foram 4,5 e 45 °C, respectivamente. A enzima mostrou maior estabilidade ao pH na faixa de 3,5-6,0 e termoestabilidade a 50 °C. Já a endo- β -1,3-glucanase obtida do cogumelo *Perna viridis* pelo Zakharenko et al. (2009) encontraram o pH ótimo entre 4-6,5 a 45 °C. Por outro lado a β -1,3-glucanase purificada do *Chaetomium thermophilum* apresentou melhor atividade catalítica em pH 6,0 a 60 °C, a enzima reteve 90 % de atividade após 1 h a 60 °C.

5.6 Hidrólise Enzimática

A velocidade de degradação de diferentes polímeros é variável, portanto para obtenção das condições ideais de hidrólise enzimática foi realizado um perfil de hidrólise. O perfil hidrolítico das enzimas brutas e das parcialmente purificadas foi avaliado para a laminarina e a glucana extraída de *Agaricus blazei*. A enzima bruta obtida do *Trichoderma reesei* resultou em aproximadamente 48 % de hidrólise de laminarina e 7,6 % de glucana, após 60 minutos. Em contraste a enzima bruta produzida pelo *Trichoderma harzianum* apresentou 41,5 % de hidrólise de laminarina e 14 % de glucana, após 60 minutos (Figuras 32 e 33).

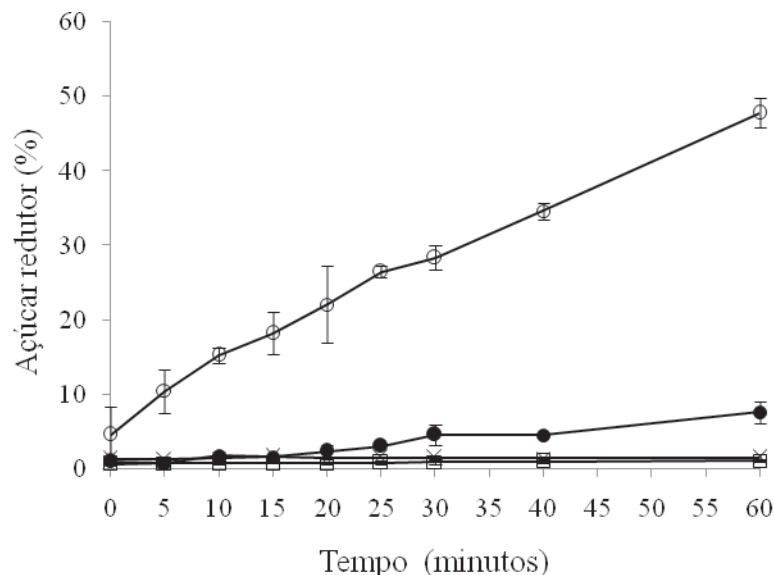


Figura 32. Hidrólise dos polissacarídeos laminarina e glucana de *Agaricus blazei* pela β -1,3-glucanase bruta de *Trichoderma reesei*. (\circ) β -1,3-glucanase + laminarina; (\bullet) β -1,3-glucanase + glucana; Controles: (\square) Laminarina; (\times) Glucana.

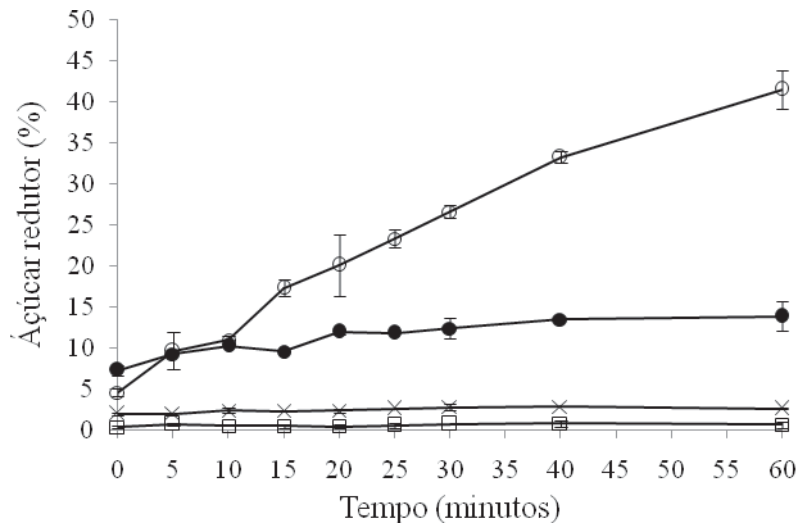


Figura 33. Hidrólise dos polissacarídeos laminarina e glucana de *Agaricus blazei* pela β -1,3-glicanase bruta de *Trichoderma harzianum*. (\circ) β -1,3-glicanase + laminarina; (\bullet) β -1,3-glicanase + glucana; Controles: (\square) Laminarina; (\times) Glucana.

A enzima parcialmente purificada do *Trichoderma reesei* apresentou 85 % de hidrólise de laminarina e 2,6 % de glucana, após 60 minutos. No entanto, a enzima parcialmente purificada do *Trichoderma harzianum* resultou em 47 % de hidrólise de laminarina e não houve diferença na degradação da glucana em relação ao controle (sem enzima), após 60 minutos (Figuras 34 e 35). Laminarina também foi hidrolisada pela β -1,3-glicanase parcialmente purificada a partir de *Trichoderma harzianum* Rifai, obtendo 70 % após 1 h (GIESE, 2008). A hidrólise de laminarina pela β -1,3-glicanase parcialmente purificada de *Trichoderma reesei* resultou em 85 % de hidrólise de laminarina e 2,6 % de glucana, após 60 minutos. No entanto, a enzima parcialmente purificada do *Trichoderma harzianum* resultou em 47 % de hidrólise de laminarina e não houve diferença na degradação da glucana em relação ao controle (sem enzima), após 60 minutos.

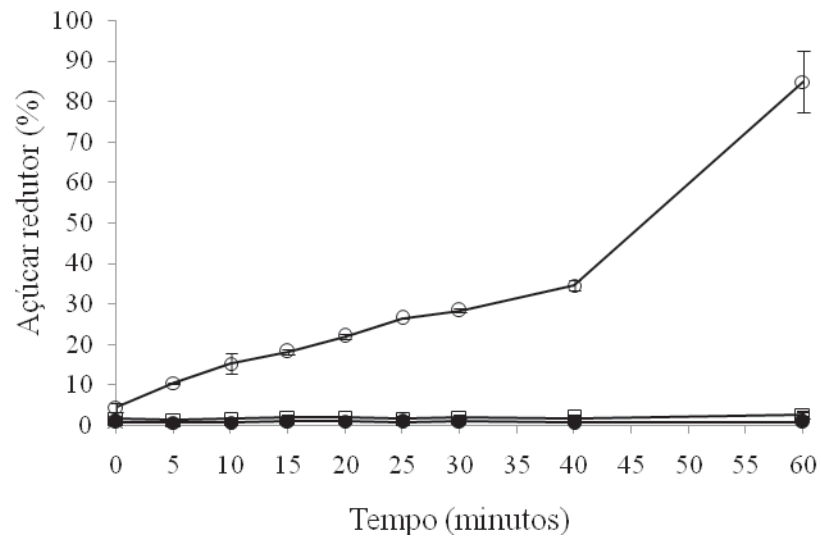


Figura 34. Hidrólise dos polissacarídeos laminarina e glucana de *Agaricus blazei* pela atuação da β -1,3-glucanase parcialmente purificada de *Trichoderma reesei*. (\circ) β -1,3-glucanase + laminarina; (\bullet) β -1,3-glucanase + glucana; Controles: (\square) Laminarina; (\times) Glucana.

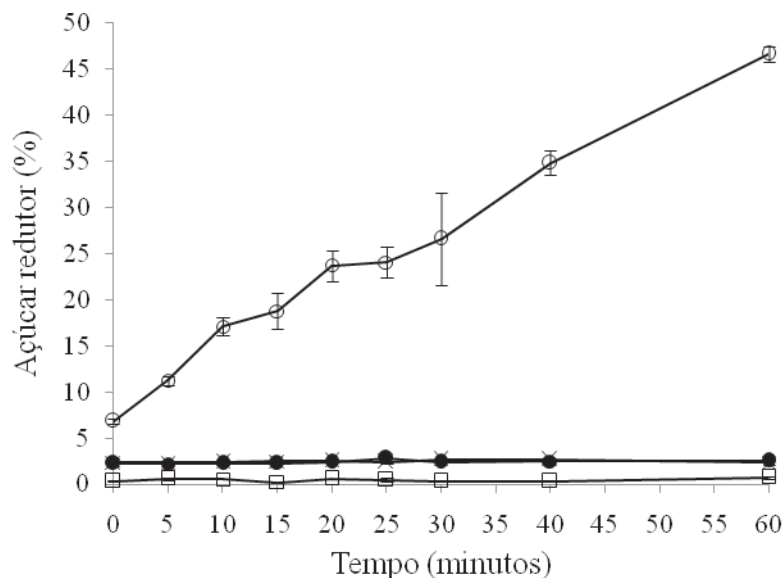


Figura 35. Hidrólise dos polissacarídeos laminarina e glucana de *Agaricus blazei* pela atuação da β -1,3-glucanase parcialmente purificada de *Trichoderma harzianum*. (\circ) β -1,3-glucanase + laminarina; (\bullet) β -1,3-glucanase + glucana; (\square) Laminarina; (\times) Glucana.

Os açúcares redutores solúveis e totais do hidrolisado enzimático de glucana de *A. blazei* e laminarina utilizando β -1,3-glucanases estão apresentados nas tabelas 18 e 19, respectivamente. Os açúcares redutores liberados da hidrólise de laminarina 415 $\mu\text{g/mL}$ pela ação da β -1,3-glucanase bruta de *Trichoderma harzianum* foi superior ao encontrado por

Giese et al. (2006). Esses autores relataram 268 $\mu\text{g/mL}$ de açúcares redutores após 1 h, utilizando o mesmo fungo. Essa diferença pode ser atribuída à fonte de carbono utilizada durante a fermentação, produzindo enzimas com atividades específicas diferentes. Em relação aos níveis de açúcares totais quantificados após a hidrólise pelas enzimas parcialmente purificadas, observou-se que foram maiores com laminarina.

Tabela 18: Açúcar redutor liberado da hidrólise enzimática de glucana usando β -1,3-glucanase bruta de *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum*.

| β -1,3-glucanases | Tempo de hidrólise (min) | Açúcar redutor $\mu\text{g/mL}$ |
|------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| <i>Trichoderma reesei</i> | 0 | 9,4 \pm 3,2 |
| | 5 | 7,1 \pm 2,1 |
| | 10 | 17,2 \pm 7,8 |
| | 15 | 15,7 \pm 13,6 |
| | 20 | 23,2 \pm 15,0 |
| | 25 | 30,0 \pm 1,8 |
| | 30 | 45,7 \pm 24,6 |
| | 40 | 44,4 \pm 21,4 |
| | 60 | 75,7 \pm 12,1 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | 0 | 73,2 \pm 6,4 |
| | 5 | 74,2 \pm 0,7 |
| | 10 | 102,4 \pm 2,9 |
| | 15 | 96,1 \pm 12,7 |
| | 20 | 120,1 \pm 17,8 |
| | 25 | 118,6 \pm 0 |
| | 30 | 123,9 \pm 11,8 |
| | 40 | 134,4 \pm 5,4 |
| | 60 | 138,7 \pm 3,6 |

Tabela 19: Hidrólise enzimática de laminarina usando β -1,3-glucanase bruta e parcialmente purificada de *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum*.

| <i>B-1,3-glucanases</i> | <i>Tempo de hidrólise (min)</i> | <i>Açúcar redutor $\mu\text{g/mL}$</i> |
|------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <i>Trichoderma reesei</i> | 0 | 114,8 \pm 37,5 |
| | 5 | 175,6 \pm 29,2 |
| | 10 | 233,8 \pm 10,3 |
| | 15 | 294,9 \pm 28,2 |
| | 20 | 351,6 \pm 51,4 |
| | 25 | 354,6 \pm 7,8 |
| | 30 | 395,5 \pm 16,4 |
| | 40 | 489,8 \pm 10,7 |
| | 60 | 478,2 \pm 20,0 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | 0 | 46,2 \pm 4,6 |
| | 5 | 96,6 \pm 22,5 |
| | 10 | 110,0 \pm 4,3 |
| | 15 | 173,3 \pm 9,6 |
| | 20 | 201,0 \pm 37,7 |
| | 25 | 233,3 \pm 10,3 |
| | 30 | 266,1 \pm 7,5 |
| | 40 | 332,2 \pm 6,8 |
| | 60 | 415,2 \pm 23,5 |
| <i>B-1,3-glucanases</i> | <i>Tempo de hidrólise (min)</i> | <i>Açúcar redutor $\mu\text{g/mL}$</i> |
| <i>Trichoderma reesei</i> | 0 | 45,2 \pm 11,1 |
| | 5 | 104,4 \pm 0,7 |
| | 10 | 152,6 \pm 24,6 |
| | 15 | 181,6 \pm 5,0 |
| | 20 | 220,7 \pm 6,1 |
| | 25 | 264,1 \pm 0,4 |
| | 30 | 283,2 \pm 4,6 |
| | 40 | 346,0 \pm 13,3 |
| | 60 | 424,2 \pm 37,8 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | 0 | 68,4 \pm 3,2 |
| | 5 | 112,3 \pm 5,3 |
| | 10 | 171,3 \pm 10,3 |
| | 15 | 187,9 \pm 19,6 |
| | 20 | 237,3 \pm 16,7 |
| | 25 | 240,3 \pm 16,7 |
| | 30 | 266,0 \pm 49,5 |
| | 40 | 348,6 \pm 13,6 |
| | 60 | 466,6 \pm 7,8 |

5.7 Cromatografia líquida de alta pressão em cromatógrafo de íons (HPAEC/PAD)-Análises dos produtos de hidrólise enzimática

Análises de HPAEC/PAD revelaram diferenças nos produtos de hidrólises da glucana e laminarina usando enzima bruta e parcialmente purificada. A glucose foi o principal produto encontrado nos hidrolisados de glucana e de laminarina, utilizando ambas as enzimas.

Em 48 % de hidrólise de laminarina por ação da enzima bruta de *Trichoderma reesei*, após 60 minutos, resultou na obtenção de diferentes gluco-oligossacarídeos, principalmente gentiobiose, celotriose, laminaritriose e laminaritetraose, e para a degradação da glucana somente gentiobiose foi identificado (Tabela 20; Figura 36).

A enzima bruta de *Trichoderma harzianum* resultou em 41,5 % de hidrólise de laminarina depois de 60 minutos, e 2,40 % corresponderam a gentiobiose e laminaritriose. Já a glucana apresentou 14 % de hidrólise que corresponderam a 35 % de gluco-oligossacarídeos. Laminaritetraose foi o principal gluco-oligossacarídeo obtido de hidrólise de glucana, seguido pela laminaritriose e gentiobiose e menores quantidades de celotriose e celotetraose (Tabela 20; Figura 36). GIESE et al. (2006) observaram a produção de glucose, gentiobiose, laminaribiose e menores quantidades de glucooligossacarídeos de grau de polimerização entre 3-4, pela ação da β -1,3-glucanase bruta de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre a laminarina e botriosferana ((1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucana), após 60 minutos. Curdlana (β -1,3-glucana) também foi hidrolisada pelo extrato enzimático bruto da β -1,3-glucanase obtido do *Trichoderma harzianum* CECT 2413, após 20 h aproximadamente 90 % deste polissacarídeo foi hidrolisado (GRANDPIERRE et al. 2008).

Para 85 % de degradação da laminarina pela enzima de *Trichoderma reesei* purificada parcialmente foram identificados gentiobiose, celotriose e laminaritriose e para 2,6 % de degradação da glucana somente 1,36 % correspondeu a gentiobiose (Tabela 20; Figura 37). Para 47 % de degradação da laminarina pela enzima de *Trichoderma harzianum* purificada parcialmente foram encontrados gentiobiose e laminaritriose (Tabela 20; Figura 38).

VIJAYENDRA; KASHIWAGI (2009) encontraram apenas glucose no hidrolisado de curdlan powder, após 60 minutos de hidrólise, utilizando uma $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase purificada de *Rhizoctonia solani*. No hidrolisado de laminarina, encontraram glucose e laminaribiose, após incubação overnight.

Gentiobiose também foi observada durante a hidrólise de laminarina por Kulminskaya et al. (2001) que também encontraram glucose durante a hidrólise de β -1,3-oligoglicosídicos, a partir de β -1,3-glucanase purificada de *Trichoderma viride* AZ36. KIM et al. (2005)

encontraram di- e trissacarídeos como os principais produtos de hidrolisados de β -glucanas de *Agaricus blazei* pela ação da endo β -(1,6)-glucanase de *Bacillus megaterium* comercial, tanto a enzima quanto a glucana estavam purificadas. FUKUDA et al. (2008) também encontraram apenas glucose como produto da hidrólise de uma β -1,3-1,6-glucanase purificada obtida do corpo de frutificação do cogumelo *Flammulina velutipes* sobre a parede celular de β -glucana deste cogumelo, assim como β -1,3 e β 1,6-glucana obtida de diversas fontes. Por outro lado, quando laminarinonase (β -1,3 oligossacarídeos lineares com GP=9) e gentiononase (β -1,6 oligossacarídeos lineares com GP=9) foram hidrolisados, diversos oligossacarídeos foram liberados.

O mecanismo de ação das β -1,3-glucanas ainda não é completamente conhecido, acredita-se que seja atribuído a alguns fatores, tais como a estrutura molecular, a influência do peso molecular, os tipos de ligações glicosídicas e resíduos presentes, além da conformação espacial (FREIMUND et al. 2003).

Tabela 20: Análise do hidrolisado (em 100 µg/mL de açúcar total) enzimático de glucana e laminarina usando β-1,3-glucanase bruta e parcialmente purificada a partir do *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum*.

| <i>Hidrolisados de β-1,3-glucanases brutas</i> | <i>Produtos de hidrólise e suas ligações</i> | <i>Glucana µg/mL</i> | <i>Laminarina µg/mL</i> |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------|-------------------------|
| <i>Trichoderma reesei</i> | G1 | 15,40 | 23,62 |
| | G2 β-(1-6) | 0,63 | 2,70 |
| | C2 β-(1-4) | nd | nd |
| | C3 β-(1-4) | nd | 0,47 |
| | C4 β-(1-4) | nd | nd |
| | L3 β-(1-3) | nd | 4,69 |
| | L4 β-(1-3) | nd | 10 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | G1 | 21,18 | 18,2 |
| | G2 β-(1-6) | 3,24 | 2,41 |
| | C2 β-(1-4) | nd | nd |
| | C3 β-(1-4) | 2,36 | nd |
| | C4 β-(1-4) | 1,36 | nd |
| | L3 β-(1-3) | 11,78 | 2,40 |
| | L4 β-(1-3) | 16,08 | Nd |
| <i>Hidrolisados de β-1,3-glucanases parcialmente purificada</i> | | | |
| | | | |
| <i>Trichoderma reesei</i> | G1 | 5,08 | 19,14 |
| | G2 β-(1-6) | 1,36 | 2,27 |
| | C2 β-(1-4) | nd | nd |
| | C3 β-(1-4) | nd | 0,32 |
| | C4 β-(1-4) | nd | nd |
| | L3 β-(1-3) | nd | 5,59 |
| | L4 β-(1-3) | nd | Nd |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | G1 | Nd | 16,45 |
| | G2 β-(1-6) | nd | 1,92 |
| | C2 β-(1-4) | nd | nd |
| | C3 β-(1-4) | nd | nd |
| | C4 β-(1-4) | nd | nd |
| | L3 β-(1-3) | nd | 4,27 |
| | L4 β-(1-3) | nd | Nd |

*G₁, glucose; G₂, gentiobiase; C₂, celobiose; C₃, celotriose; C₄, celotetraose; L₃, laminaritriose; L₄, Laminaritetraose; nd, não detectado.

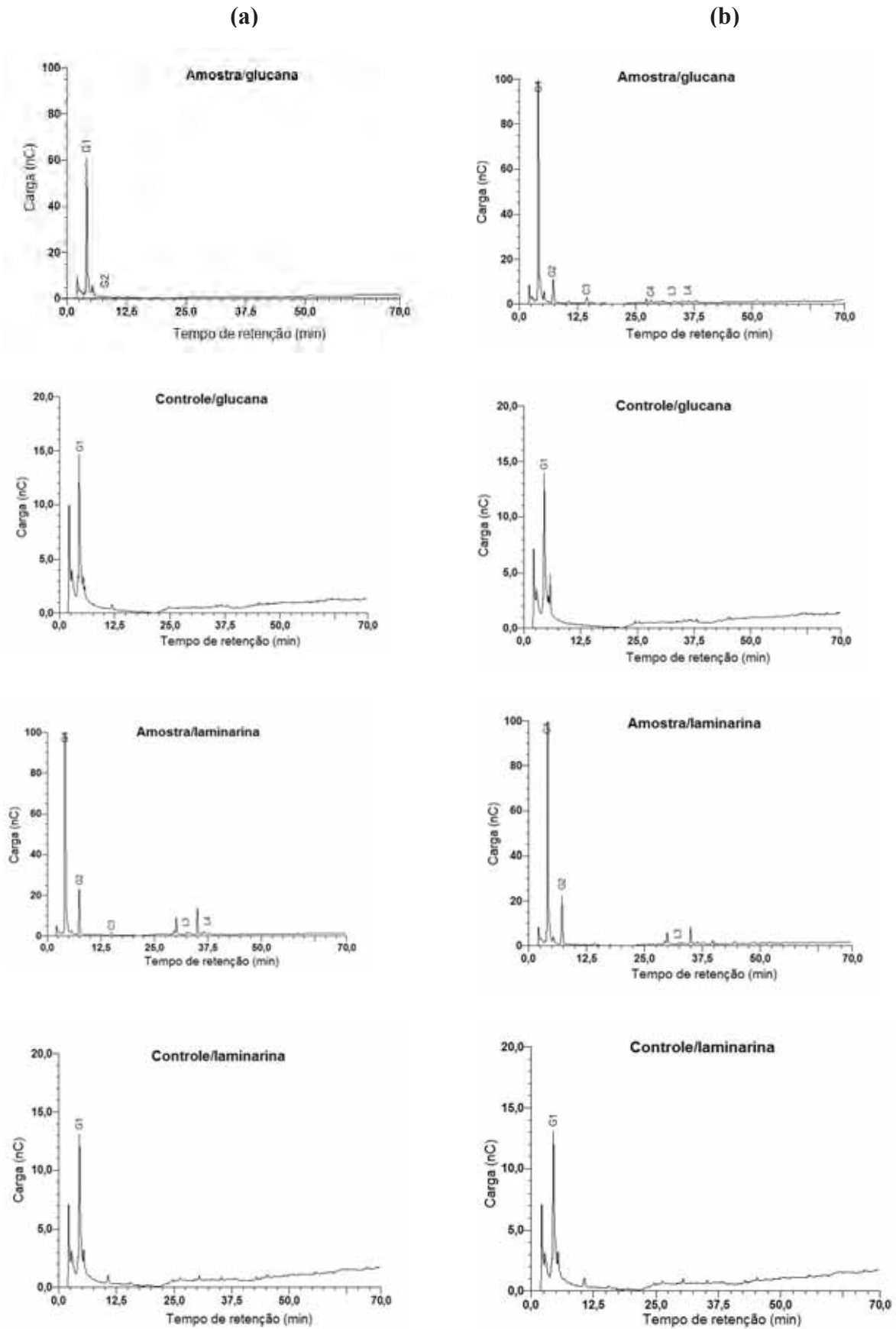


Figura 36. HPAEC/PAD análise dos produtos de hidrólise de glucana e laminarina usando β -glucanase bruta de *Trichoderma reesei* QM 9414 (a) e de *Trichoderma harzianum* Rifai (b).

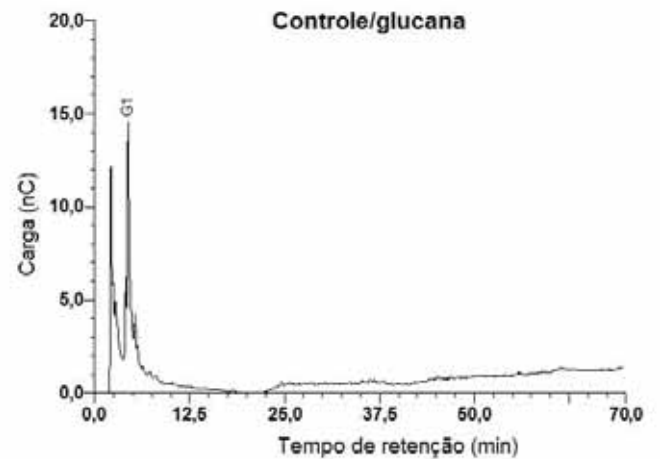
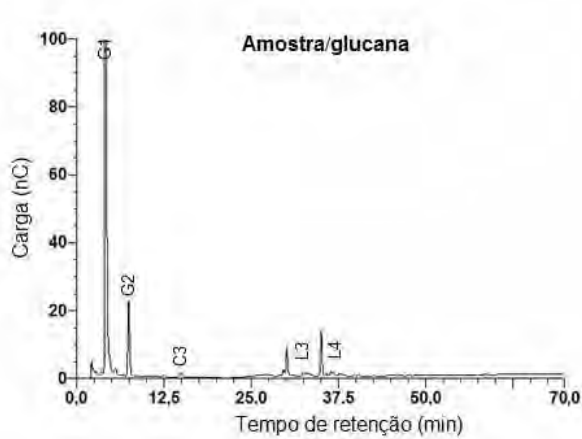


Figura 37. HPAEC/PAD análise dos produtos de hidrólise de glucana usando β -glucanase parcialmente purificada de *Trichoderma reesei*.

(a)

(b)

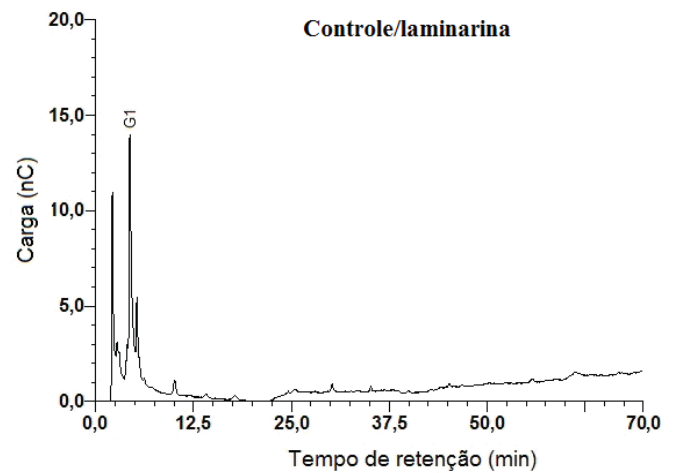
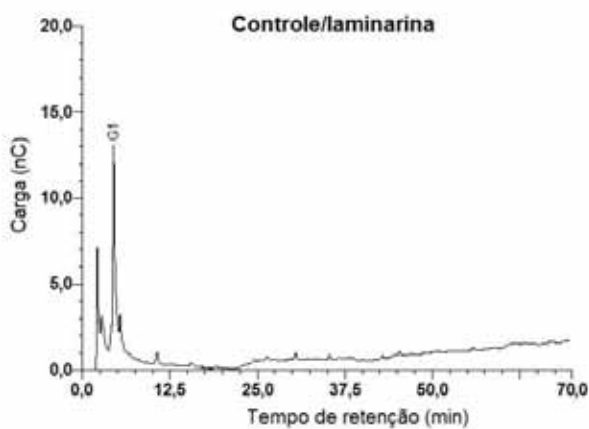
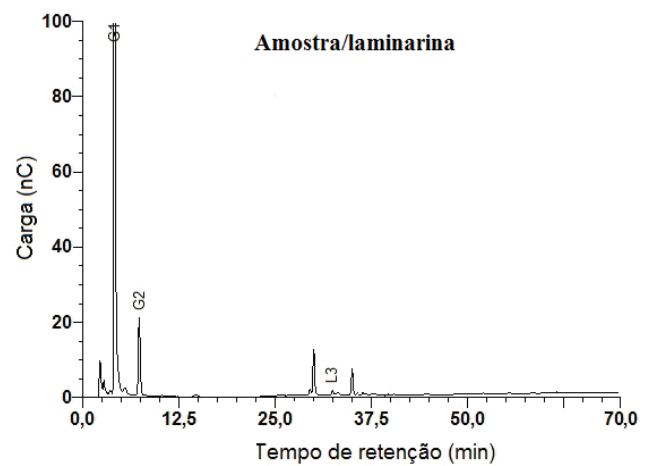
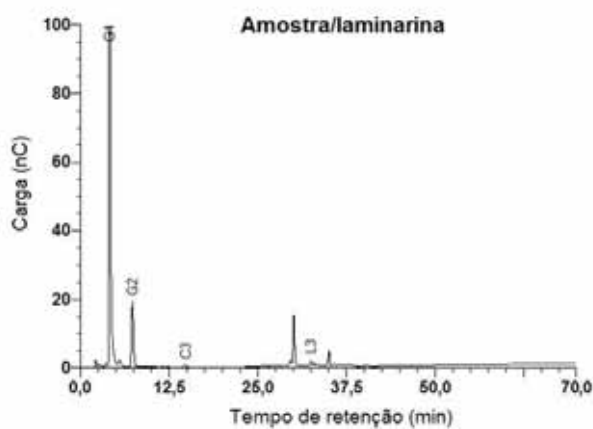


Figura 38. HPAEC/PAD análise dos produtos de hidrólise de laminarina usando β -glucanase parcialmente purificada de *Trichoderma reesei* (a) e de *Trichoderma harzianum* (b).

5.8 Extrações da glucana de *Agaricus blazei* e Aveia

Na tentativa de obter melhores rendimentos de glucana comparada à primeira extração realizada segundo a metodologia de Mizuno et al. (1990), diferentes métodos de extração de glucana de *Agaricus blazei* foram avaliados. Esta metodologia é uma das mais utilizadas pelos pesquisadores, apesar de seu baixo rendimento, que neste trabalho foi de 2,9 %. Além disso, a aveia em flocos foi utilizada para obtenção deste polissacarídeo. Em estudos semelhantes Camelini et al. (2005b) encontraram 41,9 e 43,4 mg/g de β -glucana purificada nos corpos de frutificação de *Agaricus blazei* com píleo fechado e aberto, respectivamente.

A fração de polissacarídeo com baixo peso molecular apresentou melhor produção de 6,2 % pelo processo de extração aquosa de glucana de *Agaricus blazei*, aplicando a metodologia de Poli et al. (2009). No entanto, a fração de polissacarídeo de alto peso molecular que apresentou 1,6 % de rendimento, foi escolhida como substrato utilizado na hidrólise enzimática, devido aos melhores resultados obtidos nos hidrolisados, descrito na seção 4.3. A melhor produção de 7,57 % de glucana de aveia foi obtida quando extraída pelo processo alcalino, ao contrário da extração ácida 0,19 %. Segundo Ahmad et al. (2010) impurezas são extraídas juntamente com as glucanas, tais como pequenas quantidades de amido, pentosanas, gorduras e proteínas. Esses autores verificaram que o processo alcalino e enzimático foram as melhores técnicas empregadas na obtenção deste polissacarídeo. A melhor produção foi obtida pelo processo enzimático, provavelmente devido a maior remoção de amido e proteínas pelas suas respectivas enzimas.

A tabela 21 sintetiza os resultados das extrações realizadas.

Tabela 21: Diferentes processos de extração de glucana e de polissacarídeos de *Agaricus blazei* e de aveia.

| Extrações de glucana | Amostras (g) | Massa obtida (g) | Rendimento (%) | Metodologia utilizada |
|-----------------------------------------|--------------|------------------|----------------|-----------------------|
| <i>Agaricus blazei</i> | 20 | 0,58 | 2,9 | MIZUNO et al. (1990) |
| <i>Agaricus blazei</i> | 3 | 0,19 | 6,2 | POLI et al. (2009) |
| Polissacarídeos de baixo peso molecular | | 0,05 | 1,2 | |
| Polissacarídeos de alto peso molecular | | | | |
| Aveia Extração com etanol | 100 | 7,54 | 7,6 | AHMAD et al. (2010) |

5.9 Hidrólise enzimática de glucana de *Agaricus blazei* e Aveia

As glucanas de *Agaricus blazei* de baixo e de alto peso molecular e glucanas de aveia extraídas anteriormente foram utilizadas nas hidrólises utilizando as enzimas de *Trichoderma harzianum* e de *Trichoderma reesei*. β -1,3-glucanases brutas de *Trichoderma reesei* hidrolisou 15 % de polissacarídeos de baixo peso molecular de *Agaricus blazei*, após 480 minutos, (Figura 39). Não houve hidrólise nos polissacarídeos de baixo peso molecular utilizando a enzima de *Trichoderma harzianum* (dados não mostrados). As β -1,3-glucanases brutas do *Trichoderma harzianum* e do *Trichoderma reesei* hidrolisaram 41 e 50 % de polissacarídeo de alto peso molecular de *A. blazei*, respectivamente, após 480 minutos, (Figura 40 e 41). A enzima bruta de *T. harzianum* hidrolisou 49 % de glucana de aveia após 480 minutos, (Figura 42). Não houve hidrólise na glucana de aveia pela ação da enzima de *Trichoderma reesei*. JOHANSSON et al., (2006) utilizaram β -glucana de aveia e a liquenase para obtenção de oligossacarídeos. Os oligossacarídeos produzidos foram β -1,4-D-gluco-oligossacarídeos com ligações β -1,3 na extremidade redutora. Os principais produtos foram oligômeros com GP 3-4.

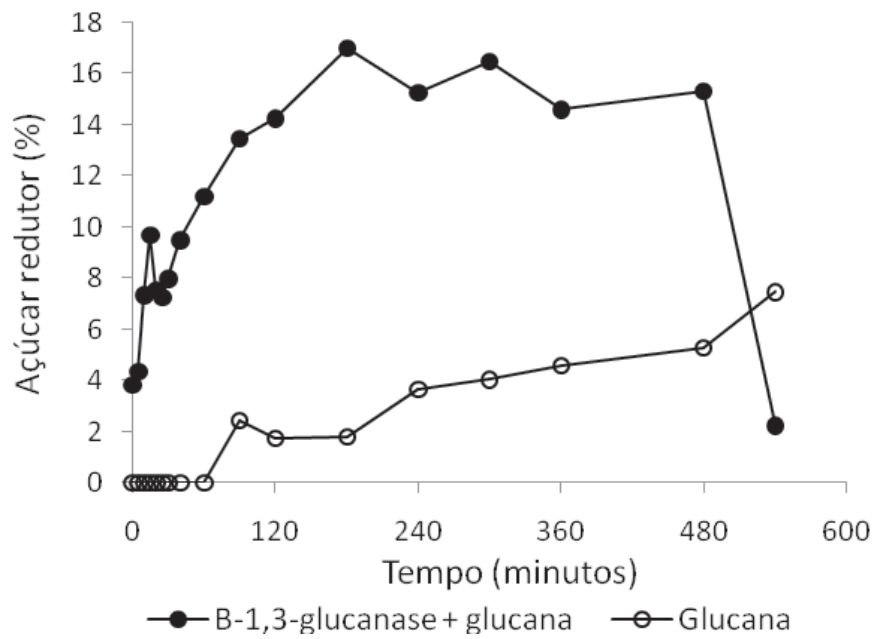


Figura 39. Hidrólise do polissacarídeo glucana de *Agaricus blazei* de baixo peso molecular pela β -1,3-glucanase bruta de *Trichoderma harzianum*. (●) β -1,3-glucanase + glucana; (○) Controle: glucana.

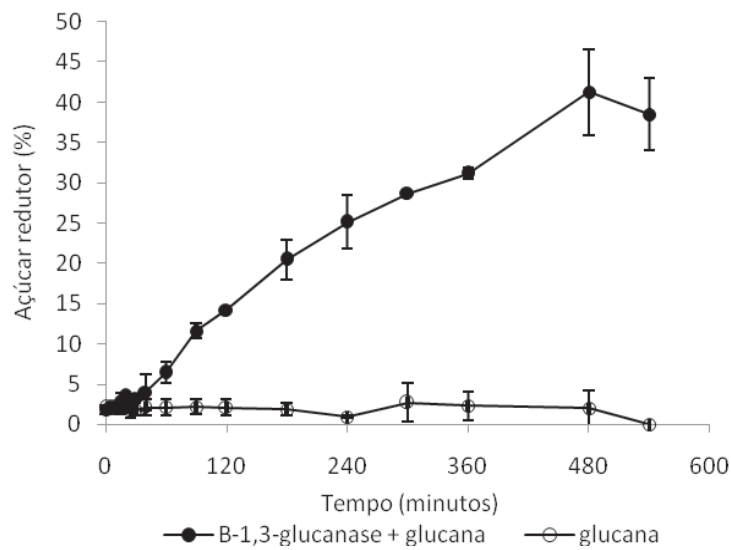


Figura 40. Hidrólise do polissacarídeo glucana de *Agaricus blazei* pela β -1,3-glucanase bruta de *Trichoderma reesei*. (●) β -1,3-glucanase + glucana; (○) Controle: glucana.

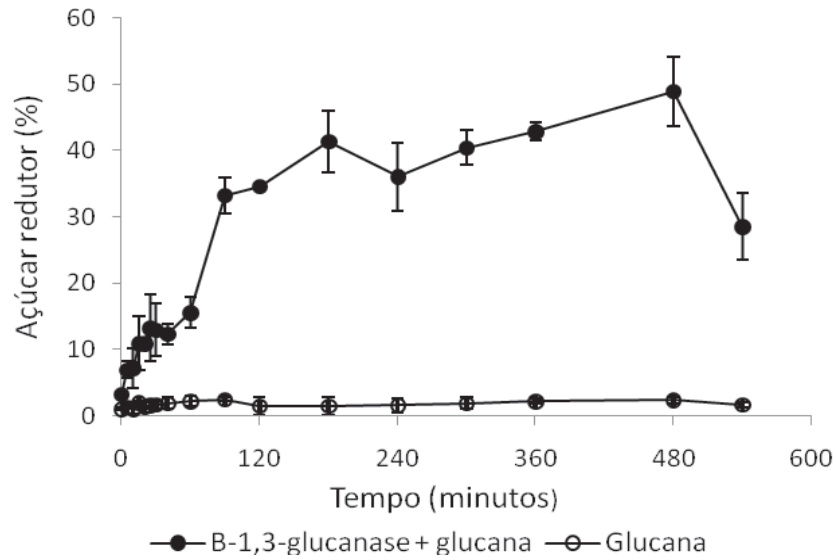


Figura 41. Hidrólise do polissacarídeo glucana de *Agaricus blazei* pela β -1,3-glucanase bruta de *Trichoderma harzianum*. (●) β -1,3-glucanase + glucana; (○) Controle: glucana.

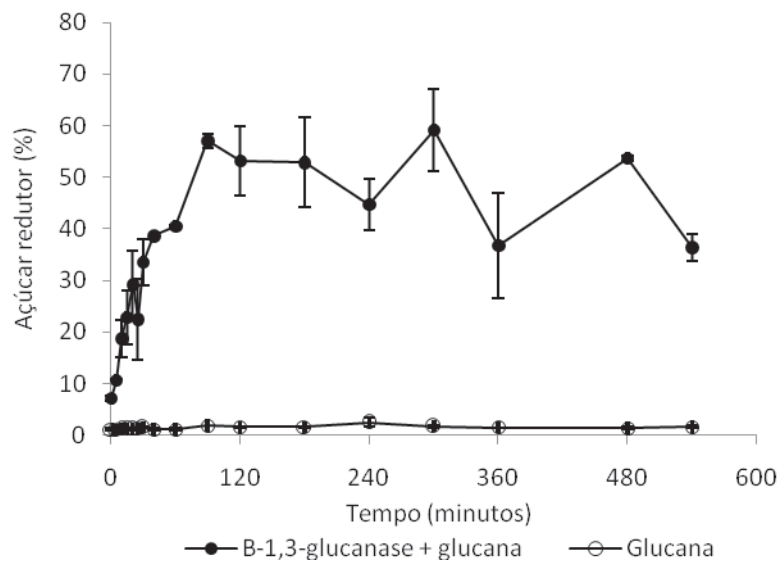


Figura 42. Hidrólise do polissacarídeo glucana de aveia pela β -1,3-glucanase bruta de *Trichoderma harzianum*. (●) β -1,3-glucanase + glucana; (○) Controle: glucana.

5.10 Atividade prebiótica

5.10.2 Estudo “in vitro” da ação dos componentes prebióticos utilizando microrganismos probióticos

O efeito positivo de *Agaricus blazei*, glucanas de *Agaricus blazei* de alto peso molecular e de baixo peso molecular sobre a proliferação de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus* está apresentado na Tabelas 23 e 24. A glucana de aveia não foi um dos melhores substratos para o crescimento dos *Lactobacillus*, no entanto surgiram colônias em 48 h de cultivo para o *L. acidophilus* e *L. reuteri* (dados não mostrados).

As diferenças de crescimento podem ser atribuídas ao fato de que segundo Synytsya et al. (2009) os probióticos mostraram diferentes características de crescimento dependendo dos extratos utilizados e da especificidade do microrganismo. Também, devido à presença de diversos componentes estruturais, quando esses autores estudaram a atividade prebiótica de extratos líquido de cogumelos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii* e os microrganismos *Lactobacillus* ssp e *Bifidobacterium* spp.

















Apesar dos substratos estimularem o crescimento das culturas probióticas, de acordo com Kim et al. (2005) os oligossacarídeos são mais eficientemente absorvidos no corpo do que as β -glucanas. Esses autores verificaram que os oligossacarídeos obtidos a partir de hidrolisado de β -glucanas com uma endo β -(1,6)-glucanase de *Bacillus megaterium* apresentaram maior atividade anti-diabética em ratos quando comparado com a β -glucana.

A degradação de oligossacarídeos, entre eles os frutooligossacarídeos, pelas bactérias ocorrem em dois estágios. No primeiro estágio, os oligossacarídeos são hidrolisados em monômeros pelas bactérias glucosidases. No segundo estágio, os monômeros liberados são degradados a ácidos graxos voláteis e gases (RIVERO-URGELL; SANTAMARIA-ORLEANS, 2001).

Tabela 23. Apresentação do efeito inibidor (-) e do efeito não inibidor (+) dos microrganismos probióticos usando diferentes fontes de carbono, após 72 h de cultivo.

| Fontes de carbono | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | <i>Lactobacillus reuteri</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Lactobacillus pentosus</i> |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Glicose | + | + | + | + |
| <i>Agaricus blazei</i> | + | + | + | + |
| Glucanas de baixo peso molecular | + | + | + | + |
| Glucanas de alto peso molecular | + | + | + | + |

Tabela 24. Crescimento dos microrganismos probióticos usando diferentes fontes de carbono, após 72 h de cultivo.

| Fontes de carbono | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | <i>Lactobacillus reuteri</i> | <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Lactobacillus Pentosus</i> |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Glicose |  |  |  |  |
| <i>Agaricus blazei</i> |  |  |  |  |
| Glucanas de baixo peso molecular |  |  |  |  |
| Glucanas de alto peso molecular |  |  |  |  |

6. Conclusões

O *Trichoderma reesei* e *Trichoderma harzianum* cresceram sobre o extrato de *Agaricus blazei* como única fonte de carbono e produziu β -1,3 glucanases. A metodologia de superfície de resposta mostrou que a maior produção de β -1,3-glucanases pelo *Trichoderma reesei* foi em 5 dias usando 3 g/L de *Agaricus blazei*. No entanto, a maior produção de β -1,3-glucanases pelo *Trichoderma harzianum* foi em 1 dia de cultivo usando 3 g/L de extrato de *Agaricus blazei*. O emprego da metodologia de superfície de resposta para produção de β -1,3-glucanases mostrou-se uma potente ferramenta para uso biotecnológico.

As β -1,3-glucanases brutas produzidas pelos fungos *T. reesei* e *T. harzianum* apresentaram pH ótimo entre 3,5-5,0 e 4,5, e uma temperatura ótima a 60 e 55 °C, respectivamente. Elas apresentaram ampla estabilidade em pH ácido e foram estáveis a 40 e a 35 °C, respectivamente.

A cromatografia de filtração em gel Sephadex G-100 resultou em apenas uma fração e apresentou um fator de purificação de aproximadamente 96 vezes e um rendimento de 27,8 e 16,78 % para o *T. reesei* e *T. harzianum*, respectivamente.

As enzimas parcialmente purificadas produzidas pelos dois microrganismos apresentaram pH ótimo entre 4,5-5,5 e uma temperatura ótima a 55 °C. Elas também demonstraram ampla estabilidade em pH ácido, com acréscimo de 5 °C em relação a temperatura de estabilidade da enzima bruta.

Os processos de extrações de β -glucanas ainda precisam ser melhorados. As enzimas de *T. reesei* e *T. harzianum* apresentam propriedades diferentes, assim como as glucanas, obtendo distintos produtos de hidrólise.

A enzima bruta e purificada parcialmente produzida pelos fungos *T. harzianum* e *T. reesei* apresentaram os melhores resultados de hidrólise para a glucana e laminarina, respectivamente. A enzima bruta e purificada parcialmente hidrolisou 14 e 85 % glucana e laminarina, respectivamente.

Apesar da enzima produzida pelo *T. reesei* apresentar maior atividade enzimática utilizando o *Agaricus blazei* como substrato, ela não foi a melhor alternativa para a hidrólise comparada a enzima produzida pelo *T. harzianum*.

β -1,3-glucanases hidrolisaram β -glucanas de *A. blazei* e laminarina e produziram diferentes glucooligossacarídeos, principalmente gentiobiose, laminaritriose e laminaritetraose, todos de interesse biológico. Essas diferenças podem ser, provavelmente, explicadas pelas diferenças no grau de polimerização, conformação e ramificação de cada

polissacarídeo. Quanto aos probióticos, eles cresceram em meio MRS utilizando *Agaricus blazei* e suas glucanas como fonte de carbono, demonstrando o seu potencial prebiótico. Cabe salientar a contribuição deste trabalho para o desenvolvimento de uma tecnologia de hidrólise enzimática viável para a obtenção de glucooligossacarídeos, com ação prebiótica. Outra possibilidade será o desenvolvimento de novos produtos nutracêuticos, visto que esses compostos são reconhecidos como seguros *Generally Regarded as Safe* (GRAS) (pelo FDA, EUA). Além da atividade prebiótica, outra atividade que tem sido muito estudada é a atividade antioxidante presente em diferentes produtos, o que vai ao encontro de uma tendência recente, a qual os consumidores demonstram interesse por alimentos com efeitos benéficos à saúde, prevenindo o aparecimento de doenças específicas.

7. Referências Bibliográficas

- AHMAD, A.; ANJUM, F. M.; ZAHOR, T.; NAWAZ, H.; AHMED, Z. Extraction and characterization of β -D-glucan from oat for industrial utilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 46, p. 304-309, 2010.
- AIDA, F. M. N. A.; SHUHAIMI, M.; YAZID, M.; MAARUF, A. G. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review, *Trends in Food Science & Technology*, v. 20, p. 567-575, 2009.
- ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; CABALLERO, V.; CASTELLANO, V. Assessment of prebiotics and probiotics: An overview. *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*, Chapter 2., 2010.
- ANGELI, J. P. F.; RIBEIRO, L. R.; CAMELINI, C. M.; MENDONÇA, M. M.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the antigenotoxicity of polysaccharides and β -glucans from *Agaricus blazei*, a model study with the single cell gel electroforese/Hep G2 assay. *Food Chemistry*, v. 113, p. 386-393, 2009.
- BAR-SHIMON, M.; YEHUDA, H.; COHEN, L.; WEISS, B.; KOBESHNIKOV, A.; DAUS, A.; GOLDWAY, M.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Current Genetics*, v. 45, p. 140-148, 2004.
- 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.
- BARBOSA, A. M. Seleção de microrganismo xilanolíticos e produção de xilanases pelo *Trichoderma harzianum* Rifai em bagaço de cana de açúcar, 1992. Tese (Doutorado em Ciências (Bioquímica)), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- BENITO-ROMÁN, O.; ALONSO, E.; LUCAS, S. Optimization of the β -glucan extraction conditions from different waxy barley cultivars. *Journal of Cereal Science*, v. 53, p. 271-276, 2011.
- BESHAY, U.; EL-ENSHASY, H.; ISMAIL, I. M. K.; MOAWAD, H.; WOJCIECHOWSKA, E.; ABD-EL-GHANY, S. β -glucanase production from genetically modified recombinant *Escherichia coli*: Effect of growth substrates and development of a culture medium in shake flasks and stirred tank bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 307-313, 2003.
- BLAND, E. J.; KESHAVARZ, T.; BUCKE, C. The influence of small oligosaccharides on the immune system. *Carbohydrate Research*, v. 339, p. 1673-1678, 2004.
- BLUM, H.; BIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BRASIL. Informe técnico nº 6, de 31 de Janeiro de 2003. Procedimentos sobre cogumelos. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/31012003-2.htm>. Acesso em: novembro de 2007.
- BRENNAN, C. S.; CLEARY, L. J. The potential use of cereal (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)- β -D-glucans as functional food ingredients. *Journal of Cereal Science*, v. 42, p. 1-13, 2005.
- CAMELINI, C. M. (2005). Caracterização estrutural e atividade vasculogênica de β -glucanas isoladas das frutificações de *Agaricus blazei* em diferentes estágios de maturação: implicações na produção de nutracêuticos. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Federal de Santa Catarina.
- CAMELINI, C. M.; MENDONÇA, M. M.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. β -glucanas do cogumelo. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 35, p. 36-47, 2005a.
- CAMELINI, C. M.; MARASCHIN, M.; MENDONÇA, M. M.; ZUCCO, C.; FERREIRA, A. G.; TAVARES, L. A. Structural characterization of β -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. *Biotechnology Letters*, v. 27, p. 1295–1299, 2005b.
- CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; SMIDERLE, F. R.; ROSADO, F. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 252–257, 2006.
- CELESTINO, K. R. S.; CUNHA, R. B.; FELIX, C. R. Characterization of a β -glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry. *BMC Biochemistry*, v. 7, p.1-9, 2006.
- CHAKRABORTY, I.; MONDAL, S.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. A water-insoluble (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan from the alkaline extract of an edible mushroom *Termitomyces eurhizus*. *Carbohydrate Research*, v. 341, p. 2990-2993, 2006.

- CHUNG, C. H.; DAY, D. F. Glucooligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* B-742 (ATCC 13146): A potential prebiotic. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 29, p. 196-199, 2002.
- DE LA CRUZ, J.; REY, M.; LORA, J. M.; HIDALGO-GALLEGO, A.; DOMÍNGUEZ, F.; PINTOR-TORO, J. A.; LLOBEL, A.; BENÍTEZ, T. Carbon source control on β -glucanases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Archives of Microbiology*, v. 159, p. 316-322, 1993.
- DE MARCO, J. L.; VALADARES-INGLIS, M. C.; FELIX, C. R. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosus*, the causal agent of witches "broom of cocoa". *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 33-38, 2003.
- DE 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, p.21-29, 2007.
- DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X. T.; FANG, J. N. Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murril. *Carbohydrate Research*, v. 337, p. 1417-1421, 2002.
- DONGOWSKI, G.; DRZIKOVA, B.; SENGE, B.; BLOCHWITZ, R.; GEBHARDT, E.; HABEL, A. Rheological behaviour of β -glucan preparations from oat products. *Food Chemistry*, v. 93, p. 279-291, 2005.
- DONZELLI, B. G. G; SIEBERT, K. J; HARMAN, G. E. Response surface modeling of factors influencing the production of chitinolytic and β -1,3-glucanolytic enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 82-92, 2005.
- DORE, C. M. P. G; AZEVEDO, T. C. G.; DE SOUZA, M. C. R.; REGO, L. A.; DE DANTAS, J. C. M.; SILVA, F. R. F.; ROCHA, H. A. O.; BASEIA, I. G.; LEITE, E. L. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of β -glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. *International Immunopharmacology*, v. 7, p. 1160-1169, 2007.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 350-356, 1956.
- EL-KATATNY, M. H.; GUDELJ, M.; ROBRA, K. H.; ELNAGHY, M. A.; GÜBITZ, G. M. Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, p. 137-143, 2001.
- FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie*, v. 40, p. 30-35, 2007.

- FERREIRA, C. L. L. Tecnologia para produtos lácteos funcionais. In: *O agronegócio do leite e os alimentos lácteos funcionais*. Portugal, J.A., Castro, M.C.D., et al., Eds. Epamig. Juiz de Fora, p.181-203, 2001.
- 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. Produção e Purificação de β -1,3-glucanase. *Biotecnologia Ciência & desenvolvimento*, v. 37, p. 40-43, 2007.
- FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 299-310, 2008.
- FONTAINE, T.; HARTLAND, R. P.; BEAUVAIS, A.; DIAQUIN, M.; LATGE, J. P. Purification and characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus*, *European Journal of Biochemistry*, v. 243, p. 315-321, 1997.
- FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. A new now-degrading isolation process for 1,3 β -D-glucan of high purity from Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Carbohydrate Polymers*, v. 54, p. 159-171, 2003.
- FUKUDA, K.; HIRAGA, M.; ASAKUMA, S.; ARAI, I.; SEKIKAMA, M.; URASHIMA. Purification and characterization of a novel exo- β -1,3-1,6-glucanase from the fruiting body of the edible mushroom Enoki (*Flammulina velutipes*). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 72, p. 3107-3113, 2008.
- FULLER, R.; GIBSON, G. R. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 32, p. 28-31, 1997.
- GERMAN, B.; SCHIFFRIN, E. J.; RENIERO, R.; MOLLET, B.; PFEIFER, A.; NEESER, J. R. The development of functional foods: lessons from the gut, v. 17, p. 492-499, 1999.
- GIBSON, G. R. Prebiotics. *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology*, v. 18, p. 287-298, 2004.
- GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M., CORRADI DA SILVA, M. L. Glucanases fúngicas: Produção e aplicações das β -1,3 e β -1,6 glucanases. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 30, p. 97-104, 2003.
- GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; BORSATO, D.; DEKKER, R. F. H.; CORRADI DA SILVA, M. L.; BARBOSA, A. M. Botryosphaeran, a new substrate for the production of β -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3783-3788, 2005.
- GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; BORSATO, D.; DEKKER, R. F. H.; MONTEIRO, N. K.; CORRADI DA SILVA, M. L.; BARBOSA, A. M. 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.

GIESE, E. C (2008). *Produção de beta-glucanases de Trichoderma harzianum Rifai para obtenção de gluco-oligosacarídeos a partir do botriosferana*. 2008. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto.

GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; SCARMÍNIO, I. S.; BARBOSA, A. M.; SILVA, R. Comparation of β -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical mixture-design. *Biochem. Eng. J.* v. 53, p. 239-243, 2011.

GONZAGA, M. L. C.; RICARDO, N. M. P.; HEATLEY, F.; SOARES, S. A. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murril. *Carbohydrate Polymers*, v. 60, p. 43-49, 2005.

GRANDPIERRE, C.; JANSSEN, H. G.; LAROCHE, C.; MICHAUD, P.; WARRAND, J. Enzymatic and chemical degradation of curdlan targeting the production of β -(1 \rightarrow 3) oligoglucans. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, p. 277-286, 2008.

GRIMOUD, J.; DURAND, H.; COURTIN, C.; MONSAN, P.; OUARNÉ, F.; THEODOROU, V.; ROQUES, C. *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe*, v. 16, p. 493-500, 2010.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem* 1972;48:422-427.

HERRE, J.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. *Molecular Immunology*, v. 40, p. 869-876, 2004.

HONG, T. Y.; MENG, M. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3- β -glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from garden soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 61, p. 472-478, 2003.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. *Bulletin of the IDF*, n. 306, p. 23-33, 1999.

JAYUS, McDOUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. The effect of dissolved oxygen concentrations on (1-3)-and (1-6)- β -glucanase production by *Acremonium* sp. IMI 383068 in bath culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 176-181, 2005.

JOHANSSON, L.; VIRKKI, L.; ANTTILA, H.; ESSELSTRÖM, H.; TUOMAINEN, P.; SONTAG-STROHM, T. Hydrolysis of β -glucan. *Food Chemistry*, v. 97, p. 71-79, 2006.

KALACĚ, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, v. 113, p. 9-16, 2009.

KAUR, J.; MUNSHI, G. D.; SINGH, R. S.; KOCH, E. Effect of carbon source on production of lytic enzymes by the sclerotial parasites *Trichoderma atroviride* and *Coniothyrium minitans*. *Journal of Phytopathology*, v. 153, p. 274-279, 2005.

- KEDIA, G.; VÁSQUEZ, J. A.; PANDIELLA, S. S. Enzymatic digestion and in vitro fermentation of oat fractions by human *Lactobacillus* strains. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 43, p. 355-361, 2008.
- KIM, Y. W.; KIM, K. H.; CHOI, H. J.; LEE, D. S. Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnology Letters*, v. 27, p. 483-487, 2005.
- KULMINSKAYA, A. A.; THOMSEN, K. K.; SHABALIN, K. A.; SIDORENKO, I. A.; ENEYSKAYA, E. V.; SAVEL'EV, A. N.; NEUSTROEV, K. N. Isolation, enzymatic properties, and mode of action of an exo-1,3- β -glucanase from *Trichoderma viride*. *European Journal of Biochemistry*, v. 268, p. 6123-6131, 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAMBO, A. M.; ÖSTE, R.; NYMAN, M. E. G. L. Dietary fibre in fermented oat and barley β -glucan rich concentrates. *Food Chemistry*, v. 89, p. 283-293, 2005.
- LEE, I. P.; KANG, B. H.; ROH, J. K.; KIM, J. R. Lack of carcinogenicity of lyophilized *Agaricus blazei* Murill in a F344 rat two year bioassay. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 87-95, 2008.
- LI, W.; CUI, S. W.; KAKUDA, Y. Extraction, fractionation, structural and physical characterization of wheat β -D-glucans. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, p. 408-416, 2006.
- LI, H.; CHEN, J.; LI, A.; LI, D. C. Purification and partial characterization of β -1,3-glucanase from *Chaetomium thermophilum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 23, p.1297-1303, 2007.
- MARCELLO, C. M.; STEINDORFF, A. S.; DA SILVA, S. P.; SILVA, R. D. N.; BATAUS, L. A. M.; ULHOA, C. J. Expression analysis of the exo-1,3- β -glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research*, v. 165, p. 75-81, 2010.
- MARTIN, K. L.; McDOUGALL, B. M.; UNKLES, S. E.; SEVIOUR, R. J. The three β -1,3-glucanases from *Acremonium blochii* strain C59 appear to be encoded by separate genes. *Mycological Research*, v. 110, p. 66-74, 2006.
- MASIH, E. I.; PAUL, BERNARD. 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.
- McCARTHY, T.; HANNIFFY, O.; LALOR, E.; SAVAGE, A. V.; TUOHY, M. G. Evaluation of three thermostable fungal endo- β -glucanases from *Talaromyces emersonii* for brewing and food applications, *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1741-1748, 2005.

MENEZES, C. R. DE. *Estudo da atividade prebiótica de hidrolisados lignocelulósicos*, 2007. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MIN-YOUNG, K.; LLL-MIN, C.; SUN-JOO, L.; JOUNG-KUK, A.; EUN-HYE, K.; MI-JUNG, K.; SUN-LIM, K.; HYUNG-IN, M.; HEE-MYONG, R.; EUN-YOUNG, K.; SU-HYUN, S.; HONG-KEUN, S. Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms. *Food Chemistry*, v. 113, p. 386-393, 2009.

MIYANISHI, N.; HAMADA, N.; KOBAYASHI, T.; IMADA, C.; WATANABE, E. Purification and characterization of a novel extracellular β -1,3-glucanase produced by *Bacillus clausii* NM-1 isolated from ezo abalone *Haliotis discus hannai*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 95, p. 45-51, 2003.

MIZUNO, T.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from “Himematsutake,” the fruiting body of *Agaricus blazei* murill. *Agricultural Biological Chemistry*, v. 54, p. 2897-2905, 1990.

MONSAN, P.; PAUL, F. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 16, p. 187-192, 1995.

MONTEIRO, C. S.; KALLUF, V.; PENTEADO, P. T. P. S.; WASZCZYNSKYJ, N.; FREITAS, R. J. S. DE.; STERTZ, S. C. Caracterização química do cogumelo *Agaricus blazei* murril, *Visão Acadêmica*, v. 6, p. 7-13, 2005.

MONTEIRO, V. N.; ULHOA, C. J. Biochemical characterization of a β -1,3-glucanase from *Trichoderma koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. *Current Microbiology*, v. 52, p. 92-96, 2006.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, p. 109-122, 2006.

MOURA, P.; BARATA, R.; CARVALHEIRO, F.; GÍRIO, F.; LOUREIRO-DIAS, M. C.; ESTEVES, M. P. *In vitro* fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *LWT-Food Science and Technology*, v. 40, p. 963-972, 2007.

MUCHA, J.; DAHM, H.; STRZELCZYK, E.; WERNER, A. Synthesis of enzymes connected with mycoparasitism by ectomycorrhizal fungi. *Archives of Microbiology*, v. 185, p. 69-77, 2006.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 68, p. 587-597, 2007.

MUTALIK, S. R.; VAIDYA, B. K.; JOSHI, R. M.; DESAI, K. M.; NENE, S. N. Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 7875–7880, 2007.

- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 153, p. 375-380, 1944.
- NOBE, R.; SAKAKIBARA, Y.; FUKUDA, N.; YOSHIDA, N.; OGAWA, K.; SUIKO, M. Purification and characterization of laminarin hydrolases from *Trichoderma viride*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 67, p. 1349-1357, 2003.
- NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 183, p. 119-123, 2000.
- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Determinação da concentração de β -glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murill por método enzimático. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 312-316, 2003.
- PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; McDOUGALL, B. M. Noncellulytic fungal β -glucanase: their physiology and regulation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p.178-192, 1993.
- POLI, F. V.; RICHARTZ, R. R. T. B.; CHAVES, M. B.; GERN, R. M. M. Estudo do efeito citotóxico e da atividade antiviral de polissacarídeos extraídos de corpos frutíferos de *Agaricus blazei* (Murril). In: *IV Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, Centro Universitário de Maringá-Paraná*, 2009.
- PRZEMYSŁAW, J. T.; PIOTR, T. Probiotics and prebiotics. *Cereal Chemistry*, v. 2, p. 113-117, 2003.
- QUIGLEY, E. M. M. Prebiotics and probiotics, modifying and mining the microbiota. *Pharmaceutical research*, v. 61, p. 212-218, 2010.
- RAMOT, O.; COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. Regulation of β -1,3-glucanase by carbon starvation in the mycoparasite *Trichoderma harzianum*. *Mycological Research*, v. 104, p. 415-420, 2000.
- RANA, D. S.; THÉODORE, K.; NAIDU, S. N.; PANDA, T. Stability and Kinetics of β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 149-155, 2003.
- READ, S. M.; CURRIE, G.; BACIC, A. Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, v. 281, p. 187-201, 1996.
- RHEE, S. J.; CHO, S. Y.; KIM, K. M.; CHA, D. S.; PARK, H. J. A comparative study of analytical methods for alkali-soluble β -glucan in medicinal mushroom, Chaga (*Inonotus obliquus*). *LWT- Food Science and Technology*, p. 545-549, v. 41, 2008.
- RIVERO-URGEL, M.; SANTAMARIA-ORLEANS, A.; Oligosaccharides: application in infant food. *Early Human Development*, v. 65, p. 43-52, 2001.

- RYCROFT, C. E.; JONES, M. R.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Fermentation properties of gentio-oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, v. 32, p. 156-161, 2001.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 1-16, 2006.
- SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*, v. 9, p. 69-80, 1999.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Agarose gel electrophoresis. In: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, v. 16, p. 442-457, 2005.
- SANTOS-NEVES, J. C.; PEREIRA, M. I.; CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; ALQUINI, G.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A novel branched $\alpha\beta$ -glucan isolated from the basidiocarps of the edible mushroom *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, p. 309-314, 2008.
- SARDI, P. K. Z. Oats. *Encyclopedia of Grain Science*, p. 365-375, 2004.
- SHIMIZU, J.; TSUCHIHASHI, N.; KUDOH, K.; WADA, M.; TAKITA, T.; INNAMI, S. Dietary curdlan increases proliferation of bifidobacteria in the cecum of rats. *Bioscience, Biotechnolog and Biochemistry*, v. 65, p. 466-469, 2001.
- SHU, C. H.; XU, C. J.; LIN, E. S. Production, purification and partial characterization of a novel endo- β -1,3-glucanase from *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochemistry*, v. 41 p. 1229-1233, 2006.
- SHU, C. H.; XU, C. J. Medium optimization for producing bioactive exopolysaccharides by *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (= *A. blazei* Murril ss. Heinem) in submerged culture. *Food Technology and Biotechnology*, v. 45, p. 327-333, 2007.
- SMAALI, M. I.; MICHAUD, N.; MARZOUKI, N.; LEGOY, M. D.; MAUGARD, T. Comparison of two β -glucosidases for the enzymatic synthesis of β -(1-6)- β -(1-3)-gluco-oligosaccharides. *Biotechnology Letters*, v. 26, p. 675-679, 2004.
- SOARES, A. A.; SOUZA, C. G. M.; DANIEL, F. M.; FERRARI, G. P.; COSTA, S. M. G.; PERALTA, R. M. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry*, v. 112, p. 775-781, 2009.
- SOLDATI, R. C. Bactérias utilizadas na indústria de laticínios: Descrição, Caracterização e Utilização. *Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes*, v. 61, p. 3-12, 2006.
- SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 160, p. 61-68, 1945.

SYNYTSYA, A.; MÍČKOVÁ, K.; SYNYTSYA, A.; JABLONSKÝ, I.; SPĚVÁČEK, J.; ERBAN, V.; KOVÁŘIKOVÁ, E.; ČOPÍKOVÁ, J. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, v. 76, p. 548-556, 2009. *Food Technology and Biotechnology*, v. 45, p. 327-333, 2007.

TANG, X. J.; HE, G. Q.; CHEN, Q. H.; ZHANG, X. Y.; ALI, M. A. M. Medium optimization for the production of thermal stable β -glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. *Bioresource Technology*, v. 93, p. 175-181, 2004.

TANGARONE, B.; ROYER, J. C.; NAKAS, J. P. Purification and Characterization of an Endo-(1,3)- β -D-Glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.55, p.177-184, 1989.

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.

TWEDDELL, R. J.; JABAJI-HARE, S. H.; CHAREST, P. M. Production of Chitinases and β -1,3-Glucanases by *Stachybotrys elegans*, a Mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 489-495, 1994.

VAZ, J. A.; BARROS, L.; MARTINS, A.; SANTOS-BUELGA, C.; VASCONCELOS, M. H.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chemistry*, v. 126, p. 610-616, 2011.

VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS, S.; LEAL-MORALES, C. A.; HERRERA-ESTRELLA, A. Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 1442-1446, 1998.

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

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microbial Genetic Bulletin*, v. 13, p. 42-43, 1956.

WEBER, F. H.; GUTKOSKI, L. C.; ELIAS, M. C. Caracterização química de cariopses de aveia (*Avena sativa* L) da cultivar UPF18. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, p. 39-44, 2002.

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

YI, H.; XIONG, S.; DU, M.; ZHANG, L. Purification and partial characterization of β -glucanase produced by *Trichoderma viride* TP09 isolated from sewage of beer-making. *European Food Research and Technology*, v. 227, p. 821-826, 2008.

YU, C. H.; KAN, S. F.; SHU, C. H.; LU, T. J.; SUN-HWANG, L.; WANG, P. S. Inhibitory mechanisms of *Agaricus blazei* Murill on the growth of prostate cancer in vitro and in vivo. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 20, p. 753-764, 2009a.

YU, Y. T.; KANG, Z. S.; BUCHENAUER, H.; HUANG, L. L. Purification and characterization of a novel extracellular β -1,3-glucanase complex (GluGgt) secreted by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 2179-2186, 2009b.

ZAKHARENKO, A. M.; KUSAIKIN, M. I.; LI, B. M.; HUEN, F. V.; KHAN, H. H.; SOVA, V. V.; ZVYAGINTSEVA, T. N. Catalytic properties of endo-1,3- β -D-glucanase from the vietnamese edible mussel *Perna viridis*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, v. 35, p. 62-69, 2009.

ZHU, B. W.; ZHAO, J. G.; YANG, J. F.; MIKIRO, T.; ZHANG, Z. S.; ZHOU, D. Y. Purification and partial characterization of a novel β -1,3-glucanase from the gut of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 1102-1106, 2008.

ANEXO I

CAPÍTULO I

Agaricus blazei as a substrate for the production of β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* Rifai

Agaricus blazei as a Substrate for the Production of β -1,3-Glucanase by *Trichoderma harzianum* Rifai

Andréia A. J. Carneiro^{1*}, Ellen C. Giese², Aneli M. Barbosa³, Eleni Gomes¹ and Roberto Da Silva¹

¹São Paulo State University, UNESP, IBILCE, Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, R. Cristóvão Colombo 2265, 15054-000 São José do Rio Preto-SP, Brazil

²Biorefining Research Initiative, Lakehead University, P7B5E1 Thunder Bay, Ontario, Canada

³State University of Londrina, Department of Biochemistry and Biotechnology, Rod. Celso Garcia Cid s/n, 86051-990 Londrina-PR, Brazil

Received: September 14, 2010

Accepted: January 19, 2011

Summary

Extracellular β -1,3-glucanase was produced by *Trichoderma harzianum* Rifai cultivated in the *Agaricus blazei* (*Agaricus brasiliensis*) extract as a substrate in submerged fermentation. A 2²-central composite factorial design was developed using the time of culture (x_1 /day) and *Agaricus blazei* extract concentration (x_2 /(g/L)) as variables, and the results were analyzed using response surface methodology (RSM). The results showed that the *Agaricus blazei* extract concentration was the most important variable in the production of β -1,3-glucanase, and the maximum β -1,3-glucanase activity (0.77 U/mL) was obtained in one day of cultivation. The β -glucan present in the cell wall of *Agaricus blazei* mushroom proved to be a good substrate for inducing the production of specific β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* Rifai.

Key words: β -1,3-glucanase, medicinal mushrooms, *Trichoderma harzianum* Rifai, response surface methodology

Introduction

Agaricus blazei is an edible mushroom that belongs to the Basidiomycetes fungal class, and its consumption has increased significantly in Brazil, Japan, China, Korea, Canada, and the USA (1). It is made up of essential amino acids, among which arginine is the most abundant, followed by isoleucine, methionine and leucine. Some carbohydrates are also present, including manose, glucose and xylose (2), as well as the biopolymer β -glucan, which constitutes part of the cell wall (3).

β -Glucans are glucose polymers connected by β -(1 \rightarrow 3) glucopyranosyl bonds with β -(1 \rightarrow 6) branches, and are considered the main components of the cell wall of filamentous fungi (4) and yeasts (5). They are also pres-

ent in cereals, and they are found in higher quantities in barley and oat grains (6).

Mushrooms have become attractive as functional foods, and they serve as a source of bioactive compounds (7), which have broad beneficial effects, including an increase of immunity, and decrease of blood cholesterol and lipid levels, as well as of blood pressure (8). *Agaricus blazei* (*Agaricus brasiliensis*) mushrooms have gained importance in many different countries, mainly because of their nutraceutical and medicinal properties, which come from the β -glucans present in their composition (9). Thus, other properties of *A. blazei* have been studied, including their antioxidant (8), antitumour (10), antigenotoxic (3) and anti-diabetic properties (11).

*Corresponding author; Phone: +55 17 3221 2200 2724; E-mail: andreiajacomessi@yahoo.com.br

Fungi belonging to the *Trichoderma* genus have been studied to evaluate their production of different enzymes, most commonly cellulases and hemicellulases (12), β -glucosidases (13), proteases (14), lactases (15), xylanases (16), chitinases (17) β -1,3-glucanases (18), and other metabolites. Their role in biological control has also been evaluated (17). They present rapid growth and have the ability to assimilate various substrates. Also, they are important as wood and herbal material decomposers (19).

β -1,3-Glucanase can be produced by several microorganisms such as *Pichia membranifaciens* yeast (20), *Bacillus* sp. bacteria using a recombinant *Escherichia coli* (21), and *Acremonium* sp. IM1383068 fungi (22), which showed distinct levels of β -1,3-glucanase when cultivated in different carbon sources, such as the crude cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* (20), the cell wall of *Botrytis cinerea* (21) and lactose, pustulan and chitin (22). Factorial design and analysis by response surface methodology (RSM) have been used by Giese *et al.* (23), Donzelli *et al.* (24) and Théodore and Panda (25) in cultures of *T. harzianum* in order to optimize the production of β -1,3-glucanases in submerged fermentations.

The production of β -1,3-glucanase can be affected by some fermentation parameters, such as agitation, pH, and temperature (26). The production of microbial enzymes can be affected by the aeration, incubation time, moisture and fermentative process.

RSM is an empirical model technique used to estimate the relationship between a set of controllable experimental factors and the observed results. It is currently one of the most popular optimization techniques in the field of biotechnology because of its reasonably high efficiency and simplicity. The most common experimental design used in RSM is the central composite design (CCD), which has equal predictability in all directions from the centre (27).

The production of β -glucanase is an essential key to evaluate its action in degrading β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-glucans for future production of oligosaccharides that exhibit prebiotic and immunomodulator activity. In this study, an extract of *A. blazei* was used as a substrate to produce specific β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* Rifai. The goal of this study is to optimize the production of β -glucanase by *Trichoderma harzianum* Rifai using *A. blazei* as a substrate. RSM was used to optimize the production, with cultivation time (x_1 /day) and substrate concentration (x_2 /(g/L)) as parameters.

Materials and Methods

Mushroom

The dried *Agaricus blazei* fruiting bodies were purchased from the Commerce of Natural Products Ltd, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil. The composition of 100 g of dry mass was: carbohydrates 44.4, proteins 33.3, dietary fibre 33.3, and (in mg): sodium 6, phosphorus 22, copper 0.21, iron 0.28 and zinc 0.14, according to the manufacturer's label. Dried material was ground and sieved to obtain homogenous particle size that could pass through the voile cloth.

Microorganism and optimization of β -1,3-glucanase production

The fungus *Trichoderma harzianum* Rifai, isolated from *Aspidosperma* sp. (Peroba) by Barbosa (28), was maintained at room temperature in xylose agar slants, incorporating the Vogel's minimal salts medium (VMSM). Before each experiment, the microorganism was transferred to 250-mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of xylose agar with VMSM and incubated at 28 °C for 5 days. Fermentation was carried out in 125-mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL of VMSM (29) and different concentrations of *A. blazei* extract powder as a substrate. Each flask was inoculated with a suspension containing 10^7 spores, and was kept under constant agitation at 180 rpm and 28 °C, according to the earlier investigation which showed that the best glucanase production was obtained under these conditions. The effects of carbon source and cultivation time on β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* Rifai were used as variables in the experimental design presented below.

Factorial design and statistical analysis

The concentration of *A. blazei* and cultivation time for β -glucanase production by *T. harzianum* Rifai were optimized using RSM through a 2²-factorial central composite experimental design, with five repetitions at the central point and a total of 13 experiments carried out in duplicate (Table 1). The design was chosen according to the growth profile obtained before the optimization. The independent variables studied for β -glucanase production (Y_1 /(U/mL)) were as follows: x_1 =cultivation time (day) and x_2 =*A. blazei* concentration (g/L). Analysis of variance (ANOVA) and multiple regression analysis were also carried out using STATISTICA software v. 6.0, StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA.

Table 1. Statistical design of the experiments for two variables for *T. harzianum* Rifai

| Experiments | t/day (x_1) | γ (<i>A. blazei</i>)/(g/L) (x_2) | |
|----------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------|-----|
| 1 | -1 | -1 | |
| 2 | -1 | +1 | |
| 3 | +1 | -1 | |
| 4 | +1 | +1 | |
| 5 | -1 | 0 | |
| 6 | +1 | 0 | |
| 7 | 0 | -1 | |
| 8 | 0 | +1 | |
| 9 | 0 | 0 | |
| 10 | 0 | 0 | |
| 11 | 0 | 0 | |
| 12 | 0 | 0 | |
| 13 | 0 | 0 | |
| Original independent variables | Levels of variable | | |
| x_1 , time of growth/day | -1 | 0 | +1 |
| x_2 , γ (<i>A. blazei</i> extract)/(g/L) | 1.0 | 2.0 | 3.0 |

Analytical methods

β -1,3-Glucanase activity was measured by quantifying the reducing sugars liberated after the hydrolysis of laminarin (β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-glucan produced by the algae *Laminaria digitata*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The final assay volume was 0.5 mL, which was made up of 0.35 mL of laminarin (4 mg/mL) in a 25-mM sodium acetate buffer at pH=5.0 and 0.1 mL of crude enzyme. The assay was carried out at 50 °C and stopped after 10 min with 50 μ L of 1.0 M NaOH. The method of Somogyi (30) and Nelson (31) was used to quantify the reducing sugars. One unit of enzymatic activity was defined as the number of μ moles of reducing sugars released per minute per mL of enzymatic extract. Glucose was used for the standard curve.

Total sugars were measured using the phenol-sulphuric acid method of Dubois *et al.* (32). Fungal biomass was determined gravimetrically by drying to constant mass at 60 °C. pH was measured using a pH meter during fermentation.

Results and Discussion

The variables chosen were based on scientific data from the literature, with the incubation time and substrate concentration as probably the most influential factors in the production of β -1,3-glucanases. These variables were also studied by Giese *et al.* (23) and Théodore and Panda (25) in the optimization of the production of β -1,3-glucanases using *Trichoderma harzianum*.

Through multiple regression analysis of the experimental data, a second order polynomial equation was obtained for β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* Rifai (Eq. 1):

$$\hat{Y}_1 = 0.228276 - 0.123333x_1 - 0.033966x_1^2 + 0.179167x_2 + 0.113534x_2^2 - 0.107500x_1x_2 \quad (1)$$

where \hat{Y}_1 is the predicted response, and x_1 and x_2 are independent variables: cultivation time (day) and *A. blazei* concentration (g/L), respectively.

According to the results presented in Table 2, the intercept was significant, indicating that the central point (2 days of cultivation and *A. blazei* extract concentration of 2 g/L) was adequately chosen.

According to the Pareto chart (Fig. 1), the most important variable for β -1,3-glucanase production by *T. har-*

Table 2. Analysis of factors and their interaction in the production of β -1,3-glucanase by *T. harzianum* Rifai cultivated in *A. blazei* extract

| Factors | Coefficients | S.D. | T | p |
|------------------|--------------|----------|----------|----------|
| Intercept | 0.228276 | 0.008277 | 27.5795 | 0.000000 |
| x_1 linear | -0.123333 | 0.008138 | -15.1554 | 0.000000 |
| x_1 quadratic | -0.033966 | 0.011995 | -2.8317 | 0.011509 |
| x_2 linear | 0.179167 | 0.008138 | 22.0163 | 0.000000 |
| x_2 quadratic | 0.113534 | 0.011995 | 9.4635 | 0.000000 |
| $x_1 \times x_2$ | -0.107500 | 0.009962 | -10.7857 | 0.000000 |

S.D.=standard deviation; x_1 =time of growth, x_2 =*A. blazei* concentration

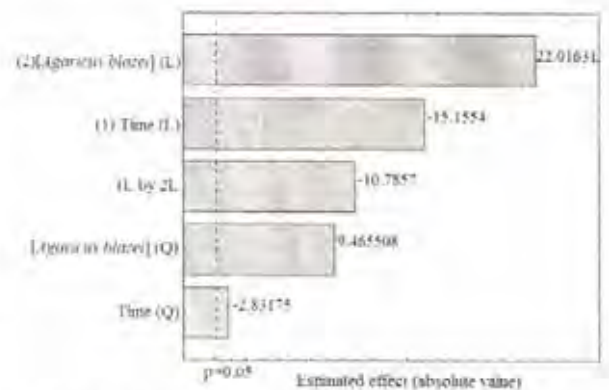


Fig. 1. Pareto chart of standardized effects for β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* Rifai cultivated in *A. blazei* extract as substrate. The point at which the effect estimates were statistically significant (at $p=0.05$) is indicated by the broken vertical line. The linear (L) and squared (Q) effects are also indicated, as well as the linear interaction (1L by 2L) between both effects

zianum Rifai was the concentration of *A. blazei*. The analysis of variance for the surface response of Eq. 1 (Table 3) showed that regression was significant ($p<0.05$) and the lack of fit was not significant, indicating that the model can be used for predictive purposes.

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for the production of β -1,3-glucanase by *T. harzianum* Rifai using *A. blazei* extract as substrate

| Variation of source | Sum of squares | Degrees of freedom | Mean square | F | p |
|---------------------|----------------|--------------------|-------------|----------|----------|
| Regression | 0.567742 | 2 | 0.283871 | 33.29297 | 0.000000 |
| Residues | 0.196108 | 23 | 0.008526 | | |
| Standard error | 0.013510 | 17 | 0.000795 | | |
| Total | 0.763850 | 25 | | | |

F=relation (regression/residual), p=relation (deviation of regression/standard error)

The experimental results and predictive activities for β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* Rifai using Eq. 1 are presented in Table 4. The highest β -1,3-glucanase activity (0.77 U/mL) was observed on the first day of cultivation using 3 g/L of *A. blazei* extract as substrate. This activity was probably due to the higher concentration of β -glucan present in the extract, as well as to the type of glycosidic bond present in the glucans. Concentrations higher than 3 g/L were not tested because of the low solubility of the *A. blazei* extract. In similar studies, Giese *et al.* (23) found the highest β -1,3-glucanase activity (1.2 U/mL) produced by the same strain of *T. harzianum* Rifai using 1.5 g/L of botryosphaeran exopolysaccharide (EPS) of a β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-D-glucan type produced by *Botryosphaeria rhodina* as a sole carbon source after 5 days of cultivation. RSM was used, and the results also suggested that β -1,3-glucanase production depended on EPS concentration.

Table 4. Experimental and predictive values for β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* Rifai cultivated in *A. blazei* extract as substrate

| Experiment | β -1,3-glucanase activity/(U/mL) | |
|------------|----------------------------------------|-----------|
| | Experimental | Predicted |
| 1 | 0.14 | 0.18 |
| 2 | 0.27 | 0.72 |
| 3 | 0.09 | 0.11 |
| 4 | 0.26 | 0.22 |
| 5 | 0.24 | 0.32 |
| 6 | 0.12 | 0.14 |
| 7 | 0.22 | 0.19 |
| 8 | 0.50 | 0.52 |
| 9 | 0.20 | 0.23 |
| 10 | 0.25 | 0.23 |
| 11 | 0.25 | 0.23 |
| 12 | 0.22 | 0.23 |
| 13 | 0.18 | 0.23 |

Based on the value of R^2 , our findings showed that 96 % of the response variability could be explained either by the model, or by the experimental factors and their interactions. The low pure error indicated good reproducibility of the experimental data. RSM was also used by Donzelli *et al.* (24) and Theódore and Panda (25) to optimize the production of β -1,3-glucanase by some species of *Trichoderma* in submerged fermentation using different β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-D-glucans as the carbon source. Donzelli *et al.* (24) found the highest β -1,3-glucanase production by *Trichoderma atroviride* when the initial pH increased from 5.5 to 6.5. The highest β -1,3-glucanase production was obtained by Theódore and Panda (25) when *Trichoderma harzianum* was grown in glucose at 30 °C and at initial pH=4.7. However, the level of pH had no significant effect in any of the experimental runs. Carneiro *et al.* (33) optimized β -1,3-glucanase production by *Trichoderma reesei* using *Agaricus blazei* extract as a substrate. The best cultivation conditions occurred after 5 days, with maximum activity of 4.35 U/mL and 3 g/L of *A. blazei*. According to the results of this study, it is possible to obtain maximum β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* Rifai in 1 day of cultivation and with 3 g/L of *A. blazei* extract (Fig. 2). There are few studies reported in the scientific literature on the optimization of β -1,3-glucanase production by fungi using response surface methodology.

RMS showed to be power technique for optimizing β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* Rifai. Traditional methods for optimization are one-factor-at-a-time techniques. Unfortunately, this approach frequently fails to identify the variables that give rise to the optimum response, because the effects of factor interactions are not taken into account in such procedures (34).

The highest biomass production by fungi in 3 g/L of *Agaricus blazei* extract was 2.2 g/L, after 24 h of cultivation (Fig. 3). The lowest biomass production observed in 1 and 2 g/L of *Agaricus blazei* extract was 1 and 1.7 g/L after 48 and 24 h, respectively (data not shown). Giese

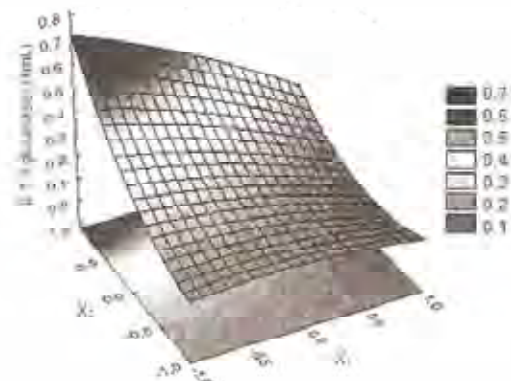


Fig. 2. Response surface for β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* Rifai as a function of cultivation time \times *A. blazei* extract ($x_1 \times x_2$)

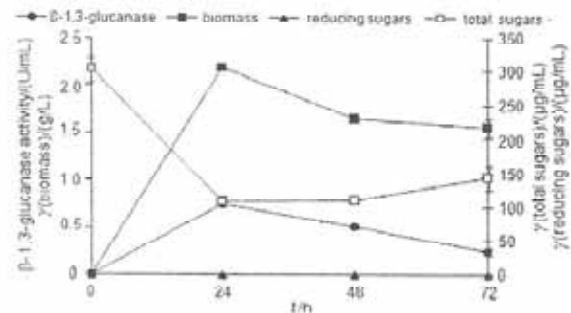


Fig. 3. Growth profile for the production of β -1,3-glucanase by *T. harzianum* Rifai on *A. blazei* extract (3 g/L)

et al. (35) also evaluated the production of biomass by *Trichoderma harzianum* Rifai from different carbon sources and observed 7.17 g/L of biomass on the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 as carbon source, after 8 days of cultivation. The level of residual reducing sugars monitored during the growth profile stayed low, which shows an equilibrium between the hydrolysis of β -1,3-glucanase in β -glucan present in the extract of *Agaricus blazei* and glucose consumption by fungi. The high-

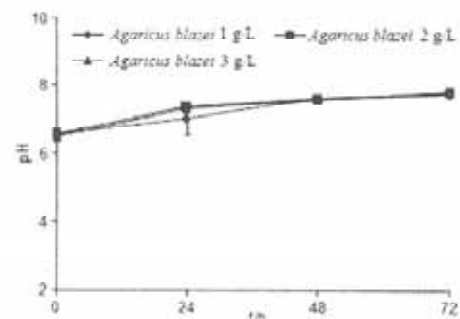


Fig. 4. pH profile during the production of β -1,3-glucanase by *T. harzianum* Rifai on *A. blazei* extract

est enzyme activity was observed by the lowest residual level of glucan in 3 g/L of *A. blazei* extract, measured as total sugar. Slight variations in pH were observed during fermentation (Fig. 4).

Conclusions

The advantage of using RSM analysis is that it allows for a reduction in time and materials known as one-factor-at-a-time, which minimizes possible common errors in traditional techniques. RSM can study many factors simultaneously. *T. harzianum* Rifai grew in *A. blazei* extract as a substrate and produced β -1,3-glucanase. The analysis showed that the highest β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* Rifai occurred in 1 day using 3 g/L of the substrate.

Acknowledgements

The authors would like to thank for the financial support provided by the Brazilian Foundation FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), São Paulo, Brazil.

References

1. I.P. Lee, B.H. Kang, J.K. Roh, J.R. Kim, Lack of carcinogenicity of lyophilized *Agaricus blazei* Murril in a F344 rat two year bioassay, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 87-95.
2. M.Y. Kim, I.M. Chung, S.J. Lee, J.K. Ahn, E.H. Kim, M.J. Kim *et al.*, Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms, *Food Chem.* 113 (2009) 386-393.
3. J.P. Friedmann Angeli, L.R. Ribeiro, C.M. Camellini, M.M. de Mendonça, M.S. Mantovani, Evaluation of the antigenotoxicity of polysaccharides and β -glucans from *Agaricus blazei*, a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay, *J. Food Compos. Anal.* 22 (2009) 699-703.
4. G.D. Brown, S. Gordon, Fungal β -glucans and mammalian immunity, *Immunity*, 19 (2003) 311-315.
5. K.S. Kim, H.S. Yun, Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 496-500.
6. A. Demirbas, β -Glucan and mineral nutrient contents of cereals grown in Turkey, *Food Chem.* 90 (2005) 773-777.
7. J.A. Vaz, L. Barros, A. Martins, C. Santos-Buelga, M.H. Vasconcelos, I.C.F.R. Ferreira, Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions, *Food Chem.* 126 (2011) 610-616.
8. A.A. Soares, C.G.M. de Souza, F.M. Daniel, G.P. Ferrari, S.M.G. da Costa, R.M. Peralta, Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity, *Food Chem.* 112 (2009) 775-781.
9. C.M. Camellini, M. Maraschin, M.M. Mendonça, C. Zucco, A.G. Ferreira, L.A. Tavares, Structural characterization of β -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products, *Biotechnol. Lett.* 27 (2005) 1295-1299.
10. C.H. Yu, S.F. Kan, C.H. Shu, T.J. Lu, L. Sun-Hwang, P.S. Wang, Inhibitory mechanisms of *Agaricus blazei* Murril on the growth of prostate cancer *in vitro* and *in vivo*, *J. Nutr. Biochem.* 20 (2009) 753-764.
11. Y.W. Kim, K.H. Kim, H.J. Choi, D.S. Lee, Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*, *Biotechnol. Lett.* 27 (2005) 483-487.
12. A. Hideno, H. Inoue, K. Tsukahara, S. Yano, X. Fang, T. Endo, S. Sawayama, Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source, *Enzyme Microb. Technol.* 48 (2011) 162-168.
13. K. Kovács, L.S. Megyeri, C. Szakacs, C.P. Kubicek, M. Galbe, G. Zacchi, *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and β -glucosidase on pretreated willow, *Enzyme Microb. Technol.* 43 (2008) 48-55.
14. Á. Szekeres, L. Kredics, Z. Antal, E. Kevei, L. Manczinger, Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*, *FEMS Microbiol. Lett.* 233 (2004) 215-222.
15. I. Seyis, N. Aksoz, Production of lactase by *Trichoderma sp.*, *Food Technol. Biotechnol.* 42 (2004) 121-124.
16. I. Seyis, N. Aksoz, Xylanase production from *Trichoderma harzianum* 1073 D3 with alternative carbon and nitrogen sources, *Food Technol. Biotechnol.* 43 (2005) 37-40.
17. M.H. El-Katatny, W. Somitsch, K.H. Robra, M.S. El-Katatny, G.M. Gübitz, Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*, *Food Technol. Biotechnol.* 38 (2000) 173-180.
18. K. Sharma, A.K. Mishra, R.S. Misra, Morphological, biochemical and molecular characterization of *Trichoderma harzianum* isolates for their efficacy as biocontrol agents, *J. Phytopathol.* 157 (2009) 51-56.
19. R. López-Mondejar, M. Ros, J.A. Pascual, Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent, *Biol. Control*, 56 (2011) 59-66.
20. E.I. Masih, B. Paul, 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, *Curr. Microbiol.* 44 (2000) 391-395.
21. U. Beshay, H. El-Ershasy, I.M.K. Ismail, H. Moawad, E. Wojciechowska, S. Abd-El-Ghany, β -glucanase production from genetically modified recombinant *Escherichia coli*: Effect of growth substrates and development of a culture medium in shake flasks and stirred tank bioreactor, *Process Biochem.* 39 (2003) 307-313.
22. Jayus, B.M. McDougall, R.J. Seviour, The effect of dissolved oxygen concentrations on (1 \rightarrow 3)- and (1 \rightarrow 6)- β -glucanase production by *Acremonium sp.* IMI 383068 in bath culture, *Enzyme Microb. Technol.* 36 (2005) 176-181.
23. E.C. Giese, L.G. Covizzi, D. Borsato, R.F.H. Dekker, M.L. Corradi Da Silva, A.M. Barbosa, Botryosphera, a new substrate for the production of β -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai, *Process Biochem.* 40 (2005) 3783-3788.
24. B.G.G. Donzelli, K.J. Siebert, G.E. Harman, Response surface modeling of factors influencing the production of chitinolytic and β -1,3-glucanolytic enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1, *Enzyme Microb. Technol.* 37 (2005) 82-92.
25. K. Théodore, T. Panda, 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 Microb. Technol.* 17 (1995) 1043-1049.
26. L.F. Fleuri, H.H. Sato, Study of the influence of different parameters in the production of lytic enzymes, *Ciênc. Technol. Aliment.* 28 (2008) 299-310 (in Portuguese).
27. Y.L. Gao, X.R. Ju, H.H. Jiang, Use of response surface methodology to investigate the effect of food constituents on *Staphylococcus aureus* inactivation by high pressure and mild heat, *Process Biochem.* 41 (2006) 362-369.

28. A.M. Barbosa, Selection of xylanolytic microorganisms and production of xylanases by *Trichoderma harzianum* Rifai in sugarcane bagasse. *PhD Thesis*, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brazil (1992) (in Portuguese).
29. H.J. Wiget, A convenient growth medium for *Neurospora crassa*, *Microbial Genetics Bull.* 13 (1956) 42–43.
30. M. Somogyi, A new reagent for the determination of sugars, *J. Biol. Chem.* 160 (1945) 61–68.
31. N. Nelson, A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.* 153 (1944) 375–380.
32. M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356.
33. A.A.J. Carneiro, E.C. Giese, C.M. Landi Franco, E. Gomes, R. Da Silva, β -glucans from *Agaricus blazei* as substrate for the production of β -1,3-glucanase by *Trichoderma reesei*, *XVII National Symposium on Bioprocesses*, Natal, Brazil (2009) (in Portuguese).
34. V. Deepak, K. Kalishwaralal, S. Ramkumarpandian, S. Venkatesh Babu, S.R. Senthilkumar, G. Sangiliyandi, Optimization of media composition for nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 8170–8174.
35. E.C. Giese, R.F.H. Dekker, I.S. Scarmínio, A.M. Barbosa, R. Silva, Comparison of β -1,3-glucanase production by *Batrachosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical mixture-design, *Biochem. Eng. J.* 53 (2011) 239–243.

ANEXO II

CAPÍTULO II

GLUCOOLIGOSACCHARIDES PRODUCED FROM AGARICUS BLAZEI β -
GLUCAN HYDROLYSIS USING β -(1 \rightarrow 3) GLUCANASES PRODUCED BY
TRICHODERMA HARZIANUM RIFAI

**β -GLUCOOLIGOSACCHARIDES PRODUCED FROM AGARICUS BLAZEI β -
GLUCAN HYDROLYSIS USING β -(1 \rightarrow 3) GLUCANASES PRODUCED BY
TRICHODERMA HARZIANUM RIFAI**

**Carneiro, A. A. J^a.; Giese, E. C^b.; Barbosa, A. M^c.; Menezes, G. F^a.; Paulino, T. C. C^a.;
Landi, C.M.F^d.; Gomes, E^a and Da Silva, R^{a*}**

^aLaboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, São Paulo State University, UNESP, IBILCE, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000 São José do Rio Preto-SP, Brazil.

^bDepartament of Biotechnology, School of Engineering of Lorena, University of São Paulo, Estrada Municipal do Campinho - Caixa Postal 116, 12602-810 Lorena-SP, Brazil

^cBiorefining Research Initiative, Lakehead University, Thunder Bay, Ontario, Canada P7B 5E1.

^dDepartment of Engineering and Food Technology, São Paulo State University, UNESP, IBILCE, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000 São José do Rio Preto-SP, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 17 32212354; Fax: +55 17 32212350.

E-mail address: dasilva@ibilce.unesp.br

São Paulo State University, UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Abstract

The fungus *Agaricus blazei* (*Agaricus brasiliensis*), also known as the sun mushroom, is a Basidiomycete whose β -glucan producer oligosaccharides with functional properties. The potential of β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma harzianum* Rifai, grown on *A. blazei* extract as carbon source, to produce glucooligosaccharides from of β -glucan of *A. blazei* was investigated in the present study. Crude enzyme obtained from *Trichoderma harzianum* Rifai resulted in 14% of β -glucan hydrolysis and 41.5% of laminarin hydrolysis after 60 min. Gentiobiose (G₂) and laminaritriose (L₃) were detected in the both enzymatic hydrolysates

through high performance anionic exchange chromatography (HPAEC/PAD). Laminaritetraose (L_4), cellotetraose (C_4) and celotriose (C_3) were identified and quantified only in hydrolysis reaction products from *A. blazei* β -glucan. The differences in the results between laminarin and β -glucan hydrolysis may likely be explained by the differences in the degree of polymerization, conformation and branching of each polysaccharides and suggests a possible synergism between β -1,3-glucanases and another hydrolytic enzymes present in crude extract.

Key-words: *Agaricus blazei*; *Trichoderma harzianum* Rifai; β -1,3-glucanase; enzymatic hydrolysis; glucooligosaccharides.

INTRODUCTION

β -glucan is an heterogeneous glucose polymer made up of a β -1,3 structure linked by β -D-glucopyranosyl units with β -1,6 branches, which vary in length and distribution (RODRÍGUEZ et al., 2009). Its structure is also made up of approximately 70% β -1,4 bonds, and this is the main glycosidic bond (MOURA et al., 2011). Solubility of β -(1 \rightarrow 3)-glucan increases as the degree of polymerization (DP) decreases (ZEKOVIĆ & KWIATKOWSKI, 2005).

β -glucans are the major cell wall structural components in fungi and are also found in some bacteria and plants (RODRÍGUEZ et al. 2009). Different extraction methods have been applied to determine the type of glucan according to its sources. There are many glucans found in the mushroom *Agaricus blazei*, including β -(1 \rightarrow 3) and β -(1 \rightarrow 6)-glucans (CAMELINI et al. 2005; DONG et al., 2002; OHNO et al., 2001), α -(1 \rightarrow 4)-glucans (GONZAGA et al., 2005), and a glucomannan-protein complex found in the mycelial mass obtained during submerged fermentation (MIZUNO et al., 1999). All of these glucans were extracted with water at 100°C and precipitated with ethanol. Dong et al. (2002) reported that the glucan structure is largely made up of glucose, with the main chain exhibiting β -(1 \rightarrow 6) bonds and two β -(1 \rightarrow 3) glycosil units linked to every three D-glucose units.

Purified β -glucan from *Agaricus blazei* produced oligosaccharides through the use of an endo β -(1,6)-glucanase from *Bacillus megaterium*, and di- and trisaccharides with anti-diabetic properties were the main products found by Kim et al. (2005). The oligosaccharides can be extracted directly from natural sources, or through the chemical process hydrolyzing

the polysaccharide, or by enzymatic or chemical synthesis that hydrolyzes disaccharides (MUSSATTO & MANCILHA, 2006).

β -1,3-glucanase catalyzes the hydrolysis of β -D-glycosidic linkages of β -(1 \rightarrow 3)-glucan. The substrates used for this action are laminarin, paramylon and pachyman (β -(1 \rightarrow 3)-glucan) (FLEURI & SATO, 2005). Laminarin (also known as laminaran) is found in brown algae and has been mostly used in these studies. The β -1,3-glucanase can be classified into two main types, depending on their actions: (a) endo- β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39), which randomly cleave internal β -1,3 bonds throughout the polysaccharide chain, releasing small oligosaccharides; and (b) exo- β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.58), which release glucose units from the non-reducing end of β -1,3-D-glucan, producing D-glucose as the only product of hydrolysis (PITSON et al., 1993; LI et al., 2007).

Oligosaccharides with DP>6 and with a tendency to form a helix structure are more efficient in acting upon the immune system. Laminariheptose and laminarihexose, for example, are able to interact with human cells and modulate immune response. These oligosaccharides, which are known as laminarioligosaccharides (β -(1-3)-D-glucans), are commonly found in fungi, plants and algae (BLAND, KESHAVARZ & BUCKE, 2004).

In this study, the oligosaccharide production by action of crude and partially-fractionated enzymes of the β -glucanolytic complex from *Trichoderma harzianum* Rifai on *A. blazei* β -glucan and laminarin was evaluated. The crude enzyme produced under optimized conditions using *A. blazei* extract as substrate and the partially purified enzyme were characterized as their pHs and temperatures of activities. The released products were analyzed using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC/PAD).

MATERIAL AND METHODS

Mushroom

The dried *Agaricus blazei* fruiting bodies were purchased from the Commerce of Natural Products Ltd, Uruguaiana, Brazil. According to the manufacturer, the composition of 100 g (dry weight) was: 44.4% carbohydrates; 33.3% protein; 33.3% dietary fiber; 6 mg sodium; 22 mg phosphor; 0.21 mg copper; 0.28 mg iron; and 0.14 mg zinc. Dried material utilized in β -1,3-glucanase production was ground and sieved until a homogenous particle size was obtained. The sieve used was a voile cloth sieve.

Microorganism and β -1,3-glucanase production

Trichoderma harzianum Rifai obtained from decaying peroba wood (*Aspidosperma* sp.) and maintained on xylose-agar at 4 °C (Giese et al., 2005) incorporating Vogel minimal salts medium (VMSM) (Vogel, 1956). Before each experiment, the microorganism was transferred to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of VMSM-xylose-agar and incubated at 28 °C for 4 days. Fermentation was carried out in 125 ml Erlenmeyer flasks, containing 25 ml of a VMSM medium and *A. blazei* extract as the sole carbon source. Each flask was inoculated with a suspension containing 10^7 spores, and was kept under constant agitation at 180 rpm at 28°C for 24 h. The effect of carbon source and cultivation time for β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* Rifai were earlier optimized using response surface methodology by Carneiro et al. (2011).

Analytical Methods

β -1,3-glucanase activity was measured by quantifying the reducing sugars released from laminarin (β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucan produced by the algae *Laminaria digitata*, Sigma) hydrolysis. Final assay volume was 0.5 mL, which was made up of 0.35 mL of laminarin (4 mg/mL) in a 25 mM sodium acetate buffer at pH 5.0 and 0.1 mL of crude enzyme. The assay was carried out at 50 °C and was stopped after 10 minutes with 0.05 mL of 1.0 M NaOH. Products released were measured as reducing sugars according to Somogyi (1945) and Nelson (1944) using glucose as standard. One unit of enzymatic activity was defined as the number of μ moles of reducing sugars released per minute per mL of enzymatic extract. Protein contents present in the crude enzyme was determined through the Hartree-Lowry method (1972), with bovine serum albumin (BSA) used as a standard.

Partial purification of β -glucanase

The crude β -glucanase was concentrate and dialyzed in a QuixStand benchtop system laboratory scale, cross flow hollow fiber system (Amersham Biosciences). The concentrated β -glucanase was analyzed using gel filtration chromatography on a Sephadex G-100 in an open column, with the equilibrium distributed using a 50 mM acetate buffer at pH 5.5 and containing 50 mM of NaCl. Elution was carried out in the same buffer at a flow rate of 0.3 ml min^{-1} at room temperature, and 4.5 ml fractions were collected using a fraction collector (Gilson). The proteins found in each fraction were monitored during their absorption at 280

nm using spectrophotometer. Fractions containing β -1,3-glucanase activity were concentrated using Centricon® (Amicon Bioseparations, Millipore, Bedford, MA, USA).

Denaturing gel electrophoresis

Partial purity of β -glucanases was determined using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli, 1970). Protein samples were prepared by boiling for 3 min in a 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing mercaptoethanol 2%, SDS 0.2%, glycerol 10% and bromophenol blue 0.001 M. Separator gel was prepared at a 10% concentration, while the concentrator gel was prepared at a 5% concentration (Sambrook and Russell, 2001). A protein kit (18.4 to 180 kDa) was used as a marker for molecular weight (Sigma-Aldrich). Silver reagent method was used to stain the gel (Blum et al., 1987).

Effect of pH and temperature on crude and partially purified β -1,3-glucanase

To find optimum pH, enzymatic activity was determined at 50°C at different pH values by incubating the enzyme and laminarin 0.2% (w v⁻¹) in the following 0.1 M buffer solutions: acetate (pH 3.0-5.5) and sodium phosphate (pH 6.0-8.0). To find optimum temperature, enzymatic activity was assayed by incubating the reaction mixture at different temperatures ranging between 25 and 75 °C at the optimum pH.

To calculate pH stability, the enzyme was diluted (1:1) in the following buffer solutions: acetate (pH 3.0-5.5) and sodium phosphate (pH 6.0-8.0) without substrate, and was maintained at 25 °C for 24 h. After incubation period, residual β -1,3-glucanase activity was quantified at optimum pH and temperature conditions. To calculate thermostability, the enzyme was incubated without the substrate at different temperatures ranging between 25 and 75°C, for 1 h. After incubation period, residual β -1,3-glucanase activity was quantified at optimum pH and temperature conditions. Maximum activity was defined as 100%.

*Extraction of β -glucans from *Agaricus blazei**

β -glucans from *Agaricus blazei* were extracted following the methodology described by Mizuno et al. (1990), with some modifications made by Camelini et al. (2005). Dried *Agaricus blazei* fruiting bodies (20 g) were macerated with 120 ml of 85% ethanol (v/v), agitated in a magnetic agitator and vacuum-filtered. The residue was mixed with 350 ml of 85% ethanol (v/v) heated at 80 °C for 3 h and vacuum-filtered, separating and discarding the

liquid phase. This procedure was carried out 3 consecutive times. This residue was mixed with 350 ml of distilled water, heated at 100 °C for 3 h, and vacuum-filtered. This step was repeated 3 times. The 3 aqueous fractions obtained were each mixed in 4 volumes of 95% ethanol (v/v) and left to precipitate overnight at 4°C. Each liquid fraction was collected and concentrated in a rotary evaporator. The volume of concentrated liquid after combining the 3 fractions was dialyzed in a 12.000 kDa cutoff cellulose membrane for 3 days, with a daily exchange of distilled water. This fraction was then freeze dried and weighed for enzymatic hydrolysis applications.

*Enzymatic hydrolysis of laminarin and β -glucan from *Agaricus blazei**

Enzymatic hydrolysis laminarin and *A. blazei* β -glucan (1 g/l) was conducted in 10 ml solution (0.1M sodium acetate buffer, pH 4.5) using 4 unit of β -1,3-glucanase (activity measured against laminarin) at 40 °C to partially purified enzyme and at 35°C to crude enzyme preparation. Sample aliquots (1 ml) were taken at various intervals (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 and 60 min) and were heated for 10 min at 100 °C in order to inactivate the enzymes. The products from hydrolysis were analyzed following the method of Somogyi (1945) and Nelson (1944), and total sugars were analyzed using the phenol-sulfuric method described by Dubois (1956), which uses glucose as standard. Enzymatic hydrolysates were analysed by High Performance Anionic Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC/PAD).

HPAEC/PAD analysis of enzyme hydrolysis products

Undigested polymeric material remaining in the hydrolysates was removed by precipitation with ethanol, and were then centrifuged, evaporated and dissolved in 0.4 ml of distilled water. Total sugars were analyzed using the phenol-sulfuric method described by Fox & Robyt (1991). The samples of 60 minutes were filtered (0.22- μ m membrane) and injected (20 μ l sample loop) into the HPAEC-PAD system (ICS 3000, Dionex Corporation, EUA) equipped with automatic sampler AS40. The standard quadruple potential waveform was employed with the following periods and pulse potentials: $E_1 = 0.10$ V ($t_1 = 0.40$ s); $E_2 = -2.00$ V ($t_2 = 0.02$ s); $E_3 = 0.60$ V ($t_3 = 0.01$ s); $E_4 = 0.10$ V ($t_4 = 0.06$). All eluents were prepared

with ultrapure water (18 mΩ.cm) with N₂ sparging. The oligosaccharides were separated using a sodium acetate gradient in a analytical column CarboPac PA 100 (4 x 250 mm) at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹ at 40 °C. Elution conditions were determined by Giese et al. (2006) using eluents: (A) 500 mM of sodium acetate and (B) 100 mM NaOH. The first isocratic phase was 15 min in 97% of A and 3% of B, followed by a linear gradient from 100% of B and 50% of A and 50% of B over the course of 70 min. Sugar was identified and quantified according to standards of glucose, gentiobiose (G₂), cellobiose (C₂), cellotriose (C₃), cellotetraose (C₄), laminaritriose (L₃) and laminaritetraose (L₄), purchased from Sigma-Aldrich. The data was analyzed using the Chromeleon software, version 6.8 (Dionex Corporation, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

β-1,3-glucanase partial purification

After 24 h of fermentation, the supernatant from *Trichoderma harzianum* Rifai culture containing the crude enzyme was concentrated using ultra filtration and was subsequently purified by gel filtration. A summary of the results from the partial purification process are shown in Table 1. β-1,3-glucanase exhibited a final yield of 16.78% and a purification factor of 95.7 fold. The gel filtration profile as a single peak is shown in figure 1. The objective of using the partially purified β-1,3-glucanase was to avoid the presence of enzymes from the glycolytic complex, which could impair the acquisition of hydrolysis products of interest.

After molecular exclusion chromatography, SDS-PAGE analysis showed a strong protein band with β-1,3-glucanase activity with molecular mass of approximately 96 kDa (data not shown). This result is not conclusive and further purification steps must be carried out in order to obtain a more reliable result. The molecular mass of purified β-1,3-glucanase from *Trichoderma asperellum* was reported to be approximately 83.1 kDa (Bara, Lima & Ulhoa, 2003).

Effect of pH and temperature on crude β-1,3-glucanase activity and partial purification

The effect of pH and temperature on both crude and partially purified β-1,3-glucanase activity were analyzed. The optimum pH of the crude β-1,3-glucanase produced by *T. harzianum* Rifai was found to be 4.5, and the optimum temperature was found to be 55 °C.

The enzyme exhibited stability in a pH range of 3.0 to 5.0, and it maintained 43% of its activity after 1 h at 35 °C. However, the optimum pH of the partial purified β -1,3-glucanase produced by *T. harzianum* ranged from 4.5 and 5.5, and optimum temperature was also found to be 55 °C. The partially purified enzyme exhibited stability in a pH range of 4.0 to 5.5, and maintained 112% of its activity after 1 h at 40 °C. These results were similar to those found for the β -1,3-glucanase purified from *T. harzianum* Rifai T24, which presented its highest activity at a pH of 4.5 and between 50 °C and 60 °C (El-katatny et al., 2001). The stability pH for β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma viride* TP09 ranged between 3.0 and 5.0, and the stability temperature ranged between 30 °C and 40 °C (Yi et al. 2008). However, there was some variation in optimum temperature. One experiment resulted in 60 °C, in the case of β -1,3-glucanases from *T. harzianum* (Ramot, Cohen-Kupiec, Chet, 2000).

Enzymatic hydrolysis and HPAEC/PAD analysis of enzymatic products of hydrolysis

Hydrolytic action of both crude and partially purified β -1,3-glucanase from *T. harzianum* Rifai was evaluated in laminarin and also in *A. blazei* β -glucan. The crude enzyme obtained from *T. harzianum* Rifai resulted in approximately 41.5% of laminarin hydrolysis and 14% of β -glucan hydrolysis after 60 min. The partially purified enzyme presented 47% of laminarin degradation after 60 min, and there was no glucan degradation.

HPAEC/PAD analysis confirmed the different standard of actions of the different enzyme solution, and revealed differences in the hydrolysis products from glucans and laminarin using both the crude and partially purified enzyme (Figure 2a, 2b and 3). Glucose was the main hydrolysis product from β -glucan and laminarin by the crude enzyme. The partially purified enzyme did not hydrolyze *A. blazei* β -glucan, but it did have glucose as the main product in laminarin hydrolysis. The molecule laminarin is a linear polysaccharide made up of β (1 \rightarrow 3)-glucan with β (1 \rightarrow 6)-linkages, with a β (1 \rightarrow 3): β (1 \rightarrow 6) ratio of 3:1 (Nisizawa et al.; 1963). The molecule of β -glucan extracted from *A. blazei* is probably different of laminarin and is not linear. So, its hydrolyses require different enzymes in solution, which were probably absent in the purified extract. However, despite of this, important oligosaccharides were detected in enzymatic hydrolysates of both crude and partially purified β -1,3-glucanases, including gentiobiose (G_2) and laminaritriose (L_3) in the laminarin hydrolysates (Table 2 and 3). G_2 and L_3 were also found in the *A. blazei* β -glucan hydrolysates products from crude enzyme hydrolysis. Laminaritetraose (L_4), cellotriose (C_3)

and cellotetraose (C₄) were also identified and quantified in *A. blazei* β -glucan hydrolysates from the crude enzyme after 60 min (Table 2).

In related studies, Giese et al. (2006) reported the production of glucose, gentiobiose, laminaribiose and lower quantities of gluco-oligosaccharides with a DP between 3 and 4 by the action of crude β -1,3-glucanase from *T. harzianum* Rifai on laminarin and botryosphaeran (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucan) after 60 min. Partially purified β -glucanase fractions also presented different modes of action on botryosphaeran and laminarin (Giese et al., 2009). The crude β -1,3-glucanase obtained from *T. harzianum* CECT 2413 also hydrolyzed curdlan (β -1,3-glucan) and, after 20 h, approximately 90% of this polysaccharide was hydrolyzed (Grandpierre et al. 2008).

Different analysis methodologies have been used to identify the β -1,3-glucanase hydrolysis products. Laminarin hydrolysis products obtained using β -1,3-glucanases from *Perna viridis* were analyzed using MALDI-TOFMS mass-spectrometry and HPLC. Glucose and glucooligosaccharides with different DP were found in the reaction products (ZAKHARENKO et al., 2011). In addition, use of TLC identified the laminarioligosaccharides L₃ and L₄ released from hydrolysis of laminarin from *Eisenia bicyclis* (β -1,6) and *Laminaria digitata*, respectively, using a purified β -1,3-glucanase from *Bacillus clausii* NM-1 during 30 min (Miyanishi et al., 2003).

It can be observed that there are differences in quantity and types of gluco-oligosaccharides formed according to the substrate used for β -1,3-glucanase action. The mechanism of action of β -1,3-glucans is not yet completely understood. It is believed to be attributed to a few specific factors, including molecular structure, molecular mass, the types of glycosidic bonds and residues present, and also to space conformation (Freimund et al. 2003).

The results of this study will contribute to the development of an enzymatic hydrolysis process that is viable for the production of β -glucooligosaccharides of biotechnological interest from more accessible substrate, as laminarin is expensive and its cost limit its use on this purpose. Laminarioligosaccharides obtained by the action of β -1,3-glucanase upon laminarin from *Laminaria digitata* induced the production of tumor necrosis factor- α (TNF α) obtained from human monocytes (Miyanishi et al., 2003). Also, hydrolysis products of laminarin from *Eisenia bicyclis* produced by the action of β -1,3-glucanase stimulated immune response in humans (Pang et al., 2005).

In conclusion, the quantity and type of β -glucooligosaccharides obtained by enzyme hydrolysis is influenced, not only by the action of β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai, but also by the molecule structure of polysaccharide used. These differences may likely be explained by the differences in the DP, conformation and ramification of each polysaccharide.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Brazilian Foundation FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), in Sao Paulo, Brazil, for their financial support.

REFERENCES

- AHMAD, A.; ANJUM, F. M.; ZAHOR, T.; NAWAZ, H.; AHMED, Z. Extraction and characterization of β -D-glucan from oat for industrial utilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 46, p. 304-309, 2010.
- ANGELI, J. P. F.; RIBEIRO, L. R.; CAMELINI, C. M.; MENDONÇA, M. M.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the antigenotoxicity of polysaccharides and β -glucans from *Agaricus blazei*, a model study with the single cell gel electroforese/Hep G2 assay. *Food Chemistry*, v. 113, p. 386-393, 2009.
- 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.
- BENITO-ROMÁN, O.; ALONSO, E.; LUCAS, S. Optimization of the β -glucan extraction conditions from different waxy barley cultivars. *Journal of Cereal Science*, v. 53, p. 271-276, 2011.
- BLAND, E. J.; KESHAVARZ, T.; BUCKE, C. The influence of small oligosaccharides on the immune system. *Carbohydrate Research*, v. 339, p. 1673-1678, 2004.
- BLUM, H.; BIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BROWN, G. D.; GORDON, S. MicroReview. Immune recognition of fungal β -glucans. *Cellular Microbiology*, v. 7, p. 471-479, 2004.
- CAMELINI, C. M.; MARASCHIN, M.; MENDONÇA, M. M.; ZUCCO, C.; FERREIRA, A. G.; TAVARES, L. A. Structural characterization of β -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. *Biotechnology Letters*, v. 27, p. 1295-1299, 2005.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; SMIDERLE, F. R.; ROSADO, F. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A. β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 252–257, 2006.

CARNEIRO, A. A. J., GIESE, E. C., BARBOSA, A. M., GOMES, E., DASILVA, R. *Agaricus blazei* as substrate to produce β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* Rifai. *Food Technology and Biotechnology*, v. 49, p. 341-346, 2011.

CHAKRABORTY, I.; MONDAL, S.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. A water-insoluble (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan from the alkaline extract of an edible mushroom *Termitomyces eurhizus*. *Carbohydrate Research*, v. 341, p. 2990-2993, 2006.

DONG, Q.; YAO, J.; YANG, X. T.; FANG, J. N. Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murril. *Carbohydrate Research*, v. 337, p. 1417-1421, 2002.

DORE, C. M. P. G.; AZEVEDO, T. C. G.; DE SOUZA, M. C. R.; REGO, L. A.; DE DANTAS, J. C. M.; SILVA, F. R. F.; ROCHA, H. A. O.; BASEIA, I. G.; LEITE, E. L. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of β -glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. *International Immunopharmacology*, v. 7, p. 1160-1169, 2007.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 350-356, 1956.

EL-KATATNY, M. H.; GUDELJ, M.; ROBRA, K. H.; ELNAGHY, M. A.; GÜBITZ, G. M. Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 56, p. 137-143, 2001.

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

FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. A new now-degrading isolation process for 1,3 β -D-glucan of high purity from Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers*, v. 54, p. 159-171, 2003.

FONTAINE, T.; HARTLAND, R. P.; BEAUVAIS, A.; DIAQUIN, M.; LATGE, J. P. Purification and characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *European Journal of Biochemistry*. v. 243, p. 315-321, 1997.

FOX, J. D.; ROBYT, J. F. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Analytical Biochemistry*, v. 195, p. 93-96, 1991.

GENTA, F. A.; BRAGATTO, I.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Purification, characterization and sequencing of the major β -1,3-glucanase from midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 39, p. 861-874, 2009.

GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; BORSATO, D.; DEKKER, R. F. H.; MONTEIRO, N. K.; CORRADI DA SILVA, M. L.; BARBOSA, A. M. 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.

GONZAGA, M. L. C.; RICARDO, N. M. P.; HEATLEY, F.; SOARES, S. A. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murril. *Carbohydrate Polymers*, v. 60, p. 43-49, 2005.

GRANDPIERRE, C.; JASSEN, H. G.; LAROCHE, C.; MICHAUD, P.; WARRAND, J. Enzymatic and chemical degradation of curdlan targeting the production of β -(1,3) oligoglucans. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, p. 277-286, 2008.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem* 1972;48:422-427.

HONG, T. Y.; MENG, M. Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3- β -glucanase of *Paenibacillus* sp. Isolated from garden soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 61, p. 472-478, 2003.

KIM, Y. W.; KIM, K. H.; CHOI, H. J.; LEE, D. S. Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*, *Biotechnology Letters*, v. 27, p. 483-487, 2005.

KEDIA, G.; VÁSQUEZ, J. A.; PANDIELLA, S. S. Enzymatic digestion and in vitro fermentation of oat fractions by human *lactobacillus* strains. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 43, p. 355-361, 2008.

KULMINSKAYA, A. A.; THOMSEN, K. K.; SHABALIN, K. A.; SIDORENKO, I. A.; ENEYSKAYA, E. V.; SABEL'EV, A. N., & et al. Isolation, enzymatic properties, and mode action of an exo-1,3- β -glucanase from *Trichoderma viride*, *European Journal of Biochemistry*, v. 268, p. 6123-6131, 2001.

KUMAGAI, Y.; OJIMA, T. Isolation and characterization of two types of β -1,3-glucanases from the common sea hare *Aplysia kurodai*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, v. 155, p. 138-144, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, I. P.; KANG, B. H.; ROH, J. K.; KIM, J. R. Lack of carcinogenicity of lyophilized *Agaricus blazei* Murill in a F344 rat two year bioassay. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 87-95, 2008.

LI, W.; CUI, S. W.; KAKUDA, Y. Extraction, fractionation, structural and physical characterization of wheat β -D-glucans. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, p. 408-416, 2006.

LI, H.; CHEN, J.; LI, A.; LI, D. C. Purification and partial characterization of β -1,3-glucanase from *Chaetomium thermophilum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 23, p.1297–1303, 2007.

MANISSERI, C.; GUDIPATI, M. Bioactive xylo-oligosaccharides from wheat bran soluble polysaccharides. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, p. 421-430, 2010.

MIYANISHI, N.; IWAMOTO, Y., WATANABE, E.; ODA, T. Induction of TNF- α production from human peripheral blood monocytes with β -1,3-glucan oligomer prepared from laminarin with β -1,3-glucanase from *Bacillus clausii* NM-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 95, p. 192-195, 2003.

MIZUNO, T.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from "Himematsutake," the fruiting body of *Agaricus blazei* murill. *Agricultural Biological Chemistry*, v. 54, p. 2897-2905, 1990.

MONTEIRO, V. N.; ULHOA, C. J. Biochemical characterization of a β -1,3-glucanase from *Trichoderma Koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. *Current Microbiology*, v. 52, p. 92-96, 2006.

MOURA, F. A.; PEREIRA, J. M.; SILVA, D. O.; ZAVAREZE, E. R.; MOREIRA, A. S.; HELBIG, E.; DIAS, A. R. G. Effect of oxidative treatment on the physicochemical, rheological and functional properties of oat β -glucan. *Food Chemistry*, v. 128, p. 982-987, 2011.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 68, p. 587-597, 2007.

NELSON, N. A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 153, p. 375-380, 1944.

NISIZAWA, K.; YAMAGUCHI, T.; HANDA, N.; MAEDA, M.; YAMAZAKI, H. Chemical nature of a uronic acid-containing polysaccharide in the peritrophic membrane of the silkworm. *The Journal of Biochemistry*, v. 54, p. 419-426, 1963.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 183, p.119-123, 2000.

OHNO, N.; FURUKUAWA, M.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; MOTOI, M.; YADOMAE, T. Antitumor β -glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 24, p. 820-828, 2001.

PANG, Z.; OTAKA, K.; MAOKA, T.; HIDAKA, K.; ISHIJIMA, S.; ODA, M.; OHNISHI, M. Structure of β -glucan oligomer from laminarin and its effect of human monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 69, p. 553-558, 2005.

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

RAMOT, O.; COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. Regulation of β -1,3-glucanase by carbon starvation in the mycoparasite *Trichoderma harzianum*. *Mycological Research*, v. 104, p. 415-420, 2000.

RHEE, S. J.; CHO, S. Y.; KIM, K. M.; CHA, D. S.; PARK, H. J. A comparative study of analytical methods for alkali-soluble β -glucan in medicinal mushroom, Chaga (*Inonotus obliquus*). *LWT- Food Science and Technology*, v. 41, p. 545-549, 2008.

RODRÍGUEZ, I.; CHAMORRO, R.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. β -glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*, v. 27, p. 369-373, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Agarose gel electrophoresis. In: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS-NEVES, J. C.; PEREIRA, M. I.; CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; ALQUINI, G.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A novel branched $\alpha\beta$ -glucan isolated from the basidiocarps of the edible mushroom *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Polymers*, v.73, p. 309-314, 2008.

SHU, C. H.; XU, C. J.; LIN, E. S. Production, purification and partial characterization of a novel endo- β -1,3-glucanase from *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochemistry*, v. 41 p. 1229-1233, 2006.

SOARES, A. A.; SOUZA, C. G. M.; DANIEL, F. M.; FERRARI, G. P.; COSTA, S. M. G.; PERALTA, R. M. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry*, v. 112, p.775-781, 2009.

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugars. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 160, p. 61-68, 1945.

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

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microbial Genetic Bulletin*, v. 13, p. 42-43, 1956.

YI, H.; XIONG, S.; DU, M.; ZHANG, L. Purification and partial characterization of β -glucanase produced by *Trichoderma viride* TP09 isolated from sewage of beer-making. *European Food Research and Technology*, v. 227, p. 821-826, 2008.

ZAKHARENKO, A. M.; KUSAYKIN, M. I.; KOVALCHUK, S. N.; ANASTYUK, S. V.; LY, B. M.; SOVA, V. V.; RASSKAZOV, V.; ZVYAGINTSEV, T. N. Enzymatic and molecular characterization of an endo-1,3- β -D-glucanase from the crystalline styles of the mussel *Perna viridis*. *Carbohydrate Research*, v. 346, p. 243-252, 2011.

ZEKOVIC, D. B.; KWIATKOWSKI, S. Natural and modified (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 25, p. 205-230, 2005.

Table 1. Partial purification of the β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai.

| Steps | Total volume (ml) | β -1,3-glucanase activity (U/ml ⁻¹) | Total activity (U) | Protein (mg/ml ⁻¹) | Total Protein (mg) | Specific activity (U/mg ⁻¹) | Yield (%) | Purification (fold) |
|------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|-----------------------------------------|-----------|---------------------|
| Crude extract | 1000 | 0.27 | 270 | 0.08 | 80 | 3.37 | 100 | 1 |
| Ultrafiltration Quixstand TM | 120 | 2.38 | 285.6 | 0.27 | 32.4 | 8.81 | 105.77 | 2.61 |
| Ultrafiltration Amicon | 15 | 13 | 195 | 1.24 | 18.6 | 10.48 | 72.22 | 3.11 |
| Ultrafiltration Amicon | 6.65 | 20 | 133 | 1.24 | 8.25 | 16.13 | 49.26 | 4.79 |
| Sephadex G-100 | 35 | 1.29 | 45.15 | 0.004 | 0.14 | 322.5 | 16.78 | 95.7 |

Table 2. Analysis of the enzymatic hydrolysates from glucan and laminarin using crude β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*.

| Hydrolysis products of glucan and linkage type* | | Total sugars applied ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | | |
|----------------------------------------------------|----------------|---------------------------------------------------|---------------------------|-------|
| | | 10 | 32 | |
| | | Hydrolysis products amount | | |
| | | ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | (%) |
| G1 | - | 2.12 \pm 0.04 | 6.78 | 21.18 |
| G2 | β -(1-6) | 0.32 \pm 0 | 1.02 \pm 0.05 | 3.24 |
| C2 | β -(1-4) | ND | ND | ND |
| C3 | β -(1-4) | ND | 0.75 \pm 0.05 | 2.36 |
| C4 | β -(1-4) | ND | 0.43 \pm 0.06 | 1.36 |
| L3 | β -(1-3) | ND | 3.77 \pm 0.18 | 11.76 |
| L4 | β -(1-3) | ND | 5.14 \pm 0.38 | 16.08 |
| Total | | | | 56 |

| Hydrolysis products of Laminarin and linkage type* | | Total sugars applied ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | | |
|-------------------------------------------------------|----------------|---------------------------------------------------|---------------------------|-------|
| | | 10 | 100 | |
| | | Hydrolysis products amount | | |
| | | ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | (%) |
| G1 | - | 1.82 \pm 0.06 | 18.10 | 18.2 |
| G2 | β -(1-6) | 0.24 \pm 0.01 | 2.4 | 2.41 |
| C2 | β -(1-4) | ND | ND | ND |
| C3 | β -(1-4) | ND | ND | ND |
| C4 | β -(1-4) | ND | ND | ND |
| L3 | β -(1-3) | ND | 2.40 \pm 0.14 | 2.40 |
| L4 | β -(1-3) | ND | ND | ND |
| Total | | | | 23.01 |

*G¹, glucose; G², gentiobiose; C², cellobiose; C³, cellotriose; C⁴, cellotetraose; L³, laminaritriose; L⁴ laminaritetraose; ND, not detected.

Table 3. Analysis of the enzymatic hydrolysates from laminarin using partially purified β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*.

| Hydrolysis products of Laminarin and linkage type* | Total sugars applied ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | | |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------|-------|
| | 10 | 100 | |
| | Hydrolysis products amount | | |
| | ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | (%) |
| G1 - | 1.65 \pm 0.01 | 16.5 | 16.45 |
| G2 β -(1-6) | 0.19 \pm 0 | 1.9 | 1.92 |
| C2 β -(1-4) | ND | ND | ND |
| C3 β -(1-4) | ND | ND | ND |
| C4 β -(1-4) | ND | ND | ND |
| L3 β -(1-3) | ND | 4.26 \pm 0.43 | 4.27 |
| L4 β -(1-3) | ND | ND | ND |
| Total | | | 22.64 |

*G¹, glucose; G², gentiobiose; C², cellobiose; C³, cellotriose; C⁴, cellotetraose; L³, laminaritriose; L⁴ laminaritetraose; ND, not detected.

Figure Captions

Figure 1: Elution profile of β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* after gel filtration.

Figure 2: HPAEC/PAD analysis of hydrolysis products from glucan (a) and laminarin (b) using crude β -glucanase from *Trichoderma harzianum*, after 60 min of incubation.

Figure 3: HPAEC/PAD analysis of hydrolysis products from laminarin using partially purified β -glucanase from *Trichoderma harzianum*, after 60 min of incubation.

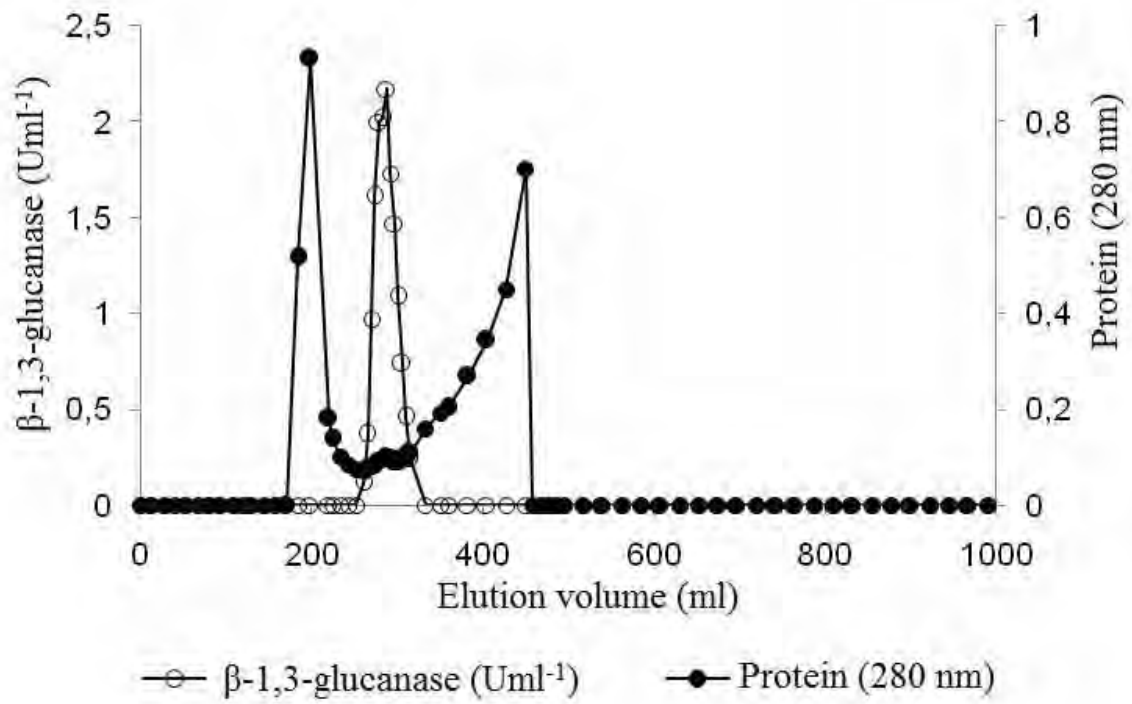


Figure 1

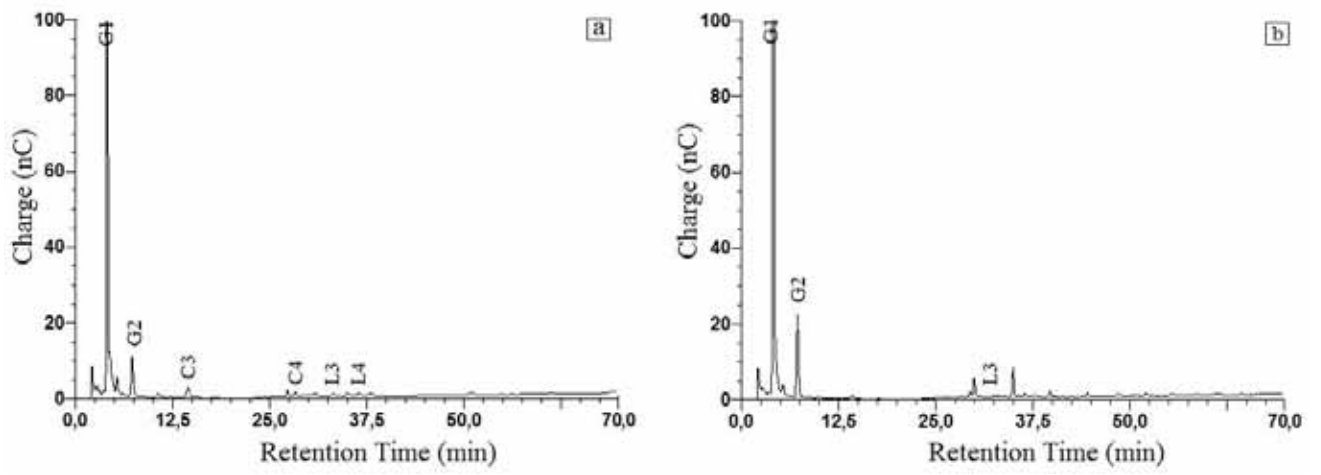


Figure 2a e 2b.

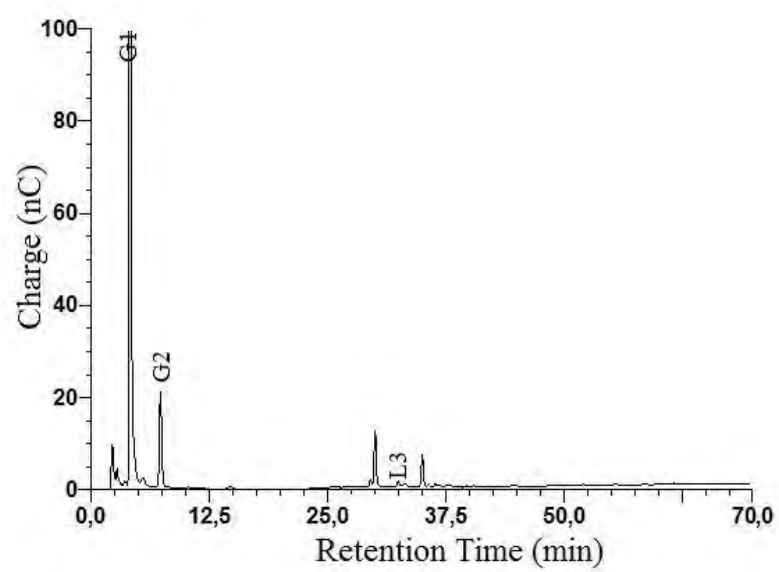


Figure 3

ANEXO III

CAPÍTULO III

Production of β -1,3-glucanase by *Trichoderma reesei* QM9414 on *Agaricus blazei* as a substrate and the application of enzymes in hydrolysis of β -glucans from *Agaricus blazei* to glucooligosaccharides obtainment

Production of β -1,3 glucanase by *Trichoderma reesei* QM 9414 on *Agaricus blazei* as a substrate and the application of enzymes in hydrolysis of β -glucan from *Agaricus blazei* to glucooligosaccharides obtainment

Andréia Aparecida Jacomassi Carneiro^a, Ellen Cristine Giese^b, Eleni Gomes^a, Célia Maria Landi Franco^c, Roberto da Silva^{a*}

^aLaboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, São Paulo State University, UNESP, IBILCE, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000 São José do Rio Preto-SP, Brazil

^bDepartment of Biotechnology, School of Engineering of Lorena (EEL), University of São Paulo, Estrada Municipal do Campinho - Caixa Postal 116, 12602-810 Lorena-SP, Brazil

^cDepartment of Engineering and Food Technology, São Paulo State University, UNESP, IBILCE, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000 São José do Rio Preto-SP, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 17 32212354; Fax: +55 17 32212350.

E-mail address: dasilva@ibilce.unesp.br

São Paulo State University, UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Running Title: *Production of β -1,3 glucanase by *Trichoderma reesei**

ABSTRACT

In this study, we investigated the production and application of β -1,3-glucanase from *Trichoderma reesei* QM 9414 in the hydrolysis of β -glucan of *Agaricus blazei* in order to obtain glucooligosaccharides. For enzyme production, a 2²-central composite factorial design was developed using time of culture (x_1 , days) and concentration of *A. blazei* (x_2 , g l⁻¹) as variables, and the results were analyzed using response surface methodology (RSM). The results showed that x_2 was the most important variable for β -1,3-glucanase production, and that maximum activity (4.36 U ml⁻¹) was reached on the fifth day of cultivation. The crude enzyme obtained under optimized conditions exhibited both optimum pH and pH stability

when the pH was between 3.5 and 5.0. Maximum activity was at 60°C, and the enzyme maintained 80% of its activity after 1h at 40°C. High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC/PAD) analysis detected gentiobiose in the enzymatic hydrolysates of β -glucan and laminarin using the crude and partial purified enzyme from *Trichoderma reesei*. In laminarin hydrolysate, laminaritriose, laminaritetraose and cellobiose were also found using the crude enzyme, and cellotriose and laminaritriose were detected using the partial purified enzyme. These results suggest a possible difference in the catalytic action of the two enzymatic complexes.

Key words: *Agaricus blazei*; *Trichoderma reesei*; β -1,3-glucanase; Response surface methodology; enzymatic hydrolysis; glucooligosaccharides.

1. Introduction

Glucans from basidiomycetes are polysaccharides with potential biological activities (Carbonero et al., 2006). Among the edible mushrooms, *Agaricus blazei* (*Agaricus brasiliensis*) is considered the most attractive due to its functional properties and as source for the development of drugs and nutraceuticals (Fan et al., 2007). It consists of high protein and low lipid concentrations, and also contains fibers. These characteristics may justify its inclusion in a healthy diet (Monteiro et al., 2005). The proportion of essential amino acids in this mushroom is nutritionally favorable (Kalač, 2009). Among them, arginine was the one that was most commonly found in *A. blazei*, as reported by Kim et al. (2009). It has long been eaten in Eastern cultures because it offers no health risk. According to Le et al. (2008), its consumption has increased in Japan in recent years, to approximately 300 tons annually.

It is important to emphasize that the concentration of β -glucans present in the cell wall of *A. blazei* varies depending on the maturation stage of the spores (Camelini et al., 2005), as well as on conditions during cultivation (Park et al. 2003). Different glucans can be found during various stages of the fruiting body development of *A. blazei*, including β -(1 \rightarrow 3) and β -(1 \rightarrow 6)-glucans (Camelini et al., 2005), and α -(1 \rightarrow 4)-glucans (Gonzaga et al., 2005).

The β -glucans and their oligosaccharides containing β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 4) and β -(1 \rightarrow 6) types of glycosidic bonds exhibit immunomodulator, antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer activity (Park et al. 2003). The production and the evaluation of the action of specific β -glucanases involved in the degradation of β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucans are essential keys in the development of oligosaccharides that exhibit prebiotic and immunomodulator activity.

β -1,3-glucanase catalyzes the hydrolysis of β -D-glycosidic linkages of β -(1 \rightarrow 3)-glucan. The substrates used for its action are laminarin, paramylon and pachyman (β -(1 \rightarrow 3)-glucan) (Fleuri & Sato, 2005). According to Ramot, Cohen-Kupiec & Chet (2000) the

variations between the hydrolyses of laminarin and pachyman may be attributed to differences in chain length and to the extent of branching. These variations can be classified into one of two main types, depending on their modes of action: (a), endo- β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39), which randomly cleave internal β -1,3 bonds along the polysaccharide chain. These bonds release small oligosaccharides. (b), exo- β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.58) consecutively release units of glucose from the non-reducing end of β -1,3-D-glucan. This release produces D-glucose as the only product of hydrolysis (Pitson et al., 1993; Li et al., 2007). Many β -1,3-glucanases have been purified and characterized, with results reported in the literature (Genta et al., 2009; Zhu et al., 2008; Li et al., 2007).

Fungi from the genus *Trichoderma* are filamentous fungi that belong to a genus of hyphomycetes (Samuels, 1996). They are commonly found in soil and root ecosystems (Harman et al., 2004), such as soil used for sugar beet production (Annes et al., 2010) and drainage areas in beer-making plants (Yi et al., 2008).

Some species of *Trichoderma* have been used for the production of commercial enzymes, the most common of which being cellulases, hemicellulases, proteases and β -1,3-glucanases (Verma et al., 2007). *Trichoderma reesei* mutants strains are most commonly used to produce cellulases and hemicellulases for enzymatic hydrolysis (Juhász et al., 2005). *Trichoderma viride* is a potential producer of many glucanolytic enzymes, including β -1,3- and β -1,6-glucanases (Nobe et al., 2003). This genus has also been evaluated as a biological control (John et al., 2010).

Through the use of different carbon sources, β -1,3-glucanases can be produced by many different strains of *Trichoderma*, including *Trichoderma harzianum* (Vázquez-Garcidueñas et al. 1998; Giese et al., 2011), *Trichoderma asperellum* (Marcello et al. 2010), *Trichoderma konningi* (Monteiro & Ulhoa, 2006), *Trichoderma viride* (Kulminskaya et al. 2001), and it can be produced when it is cultivated in the cell wall material of *Saccharomyces cerevisiae* (Vázquez-Garcidueñas et al. 1998), starch, in the purified cell wall from *Rizoctonia solani*, chitin and chitosan (Marcello et al. 2010), cellulose (Monteiro & Ulhoa, 2006), mono- and polysaccharides (Giese et al., 2005; Giese et al., 2011) and from wheat bran (Kulminskaya et al. 2001).

Different carbon sources are incorporated into the medium, and the production of β -1,3-glucanase can also be affected by certain fermentation parameters, such as agitation, pH, temperature (Fleuri & Sato, 2008), and aeration (Jayus, McDougall & Seviour, 2002). Additionally, the production of microbial enzymes can be affected by moisture, the incubation period, and the fermentation process. These parameters may reflect on the enzymes' properties. Jayus, McDougall & Seviour, (2004) found multiple forms of β -1,3-glucanases

produced by the fungus *Acremonium* sp. IMI 383068, which exhibited the same biochemical characteristics for molecular mass, pH and optimum temperature.

The compounds that are most commonly used to determine β -1,3-glucanase activity obtained from different microorganisms are 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), which was reported by Miller (1959) and cuproarsenate, which was reported by Nelson (1944) and Somogyi (1945). Through the use of DNS, Ramada et al. (2010) determined β -1,3-glucanase activity from different strains of *Trichoderma* based on the quantity of reducing sugars released from laminarin. According to Breuil & Saddler (1984), DNS is not as sensitive as sodium arsenite, which can detect even small concentrations of sugars.

Response surface methodology (RSM) is an empirical modeling technique used to estimate the relationship between a set of controllable experimental factors and observed results. It is currently one of the most popular optimization techniques in the field of biotechnology because of its simplicity, comprehensive theory, and reasonably high efficiency. The most common experimental design used in RSM is the central composite design (CCD), which has equal predictability in all directions from the center (Gao, Ju & Jiang, 2006).

RSM has been used by Giese et al. (2005), Donzelli, Siebert & Harman (2005), and Théodore & Panda (1995) in cultures of *T. harzianum* in order to optimize β -1,3-glucanase production in submerged fermentations. This technique was also used to optimize pH and temperature in order to stabilize β -1,3-glucanase (Rana et al., 2003). Additionally, it was used to optimize β -1,3-glucanase activity in *Trichoderma asperellum* through the micro-assays method (Ramada et al., 2010). It allows for a reduction in the number of experiments without neglecting the interaction between the parameters (Cavalitto & Mignone, 2007).

Enzymatic hydrolysis of β -glucans by specific β -glucanases may aid in the structural and rheological characterization of these polymers. It can also contribute to the development of substances with pharmacological properties or with higher biological activity (Giese et al., 2003). The gentiooligosaccharides were shown to exhibit bifidogenic activity (Rycroft et al., 2001; Sanz et al., 2006), whereas the laminarioligosaccharides, along with stimulating proliferation of bifidobacteria in the cecum (the first portion of the large intestine), were shown to exhibit biological activity.

In an attempt to find new microorganisms to produce β -1,3-glucanases that would possess higher enzyme activity with the potential for enzymatic hydrolysis, this study aimed to optimize the production of β -glucanases by *Trichoderma reesei* QM 9414 using *A. blazei* as a substrate. RSM was used to achieve optimization of production, with cultivation time (x_1 , days) and substrate concentration (x_2 , g l⁻¹) as parameters. Additionally, the enzyme produced

under optimized conditions was characterized by its pH and temperature of activity, and it was used in the hydrolysis of laminarin and β -glucans that were extracted from *A. blazei*. The products were analyzed using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC/PAD).

2. Materials and methods

2.1. The Mushroom

The dried *Agaricus blazei* fruiting bodies were purchased from the Commerce of Natural Products Ltd, Uruguaiana, Brazil. According to the manufacturer, the composition of 100 g (dry weight) was: 44.4% carbohydrates; 33.3% protein; 33.3% dietary fiber; 6 mg sodium; 22 mg phosphor; 0.21 mg copper; 0.28 mg iron; and 0.14 mg zinc. Dried material utilized in β -1,3-glucanase production was ground and sieved until a homogenous particle size was obtained. The sieve used was a voile cloth sieve.

2.2. Microorganism and optimization of β -1,3-glucanase production

The fungus *Trichoderma reesei* QM 9414, obtained from the culture collection at the André Tosello Foundation (Campinas, Sao Paulo, Brazil), was maintained at room temperature in slants of xylose-agar incorporating Vogel minimal salts medium (VMSM). Before each experiment, the microorganism was transferred to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of xylose-agar-VMSM and incubated at 28 °C for 5 days. Fermentation was carried out in 125 ml Erlenmeyer flasks, containing 25 ml of a VMSM medium reported by Vogel (1956) and *A. blazei* as the sole carbon source. Each flask was inoculated with a suspension containing 10^7 spores, and was kept under constant agitation at 180 rpm at 28°C. The effects of the carbon source and the cultivation time on β -1,3-glucanase production by *T. reesei* were used as variables in the experimental design presented in Section 2.3.

2.3. Factorial design and statistical analysis

The concentration of *A. blazei* and the cultivation time for β -glucanase production by *T. reesei* were optimized using RSM through a 2^2 -factorial central-composite experimental design (STATISTICA software version 6.0) with five repetitions at the central point, totaling 13 experiments, which were each performed twice (Table 1). The design was chosen according to the growth profile obtained before optimization. The independent variables studied for β -glucanase production ($Y_1 = U \text{ ml}^{-1}$) were $x_1 =$ cultivation time (in days) and $x_2 =$ *A. blazei* concentration (g l^{-1}). Variance analyses (ANOVA) and multiple regression analyses

were also performed using the STATISTICA software version 6.0 (www.statsoft.com), StatSoft Inc., 2001.

2.4. Analytical Methods

β -1,3-glucanase activity was measured by quantifying the reducing sugars that were liberated after the hydrolysis of laminarin (β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucan produced by the algae *Laminaria digitata*, Sigma). The final assay volume was 0.5 ml, which was made up of 0.35 ml of laminarin (4 mg ml⁻¹) in a 25 mM sodium acetate buffer at pH 5.0 and 0.1 ml of crude enzyme. The assay was carried out at 50 °C and was stopped after 10 minutes with 50 μ L of 1.0 M NaOH. The method of Somogyi (1945) and Nelson (1944) was used to quantify reducing sugars. One unit of enzymatic activity was defined as the number of μ moles of reducing sugars released per minute per ml of enzyme extract. Glucose was used for the standard curve. The concentration of proteins present in the crude enzyme was determined through the Hartree-Lowry method (1972), with bovine serum albumin (BSA) used as a standard.

2.5. Partial Purification of β -1,3-glucanase

The concentrated β -glucanase was analyzed using gel filtration chromatography on a Sephadex G-100 in an open column, with the equilibrium distributed using a 50 mM acetate buffer at pH 5.5 and containing 50 mM of NaCl. Elution was carried out in the same buffer at a flow rate of 0.3 ml min⁻¹ at room temperature, and 4.5 ml fractions were collected using a fraction collector (Gilson). The proteins found in each fraction were monitored during their absorption at 280 nm using spectrophotometry. The active β -1,3-glucanases fractions were concentrated using Centricon® (amicon bioseparations, Millipore, Beldford, MA, USA).

2.6. Effect of pH and temperature on crude and partially purified β -1,3-glucanase

To find optimum pH, activity was determined at 50°C at different pH values by incubating the enzyme and laminarin 0.2% (w v⁻¹) in the following 0.1 M buffer solutions: acetate (pH 3.0-5.5) and sodium phosphate (pH 6.0-8.0). To find optimum temperature, activity was assayed by incubating the reaction mixture at different temperatures ranging between 25 and 75 °C at the optimum pH.

To calculate pH stability, the enzyme was diluted (1:1) in the following buffer solutions: acetate (pH 3.0-5.5) and sodium phosphate (pH 6.0-8.0) without the substrate, and was maintained at 25 °C for 24 h. After this incubation period, residual β -1,3-glucanase

activity was quantified at optimum pH and temperature conditions. To calculate thermostability, the enzyme was incubated without the substrate at different temperatures ranging between 25 and 75°C, for 1 h. After this incubation period, residual β -1,3-glucanase activity was quantified at optimum pH and temperature conditions. Maximum activity was defined as 100%.

2.7. Extraction of glucans from *Agaricus blazei*

β -glucans from *Agaricus blazei* were extracted following the methodology of Mizuno et al., (1990), with some modifications made by Camelini et al. (2005). The dried *Agaricus blazei* fruiting bodies (20 g) were macerated with 120 ml of 85% ethanol (v/v), agitated in a magnetic agitator and vacuum-filtered. The residue was mixed with 350 ml of 85% ethanol (v/v) heated at 80 °C for 3 h and vacuum-filtered, separating and discarding the liquid phase. This procedure was carried out 3 consecutive times. This residue was mixed with 350 ml of distilled water, heated at 100 °C for 3 h, and vacuum-filtered. This step was repeated 3 times. The 3 aqueous fractions obtained were each mixed in 4 volumes of 95% ethanol (v/v) and left to precipitate overnight at 4°C. Each liquid fraction was collected and concentrated in a rotary evaporator. The volume of concentrated liquid after combining the 3 fractions was dialyzed in a 12.000 kDa cutoff cellulose membrane for 3 days, with a daily exchange of distilled water. This fraction was then freeze dried and weighed for enzymatic hydrolysis applications.

2.8. Enzymatic hydrolysis of laminarin and β -glucan from *Agaricus blazei*

The hydrolyses of polysaccharides laminarin and β -glucan from *Agaricus blazei* was carried out in 100 ml Erlenmeyer flasks containing 1.0 g l⁻¹ of the substrate, which was hydrolyzed by β -1,3-glucanase 4U obtained from *Trichoderma reesei* in acetate buffer 0.1 M, with pH 4.5 and with a final volume of 10 ml. This mixture was incubated and agitated at 40 °C in the case of crude β -1,3-glucanase and at 45 °C in the case of partially purified β -1,3-glucanase. Sample aliquots (1 ml) were taken at various intervals (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 and 60 min) and were heated for 10 min at 100 °C in order to inactivate the enzymes. The glucan hydrolysates were centrifuged at 7000 g for 5 min. The products from hydrolysis were analyzed following the method of Somogyi (1945) and Nelson (1944), and total sugars were analyzed using the phenol-sulfuric method described by Dubois (1956), which uses glucose as standard.

2.9. HPAEC/PAD analysis of enzyme hydrolysis products

The hydrolysates were precipitated with ethanol, and were then centrifuged, evaporated and dissolved in 0.4 ml of distilled water. Total sugars were analyzed using the phenol-sulfuric method described by Fox & Robyt (1991). The samples of 60 minutes were filtered (0.22- μm membrane) and injected (20 μl sample loop) into the HPAEC-PAD system (ICS 3000, Dionex Corporation, EUA) equipped with automatic sampler AS40. The standard quadruple potential waveform was employed with the following periods and pulse potentials: $E_1 = 0.10 \text{ V}$ ($t_1 = 0.40 \text{ s}$); $E_2 = -2.00 \text{ V}$ ($t_2 = 0.02 \text{ s}$); $E_3 = 0.60 \text{ V}$ ($t_3 = 0.01 \text{ s}$); $E_4 = 0.10 \text{ V}$ ($t_4 = 0.06$). All eluents were prepared with ultrapure water (18 $\text{m}\Omega\cdot\text{cm}$) with N_2 sparging. The oligosaccharides were separated using a sodium acetate gradient in a analytical column CarboPac PA 100 (4 x 250 mm) at a flow rate of 1.0 ml min^{-1} at 40 $^\circ\text{C}$. Elution conditions were determined by Giese et al. (2006) using eluents: (A) 500 mM of sodium acetate and (B) 100 mM NaOH. The first isocratic phase was 15 min in 97% of A and 3% of B, followed by a linear gradient from 100% of B and 50% of A and 50% of B over the course of 70 min. Sugar was identified and quantified according to standards of glucose, gentiobiose, cellobiose, cellotriose, cellotetraose, laminaritriose and laminaritetraose, purchased from Sigma-Aldrich. The data was analyzed using the Chromeleon software, version 6.8 (Dionex Corporation, USA). The analysis was performed twice.

3. Results and discussion

3.1. Study of the effect of carbon source and cultivation time on β -1,3-glucanase production by *Trichoderma reesei*

Through multiple regression analysis of the experimental data, a second order polynomial equation was obtained for β -1,3-glucanase production by *T. reesei* (Equation 1).

$$\hat{Y}_1 = 3,310690 + 1,855000 x_2 \quad (1)$$

Linear terms of the x_1 variable, and quadratic terms of the x_1 and x_2 variables were discarded as being non-significant. According to the results presented in Table 2, the intercept was significant, which indicates that the central point (5 days of cultivation and *A. blazei* concentration of 2 g l^{-1}) was an appropriate choice.

According to a Pareto chart (data not shown), the most important variable for β -1,3-glucanase production by *T. reesei* was the concentration of *A. blazei*. The variance analysis for the response surface of Equation 1 (Table 3) showed that regression was significant ($p < 0.05$) and the lack-of-fit was not significant, which indicates that the model can be used for predictive purposes.

The experimental results and predictive activities for β -1,3-glucanase production by *T. reesei* using Equation 1 are presented in Table 4. Highest β -1,3-glucanase activity (4.36 U ml⁻¹) was observed on the fifth day of cultivation and with an *A. blazei* concentration of 3 g l⁻¹. In similar studies, Giese et al., (2005) found highest β -1,3-glucanase activity (1.2 U ml⁻¹) from *T. harzianum* Rifai using the exopolysaccharide botryosphaeran 1.5 g l⁻¹, which contains β -(1 \rightarrow 3) and β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan bonds as the sole carbon source, after 5 days of cultivation using response surface methodology. Their results suggest that β -1,3-glucanase production depends on the concentration of exopolysaccharide.

Based on the R^2 value, it is clear that 66% of the response variability can be explained either by the model or by experimental factors and their interactions. The low pure error indicates good reproducibility of the experimental data. Response surface methodology was also used by Donzelli, Siebert & Harman (2005) and Theódore & Panda (1995) to optimize β -1,3-glucanase production by *Trichoderma* species in submerged fermentation using different β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-D-glucans as carbon sources. According to the results of our study, it was possible to achieve maximum β -1,3-glucanase production by *T. reesei* after 5 days of cultivation and at 3 g l⁻¹ of *A. blazei* (Figure 1).

There are few studies found in the literature on the optimization of β -1,3-glucanase production by fungi that use response surface methodology. However, bacteria have been used for the production of β -glucanases using this type of statistical model. Fleury & Sato (2008) optimized cultivation conditions such as pH, temperature and agitation for the production of β -1,3-glucanase by *Cellulosimicrobium cellulans* 191, using cell wall material from *Saccharomyces cerevisiae*. When Tang et al. (2004) optimized the composition of the medium for the production of β -1,3,1,4-glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5, the best carbon sources were the polysaccharides barley flour, dextrin, and soluble starch when the results were compared to those of monosaccharides, such as glucose, and disaccharides, such as maltose.

The influence of different carbon sources on β -1,3-glucanase production has been widely studied, especially in the case of the *Trichoderma* species. Among these carbon sources, the ones most used are chitin (Sharma, Mishra & Misra, 2009; De Marco, Valadares-Inglis & Felix, 2003) pustulan (De la Cruz et al., 1993), laminarin (Kaur et al., 2005) and fungal cell walls (Marcello et al., 2010). Monteiro & Ulhoa (2006) and Noronha et al. (2000) suggested that the induction of β -1,3-glucanases was influenced by the substrate containing β -glucan. According to Vázquez-Garcidueñas et al. (1998), laminarin was the best carbon source for β -1,3-glucanase production by *Trichoderma harzianum*, results which suggest that enzyme induction may vary as an answer to the structure of glucan, and that its induction

depends on the type of glycosidic bond. In addition to induction by the substrate, enzyme regulation may be due to catabolic repression (De la Cruz et al., 1993).

3.2. Partial purification of β -1,3-glucanase

A summary of the results of the partial purification process is shown in Table 5. β -1,3-glucanase was shown to have a final yield of 27.8 % at a purification factor of 95.5 times (Table 5). The gel filtration profile as a single peak was shown in Figure 2. Partially purified β -1,3-glucanase was used to avoid the presence of other enzymes, such as enzymes from glucanolytic complexes, which can interfere in the acquisition of the hydrolysis products of interest.

3.3. Effect of pH and temperature on crude and partially purified β -1,3-glucanase activity

Different β -1,3-glucanase profiles were observed in each isolate of *Trichoderma harzianum* when glucose was used as a carbon source (Ramot, Cohen-Kupiec & Chet, 2000). Enzyme activity and stability may be affected by temperature and pH, as well as by the presence of inhibitors or activators. Among these parameters, pH and temperature are the ones that most affect enzyme stability (Rana et al., 2003).

The effect of pH and temperature on β -1,3-glucanase activity was analyzed under optimized conditions. In the case of the β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma reesei*, the optimum pH was between 3.5 and 5.0, and the optimum temperature was 60 °C. The enzyme exhibited stability in a pH range of 3.5 to 5.0, and maintained 80% of its activity after 1 h at 40 °C. The optimum pH for partially purified *T. reesei* enzyme was found to be at between 4.5 and 5.5, and the optimum temperature was found to be 55 °C. These values are similar to those found for the crude enzyme. All other characteristics were different than those found in the assays with crude enzymes. The partially purified enzyme of *T. reesei* showed to be stable at a pH between 4.5 and 6.5, and it maintained 145 % of its activity after 1 h at 45 °C.

These results were similar to those found for the β -1,3-glucanase purified from *Trichoderma viride*, which presented its highest activity at a pH of 4.5 and at 55°C. In the case of *Trichoderma viride*, the enzyme maintained stability at a pH between 3.5 and 7.5, and it lost stability above 60 °C (Kulminskaya et al., 2001). The optimum pH for β -1,3-glucanases produced by different species of *Trichoderma* generally ranges between 4.5 and 5.0, and the optimum temperature is generally 50 °C (Noronha & Ulhoa, 2000; Monteiro & Ulhoa, 2006; Yi et al., 2008). However, variations in optimum temperature, such as one experiment that resulted in 40 °C, were observed for β -1,3-glucanases from *Rhizoctonia solani* (Vijayendra &

Kashiwagi, 2009) and for marine animals (Zhu et al., 2008). Another variation at 60 °C was reported for *Trichoderma harzianum* (Ramot, Cohen-Kupiec, Chet, 2000).

3.4. Enzymatic hydrolysis and HPAEC/PAD analysis of enzymatic hydrolysis products

The hydrolytic potential of β -1,3-glucanase was evaluated for laminarin and also for glucan extracted from *Agaricus blazei*. The crude enzyme obtained from *Trichoderma reesei* resulted in approximately 48% laminarin hydrolysis and 7.6% glucan hydrolysis after 60 min. However, the partially purified enzyme from *T. reesei* hydrolyzed 85% of the laminarin and 2.6% of the glucan after 60 min. HPAEC/PAD analysis revealed differences in the hydrolysis products from glucans and laminarin using the crude and partial purified enzyme (Figure 3 and 4). Glucose was the main hydrolysis product from glucan and laminarin. However, important oligosaccharides were detected in enzymatic hydrolysates of both crude and partial purified β -1,3-glucanase, which suggests the presence of gentiobiose in the laminarin and glucan hydrolysates. Laminaritetraose, laminaritriose and cellobiose were also identified and quantified in laminarin hydrolysates using the crude enzyme, while laminaritriose and cellotriose were identified and quantified using the partially purified enzyme after 60 min. The data is shown in Tables 6 and 7.

Giese et al. (2006) reported the production of glucose, gentiobiose, laminaribiose and lower quantities of gluco-oligosaccharides with degree of polymerization between 3-4 by the action of crude β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai on laminarin and botryosphaeran (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucan), after 60 min. Using a partially-fractioned enzymes, ~70 % of laminarin had been hydrolysed at the stage of 30 min hydrolysis, represented a conversion into glucose of 15 % and oligosaccharides presenting DP \geq 4 (Giese et al., 2009).

Gentiobiose was also observed by Kulminskaya et al. (2001) during laminarin hydrolysis. These authors also reported findings of glucose during the hydrolysis of β -1,3-oligoglycosidics from purified β -1,3-glucanase from *Trichoderma viride* AZ36. Kim et al. (2005) found di- and trisaccharides as being the main products in the hydrolysates of β -glucans from *Agaricus blazei* by the action of endo β -(1,6)-glucanase from commercial *Bacillus megaterium*, with both enzyme and glucans purified.

Curdlan (β -1,3-glucan) was also hydrolyzed by the crude enzymatic extract of β -1,3-glucanase obtained from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. After 20 h, approximately 90% of this polysaccharide was hydrolyzed (Grandpierre et al. 2008). Vijayendra & Kashiwagi (2009) found only glucose in the hydrolysate of curdlan powder after 60 min of hydrolysis when using exo- β -1,3-glucanase purified from *Rhizoctonia solani*. In their laminarin hydrolysate, glucose and laminaribiose were found after overnight incubation.

The mechanism of action of β -1,3-glucans is still not completely understood. It is believed to be attributed to certain factors, including molecular structure, molecular mass, types of glycosidic bonds and residues present, as well as to space conformation (Freimund et al. 2003).

Both the scientific information obtained in this study and its contribution to the development of an enzyme hydrolysis process that is viable for obtaining gluco-oligosaccharides will ideally give value to our research. Today, these oligosaccharides are being studied in order to verify their role as prebiotics and nutraceutical products for biotechnological applications.

4. Conclusion

T. reesei grew on *A. blazei* as a substrate and produced β -1,3 glucanases. Response surface methodology analysis showed that the highest β -1,3-glucanases production by *T. reesei* occurred after 5 days using 3 g l⁻¹ of the substrate. The advantage of using this analysis is that it allows for a reduction in time and materials, which minimizes possible and common errors in traditional techniques. Both the crude enzyme and the partially purified enzyme exhibited optimum activity at a wide range of pH levels. The crude enzyme was at optimum activity between pH 3.5 and 5.0 and at 60 °C, and the partially purified enzyme was at optimum activity between pH 4.5 and 5.5 at 55 °C. The crude enzyme was stable at 40 °C, while the partially purified enzyme was at 45 °C, and both proved to be stable at acidic pH levels. The physical-chemical properties of an enzyme must be known to be able to understand its behavior, and understanding this behavior makes the definition of operational conditions for biotechnological processes possible. Different oligosaccharides were produced, and those that were most commonly found were gentiobiose, laminaritriose and laminaritetraose. The differences in obtaining oligosaccharides from laminarin and glucan hydrolysis may likely be explained by the differences in the degrees of polymerization, conformation and ramification of each polysaccharide.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Sao Paulo Foundation for Research Support (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP) for their financial investment in our study.

References

- Anees M, Tronsmo A, Edel-Hermann V, Hjeljord LG, Héraud C, Steinberg C. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal biology* 2010;114:691-701.
- Breuil C, Saddler JN. Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. *Enzyme and Microb. Technol* 1985;7:327-332.
- Camelini CM, Maraschin M, Mendonça AMM, Zucco C, Ferreira AG, Tavares LA. Structural characterization of β -glucans of *Agaricus brasiliensis* in different stages of fruiting body maturity and their use in nutraceutical products. *Biotechnology Letters* 2005;27:1295-1299.
- Carbonero ER, Gracher AHP, Smiderle FR, Rosado FR, Sasaki GL, Gorin PJ, et al. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydrate Polymers* 2006;66:252-257.
- Cavalitto SF, Mignone CF. Application of factorial and Doehlert designs for optimization of protopectinase production by a *Geotrichum klebahnii* strain. *Process Biochemistry* 2007;42:175-179.
- De la Cruz J, Rey M, Lora JM, Hidalgo-Gallego A, Domínguez F, Pintor-Toro JA, et al. Carbon source control on β -glucanases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Archives of Microbiology* 1993;59:316-322.
- De Marco JL, Valadares-Inglis MC, Felix CR. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. *Brazilian Journal of Microbiology* 2003; 34: 33-38.
- Donzelli BGG, Siebert KJ, Harman GE. Response surface modeling of factors influencing the production of chitinolytic and β -1,3-glucanolytic enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Enzyme and Microbial Technology* 2005;37: 82-92.

- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith, F. Colorimetric method for determination sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 1956;28:350-356.
- Fan L, Soccol AT, Pandey A, Soccol CR. Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie* 2007;40:30-35.
- Fleuri LF, Sato HH. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2005;28:871-879.
- Fleuri LF, Sato HH. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2008;28:299-310.
- Fox JD, Robyt JF. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Analytical Biochemistry* 1991;195:93-96.
- Freimund S, Sauter M, Käppeli O, Dutler H. A new now-degrading isolation process for 1,3 β -D-glucan of high purity from Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Carbohydrate Polymers* 2003;54:159-171.
- Gao Y-L, Ju X-R, Jiang H-H. Use of response surface methodology to investigate the effect of food constituents on *Staphylococcus aureus* inactivation by high pressure and mild heat. *Process Biochemistry* 2006;41:362-369.
- Genta FA, Bragatto I, Terra WR, Ferreira C. Purification, characterization and sequencing of the major β -1,3-glucanase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2009;39:861-874.
- Giese EC, Barbosa AM, Corradi Da Silva ML. Glucanases fúngicas: Produção e aplicações das β -1,3 e β -1,6 glucanases. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 2003;30:97-104.
- Giese EC, Covizzi LG, Borsato D, Dekker RFH, Corradi Da Silva ML, Barbosa AM. Botryosphaeran, a new substrate for the production of β -1,3-glucanases by

Botryosphaeria rhodina and *Trichoderma harzianum* Rifai. *Process Biochemistry* 2005;40:3783-3788.

Giese EC, Covizzi LG, Borsato D, Dekker RFH, Monteiro NK, Corradi Da Silva ML, Barbosa AM. Enzymatic hydrolysis of botryosphaeran and laminarin by β -1,3-glucanases produced by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. *Process Biochemistry* 2006;41:1265-1271.

Giese EC, Monteiro AC, Barbosa AM, Dekker RFH, Santos Jr O, Corradi da Silva ML, Gomes E, Da Silva R. Evaluation of the β -glucanolytic enzyme complex of *Trichoderma harzianum* Rifai for the production of gluco-oligosaccharide fragments by enzymatic hydrolysis of 1,3;1,6- β -D-glucans. In: *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1, p. 438-441, 2009.

Giese EC, Dekker RFH, Scarminio IS, Barbosa AM, Da Silva R. Comparison of β -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical mixture-design. *Biochemical Engineering Journal* 2011;53:239-243.

Gonzaga MLC, Ricardo NMPS, Heatley F, Soares SA. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murril. *Carbohydrate Polymers* 2005;60:43-49.

Grandpierre C, Janssen H-G, Laroche C, Michaud P, Warrand J. Enzymatic and chemical degradation of curdlan targeting the production of β -(1; 3) oligoglucans. *Carbohydrate Polymers* 2008;71:277-286.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet IL, Lorito M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. Review. *Nature Review/Microbiology* 2004;2:43-46.

Hartree EF. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem* 1972;48:422-427.

- Jayus, McDougall BM, Seviour RJ. Factors affecting the synthesis of (1→3) and (1→6)- β -glucanases by the fungus *Acremonium* sp. IMI 383068 grown in batch culture. *Enzyme and Microbial Technology* 2002; 31:289-299.
- Jayus, McDougall BM, Seviour RJ. Purification and characterization of the (1→3)- β -glucanases from *Acremonium* sp. IMI 383068. *FEMS Microbiology Letters* 2004;230:259-264.
- John RP, Tyagi RD, Prévost D, Brar SK, Pouleur S, Surampalli RY. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection* 2010;29:1452-1459.
- Juhász T, Szengyel Z, Réczey K, Siika-Aho M, Viikari L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry* 2005;40:3519-3525.
- Kalač P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry* 2009;113:9-16.
- Kaur J, Munshi GD, Singh RS, Koch E. Effect of carbon source on production of lytic enzymes by the sclerotial parasites *Trichoderma atroviride* and *Coniothyrium minitans*. *Journal of Phytopathology* 2005;153:274-279.
- Kim Y-W, Kim Ki-H, Choi H-J, Lee D-S. Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnology Letters* 2005;27:483-487.
- Kulminskaya AA, Thomsen KK, Shabalin KA, Sidorenko IA, Eneyskaya EV, Savel'ev AN, et al. Isolation, enzymatic properties, and mode action of an exo-1,3- β -glucanase from *Trichoderma viride*. *European Journal of Biochemistry* 2001;268:6123-6131.
- Lee IP, Kang BH, Roh JK, Kim JR. Lack of carcinogenicity of lyophilized *Agaricus blazei* Murill in a F344 rat two year bioassay. *Food and Chemical Toxicology* 2008;46:87-95.

- Li H, Chen J, Li A, Li D-C. Purification and partial characterization of β -1,3-glucanase from *Chaetomium thermophilum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2007;23:1297-1303.
- Marcello CM, Steindorff AS, Da Silva SP, Silva RDN, Bataus LAM, Ulhoa CJ. Expression analysis of the exo-1,3- β -glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research* 2010;165, 75-81.
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem* 1959;31:426-428.
- Kim M-Y, Chung L-M, Lee S-J, Ahn J-K, Kim E-H, Kim M-J, et al. (2009). Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms. *Food Chemistry*. 113, 386-393.
- Mizuno T, Inagaki R, Kanao T, Hagiwara T, Nakamura T, Ito H, Shimura K, Sumiya T, Asakura, A. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from "Himematsutake," the fruiting body of *Agaricus blazei* murill. *Agricultural Biological Chemistry* 1990;54:2897-2905.
- Monteiro CS, Kalluf V, Penteado PTPS, Waszczyński N, Freitas RJS, Stertz SC. Caracterização química do cogumelo *Agaricus blazei* Murril, *Visão Acadêmica* 2005; 6:7-13.
- Monteiro VN, Ulhoa CJ. Biochemical characterization of a β -1,3-glucanase from *Trichoderma koningii* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. *Current Microbiology* 2006;52: 92-96.
- Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry* 1944;153:375-380.
- Nobe R, Sakakibara Y, Fukuda N, Yoshida N, Ogawa K, Suiko M. Purification and characterization of laminaran hydrolases from *Trichoderma viride*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2003;67:1349-1357.

- Noronha EF, Ulhoa CJ. Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiology Letters 2000;183:119-123.
- Noronha EF, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP, Ulhoa CJ. Regulation of 36-kDa β -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiology Letters 2000;188:19-22.
- Park YK, Ikegaki M, Alencar SM, Aguiar CL. Determinação da concentração de β -glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murill por método enzimático. Ciência e Tecnologia de Alimentos 2003;23:312-316.
- Pitson SM, Seviour RJ, McDougall BM. Noncellulytic fungal β -glucanase: their physiology and regulation. Enzyme and Microbial Technology 1993;15:178-192.
- Ramada MHS, Lopes FAC, Ulhoa CJ, Silva RdoN. Optimized microplate β -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. Journal of Microbiological Methods 2010;81:6-10.
- Ramot O, Cohen-Kupiec R, Chet I. Regulation of β -1,3-glucanase by carbon starvation in the mycoparasite *Trichoderma harzianum*. Mycological Research 2000;4:415-420.
- Rana DS, Théodore K, Naidu SN, Panda T. Stability and Kinetics of β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. Process Biochemistry 2003;39:149-155.
- Rycroft CE, Jones MR, Gibson GR, Rastall RA. Fermentation properties of gentio-oligosaccharides. Letters in Applied Microbiology 2001;32:156-161.
- Samuels GJ. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycol. Res 1996;100:923-935.
- Sanz ML, Côté GL, Gibson GR, Rastall RA. Selective fermentation of gentiobiose-derived oligosaccharides by human gut bacteria and influence of molecular weight. FEMS Microbiology Ecology 2006;56:383-388.

- Sharma K, Mishra AK, Misra RS. Morphological, Biochemical and Molecular Characterization of *Trichoderma harzianum* Isolates for their Efficacy as Biocontrol Agents. *Journal of Phytopathology* 2009;157:51-56.
- Somogyi M. A new reagent for determination of sugars. *The Journal of Biological Chemistry* 1945;160: 61-68.
- Tang X-J, He G-Q, Chen Q-H, Zhang X-Y, Ali MAM. Medium optimization for the production of thermal stable β -glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. *Bioresource Technology* 2004;93:175-181.
- 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* 1995;17:1043-1049.
- Vázquez-Garcidueñas S, Leal-Morales CA, Herrera-Estrella A. Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 1998;64:1442-1446.
- Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 2007;37:1-20.
- Vijayendra SVN, Kashiwagi Y. Characterization of a new acid stable exo- β -1,3-glucanase of *Rhizoctonia solani* and its action on microbial polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules* 2009;44: 92-97.
- Vogel, HJ. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microbial Genetic Bulletin* 1956;13:42-43.
- Yi H, Xiong S, Du M, Zhang L. Purification and partial characterization of β -glucanase produced by *Trichoderma viride* TP09 isolated from sewage of beer-making. *European Food Research and Technology* 2008;227:821-826.

Zhu B-W, Zhao J-G, Yang J-F, Mikiro T, Zhang Z-S, Zhou D-Y. Purification and partial characterization of a novel β -1,3-glucanase from the gut of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Process Biochemistry* 2008, 43:1102-1106.

Table 1: Statistical design of the experiments for two variables for *T. reesei*.

| Experiments | Time | [<i>A. blazei</i>] | |
|-------------|-----------|----------------------|----|
| | (x_1) | (x_2) | |
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | -1 | +1 | +1 |
| 3 | +1 | -1 | -1 |
| 4 | +1 | +1 | +1 |
| 5 | -1 | 0 | 0 |
| 6 | +1 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | -1 | -1 |
| 8 | 0 | +1 | +1 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 |

| Originals variables independent | Levels of variable | | |
|----------------------------------------------------------|--------------------|-----|-----|
| | -1 | 0 | +1 |
| x_1 , time of growth (days) | 3 | 5 | 7 |
| x_2 , <i>A. blazei</i> extract (g l ⁻¹) | 1.0 | 2.0 | 3.0 |

Table 2: Analysis of factors and their interaction on the production of β -1,3-glucanase by *T. reesei* cultivated in *A. blazei* extract.

| Factors | Coefficients | SD ^a | T | P |
|--------------|--------------|-----------------|----------|----------|
| Intercept | 3.310690 | 0.157887 | 20.86870 | 0.000000 |
| x_2 linear | 1.855000 | 0.310467 | 5.97487 | 0.000008 |

^a Standard deviation; x_2 = *A. blazei* concentration

Table 3: Variance analysis (ANOVA) for the production of β -1,3-glucanase by *T. reesei* using *A. blazei* extract as substrate.

| Variation of source | Sum of squares | Degrees of freedom | Mean square | F^a | p^b |
|---------------------|----------------|--------------------|-------------|----------|----------|
| Regression | 10.36275 | 2 | 5.181375 | 17.16450 | 0.000027 |
| Residues | 6.94291 | 23 | 0.301866 | | |
| Standard Error | 5.78338 | 20 | 0.28917 | | |
| Total | 17.30566 | 25 | | | |

^a F – relation (regression/residual); ^b p – relation (deviation of regression/error standard)

Table 4: Experimental and predictive values for β -1,3-glucanase production by *T. reesei* cultivated in *A. blazei* extract .

| Experiment | B-1,3-glucanase activity (U ml ⁻¹) | | |
|------------|------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | Experimental (Y ₁) | Average (Y ₁) | Predicted (Y ₁) |
| 1 | 2.16 | 1.78 | 1.97±0.2687 |
| 2 | 3.67 | 3.56 | 3.62±0.0778 |
| 3 | 2.35 | 1.43 | 1.89±0.6505 |
| 4 | 4.30 | 2.83 | 3.57±1.0394 |
| 5 | 3.17 | 2.76 | 2.97±0.2899 |
| 6 | 3.59 | 3.29 | 3.44±0.2121 |
| 7 | 2.60 | 1.35 | 1.98±0.8839 |
| 8 | 4.36 | 4.08 | 4.22±0.1980 |
| 9 | 3.53 | 3.81 | 3.67±0.1980 |
| 10 | 3.65 | 4.00 | 3.83±0.2475 |
| 11 | 3.87 | 2.91 | 3.39±0.6788 |
| 12 | 2.62 | 2.64 | 2.63±0.0141 |
| 13 | 3.00 | 2.71 | 2.86±0.2051 |

Table 5- Partial purification of the β -1,3-glucanase from *Trichoderma reesei*.

| Steps | Total volume (ml) | β -1,3-glucanase activity (U/ml ⁻¹) | Total activity (U) | Protein (mg/ml ⁻¹) | Total Protein (mg) | Specific activity (U/mg ⁻¹) | Yield (%) | Purification (fold) |
|------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------|-----------------------------------------|-----------|---------------------|
| Crude extract | 828 | 0.37 | 306.36 | 0.10 | 82.8 | 3.70 | 100 | 1 |
| Ultrafiltration Quixstand TM | 100 | 6.01 | 601 | 0.26 | 26 | 23.11 | 196.17 | 6.24 |
| Ultrafiltration Amicon | 8 | 63.13 | 505.04 | 1.33 | 10.64 | 47.47 | 164.97 | 12.83 |
| Sephadex G-100 | 20 | 4.26 | 85.2 | 0.012 | 0.24 | 355 | 27.81 | 95.95 |

Table 6: Analysis of enzymatic hydrolysates of glucan and laminarin using crude β -1,3-glucanase from *Trichoderma reesei*, after 60 minutes at incubation.

| Hydrolysis products of Laminarin and linkage type* | | Total sugars applied ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) | | |
|-------------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------|-------|
| | | 10 | 21.5 | |
| | | Hydrolysis products amount | | |
| | | | ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) | (%) |
| G1 | - | 1.54 \pm 0.05 | 3.26 | 15.45 |
| G2 | β -(1-6) | ND | 0.13 \pm 0.04 | 0.63 |
| C2 | β -(1-4) | ND | | ND |
| C3 | β -(1-4) | ND | | ND |
| C4 | β -(1-4) | ND | | ND |
| L3 | β -(1-3) | ND | | ND |
| L4 | β -(1-3) | ND | | ND |
| Total | | | | 16.03 |

| Hydrolysis products of Laminarin and linkage type* | | Total sugars applied ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) | | |
|-------------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------|-------|
| | | 10 | 100 | |
| | | Hydrolysis products amount | | |
| | | ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) | ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) | (%) |
| G1 | - | 2.36 \pm 0 | 23.6 | 23.62 |
| G2 | β -(1-6) | 0.27 \pm 0.01 | 2.7 | 2.70 |
| C2 | β -(1-4) | ND | ND | ND |
| C3 | β -(1-4) | ND | 0.47 \pm 0 | 0.47 |
| C4 | β -(1-4) | ND | ND | ND |
| L3 | β -(1-3) | ND | 4.69 \pm 0.01 | 4.69 |
| L4 | β -(1-3) | ND | 10.0 \pm 0.30 | 10 |
| Total | | | | 41.48 |

*G¹, glucose; G², gentiobiose; C², cellobiose; C³, cellotriose; C⁴, cellotetraose; L³, laminaritriose; L⁴ laminaritetraose; ND, not detected.

Table 7: Analysis of enzymatic hydrolysates of glucan and laminarin using partially purified β -1,3-glucanase from *Trichoderma reesei*, after 60 minutes at incubation.

| Hydrolysis products of Laminarin and linkage type* | | Total sugars applied ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) | | |
|----------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------|--|------|
| | | 10 | | |
| | | Hydrolysis products amount ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) | | (%) |
| G1 | - | 0.51 \pm 0 | | 5.08 |
| G2 | β -(1-6) | 0.136 \pm 0 | | 1.36 |
| C2 | β -(1-4) | ND | | ND |
| C3 | β -(1-4) | ND | | ND |
| C4 | β -(1-4) | ND | | ND |
| L3 | β -(1-3) | ND | | ND |
| L4 | β -(1-3) | ND | | ND |
| Total | | | | 6.44 |

| Hydrolysis products of Laminarin and linkage type* | | Total sugars applied ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) | | |
|----------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------|-----------------|-------|
| | | 10 | 100 | |
| | | Hydrolysis products amount ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) | | (%) |
| G1 | - | 1.92 \pm 0,01 | 19.2 | 19.14 |
| G2 | β -(1-6) | 0.227 \pm 0 | 2.27 | 2.27 |
| C2 | β -(1-4) | ND | ND | ND |
| C3 | β -(1-4) | ND | 0.32 \pm 0.01 | 0.32 |
| C4 | β -(1-4) | ND | ND | ND |
| L3 | β -(1-3) | ND | 5.59 \pm 0.01 | 5.59 |
| L4 | β -(1-3) | ND | ND | ND |
| Total | | | | 27.32 |

*G¹, glucose; G², gentiobiose; C², cellobiose; C³, cellotriose; C⁴, cellotetraose; L³, laminaritriose; L⁴, laminaritetraose; ND, not detected.

Figure Captions

Figure 1: Response surface for β -1,3-glucanase production by *T. reesei* as a function of cultivation time (x_1) x *A. blazei* (x_2): Highest activity level was found after 5 days and at 3 g/L.

Figure 2: Elution profile of β -1,3-glucanase from *Trichoderma reesei* after gel filtration.

Figure 3: HPAEC/PAD analysis of hydrolysis products from glucan (a) and laminarin (b) using crude β -glucanase from *Trichoderma reesei* QM 9414, after 60 min of incubation.

Figure 4: HPAEC/PAD analysis of hydrolysis products from glucan (a) and laminarin (b) using partially purified β -glucanase from *Trichoderma reesei* QM 9414, after 60 min of incubation.

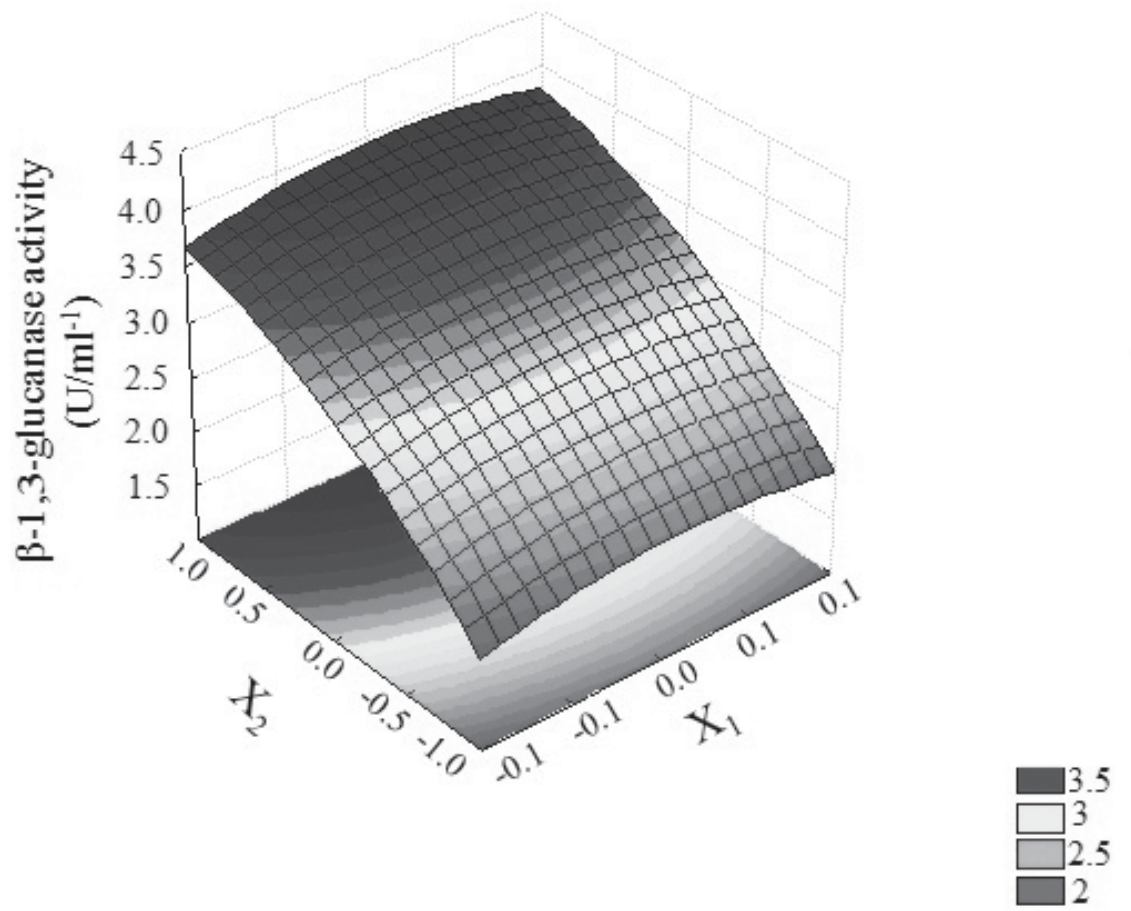


Figure 1

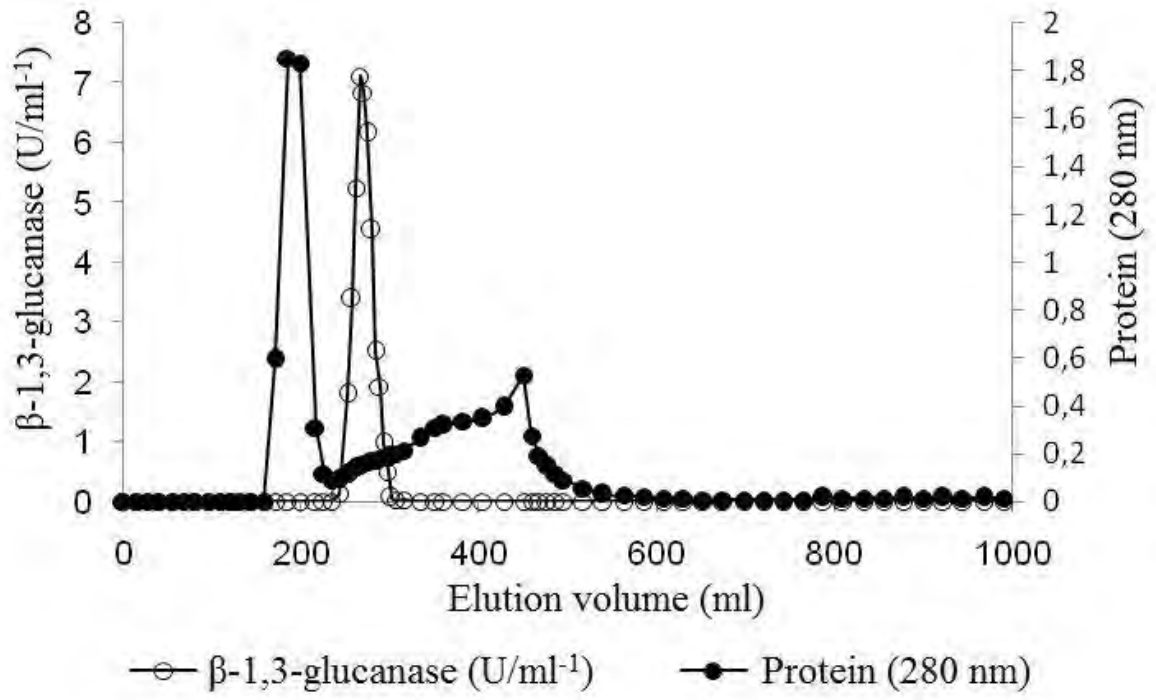


Figure 2

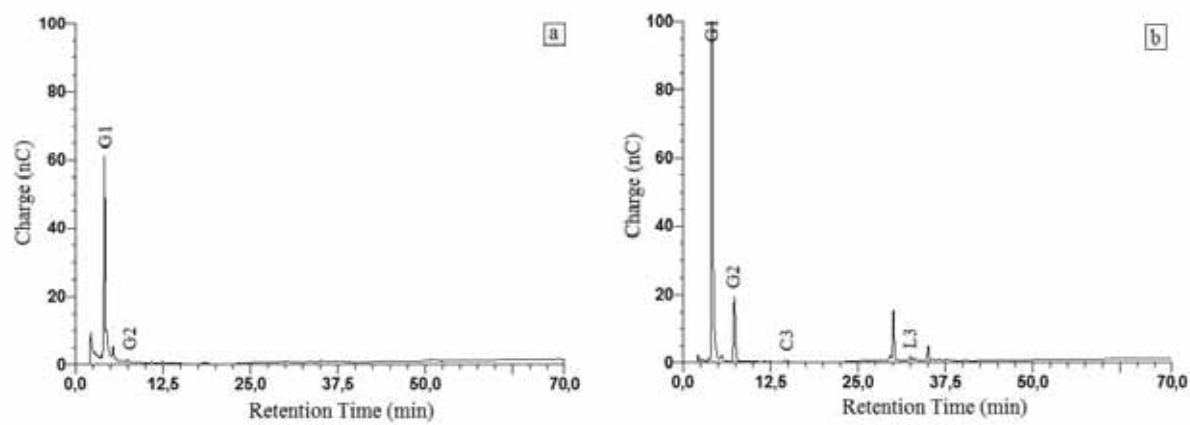


Figura 3a e 3b

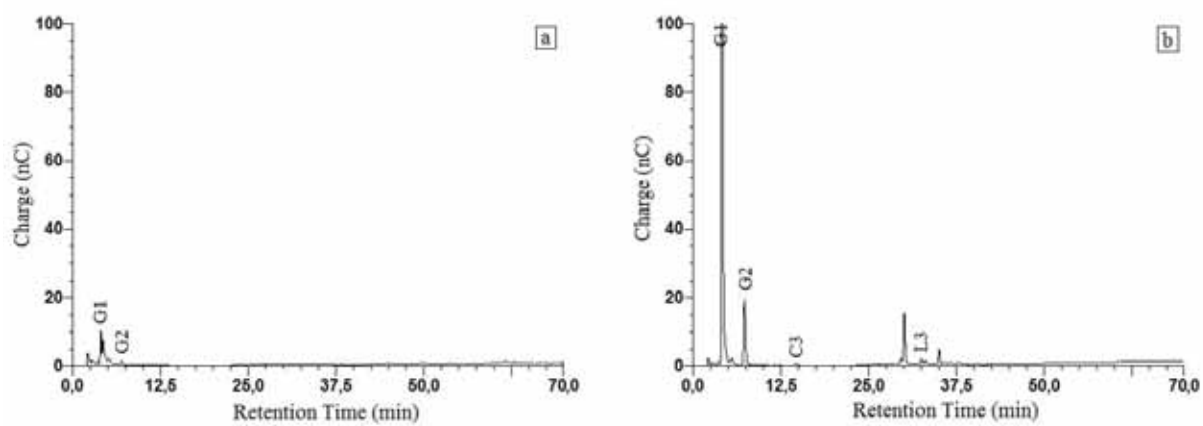


Figura 4a e 4b

ANEXO IV

CAPÍTULO IV

Contribuição nutricional e nutracêutica de formulações em pó de
Agaricus blazei e *Lentinus edodes*

**Contribuição nutricional e nutracêutica de formulações em pó de
Agaricus blazei e *Lentinus edodes***

Andreia A.J. Carneiro^{a,b,c}, Isabel C.F.R. Ferreira^{b,*}, Montserrat Dueñas^a, Lillian Barros^b,
Roberto da Silva^c, Eleni Gomes^c, Celestino Santos-Buelga^{a,*}

^a*Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP-USAL), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain*

^b*CIMO-ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal*

^c*Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, Brasil*

*Authors to whom correspondence should be addressed (e-mail: iferreira@ipb.pt, telephone +351273303219, fax +351273325405; e-mail: csb@usal.es; telephone +34 923 294537; fax +34 923 294

Resumo

A composição química revelou que o *Agaricus blazei* e o *Lentinus edodes* são fontes ricas em proteínas e hidratos de carbono, e contém reduzida quantidade de gorduras. A cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC/FID) permitiu a quantificação de vinte e seis ácidos graxos em *Agaricus blazei* e vinte e um em *Lentinus edodes*. Os principais ácidos graxos encontrados em ambos os cogumelos foram o ácido linoléico (C18:2n-6c), ácido palmítico (C16:0), ácido oléico (C18:1n-9), e o ácido linolênico (18:3n3). O Manitol e a trealose foram os açúcares detectados em ambos os cogumelos. A frutose também foi detectada em *Agaricus blazei*, e a arabinose em *Lentinus edodes*, por cromatografia líquida de alta resolução acoplada a um detector de índice de refração (HPLC/RI). Os fenóis totais, expressos como equivalentes de ácido gálico (GAE) foram 6,51 mg em *Agaricus blazei* e 3,59 mg em *Lentinus edodes*. O *Agaricus blazei* mostrou maior atividade antioxidante utilizando as técnicas de ABTS 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfônico), DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), FRAP (poder antioxidante de reduzir o ferro), Ferricianeto/Azul prussiano e inibição da descoloração do β -caroteno. O ácido fenólico detectado em ambos os cogumelos foi o ácido *p*-hidroxibenzóico e o composto relacionado, ácido cinâmico. Também foram detectados o ácido vanílico em *Lentinus edodes*, e o ácido trans-*p*-cumárico em *Agaricus blazei*, utilizando a técnica de HPLC-DAD-ESI/MS. Os tocoferóis foram identificados e quantificados por HPLC acoplada a um detector de fluorescência. α -Tocoferol foi encontrado em ambos os cogumelos, β -tocoferol em *Lentinus edodes* e γ -tocoferol em *Agaricus blazei*.

Palavras-chave: *Agaricus blazei*, *Lentinus edodes*, nutrientes, nutracêuticos, atividade antioxidante.

1. Introdução

Alimentos naturais com propriedades antioxidantes devem ser consumidos pela população no intuito de reduzir processos oxidativos, que podem ocasionar doenças específicas. De acordo com Alves et al. (2010), quando os antioxidantes presentes no organismo são insuficientes para combater os radicais livres gerados pelo próprio organismo, este sofre ações degenerativas conhecido como stress oxidativo.

Muitos estudos científicos estão sendo realizados com alimentos vegetais em busca de compostos com propriedades antioxidantes. Assim, diferentes espécies de cogumelos como *Leucopaxillus giganteus* (Barros et al., 2008a), *Boletus edulis*, *Calocybe gambosa*, *Cantharellus cibarius* (Barros et al., 2008b), *Agrocybe cylindracea* (Tsai et al., 2007) e *Agaricus blazei* (*Agaricus brasiliensis*) (Soares et al., 2009) têm sido estudadas.

A atividade antioxidante de *Agaricus blazei* foi avaliada por Tsai et al. (2007), utilizando os métodos FRAP (poder antioxidante de reduzir o ferro) e TEAC (capacidade antioxidante equivalente em trolóx). Foram ainda quantificados antioxidantes como ácido ascórbico, β -caroteno e tocoferóis.

Soares et al. (2009) também avaliaram a atividade antioxidante por diferentes métodos, alguns dos métodos utilizados foram a capacidade seqüestrante do radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) pelos antioxidantes presentes nas amostras e conseqüente conversão para 1,1-difenil-2-picril-hidrazina. Outro método utilizado foi a inibição da peroxidação lipídica pelo sistema β -caroteno-ácido linoléico. O radical livre do ácido linoléico ataca as ligações insaturadas do β -caroteno, e a presença de diferentes antioxidantes podem impedir a descoloração do β -caroteno neutralizando o radical livre linoleato e outros radicais livres no sistema. Deve, no entanto, ser realçado que os extratos de *Agaricus blazei* nos estudos de Soares et al. (2009) e Tsai et al. (2007) foram obtidos de maneira distinta, utilizando diferentes solventes de extração.

O método FRAP também foi utilizado para a avaliação da capacidade antioxidante total de cogumelos da Turquia (Orchan & Üstun, 2011). É baseado na redução do complexo tripiridiltriiazina férrico (Fe^{+3} -TPTZ) para a forma ferrosa (Fe^{+2} -TPTZ). O valor de TEAC é expresso como a capacidade de seqüestrar o radical ABTS 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfônico). Segundo Zulueta et al. (2009) a presença de compostos antioxidantes na amostra consiste na captura do radical livre, que reduz a intensidade da cor da reação, proporcional à concentração de antioxidante.

O efeito antioxidante de ácidos fenólicos (*p*-cumárico) tem sido demonstrado em estudos *in vitro* tais como a prevenção de radicais livres em células de córnea de coelhos (Lodovici et al., 2003) e *in vivo* na prevenção do stress oxidativo em coração de ratos causado pelo doxorubicina (Abdel-Wahab et al., 2003).

Embora estudos de atividade antioxidante de *Agaricus blazei* já tenham sido relatados, não há registros de determinação de compostos fenólicos nesta espécie utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-DAD-ESI/MS), uma técnica muito sensível, permitindo detecção e identificação dos compostos em baixos níveis.

A composição nutricional de *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes* (formulações em pó) foi determinada através da quantificação de gorduras totais, proteínas, cinzas e carboidratos. Foram também analisados moléculas com potencial nutracêutico como ácidos graxos, açúcares e tocoferóis identificados e quantificados por GLC/FID, HPLC/RI e HPLC/fluorescência, respectivamente. Foi avaliada a atividade antioxidante das mesmas espécies e determinada a sua composição em compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI/MS.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostras

A formulação em pó de *Agaricus blazei* (disponível em cápsulas) foi adquirida do comércio de Produtos naturais Ltd, Uruguaiana, Brasil. O *Lentinus edodes* foi adquirido de uma propriedade rural, São Paulo, Brasil.

2.2. Reagentes e Padrões

Acetonitrila 99,9 %, *n*-hexano 95 % e acetato de etil 99,8 % de grau HPLC obtidos Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). A mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) padrão de referência (padrão 47885-U) foi adquirida da Sigma (St. Louis, MO, USA), como também outros isômeros de ácidos graxos individuais, açúcares (D(-)-frutose, D(-)-manitol, D(+)-arabinose e D(+)-trealose), tocoferóis (α -, β -, γ -, e δ -isoformas), trolóx (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) e padrões fenólicos (ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, *p*-cumárico, vanílico e cinâmico). Butil hidroxitolueno (BHT) e tocol racémico, 50 mg/mL (padrão interno), foi adquirido da Matreya (PA, USA). 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido da Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). Todos os outros reagentes químicos e

solventes foram de grau analítico e adquiridos de fontes comuns. A água foi tratada em um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, USA).

As amostras foram analisadas para a composição química (proteínas, gorduras, carboidratos e cinzas) usando o procedimento da AOAC (AOAC, 1995). O conteúdo de proteína bruta ($N \times 4,38$) das amostras foi calculado pelo método macroKjeldahl; a gordura bruta foi determinada pela extração de uma massa conhecida da amostra em pó com éter de petróleo, usando um Soxhlet; o conteúdo de cinzas foi determinado pela incineração a 600 ± 15 °C. Os carboidratos totais foram calculados pela diferença: Carboidratos = $100 - (\text{proteína g} + \text{gordura g} + \text{cinza g})$. Energia foi calculada de acordo com a seguinte equação: Energia (kcal) = $4 \times (\text{g proteína} + \text{g carboidratos}) + 9 \times (\text{lipídeo g})$.

2.3.2. Açúcares livres

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência ligada a um detector de índice de refração (HPLC-RI), seguindo o procedimento descrito por Heleno et al. (2009). Portanto, adicionou-se 1 mL do padrão interno PI (rafinose, 5 mg/mL) à amostra em pó (1 g) e extraiu-se com 40 mL de etanol 80% a 80 °C durante 1 h e 30 min. Posteriormente, procedeu-se à filtração e evaporação do etanol (evaporador rotativo Büchi R-210). O sobrenadante foi lavado 3 vezes sucessivas com 10 mL de éter etílico. Após concentração a 40°C, o resíduo sólido foi dissolvido em água num volume final de 5 mL, filtrado através de um filtro de 0,22 µm, seguidamente transferido para um frasco âmbar e analisado. O volume de amostra injetado foi de 10 µL.

O equipamento de HPLC consistiu num sistema integrado com uma bomba (Knauer, Smartline 1000), sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), amostrador automático (AS-2057 Jasco) e um detector de RI (Knauer, Smartline 2300). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna NH₂ Eurospher 100-5 (4,6 x 250 mm, 5µm, Knauer) operando a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel foi água deionizada/acetoneitrila, 70:30 (v/v) com um fluxo de 1 mL/min. Os dados foram analisados utilizando o Software Clarity 2.4 (DataApex).

Os compostos foram identificados por comparação cromatográfica com padrões e a quantificação foi realizada usando o método do padrão interno. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

2.3.3. Ácidos graxos

Os ácidos graxos foram determinados por cromatografia gasosa através de um detector de ionização de chama (GC-FID), de acordo com o procedimento otimizado e implementado por Heleno et al. (2009), após um processo de transesterificação: os ácidos graxos foram metilados com 5 mL de metanol: ácido sulfúrico 95%: tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante pelo menos 12 h num banho a 50 °C e a 160 rpm; em seguida, adicionaram-se 3 mL de água deionizada para obter uma separação de fases. Recuperaram-se os FAME adicionando 3 mL de éter dietílico e agitando no vórtex. Fez-se passar o sobrenadante por uma microcoluna com sulfato de sódio anidro, com o objetivo de eliminar a água, e colocou-se a amostra em um frasco com Teflon. Antes da injeção, filtrou-se a amostra com um filtro de nylon da Milipore 0,2 µm.

O equipamento utilizado foi um GC DANI 1000 com um injetor *split/splitless*, um detector FID e uma coluna Macherey-Nagel (30 m × 0,32 mm ID × 0,25 µm *df*). A temperatura do FID foi de 260 °C. O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 50 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 30 °C/min até 125 °C, 5 °C/min até 160, 20 °C/min até 180 °C, 3 °C/min até 200 °C, 20 °C/min até 220 que foi mantida por 15 min. O gás de transporte (hidrogênio) tinha um caudal de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. Utilizou-se um modo de injeção *split* (1:40) a 250 °C. O volume de amostra injetado foi de 1 µL. A identificação dos ácidos graxos foi feita por comparação dos tempos de retenção relativos das amostras com os picos dos padrões de FAME. Os resultados foram processados usando o software CSW 1.7 (DataApex 1.7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido graxo.

2.4. Contribuição nutracêutica

2.4.1. Tocoferóis

A quantidade de tocoferóis presente nas amostras foi determinada seguindo um protocolo previamente descrito (Heleno et al., 2010).

Uma solução de BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) em hexano (10 mg/mL; 100 µL) e o padrão interno (PI) de tocol em hexano (50 µg/mL; 250 µL) foram adicionados às

amostras liofilizadas antes do procedimento de extração. As amostras, com uma massa aproximada de 500 mg, foram homogeneizadas com 4 mL de metanol em vórtex cerca de 1 min. Subsequentemente, adicionou-se 4 mL de hexano e homogeneizou-se novamente no vórtex (durante 1 min). De seguida, adicionou-se 2 mL de solução saturada de NaCl, homogeneizou-se a mistura durante 1 min, centrifugou-se (centrífuga refrigerada Centurion K24OR, 5 min, 6185 rpm) e transferiu-se, cuidadosamente, o sobrenadante para um frasco. A amostra foi extraída mais duas vezes com hexano. Os extratos foram levados à secura utilizando uma corrente de nitrogênio, dissolvidos em 1 mL de hexano, desidratados com sulfato de sódio anidro, filtrados através de um filtro (0,22 µm), transferidos para frascos âmbar e analisados por HPLC.

As análises foram realizadas pelo sistema de HPLC descrito anteriormente, conectado a um detector de fluorescência (FP-2020; Jasco), programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. A separação cromatográfica foi feita com uma coluna de poliamida II (250 × 4,6 mm) de fase normal (YMC Waters) a 30 °C. A fase móvel consistia de uma mistura de hexano e acetato de etila (70:30,v/v) com um fluxo de 1 mL/min e volume de amostra injetado foi de 20 µL.

Os compostos foram identificados através de comparação cromatográfica com padrões. A quantificação foi baseada na resposta do sinal fluorescente, usando o método do padrão interno. A quantidade de tocoferóis foi expressa em µg por 100 g de massa seca.

4.2. Compostos fenólicos

Agaricus blazei em pó (3 g) foi extraído em 30 mL de metanol:água (80:20, v/v), durante 30 min em sonicador. Posteriormente foi armazenado em congelador e após 6 h centrifugado a 5000 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi reservado para as análises de atividade antioxidante e purificação líquido-líquido, e o resíduo foi novamente submetido à extração. Esta etapa de extração foi realizada quatro vezes sucessivas. As amostras de *Agaricus blazei* foram extraídas em triplicata. Os extratos metanólicos foram evaporados a 35 °C, a 160 rpm para remoção do metanol. A fase aquosa foi submetida à extração líquido-líquido com éter etílico (3 x 30 mL) e acetato de etilo (3 x 30 mL). A fase orgânica foi evaporada a 35 °C, redissolvida em água:acetonitrila (80:20), centrifugada a 12000 g por 5 min a 18 °C, e filtrada em filtros de 0,5 µm para análises de HPLC-DAD-ESI/MS (Barros et al., 2009).

As soluções de extratos (1 mL) foram filtradas em filtros de 0,22 µm para análises de HPLC. As análises foram realizadas usando um cromatógrafo líquido Hewlett-Packard 1100 (Agilent Technologies) como descrito anteriormente (Barros et al., 2009). A separação foi obtida por uma coluna de fase reversa (3 µm, 150 × 4.6 mm) Spherisorb S3 ODS-2 (Waters), termostaticada a 25 °C. Os eluentes usados foram: (A) ácido fórmico 0,1% e (B) acetonitrila. A eluição gradiente foi 10% de B para 15% de B depois de 5 min, 15-25% de B depois de 5 min, 25-35% de B depois de 10 min, a isocrática foi 50% de B por 10 min, e a coluna foi re-equilibrada, usando um fluxo de 0,5 mL/min. Dupla detecção online foi feita com DAD usando 280 nm e 370 nm como comprimentos de onda preferenciais e um espectrômetro de massa conectado ao sistema HPLC.

Para a análise de espectrometria de massa foi utilizado um espectrômetro de massa API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) equipado com uma sonda de ionização por electrospray (ESI) e um analisador de massa triplo quadrupolo/ion trap, acoplado pelo software Analyst 5.1. A detecção foi realizada em modo negativo, registrando espectro de massa entre 100 e 1000 m/z. A análise dos compostos foi realizada em dois métodos: em ambos o espectrômetro de massas foi programado para realizar uma série de duas análises consecutivas. As condições de análises de massas foram otimizadas para ambos os métodos e experimentos com quercetina. Foi empregado como gás nebulizador (30 psi) e gás turbo (400 °C, 40 psi) para eliminação do eluente *Zero*, e nitrogênio como gás cortina (20 psi) e gás de colisão médio. O método empregado foi o full scan a alta sensibilidade (Enhanced MS, EMS). Os parâmetros foram: voltagem do capilar, -4500V. Como potenciais: declustering potential (DP)-50V, entrance potential (EP) -6V, collision energy (CE) -10V. Na seqüência desta análise foi empregado o experimento Enhanced Product Ion (EPI) para obter a fragmentação característica do íon majoritário obtido no primeiro experimento. As condições empregadas: DP -50V, EP-6 V, CE-25V e collision energy spread (CES) 0 V. Os resultados foram expressos em mg/100 g de massa seca (Barros et al., 2012).

2.5. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos fenólicos

2.5.1. Efeito Seqüestrante

Sobre o radical ABTS. O método ABTS/persulfato utilizado foi o descrito por Re et al., (1999). Neste ensaio, o radical ABTS^{•+} foi produzido pela oxidação de ABTS 7 mM com persulfato de potássio (2,45 mM concentração final) em água. A mistura permaneceu em

repouso por 12-16 h antes do uso, e então a solução de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ foi diluída em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e equilibrado a 30°C para obter uma absorbância de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm. Amostra (50 μL) foi misturada com 2 mL de solução de $\text{ABTS}^{\bullet+}$, agitados por 10 s, e a absorbância medida a 734 nm após 4 min de reação a 30°C. Diferentes diluições de cada amostra foram determinadas e os resultados foram obtidos pela interpolação sobre a curva de calibração obtida com Trólox (30-1000 μM). Os resultados foram expressos como equivalentes Trólox / g amostra, realizado em triplicata para cada ensaio de amostra.

Sobre o radical DPPH. Este ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços usando um leitor de microplaca ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc). A mistura da reação em cada poço consistiu de diferentes concentrações de extratos (30 μL) e solução metanólica (270 μL) contendo radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L). A mistura permaneceu em repouso por 60 min, no escuro. A redução do radical DPPH foi determinada pela medida da absorção a 515 nm. A atividade seqüestrante do radical (ASR) foi calculada como porcentagem da descoloração do DPPH usando a equação: $\% \text{ ASR} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$, onde A_{S} é a absorbância da solução quando o extrato foi adicionado em um nível particular e o A_{DPPH} é a absorbância da solução DPPH. A concentração do extrato que proporcionou 50% de atividade seqüestrante do radical (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico da porcentagem ASR em função da concentração de extrato (Heleno et al., 2010).

2.5.3. Poder redutor

FRAP: A capacidade de reduzir o ferro foi avaliada de acordo com Benzie e Strain (1996) com pequenas modificações. O reagente FRAP constitui de solução de 10 mM de 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) in 40 mM HCl, 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, and acetate buffer (300 mM, pH 3.6) (1:1:10, v/v). Amostras (100 μL) foram adicionadas em 3 mL do reagente FRAP, e a absorbância foi medida a 593 nm depois de incubação a temperatura ambiente por 6 min. Diferentes diluições de cada amostra foram determinadas e os resultados foram obtidos pela interpolação sobre a curva de calibração obtida com Trólox (30-1000 μM). Os resultados foram expressos como equivalentes Trólox / g amostra, realizado em triplicata para cada ensaio de amostra.

Ferricianeto/azul prussiano: Este método também foi realizado utilizando microplacas e o leitor de microplaca descrito acima. Diferentes concentrações de extratos (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6, 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1% p/v, 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C por 20 min e o ácido tricloroacético (10% p/v, 0,5 mL). Esta mistura (0,8 mL) foi adicionada na microplaca de 48 poços, contendo água deionizada (0,8 mL) e cloreto férrico (0,1% p/v, 0,16 mL) e a absorbância foi medida a 690 nm. A concentração de extrato correspondente a 0,5 de absorbância (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico de absorbância a 690 nm contra a concentração do extrato (Heleno et al., 2010).

Ensaio de Folin-Ciocalteu:

A solução de extrato (500 μ L) foi misturada com o reagente de Folin-Ciocalteu (0,5 mL e carbonato de sódio (75 g/L, 10 mL), em balão volumétrico (25 mL) e completado com água destilada. Os balões foram agitados manualmente durante 15 s e deixou-se repousar por 1 h a temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor. A absorvância foi medida a 750 nm. Na elaboração da curva padrão utilizou-se ácido gálico (9.4×10^{-3} – 0.15 mg/mL) e os resultados foram apresentados em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato.

2.5.3. Inibição da descoloração do β -caroteno

A solução de β -caroteno foi preparada por dissolução de β -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 mL). A partir desta solução, pipetaram-se 2 mL para um balão de fundo redondo. Após remoção do clorofórmio da solução de β -caroteno a 40 °C sob vácuo, procedeu-se à adição de ácido linoléico (40 mg), emulsificador Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL) agitando vigorosamente. Transferiram-se alíquotas (4,8 mL) desta emulsão para diferentes tubos de ensaio contendo soluções dos extratos com diferentes concentrações (0,2 mL). Os tubos foram agitados e incubados num banho a 50 °C. Logo após a adição da emulsão a cada tubo, foi determinado o tempo zero de absorvância (470 nm). Foi preparado um branco, idêntico às amostras, mas desprovido de β -caroteno. A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação: $[(A_{470} \text{ após 2h}/A_{470} \text{ inicial}) \times 100]$.

2.6. Análise Estatística

Para cada amostra três replicas foram feitas e todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados são expressos como média dos valores e desvio padrão (DP). Os resultados foram analisados usando análises de variância com um fator (ANOVA) seguido pelo teste Tukey's com $\alpha = 0.05$. Este tratamento foi realizado usando o programa SPSS v. 18,0.

3. Resultados e Discussão

3.1. Contribuição nutricional

Na tabela 1, apresenta-se a composição nutricional, destacando as gorduras totais, proteínas, cinzas, carboidratos e açúcares livres, das amostras de *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes*.

Tabela1. Macronutrientes e açúcares livres em formulações em pó de *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes* (média \pm DP).

| | <i>Agaricus blazei</i> | <i>Lentinus edodes</i> |
|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Cinzas (g/100 g dw) | 7,47 \pm 0,04 ^a | 4,29 \pm 0,10 ^b |
| Proteínas (g/100 dw) | 31,29 \pm 1,85 ^a | 12,76 \pm 0,24 ^b |
| Gorduras (g/100 g dw) | 1,82 \pm 0,03 ^b | 1,01 \pm 0,10 ^a |
| Carboidratos (g/100 g dw) | 59,42 \pm 1,86 ^a | 81,94 \pm 0,40 ^b |
| Energia(kcal/100 g dw) | 379,24 \pm 0,29 ^a | 387,89 \pm 0,26 ^b |
| Manitol | 60,89 \pm 6,90 ^b | 23,30 \pm 0,74 ^a |
| Trealose | 5,74 \pm 0,70 ^a | 13,22 \pm 0,19 ^b |
| Frutose | 0,27 \pm 0,02 | nd |
| Arabinose | nd | 1,79 \pm 0,08 |
| Total (g/100 g dw) | 66,91 \pm 7,58 ^b | 38,31 \pm 1,01 ^a |

nd- não detectado; dw- massa seca. Em cada linha, as letras diferentes representam diferenças significativas entre as espécies ($p < 0.05$).

Verificou-se maior conteúdo de gorduras, cinzas e proteínas em *Agaricus blazei*. No entanto, os resultados obtidos foram superiores ao estudo de Tsai et al. (2008) que encontraram 26,74% de proteínas e 6,81% de cinzas em *Agaricus blazei* comercializado em Taiwan. Andrade et al. (2008) obtiveram médias de proteína bruta (10,21 a 13,64 %), cinzas (2,54 a 4,12 %) e lipídeos (1,88 a 2,35 %) em estípete (parte de basidioma) de *Lentinus edodes* próximas às encontradas neste estudo.

O elevado conteúdo de proteínas e baixo teor de gorduras tem sido descrito em muitos cogumelos comestíveis, incluindo *Agaricus campestris*, *Boletus edodes*, *Calocybe gambosa*, *Cantharellus cibarius*, *C. cornucopioides*, *Entoloma chypeatum*, *Flammulina velutipes*, *Macroleptiota procera*, *Morchella elata* e *Pleurotus ostreatus* (Beluhan & Ranogajec, 2010).

Os carboidratos totais, calculados por diferença, foram os macronutrientes mais abundantes, em especial para *Lentinus edodes*. Quanto aos açúcares livres, encontrou-se manitol e trealose em *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes*. A frutose foi encontrada apenas em *Agaricus blazei*, e a arabinose em *Lentinus edodes*. O *Agaricus blazei* apresentou maior quantidade de açúcares em relação ao *Lentinus edodes*. Manitol e trealose foram também encontrados em *Agaricus blazei*, comercializado em Taiwan (Tsai et al., 2008) e em dez espécies de cogumelos da Croácia (Beluhan & Ranocajec, 2010). Em adição, a arabinose foi também descrita em polissacarídeos de *Agaricus brasiliensis* (Zhang et al., 2010).

A composição de ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), e ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) de *Agaricus blazei* e de *Lentinus edodes* estão apresentados na tabela 2 e nas figuras 1 e 2.

Tabela 2: Ácidos graxos individuais (%) em formulações em pó de *Agaricus blazei* e de *Lentinus edodes* (mean \pm DP).

| Ácidos graxos | <i>Agaricus blazei</i> | <i>Lentinus edodes</i> |
|---------------|-------------------------------|-------------------------------|
| C6:0 | 0,14 \pm 0,01 ^b | 0,05 \pm 0,01 ^a |
| C8:0 | 0,27 \pm 0,04 ^b | 0,11 \pm 0,01 ^a |
| C10:0 | 0,11 \pm 0,02 ^a | 0,06 \pm 0,00 ^a |
| C12:0 | 0,03 \pm 0,00 ^a | 0,05 \pm 0,00 ^b |
| C13:0 | 0,01 \pm 0,00 | Nd |
| C14:0 | 0,29 \pm 0,01 ^a | 0,25 \pm 0,01 ^a |
| C14:1 | 0,004 \pm 0.001 | Nd |
| C15:0 | 0,69 \pm 0,01 ^a | 1,24 \pm 0,01 ^b |
| C15:1c | 0,01 \pm 0,00 | Nd |
| C16:0 | 11,38 \pm 0,08 ^a | 11,78 \pm 0,35 ^a |
| C16:1 | 0,10 \pm 0,00 ^a | 0,17 \pm 0,00 ^b |
| C17:0 | 0,69 \pm 0,01 ^b | 0,28 \pm 0,02 ^a |
| C17:1c | 0,01 \pm 0,00 | Nd |
| C18:0 | 2,80 \pm 0,10 ^b | 1,09 \pm 0,03 ^a |
| C18:1n9c | 1,85 \pm 0,27 ^a | 3,28 \pm 0,03 ^b |
| C18:2n6c | 72,42 \pm 0,53 ^a | 78,59 \pm 0,34 ^b |
| C18:3n6 | Nd | 0,59 \pm 0,06 |
| C18:3n3 | 0,32 \pm 0,02 ^a | 0,24 \pm 0,14 ^a |
| C20:0 | 1,36 \pm 0,00 ^b | 0,07 \pm 0,01 ^a |
| C20:1c | 0,01 \pm 0,00 | Nd |
| C20:2c | 0,16 \pm 0,00 ^a | 0,12 \pm 0,04 ^a |
| C20:3n3+C21:0 | 0,55 \pm 0,03 ^b | 0,17 \pm 0,10 ^a |
| C20:5n3 | 0,13 \pm 0,01 ^a | 0,14 \pm 0,04 ^a |
| C22:0 | 4,43 \pm 0,06 ^b | 0,25 \pm 0,01 ^a |
| C22:1n9 | 0,04 \pm 0,00 | Nd |
| C23:0 | 0,51 \pm 0,02 ^b | 0,20 \pm 0,03 ^a |
| C24:0 | 1,76 \pm 0,03 | 1,29 \pm 0.20 ^a |
| AGS | 24,39 \pm 0,29 ^b | 16,72 \pm 0,19 ^a |
| AGMI | 2,03 \pm 0,26 ^b | 3,45 \pm 0,02 ^a |
| AGPI | 73,58 \pm 0,55 ^a | 79,84 \pm 0,16 ^b |

(C6:0) ác. capróico; (C8:0) ác. caprílico; (C10:0) ác. cáprico; (C12:0) ác. láurico; (C13:0) ác. tridecanóico; (C14:0) ác. mirístico; (C14:1) ác. miristoleico; (C15:0) ác. pentadecanóico; (C15:1CIS-10) cis-10-heptadecenóico; (C16:0) ác. palmítico; (C16:1) ác. palmitoléico; (C17:0) ác. heptadecanóico; (C17:1CIS-10) cis-10-heptadecenóico; (C18:0) ác. esteárico; (C18:1n9c) ác. oléico; (C18:2n6c) ác. linoléico; (C18:3n6) ác. γ -linolênico; (C18:3n3) ác. linolênico; (C20:1c) cis-11-eicosenóico; (C20:2c) cis-11,14-eicosadienóico; (C20:3n3+C21:0) cis-11,14,17) eicosatrienóico + ác. heneicosanóico; (C22:0) ác. behenico; (C22:1n9) ác. erucico; (C23:0) ác. tricosanóico; (C24:0) ác. lignocérico. nd- não detectado. Em cada linha, as letras diferentes representam diferenças significativas entre as espécies ($p < 0.05$).

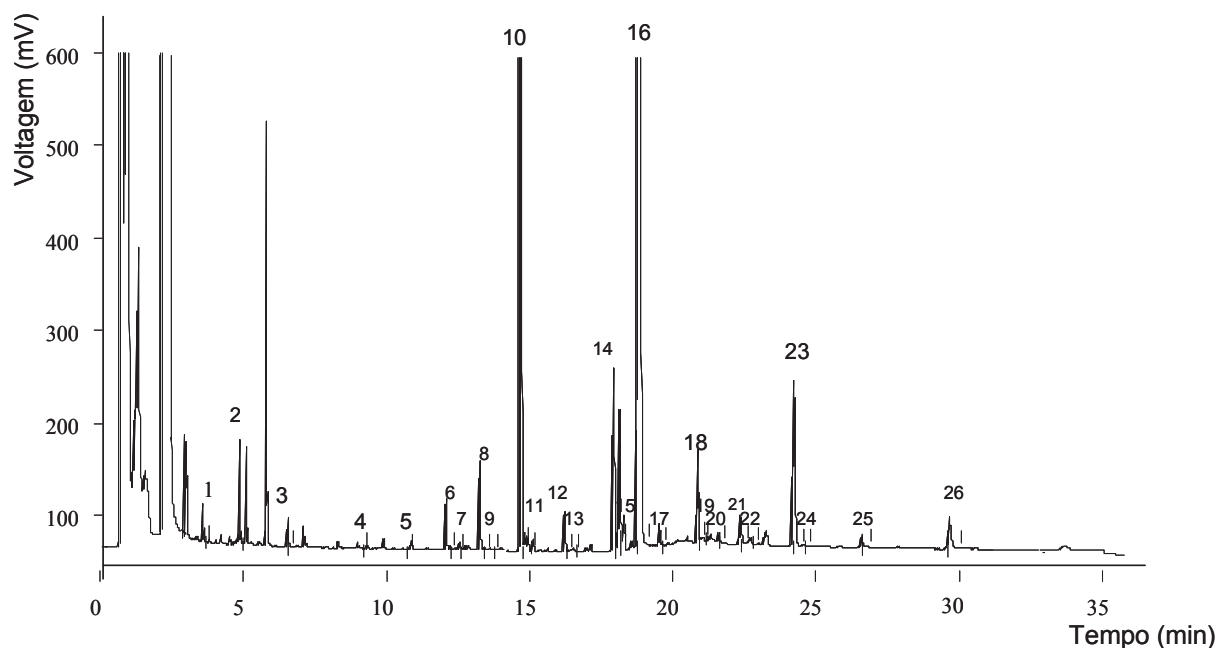


Figura 1: Perfil de Ácidos graxos de *Agaricus blazei* por CG/FID: (1) C6:0; (2) C8:0; (3) C10:0; (4) C12:0; (5) C13:0; (6) C14:0; (7) C14:1; (8) C15:0; (9) C15:1CIS-10; (10) C16:0; (11) C16:1; (12) C17:0; (13) C17:1CIS-10; (14) C18:0; (15) C18:1n9c; (16) C18:2n6c; (17) C18:3n3; (18) C20:0; (19) C20:1CIS-11; (20) C20:2CIS-11,14; (21) C20:3n3+C21:0; (22) C20:5n3; (23) C22:0; (24) C22:1n9; (25) C23:0; (26) C24:0.

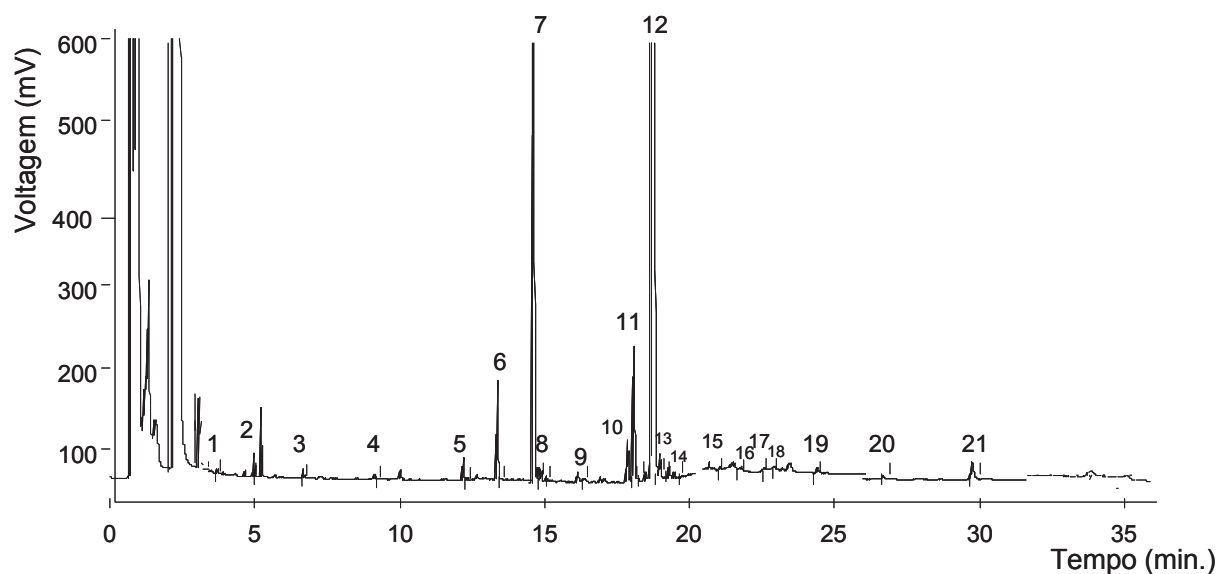


Figura 2: Perfil de ácidos graxos de *Lentinus edodes* por CG/FID: (1) C6:0; (2) C8:0; (3) C10:0; (4) C12:0; (5) C14:0; (6) C15:0; (7) C16:0; (8) C16:1; (9) C17:0; (10) C18:0; (11) C18:1n9c+t; (12) C18:2n6c; (13) C18:3n6; (14) C18:3n3; (15) C20:0; (16) C20:CIS-11,14; (17) C20-3n3+C21:0; (18) C20:5n3; (19) C20:0; (20) C21:0; (21) C22:0.

Os principais ácidos graxos encontrados em ambos os cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes* foram o ácido linoléico (C18:2n-6c), ácido palmítico (C16:0), ácido oléico (C18:1n-9), seguido do ácido linolênico (18:3n3). O maior conteúdo de ácido linoléico e o baixo conteúdo de ácido linolênico detectado em ambos os cogumelos foram similares aos encontrados em cogumelos da Turquia, incluindo o *Agaricus bisporus*, *Coprinus comatus*, *Pleurotus ostreatus* e *Oudemansiella radicata*, relatado por Yilmaz et al. (2006). Os principais ácidos graxos encontrados em cogumelos chineses *Clitocybe maxima*, *Catathelasma ventricosum*, *Stropharia rugoso-annulata*, *Craterellus cornucopioides* and *Laccaria amethystea* foram também C18:2, C18:1e C16:0 (Liu et al., 2012).

AGPI foram os principais grupos de ácidos graxos encontrados em *Lentinus edodes* e em *Agaricus blazei*. Em ambos os cogumelos, os ácidos graxos insaturados superam os ácidos graxos saturados, em *Agaricus blazei* 75,6 % e em *Lentinus edodes* 83,29 %.

3.2. Contribuição nutracêutica

O conteúdo de tocoferóis em *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes* está apresentado na tabela 3. Este conteúdo foi maior em *Agaricus blazei*, destacando maior quantidade de α -tocoferol. β -tocoferol foi encontrado somente em *Lentinus edodes*, e γ -tocoferol foi encontrado somente em *Agaricus blazei*. Estas vitaminas têm sido encontradas em espécies de cogumelos portugueses (Helena et al., 2010). α -Tocoferol e γ -tocoferol foram também encontrados em extrato etanólicos e aquosos de *Agaricus blazei*, comercializado em Taiwan (Tsai et al., 2007).

Tabela 3. Tocoferóis individuais em formulações em pó de *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes* (média \pm DP).

| | <i>Agaricus blazei</i> | <i>Lentinus edodes</i> |
|---------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| α -Tocoferol | 77,79 \pm 18,51 ^b | 1,02 \pm 0,06 ^a |
| β -Tocoferol | nd | 31,31 \pm 0,37 |
| γ -Tocoferol | 46,47 \pm 12,79 | nd |
| Total (μ g/100 g dw) | 124,25 \pm 31,30 | 32,33 \pm 0,43 |

nd- não detectado; dw- massa seca Em cada linha, as letras diferentes representam diferenças significativas entre as espécies ($p < 0.05$).

Três compostos fenólicos (ácidos *p*-hidroxibenzóico, *p*-cumárico e vanílico) e outro composto relacionado (ácido cinâmico) foram detectados e identificados nas amostras de *Agaricus blazei* e de *Lentinus edodes*, por comparação de suas características cromatográficas e espectro de absorção com as dos compostos padrões. Os ácidos *p*-hidroxibenzóico e o cinâmico foram encontrados em ambas as amostras de cogumelos. Também, em *Agaricus blazei* foi encontrado o ácido *trans-p*-cumárico, e o ácido vanílico em *Lentinus edodes*, tabela 4.

Os ácidos fenólicos *p*-hidroxibenzóico e *p*-cumárico e o ácido cinâmico foram encontrados por Vaz et al. (2011) em algumas espécies de cogumelos portugueses. Ribeiro et al. (2007) relataram a presença de ácido *p*-cumárico no cogumelo *Fistulina hepatica*. Outros autores revelaram a presença de ácido gálico, siríngico e pirogalol em extrato de corpos de frutificação e em extrato de micélio de *Agaricus blazei*, identificados por HPLC (Carvajal et al., 2012).

As diferenças entre os compostos fenólicos obtidos em uma mesma espécie de cogumelos portugueses podem ser explicadas pelas diferenças nas condições de clima e de solo (Barros et al., 2011).

Tabela 4: Ácidos fenólicos e ácidos cinâmicos detectados em formulações em pó de *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes* (média \pm DP).

| | <i>Agaricus</i> | <i>Lentinus</i> |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|
| Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico | 0,64 \pm 0,09 | 0,42 \pm 0,06 |
| Ácido <i>trans-p</i> -cumárico | 0,08 \pm 0,02 | nd |
| Ácido vanílico | Nd | 0,08 \pm 0,01 |
| Ácido cinâmico | 0,05 \pm 0,01 | 0,20 \pm 0,01 |
| Total (mg/100 g dw) | 0,77 \pm 0,12 | 0,69 \pm 0,08 |

nd- não detectado

3.3. Avaliação da atividade antioxidante

A tabela 5 mostra a atividade antioxidante de *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes*, determinada a partir de diferentes métodos.

Tabela 5: Atividade antioxidante de formulações em pó de *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes* (média \pm DP).

| | <i>Agaricusblazei</i> | <i>Lentinus edodes</i> |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| ABTS (TE*/ μ g amostra) | 158,41 \pm 5,13 ^b | 65,28 \pm 8,73 ^a |
| DPPH (EC ₅₀ ; mg/mL) | 6,77 \pm 0,43 ^a | 26,32 \pm 2,80 ^b |
| FRAP (TE*/ μ g amostra) | 31,98 \pm 5,13 ^b | 8,10 \pm 0,42 ^a |
| Ensaio Folin-Ciocalteu | 6,51 \pm 0,29 ^b | 3,59 \pm 0,15 ^a |
| Ferricianeto/Azul prussiano (EC ₅₀ ; mg/mL) | 2,23 \pm 0,12 ^a | 7,54 \pm 0,46 ^b |
| Inibição descoloração β -caroteno (EC ₅₀ ; mg/mL) | 0,30 \pm 0,03 ^a | 0,64 \pm 0,15 ^b |

*Trolóx equivalente. Em cada linha, as letras diferentes representam diferenças significativas entre as espécies ($p < 0.05$). Com relação aos métodos Folin-Ciocalteu, FRAP e TEAC, os valores maiores significam maior poder redutor ou atividade antioxidante; para os outros métodos, os resultados são apresentados em valores de EC₅₀, significando que valores maiores correspondem ao menor poder redutor ou potencial antioxidante. EC₅₀: Concentração do extrato corresponde a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorbância para o método ferricianeto/azul prussiano.

A atividade antioxidante foi determinada pela atividade seqüestrante, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica, utilizando diferentes métodos químicos. Os fenóis totais, obtidos pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, foram encontrados em maior quantidade em *Agaricus blazei*, que também apresentou maior atividade antioxidante de acordo com a tabela 5. Também, os métodos FRAP e TEAC podem confirmar esses dados, nestes casos TE altos representam maior atividade. Os antioxidantes presentes no extrato metanólico de *Agaricus blazei* foi capaz de reduzir o Fe⁺³ (FRAP), e de seqüestrar o radical ABTS (TEAC).

Em estudos anteriores, verificou-se o poder redutor com valores de EC₅₀ (8,05 mg de extrato/mL) em extratos metanólicos de *Agaricus blazei* jovem, e EC₅₀ (8,10 mg de extrato/mL) em extratos metanólicos de *Agaricus blazei* envelhecido. Em relação à inibição da descoloração do β-caroteno foram encontrados valores de EC₅₀ (2,43 mg de extrato/mL) para a amostra jovem, e EC₅₀ (2,12 mg de extrato/mL) para a amostra mais envelhecida. A atividade seqüestrante sobre DPPH foi de EC₅₀ 3,00 e 3,20 mg de extrato/mL, para os extratos imaturo e maturo, respectivamente (Soares et al., 2009). Quando o *Lentinus edodes* foi extraído em acetato de etila a atividade seqüestrante sobre DPPH foi de EC₅₀ (132,1 µg de extrato/mL) (Kitzeberge et al., 2007).

Para extração de materiais solúveis, o metanol parece ser melhor que o etanol, embora ele seja menos eficiente que a água (Soares et al., 2009). Diferentes antioxidantes têm sido quantificados em cogumelos, nomeadamente ácido ascórbico, β-caroteno e tocoferóis (Tsai et al., 2007). Numerosos compostos antioxidantes, naturais e sintéticos são comparados, em ordem de identificar os mais potentes (Arts et al., 2004).

O antioxidante trolóx é um análogo do α-tocoferol, a forma natural da vitamina E, é conhecido por sua alta capacidade de seqüestrar radical e por isso é freqüentemente utilizado como um composto padrão (Oehlke et al., 2011). Este composto e o ácido ascórbico protegeram a riboflavina no leite, na presença de luz pela reação com o oxigênio singlete (Hall et al., 2010). Também, o trolóx reduziu a oxidação do plasma sanguíneo humano (Barclay et al., 2003).

4. Conclusão

A composição química dos cogumelos *Agaricus blazei* e *Lentinus edodes* revelaram a presença de nutrientes essenciais como as proteínas e carboidratos. Por apresentar baixo conteúdo de gorduras eles podem ser usados em dietas de baixa caloria. Além disso, esses cogumelos contêm compostos fenólicos e tocoferóis que podem ser usados como antioxidantes contra doenças relacionadas ao stress oxidativo. O estudo de atividade antioxidante vai de encontro a uma tendência recente onde os consumidores demonstram interesse por alimentos com alguma propriedade benéfica à saúde, que lhes proporcione melhor qualidade de vida e previna o aparecimento de doenças.

5. Agradecimentos

À Capes-Fundação Carolina (Brasil) pela concessão de bolsa de doutorado-sanduíche, realizado na Faculdade de Farmácia-Universidade de Salamanca-Espanha em parceria com o Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

6. Referências Bibliográficas

ABDEL-WAHAB, W. H.; EL-MAHDY, M. A.; ABD-ELLAH, M. F.; HELAL, G. K.; KHALIFA, F.; HAMADA, F. M. A. Influence of *p*-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. *Pharmacological Research*, v. 48, p. 461-465, 2003.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, v. 33, p. 2202-2210, 2010.

ANDRADE, M. C. N.; MINHONI, M. T. A.; ZIED, D. C. Caracterização bromatológica de oito linhagens de *Lentinula edodes* (Shiitake) cultivadas em toras de *Eucalyptus grandis*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 793-797, 2008.

ARTS, M. J. T. J.; HAENEN, G. R. M. M.; VOSS, H-P.; BAST, A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, p. 45-49, 2004.

BARCLAY, L. R. C.; BASQUE, M. D.; STEPHENSON, V. C.; VINQVIST, M. R. Photooxidations initiated or sensitized by biological molecules: singlet oxygen versus radical peroxidation in micelles and human blood plasma. *Photochemistry and Photobiology*, v. 78, p. 248-255, 2003.

BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R.; BAPTISTA, P. Phenolics and antioxidant activity of mushroom *Leucopaxillus giganteus* mycelium at different carbon sources. *Food Science and Technology International*, v. 14, p.44-45, 2008a.

BARROS, L.; CRUZ, T.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L. M.; FERREIRA, I. C.F. R. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicological*, v. 46, p. 2742-2747, 2008b.

BARROS, L.; DUEÑAS, M.; FERREIRA, I.C.F.R.; BAPTISTA, P.; SANTOS-BUELGA, C. Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 1076-1079, 2009.

BARROS, L.; DUEÑAS, M.; FERREIRA, I. C.F.R.; CARVALHO, A, M.; SANTOS-BUELGA, C. Use of HPLC-DAD-ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. *Food Chemistry*, v. 127, p. 169-173, 2011.

BARROS, L.; DUEÑAS, M.; DIAS, M. I.; SOUSA, M. J.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I.C.F.R. Phenolic profiles of in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry*, v. 132, p. 841-848, 2012.

BELUHAN, S.; RANOGAJEC, A. Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food Chemistry*, v. 124, p. 1076-1082, 2010.

BENZIE I.F.F, STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem*, v. 239, p.70-76, 1996.

CARVAJAL, A. E.S.S.; KOEHNLEIN, E. A.; SOARES, A. A.; ELER, G. J.; NAKASHIMA, T. A.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis (blazei)* and their antioxidant properties, *LWT - Food Science and Technology*, 2012.

HALL, N. K.; CHAPMAN, T. M.; KIM, H, J.; MIN, D. B. Antioxidant mechanisms of Trolox and ascorbic acid on the oxidation of riboflavin in milk under light. *Food Chemistry*, v. 118, p. 534-539, 2010.

HELENO, S. A.; BARROS, L.; SOUSA, M. J.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C.F.R. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, v. 119, p. 1443-1450, 2010.

KITZBERGER, C. S. G.; JR, A. S.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering* , v. 80, 631-638, 2007.

LIU, Y. T.; SUN, J.; LUO, Z. Y.; RAO, S. Q.; SU, Y. J.; XU, R. R.; YANG, Y. J. Chemical Composition of Five Wild Edible Mushrooms Collected from Southwest China and Their Antihyperglycemic and Antioxidant Activity, *Food and Chemical Toxicology* (2012), doi: 10.1016/j.fct.2012.01.023.

LODOVICI M.; RAIMONDI, L.; GUGLIELMI, F.; GEMIGNANI, S.; DOLARA, P. Protection against ultraviolet B-induced oxidative DNA damage in rabbit corneal-derived cells (SIRC) by 4-coumaric acid. *Toxicology*, v. 184, 141-147, 2003.

OEHLKE, K.; HEINS, A.; STOCKMANN, H.; SONNICHSEN, F.; SCHWARZ, K. New insights into the antioxidant activity of Trolox in o/w emulsions. *Food Chemistry*, v. 124, p. 781-787, 2011.

ORHAN, I.; ÜSTÜN, O. Determination of total phenol content; antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 24, p. 386-390, 2011.

RE, N. R.; PELLEGRINI, PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE EVANS, C. Free Radical, *Bio. Med.*, v. 26, p.1231-1237, 1999.

RIBEIRO, B.; VALENTÃO P.; BAPTISTA P.; SEABRA R.M.; ANDRADE P.B. Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*), *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1805-1813, 2007.

SOARES, A. A.; SOUZA, C. G. M.; DANIEL, F. M.; FERRARI, G. P.; COSTA, S. M. G.; PERALTA, R. M. Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry*, v. 112, p. 775-781, 2009.

TSAY, S.Y.; TSAI, H.L.; MAU, F.L. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT-Food Science and Technology*, v. 40, p. 1392-1402, 2007.

TSAI, S.Y.; TSAI, H. L.; MAU, J. L. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. *Food Chemistry*, v. 107, p. 977-983, 2008.

VAZ, J. A.; BARROS, L.; MARTINS, A.; MORAIS, J. S.; VASCONCELOS, M. H.; FERREIRA, I. C.F.R. Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. *LWT - Food Science and Technology*, v. 44, p. 343-346, 2011.

YILMAZ, N.; SOLMAZ, M.; TURKEKUL, I.;ELMASTAS, M. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry*, v. 99, p. 168-174, 2006.

ZHANG, S.; HE, B.; GE, J.; ZHAI, C.; LIU, X.; LIU P. Characterization of chemical composition of *Agaricus brasiliensis* polysaccharides and its effect on myocardial SOD activity, MDA and caspase-3 level in ischemia-reperfusion rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 3, p. 363-366, 2010.

ZULUETA, A.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, v. 114, p. 310-316, 2009.