



DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

ELLEN CRISTINE GIESE

**PRODUÇÃO DE BETA-GLUCANASES POR *TRICHODERMA
HARZIANUM* RIFAI PARA OBTENÇÃO DE GLUCO-
OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE BOTRIOSFERANA**



SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2008

ELLEN CRISTINE GIESE

**PRODUÇÃO DE BETA-GLUCANASES POR *TRICHODERMA HARZIANUM* PARA
OBTENÇÃO DE GLUCO-OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE BOTRIOSFERANA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de São José do Rio Preto, como
requisito para obtenção do título de Doutora
em Engenharia e Ciência de Alimentos, área
de concentração em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.

Orientador:
Prof. Dr. Roberto da Silva
Universidade Estadual Paulista
São José do Rio Preto - SP

Co-orientadora:
Profª. Dra. Aneli de Melo Barbosa
Universidade Estadual de Londrina
Londrina - PR

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2008

Giese, Ellen Cristine.

Produção de beta-glucanases por *Trichoderma harzianum* Rifai para obtenção de gluco-oligossacarídeos a partir de botriosferana / Ellen Cristine Giese. – São José do Rio Preto, 2008

138 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Roberto da Silva

Co-orientadora: Aneli de Melo Barbosa

Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Enzimas – Aplicações industriais. 3. Glucanases. 3. Hidrólise enzimática. 4. Oligossacarídeos. I. Silva, Roberto da. II. Barbosa, Aneli de Melo. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 663.15

ELLEN CRISTINE GIESE

**PRODUÇÃO DE BETA-GLUCANASES POR *TRICHODERMA HARZIANUM* PARA
OBTENÇÃO DE GLUCO-OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE BOTRIOSFERANA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São
José do Rio Preto, como requisito para obtenção do
título de Doutora em Engenharia e Ciência de
Alimentos, área de concentração em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto da Silva (UNESP)

Profª. Dra. Elza Iouko Ida (UEL)

Profª. Dra. Maria de Lourdes Corradi Custódio da
Silva (UNESP)

Prof. Dr. João Ruggiero Neto (UNESP)

Prof. Dr. Rubens Monti (UNESP)

Profª. Dra. Heloiza Ferreira Alves do Prado
(UNESP)

Profª. Dra. Inês Conceição Roberto (USP)

Profª. Dra. Eleni Gomes (UNESP)

São José do Rio Preto, 21 de maio de 2008.

**Aos meus pais, pelo amor, amizade e
dedicação; por me acalentarem na vida
como flor de seus sonhos.**

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Roberto da Silva, que me recebeu com carinho em seu laboratório, pelo apoio, confiança, amizade e orientação da presente tese.

À professora e co-orientadora Aneli de Melo Barbosa, que despertou o meu interesse pela ciência e me incentivou à pesquisa, pela confiança, amizade, interesse e apoio durante a execução deste trabalho.

Ao professor Robert F. H. Dekker pela confiança, amizade, interesse e pelas valiosas sugestões e auxílio constantes.

À professora Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva pela amizade, incentivo e colaboração.

À professora Eleni Gomes pela amizade, sugestões e atenção constantes.

Aos técnicos Nelson Janeiro e Marilsa Cardoso, pela amizade e atenção sempre presentes.

Aos colegas de laboratório do Laboratório de Microbiologia do IBILCE-UNESP, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da UEL e do Laboratório de Química de Carboidratos da FCT-UNESP pela amizade, alegria e auxílio dedicados.

Aos colegas Alexandre, Aline, Ana Flávia, Ana Flora, Andréia, Andressa, Carolina, Caroline, Ellen, Érica, Eveline, Fabiana, Heloísa, Lívia, Luiz Gustavo, Marcelo, Márcia, Natália, Paula, Rodrigo e Sara pelos momentos de descontração e companheirismo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do IBILCE-UNESP, pelos conhecimentos transmitidos.

À UNESP, pela oportunidade da realização do curso de doutorado.

À FAPESP, pela bolsa de doutorado concedida.

A Deus, principalmente, por sua infinita bondade e misericórdia.

NUNCA DEIXE DE SONHAR

“Ao nascer, trazemos os olhos cheios de simplicidade e de uma alegria ingênua, contagiante...
Nessa época de infância, quantos sonhos carregamos!
Mas crescemos.
E a vida vai se encarregando de apagar um pouco do brilho dos nossos olhos.
Devagar, muito lentamente, passamos a colocar cada vez mais freios na alma, a exercer auto-
censura, a matar a imaginação.
Não vale a pena sufocar os sonhos, que podem ser a ponte para uma vida mais feliz e plena.
Um sonhador é alguém que não se acomoda.
Está sempre buscando algo de bom, de novo, de diferente.
É um idealista, um lutador.
A Humanidade caminha porque há quem sonhe.
Inventores, cientistas, sacerdotes, pensadores em geral são grandes sonhadores.
Permita-se, você também, sonhar coisas belas, buscar mudanças positivas.
Toque as estrelas com as pontas dos dedos. Sonhe.
Sonhe, sim. Todos os dias, todas as horas.
E tente fazer seus sonhos se materializarem, para mudar o mundo para melhor.”

*Adaptado do texto da Redação do Momento Espírita
www.momento.com*

RESUMO

As β -glucanas fúngicas apresentam uma série de respostas biológicas. Estas glucanas apresentam baixa solubilidade em meio aquoso, sendo necessário fragmentá-las em moléculas de menor peso molecular. O *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 é um ascomiceto ligninolítico produtor de uma β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucana denominada botriosferana (EPS). Estudos preliminares demonstraram que o fungo *Trichoderma harzianum* Rifai é capaz de crescer em EPS como única fonte de carbono e de produzir β -glucanases específicas. As condições para a produção de β -1,3-glucanases pelo *T. harzianum* Rifai em fermentador de bancada utilizando EPS como única fonte de carbono foram otimizadas através do uso de um planejamento fatorial e análise por superfície de resposta, o qual mostrou que a produção máxima de β -1,3-glucanases ocorreu em 5 dias de cultivo, com pH inicial igual a 5,5 e com aeração de 1,5 vvm. As enzimas do complexo β -glucanolítico extracelular foi parcialmente purificado e utilizado para a hidrólise de botriosferana, laminarina, paramilo e pustulana. Duas frações com atividade para β -glucanase (F-I e F-II) foram obtidas a partir da cromatografia de filtração em gel, as quais apresentaram diferentes modos de ação sobre o botriosferana e a laminarina. O botriosferana foi hidrolisado em cerca de 66 % pela fração F-I e em 98 % pela fração F-II, em 30 min. Os produtos de hidrólise foram principalmente constituídos por gluco-oligossacarídeos ($GP \geq 4$), e menor quantidade de glucose, di- e trissacarídeos. A ação enzimática das frações F-I e F-II sobre a laminarina resultaram em 15 % de conversão do polímero em glucose, enquanto a porcentagem de sacarificação foi totalmente diferente (70 % para F-I e 25 % para F-II). Em paramilo, ambas as frações promoveram a degradação de aproximadamente 20 % do polissacarídeo após 30 min, onde somente 0,5 % corresponderam a gluco-oligossacarídeos ($GP \geq 4$). Somente a fração F-I hidrolisou a pustulana, resultando em 25 % de glucose, gentiobiose e oligossacarídeos (não identificados), após 30 min. A diferença observada nos produtos de hidrólise de cada polissacarídeo pode ser explicada pela especificidade das enzimas de cada fração, pela diferença estrutural e complexidade dos carboidratos estudados, incluindo a diferença entre suas ligações β -glicosídicas. A correlação entre a produção de botriosferana e β -1,3-glucanases pelo *B. rhodina* MAMB-05 foi avaliada através da formação de EPS e consumo de glucose durante 300 horas. As curvas de crescimento em glucose e botriosferana como únicas fontes de carbono foram comparadas para a produção de β -1,3-glucanases pelo *B. rhodina* MAMB-05 e *T. harzianum* Rifai, assim como foram avaliadas a produção destas glucohidrolases em diferentes fontes de carbono (glucose, lactose, laminarina, botriosferana, extrato de levedura e micélio fúngico de *B. rhodina*). Os dois microrganismos cresceram e produziram enzimas com atividade β -glucanolítica em todos os substratos avaliados. Através dos experimentos de transição conformacional utilizando o corante Vermelho Congo, verificou-se que o botriosferana apresenta conformação em hélice tripla. A presença de altas concentrações de álcalis provocou o rompimento da conformação em hélice tripla. Mudanças conformacionais foram observadas utilizando o fenantreno como composto de fluorescência, e a intensidade de fluorescência diminuiu na presença de 80 % de dimetil sulfóxido. Os resultados confirmaram a conformação em hélice tripla do botriosferana, uma propriedade importante relacionada à atividade como modificador da resposta biológica (MRB).

Palavras-chave: β -1,3-glucanases. *Trichoderma harzianum* Rifai. *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Botriosferana. Gluco-oligossacarídeos. Hidrólise Enzimática.

ABSTRACT

Fungal β -D-glucans presents a variety of biological response. These glucans presents low solubility in water and being necessary to obtain fragments with small molecular weight. A ligninolytic ascomyceteous *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 produces a (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucan named botryosphaeran (EPS). Preliminary studies verified that *Trichoderma harzianum* Rifai is able to grown on EPS as sole carbon source and secrete specific β -glucanases to act on this substract. Conditions for β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* Rifai in bench-fermenter using EPS as sole carbon source were developed using a statistical factorial design, and analysis by response surface method, which showed maximal enzyme production at 5 days growth in a minimum Vogel salts medium, with initial pH 5.5 under 1.5 vvm aeration. A β -glucanolytic extracellular complex was partially-purified and used to hydrolyze fungal botryosphaeran, algal laminarin, algal paramylon and the liquen pustulan. Two β -glucanase fractions (F-I and F-II) were obtained by gel permeation chromatography, which presented different modes of attack on botryosphaeran and laminarin. Botryosphaeran was 66 % hydrolyzed by the F-I fraction, and 98 % by fraction F-II, within 30 min. The main products of hydrolysis were gluco-oligosaccharides (DP \geq 4), and lower amounts of glucose, di- and tri-saccharides. The action of enzyme fractions I and II on laminarin resulted 15 % of conversion to glucose, while the percentage of saccharification was radically different (70 % for F-I and 25 % for F-II). On paramylon, both fractions promoted approximately 20 % degradation after 30 min, and only 0.5 % corresponded to gluco-oligosaccharides (DP \geq 4). Only F-I fraction could acted on pustulan resulting 25 % of glucose, gentiobiose and oligosaccharides (not identified), within 30 min. The difference in the hydrolysis products of each polysaccharide can be explained by the enzyme specificities of each fraction, the structural difference and complexity of the polysaccharides studied, including β -glycosidic linkages. The correlation between botryosphaeran and β -1,3-glucanase production by *B. rhodina* MAMB-05 was evaluated following the EPS formation and the glucose consumption during 300 hours. A growth profile on glucose and botryosphaeran as sole carbon source were compared to produce β -1,3-glucanase by *B. rhodina* MAMB-05 and *T. harzianum* Rifai as well as glucohydrolases on different carbon sources (glucose, lactose, laminarin, botryosphaeran, yeast extract and *B. rhodina* mycelium). Both microorganisms grew and produced β -glucanolytic enzymes in all substrates evaluated. Botryosphaeran was found to be present in a triple helix conformation from helix-coil transition studies using Congo Red. The triple helix conformation was disrupted at increasing alkali concentrations. Conformational changes were also observed using phenanthrene as a fluorescent probe, and the fluorescence intensity decreased 80 % in the presence of dimethyl sulfoxide. The results confirmed the triple helix conformation of botryosphaeran, an important property manifesting biological response modifying (BRM) activity.

Keywords: β -1,3-glucanases. *Trichoderma harzianum* Rifai. *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Botryosphaeran. Gluco-oligosaccharides. Enzymatic Hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Esquema da estrutura química do botriosferana, que consiste de uma β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucana, produzida pelo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 e apresenta aproximadamente 22 % de ramificações, constituídas de gentiobiose ou glucose.....14
- Figura 2 -** Mecanismo de reação da despolimerização via radical (a) e hidrólise ácida (b).....25
- Figura 3 -** Reação de isomerização da lactose (a) para formar a lactulose (b) por ação da β -galactosidase.....31
- Figura 4 -** Estrutura química do corante Vermelho Congo (ácido sulfônico-1-naftaleno-3,3-(4,4-bifenila- bis(azo))-bis(4-amino-di-sódio).....47
- Figura 5 -** Estrutura química do composto aromático fenantreno.....47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Classificação das enzimas responsáveis pela hidrólise de β -(1→3)- e β -(1→6)-glucanas.....	17
TABELA 2 -	Principais oligossacarídeos com aplicação biotecnológica.....	21
TABELA 3 -	Exemplos de enzimas microbianas utilizadas nos processos de obtenção de oligossacarídeos.....	26
TABELA 4 -	Propriedades biológicas dos oligossacarídeos presentes em alimentos funcionais.....	36
TABELA 5 -	Delineamento estatístico dos experimentos para três variáveis.....	43
TABELA 6 -	Delineamento estatístico do planejamento de misturas.....	44

APRESENTAÇÃO

Esta tese é constituída por uma introdução, seguida pelo delineamento dos objetivos do presente projeto, pela revisão da bibliografia pesquisada e pela descrição da metodologia utilizada nos experimentos realizados. A discussão dos resultados foi organizada em três capítulos, os quais estão redigidos em inglês e se encontram em formato para publicação em revistas científicas especializadas internacionais.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	β-Glucanases fúngicas	17
3.2	Aplicações biotecnológicas das polissacaridasas	19
3.3	Obtenção de oligossacarídeos	20
3.3.1	Processos físicos	21
3.3.2	Processos químicos	22
3.3.3	Processos enzimáticos	25
3.3.3.1	Hidrólise enzimática	27
3.3.3.2	Transglicosilação e hidrólise reversa	28
3.3.3.3	Isomerização	31
3.3.3.4	Processos fermentativos utilizados na produção de oligossacarídeos	31
3.4	Funções dos oligossacarídeos na dieta	32
3.5	Atividades biológicas dos oligossacarídeos	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Material	38
4.1.1	Microrganismos	38
4.2	Métodos gerais	39
4.2.1	Meios de cultivo	39
4.2.1.1	Meio de batata-dextrose-agar (BDA)	39
4.2.1.2	Meio mínimo de sais de Vogel (1956)	39
4.2.1.3	Meio de Vogel-glucose-agar (VGA)	40
4.2.1.4	Meio de Vogel-xilose-agar (VXA)	40
4.2.2	Manutenção dos microrganismos	40
4.2.3	Produção de botriosferana (EPS)	40
4.2.3.1	Preparo do inóculo de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05	40
4.2.3.1	Produção de EPS pelo <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05	41

4.2.4	Produção de β -glucanases pelos fungos <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai e <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05.....	41
4.2.5	Otimização da produção de β -1,3-glucanases pelo fungo <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai em fermentador de bancada	42
4.2.6	Avaliação da produção de β -1,3-glucanases pelos fungos <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 e <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai através de planejamento de misturas	43
4.2.7	Purificação parcial das β -1,3-glucanases produzidas pelo <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	44
4.2.8	Determinação da atividade de β -1,3-glucanases	45
4.2.9	Determinação da atividade de β -1,6-glucanases	45
4.2.10	Determinação da atividade de β -glucosidases.....	46
4.2.11	Determinação da viscosidade.....	46
4.2.12	Análise da conformação espacial com vermelho congo	47
4.2.13	Análise de fluorescência	47
4.2.14	Determinação da biomassa fúngica	47
4.2.15	Determinação da glucose residual.....	48
4.2.16	Determinação de açúcares redutores.....	48
4.2.17	Determinação de açúcares totais	48
4.2.18	Determinação de proteínas	48
4.2.19	Hidrólise enzimática dos polissacarídeos pelas β -glucanases parcialmente purificadas de <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai.....	49
4.2.20	Cromatografia líquida de alta pressão em cromatógrafo de íons (HPAEC)	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
	Capítulo 1: The potential of a β -glucanolytic complex from <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai on 1,3;1,6- β -D-glucans to produce gluco-oligosaccharide	51
	Capítulo 2: Production of β -glucanase by <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-5: a comparison with <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai and optimization of carbon sources by statistical mixture design	80
	Capítulo 3: Triple helix conformation of botryosphaeran, a (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucan produced by <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05.....	108
6	CONCLUSÕES.....	123
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são polímeros lineares ou ramificados, constituídos de unidades de monossacarídeos unidos através de ligações glicosídicas. Estes biopolímeros constituem uma importante percentagem (40-60 %) da biomassa fúngica e também podem ser secretados para o meio extracelular, sendo então denominados exopolissacarídeos (EPS). Os EPS de origem microbiana são amplamente aplicados na indústria alimentícia e cosmética como agentes geleificantes e estabilizantes de emulsões e dispersões.

Algumas glucanas fúngicas, tanto pertencentes à parede celular como também secretadas extracelularmente, têm apresentado atividade anti-tumoral, antiinflamatória, imuno-moduladora e antioxidante. Também têm sido empregadas no desenvolvimento de imunossuppressores e imunoestimulantes, que são efetivos na prevenção à rejeição de transplantes, na imunoterapia contra o câncer, e no preparo de adjuvantes utilizados em vacinas e pele artificial.

A atividade imunomoduladora destas glucanas consiste no reconhecimento destas moléculas por receptores específicos que ativam os leucócitos no corpo humano e, para tanto, se faz necessário que as ligações glicosídicas dos tipos β -(1→3)- e β -(1→6)- estejam conservadas na molécula. A massa molar assim como a conformação espacial destes gluco-oligossacarídeos são também importantes nesta atividade.

Algumas β -(1→3)(1→6)-glucanas não têm sido apropriadas para uso clínico devido à dificuldade de solubilizar maiores concentrações destes polissacarídeos em água, tornando-se necessário degradá-las em fragmentos solúveis desde que seja mantida a atividade biológica. A modificação química ou enzimática dos polissacarídeos nativos vem sendo utilizada buscando o aumento de sua funcionalidade. A modificação enzimática de EPS e degradação em oligossacarídeos têm sido mais utilizadas devido à especificidade característica de certas hidrolases que catalisam a hidrólise de alguns polissacarídeos microbianos, tais como as β -glucanases.

O ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 foi primeiramente descrito como ligninolítico por ser produtor constitutivo de lacases e, posteriormente, também foi relatado como produtor de um EPS responsável pelo aumento da viscosidade do meio de cultivo, o qual foi denominado botriosferana e caracterizado estruturalmente como sendo uma β -(1→3)(1→6)-glucana (Figura 1). Este EPS pode apresentar maior ou menor quantidade de ramificações, dependendo da fonte de carbono utilizada no cultivo, além de apresentar propriedades físico-químicas peculiares, como a capacidade de alterar as propriedades

reológicas de soluções aquosas e formar géis mesmo em baixas concentrações. Recentemente foi descrito que o botriosferana não é mutagênico e apresenta propriedades anti-mutagênica e hipoglicemiante.

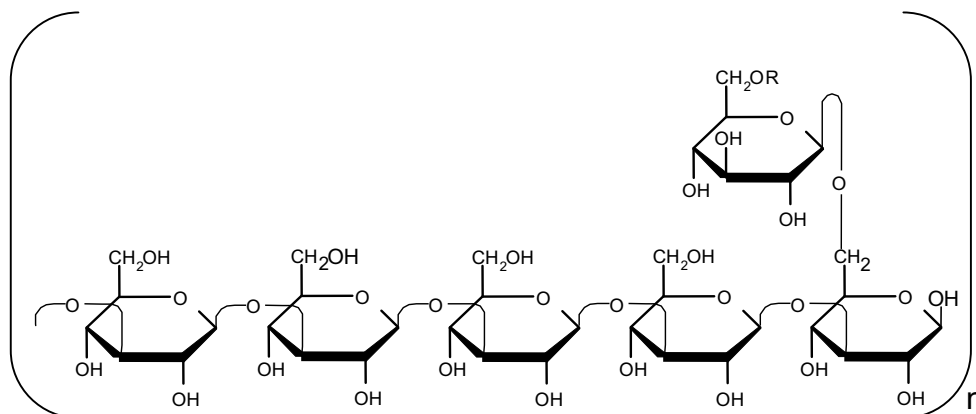


Figura 1 - Esquema da estrutura química do botriosferana, que consiste de uma β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucana, produzida pelo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* e apresenta aproximadamente 22 % de ramificações, constituídas de gentiobiose ou glucose (R).

O fungo *Trichoderma harzianum* Rifai é um micoparasita do solo que tem sido utilizado como agente de controle biológico, devido a sua capacidade de atacar uma grande variedade de fungos fitopatógenos responsáveis por infecções em plantas. A presença de β -1,3-glucanases tem sido relacionada diretamente com estas interações entre espécies de *Trichoderma* e o meio ambiente. A produção de β -1,3-glucanases por este fungo aumenta significativamente quando o meio de cultivo é suplementado com paredes celulares fúngicas ou β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucanas extracelulares.

As β -1,3-glucanases fúngicas têm sido muito estudadas e utilizadas na obtenção de protoplastos e de outras organelas intracelulares das células microbianas, na indústria alimentícia e em rações animais como pré-bióticos, entre outros. Estas hidrolases são específicas para substratos que contêm seqüências lineares de três ou mais unidades de glucose, unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3). Entretanto, elas também podem atuar sobre glucanas que apresentam um grau de substituição moderado de resíduos de glucose.

Os fungos *T. harzianum* Rifai e *B. rhodina* MAMB-05 quando cultivados em botriosferana como única fonte de carbono, produziram β -glucanases que atuaram especificamente sobre determinadas ligações β -glucosídicas em resposta às ligações presentes

na estrutura desta β -glucana. Estas β -glucanases específicas produzidas por *T. harzianum* Rifai podem atuar sobre β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucanas, como a laminarina e o próprio botriosferana, resultando oligossacarídeos que poderão apresentar atividade biológica e/ou caráter prebiótico.

Novas aplicações para os oligossacarídeos têm sido desenvolvidas nas áreas de alimentos (principalmente no desenvolvimento de prebióticos), rações animais, cosméticos e também como agentes imunomoduladores; e requerem a síntese específica de oligossacarídeos através de processos tecnicamente e economicamente viáveis.

Um maior conhecimento sobre a produção, síntese e regulação das β -glucanases é de grande interesse biotecnológico, pois certamente irá contribuir para a geração de novas tecnologias para a obtenção de fármacos, alimentos nutracêuticos e outros produtos. Dado ao exposto acima e considerando a importância da ação das β -1,3-glucanases para a obtenção de gluco-oligossacarídeos, estão descritos a seguir os objetivos da presente tese.

2 OBJETIVOS

- Otimizar os parâmetros de fermentação pH inicial, dias de cultivo e aeração para a produção de β -glucanases específicas pelo *Trichoderma harzianum* Rifai em fermentador de bancada, utilizando o botriosferana como única fonte de carbono;
- Avaliar o mecanismo de ação das β -glucanases parcialmente purificadas, através da produção de gluco-oligossacarídeos a partir de botriosferana, laminarina, paramilo e pustulana;
- Avaliar o perfil de crescimento e a produção de β -glucanases pelos fungos *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 e *Trichoderma harzianum* Rifai crescidos em glucose e botriosferana, separadamente, como únicas fontes de carbono;
- Comparar a produção de β -glucanases pelos fungos *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 e *Trichoderma harzianum* Rifai cultivados em diferentes fontes de carbono;
- Analisar e determinar a conformação espacial da β -glucana botriosferana produzida pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 utilizando técnicas colorimétricas, fluorescência e viscosidade.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 β -Glucanases fúngicas

A degradação enzimática dos polissacarídeos vegetais e microbianos é realizada através da atuação de diversas hidrolases com diferentes especificidades e modos de ação. O crescente interesse no estudo das hidrolases está relacionado com o potencial industrial dos produtos de hidrólise de seus substratos (BES et al., 1987; WARREN, 1996; GIESE et al., 2003).

A atividade das β -glucanases ocorre em todos os estágios do ciclo de vida fúngico, incluindo a autólise, e está associada principalmente aos processos de sobrevivência, degradação de polissacarídeos e patogenicidade (SANTOS et al., 1979; VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS et al., 1998; NORONHA et al., 2000; ROJO et al., 2007).

As enzimas capazes de hidrolisar β -(1 \rightarrow 3)- e β -(1 \rightarrow 6)-glucanas têm sido classificadas de acordo com a Tabela 1. As β -1,3-glucanases fúngicas foram primeiramente observadas em preparações de celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*, sendo posteriormente classificadas como enzimas constitutivas presentes na maioria das espécies fúngicas. Estas enzimas apresentam dois mecanismos de ação distintos: (a) endo-, constituindo uma ação hidrolítica aleatória na cadeia polissacarídica, resultando em oligossacarídeos de maior massa molar; (b) exo-, produzindo glucose como único produto de hidrólise (STONE, 1957; REESE; MANDELS, 1959). Recentemente, uma endo- β -1,3-glucanase foi descrita por apresentar atividade de glicosintetase e favorecer a formação de oligossacarídeos (LIESHOUT et al., 2004).

Tabela 1: Classificação das enzimas responsáveis pela hidrólise de β -(1 \rightarrow 3)- e β -(1 \rightarrow 6)-glucanas.

Enzima	Classificação
exo- β -1,3-glucanases	(EC 3. 2. 1. 58) β -D-1,3-glucana glucohidrolase
endo- β -1,3-glucanases	(EC 3. 2. 1. 6) β -D-1,3-glucana glucanohidrolase
β -1,6-glucanases	(EC 3. 2. 1. 75) β -D-1,6-glucana glucanohidrolase
β -glucosidades	(EC 3. 2. 1. 21) β -D-glucosídeo glucohidrolase

As β -1,3-glucanases são específicas para substratos contendo seqüências lineares de três ou mais unidades de glucose unidas através de ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 3) contendo uma extremidade terminal não-redutora. No entanto, um grau de substituição moderado de resíduos de glucose pode ser tolerado, e as β -1,3-glucanases podem atuar sobre β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucanas, por exemplo (MANNERS et al., 1976). As β -glucosidases também possuem um papel na degradação de β -glucanas, e atuam em sinergismo com as β -glucanases (PITSON et al., 1997).

A atividade das β -1,6-glucanases tem estado associada à atividade das β -1,3-glucanases na maioria dos microrganismos. A ocorrência de glucanas do tipo β -(1 \rightarrow 6) na natureza é rara, sendo que geralmente as ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 6) ocorrem em conjunto com ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3) em polímeros produzidos por algas, leveduras, fungos e bactérias (PITSON et al., 1991; MARTIN et al., 2006a).

Assim como as β -1,3-glucanases, as β -1,6-glucanases são constitutivas e nem todos os microrganismos produtores de celulasas (β -1,4-glucanases) e de β -1,3-glucanases são produtores destas enzimas. O mecanismo de ação destas enzimas é tipo endo, ou seja, elas atuam aleatoriamente hidrolisando o substrato, geralmente a β -(1 \rightarrow 6)-glucana fúngica pustulana (REESE; PARRISH; MANDELS, 1961).

A ocorrência de atividade de β -1,3-glucanases e β -1,6-glucanases tem sido relatada em diversos fungos produtores de EPS, como o *Sclerotium glucanicum*, *Acremonium* sp., *A. persicinum*, *Schizophyllum commune* e *B. rhodina* (RAPP, 1989; PITSON et al., 1991; 1993; JAYUS; MCDUGALL; SEVIOUR, 2002; GIESE et al., 2005; CROGNALE et al., 2007). Porém, a relação entre a produção de β -glucanases e a síntese e degradação das β -glucanas extracelulares pelos mesmos fungos ainda não está bem estabelecida.

A produção de β -1,3-glucanases por fungos que não produzem EPS é geralmente estimulada pela presença de paredes celulares de outros microrganismos (BARA; LIMA; ULHOA, 2003). A expressão de β -glucanases também pode ser influenciada pela quantidade de β -glucanas contendo ligações glicosídicas dos tipos β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) presentes no meio de cultivo, que atuam como agente indutor (NORONHA et al., 2000; GIESE et al., 2005).

Os microrganismos não produzem uma β -glucanase específica, e sim, um conjunto de enzimas com propriedades diferentes (massa molar, pH e temperatura ótimos), porém, com a mesma especificidade (JAYUS et al., 2001; BARA; LIMA; ULHOA, 2003; MARTIN et al., 2006b). O *T. harzianum*, por exemplo, tem sido descrito como produtor de

um complexo enzimático constituído por sete β -1,3-glucanases quando cultivado na presença de laminarina (VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS; LEAL-MORALES; HERRERA-ESTRELLA, 1998).

No caso dos fungos onde a síntese de β -glucanases é regulada por repressão catabólica o excesso de glucose, ou outra fonte de carbono facilmente fermentável, pode reprimir a produção de β -glucanases. Esta forma de controle tem sido observada em *Neurospora crassa*, *Penicillium italicum*, *S. glaucanicum*, *S. rolfsi* e *S. commune*, entre outros (RAPP, 1989).

As diferenças existentes na regulação e a síntese das β -glucanases fúngicas podem ser explicadas pelo papel metabólico destas enzimas, que podem acompanhar o desenvolvimento celular ou ocorrer durante a fase estacionária de crescimento. Neste último caso, a desrepressão da formação de β -glucanases pode envolver autólise dos micélios fúngicos e a degradação do EPS produzido pelo próprio fungo (SANTOS; VILLANUEVA; NOMBELA, 1977; DEL REY; GARCÍA-ACHA; NOMBELA, 1979; RAPP, 1992).

3.2 Aplicações biotecnológicas das polissacaridasas

As β -1,3-glucanases são consideradas proteínas relacionadas à patogênese, devido à habilidade peculiar de hidrolisar β -(1 \rightarrow 3)-glucanas lineares ou ramificadas, que constituem as paredes celulares microbianas, sendo, portanto, bastante aplicadas no controle biológico (HRMOVA et al., 1997). O fungo micoparasita *Verticillium fungicola* penetra na parede celular de *Agaricus bisporus* através do efeito combinado de enzimas hidrolíticas, especialmente de β -1,6-glucanases e pressão mecânica (AMEY et al., 2003). As β -1,3-glucanases também constituem as proteínas de defesa de algumas plantas contra o ataque de fitopatógenos, atuando sobre as β -glucanas das paredes celulares destes microrganismos (ESQUERRÉ-TUGAYÉ, BOUDART; DUMAS, 2000).

A adição de β -glucanases nas rações destinadas aos animais permite aumentar a digestibilidade das β -glucanas presentes nos grãos de trigo, cevada, aveia e centeio, entre outros (KIRK; BORCHET; FUGLSANG, 2002). Elas atuam hidrolisando as β -glucanas, permitindo a ação das enzimas endógenas e a fermentação da flora microbiana (COSSON et al., 1999; YIN et al., 2001). Estas hidrolases também têm sido utilizadas no preparo do mosto para fabricação de cerveja (MCCARTHY et al., 2005).

Conseqüentemente, as enzimas hidrolíticas podem ser utilizadas na obtenção e isolamento de protoplastos em fungos, além de extratos livres de células e

organelas usadas em estudos bioquímicos (BIELECKI; GALAS, 1991; MURALIDHAR et al. 2003). Os métodos mecânicos utilizados para extração de proteínas intracelulares são inadequados por não apresentarem especificidade (SALAZAR et al., 2001).

As β -glucanases também têm sido empregadas na modificação e síntese de carboidratos. Esta aplicação é decorrente da alta especificidade que lhes são peculiar e que colabora na revelação de aspectos da estrutura fina de β -glucanas, e da composição de paredes celulares fúngicas, os quais, por sua vez, não seriam reconhecidos através dos estudos químicos (SUTHERLAND, 1984; SCHMID et al., 2001). Estudos sobre sua estrutura e conformação utilizando β -glucanases podem auxiliar no entendimento sobre o seu modo de atuação (PITSON; SEVIOUR; McDOUGALL, 1993) e também na obtenção de oligossacarídeos que apresentem maior atividade biológica (MIYANISHI et al., 2003).

As β -glucanases são ainda muito utilizadas no processo de vinificação, onde a presença de β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucana produzidas por *Botrytis cinerea* dificulta os processos de clarificação e filtração durante a produção de vinho. A aplicação efetiva da enzima melhora a filtração, reduz custos de reposição de filtros, tempo de filtração, além de promover a produção de um vinho de qualidade consideravelmente melhor (ELVING; PEDERSEN, 2003; ROLDÁN et al., 2006).

3.3 Obtenção de oligossacarídeos

Alguns oligossacarídeos são encontrados na forma livre em frutas, vegetais, leite e mel, e outros, como a maltose e a celobiose, são obtidos a partir de hidrólise química ou enzimática do amido e celulose, respectivamente (HIRAYAMA, 2002; ALMEIDA; PASTORE, 2004). Hexassacarídeos, heptassacarídeos e nonassacarídeos também têm sido obtidos por via sintética, através de reações de síntese orgânica mediadas por enzimas microbianas como hidrolases e transferases (MONSAN; PAUL, 1995; ZHANG; KONG, 2003; YANG; KONG, 2005). Os oligossacarídeos mais estudados não derivados da celulose estão apresentados na Tabela 1.

Os oligossacarídeos constituem uma classe de biomoléculas que podem ser utilizadas em processos biológicos de reconhecimento, como infecções virais e bacterianas, adesão celular, transdução de sinais e comunicações intercelulares (WONG, 1995; DAVIES; CHARNOCK; HENRISSAT, 2001). O grande potencial de aplicações destes açúcares nas áreas de alimentos, rações animais, fármacos, cosméticos e também como agentes imunomoduladores e prebióticos tem promovido a condução de novas pesquisas para

viabilizar sua obtenção e elucidar suas propriedades biológicas e funcionais (REMAUD-SIMEON et al., 2000).

Tabela 2: Principais oligossacarídeos com aplicação biotecnológica.

Oligossacarídeos	Fórmulas Moleculares
Fruto-oligossacarídeos	$(\text{Glu})_{\alpha 1 \rightarrow 2}(\text{Fru})_{\beta 2 \rightarrow 1\text{Fru}}_n$
Xilo-oligossacarídeos	$(\text{Xil})_{\beta 1 \rightarrow 4(\text{Xil})}_n$
Malto-oligossacarídeos	$(\text{Glu})_{\alpha 1 \rightarrow 4(\text{Glu})}_n$
Isomalto-oligossacarídeos	$(\text{Glu})_{\alpha 1 \rightarrow 6(\text{Glu})}_n$, $(\text{Glu})_{\alpha 1 \rightarrow 6(\text{Glu})_{\alpha 1 \rightarrow 4\text{Glu}}}_n$
Galacto-oligossacarídeos	$(\text{Lac})_{\beta 1 \rightarrow 4(\text{Gal})_{\beta 1 \rightarrow 4(\text{Gal})}_n}$
Transgalacto-oligossacarídeos	$(\text{Lac})_{\beta 1 \rightarrow 4(\text{Gal})_{\beta 1 \rightarrow 4(\text{Gal})}_n}$ $(\text{Lac})_{\beta 1 \rightarrow 4(\text{Gal})_{\beta 1 \rightarrow 6(\text{Gal})}_n}$
Laminari-oligossacarídeos	$(\text{Glu})_{\beta 1 \rightarrow 3\text{Glu}}_n$
Gentio-oligossacarídeos	$(\text{Glu})_{\beta 1 \rightarrow 6\text{Glu}}_n$
Lactosacarose	$\text{Gal}_{\beta 1 \rightarrow 4\text{Glu}} \beta 1 \rightarrow 2\text{Fru}$
Lactulose*	$\text{Gal}_{\beta 1 \rightarrow 4\text{Fru}}$

*Composto semi-sintético. Glu, glucose; Fru, frutose; Xil, xilose; Lac, lactose; Gal, galactose.

A síntese de oligossacarídeos é mais difícil que a síntese de biopolímeros como ácidos nucleicos ou peptídeos, devido ao número de possibilidades de combinação entre as unidades monoméricas de açúcares e a introdução estereo-específica de ligações glicosídicas (TOLSTOGUZOV, 2004; BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006). Os oligossacarídeos bioativos podem ser obtidos através de síntese (química ou enzimática) ou da despolimerização de polissacarídeos (física, química ou enzimática), como descrito a seguir.

3.3.1 Processos físicos

Os procedimentos físicos são os menos utilizados na produção e extração de oligossacarídeos funcionais por não apresentarem seletividade e não serem específicos. Um dos métodos recentes descritos na literatura é o uso de radiação de energia ionizante, até então utilizada como agente de ligação (*cross-linking*) entre polímeros artificiais (AL-ASSAF et al., 2006).

Os métodos mais comuns envolvem mudanças drásticas de pH e temperatura, uso de microondas ou ultrasonicação (BEKERS et al., 2005). ZHANG et al (2005) obtiveram misturas oligossacarídicas de diferentes massas molares retendo a estrutura química e conformação nativa da esquizofilana, uma β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)-glucana produzida pelo

fungo *Schizophyllum commune*, através da degradação por irradiação ultra-sônica de alta energia.

A ultrasonicação e o uso de microondas em pH 1,5 provocaram a hidrólise da xilana extraída de sementes de tamarindo, resultando em xilo-oligossacarídeos (VODENICAROVÁ et al., 2006). O tratamento com microondas também foi utilizado na obtenção de malto-oligossacarídeos a partir de hidrólise ácida de amilose, substituindo a etapa convencional de tratamento térmico (WARRAND; JANSSEN, 2007). Atualmente, estudos sobre a obtenção de celo-, malto- e xilo-oligossacarídeos através de processos físicos de colisão utilizando ciclotrons (FT-ICR) e quadropolos elétricos (QIT) também têm sido investigados (PASANEN; JÄNIS; VAINIOTALO, 2007).

3.3.2 Processos químicos

Dentre os procedimentos químicos utilizados na síntese de oligossacarídeos, se destacam as reações de condensação e hidrólise ácida. Porém, o primeiro método apresenta alguns inconvenientes e as etapas requeridas para a separação e purificação dos produtos são caras e apresentam baixo rendimento (NING et al., 2003). Um exemplo é a produção de gentio-oligossacarídeos por reações de condensação em bloco “Konigs-Knoorr” entre acetobromo-açúcares e oligossacarídeos pré-formados (KIYOSHI et al., 1974).

A síntese orgânica pode ocorrer também na presença de catalisadores como o composto trimetilsililtrifluormetanossulfonato (TMSOTf) e a partir de aceptores 4,6-*O*-benzilideno-glucopiranosil, os quais têm sido bastante utilizados na formação das ligações glicosídicas tipo β -(1→3) na síntese de derivados com estrutura química correspondente à de exopolissacarídeos como a esquizofilana, epiglucana e lentinana (HE; YANG; DU, 2002).

As reações de hidrólise ácida usadas para a obtenção de oligossacarídeos devem ser controladas em termos de concentração de ácido, tipos de ácidos empregados e tempo de hidrólise. Um dos inconvenientes pode ser a formação de produtos colaterais como furfural, quando estão presentes pentoses, ou hidroximetil-furfural, quando as hexoses fazem parte da composição de polissacarídeos.

A hidrólise ácida parcial se caracterizou como uma técnica útil na análise estrutural dos polissacarídeos (VESSELS; RADDING, 1993). Essas moléculas são quebradas de forma randômica gerando uma mistura de oligossacarídeos que uma vez isolados e quimicamente caracterizados auxiliam, pela superposição de seus fragmentos, na dedução da estrutura da macromolécula, tais como seqüência de resíduos e ligações glicosídicas (PAZUR,

1994). Em anos mais recentes verificou-se que muitos oligossacarídeos, principalmente aqueles com seis ou mais unidades monossacarídicas, conservam ou até mesmo potencializam as propriedades biológicas apresentadas por seus polissacarídeos. Provavelmente devido a maior solubilidade destes oligossacarídeos, a menor massa molar e sua conformação favorável à resposta imunológica quando comparados às suas moléculas poliméricas nativas (BLAND; KESHAVARZ; BUCKE, 2004).

Diferentemente da especificidade da hidrólise enzimática, a hidrólise ácida parcial, que é um processo de degradação não seletivo, gera oligossacarídeos de diferentes tamanhos (SCHMID et al, 2001). Apesar disso, uma vantagem da hidrólise ácida está na possibilidade de ser realizada em temperaturas elevadas, promovendo maior fluidez das amostras submetidas a essa condição.

A velocidade da hidrólise ácida total ou parcial de um polissacarídeo não é uniforme, visto que é afetada por alguns fatores como a configuração anomérica das ligações glicosídicas, tamanho do anel hemiacetal, conformação dos monossacarídeos, natureza das ligações glicosídicas, presença de grupos funcionais e intensidade das interações inter e intramoleculares. As formas furanosídicas são mais facilmente hidrolisadas em condições mais suaves do que as piranosídicas; pentapiranosídeos hidrolizam-se mais rapidamente do que os hexapiranosídeos e as ligações glicosídicas (1→6) são mais resistentes à hidrólise do que ligações (1→4), que por sua vez são mais resistentes do que (1→3) e estas mais resistentes do que (1→2) (BIERMANN, 1988; CORRADI DA SILVA et al, 2006).

Se por um lado esse comportamento heterogêneo dos açúcares frente à hidrólise ácida total é desvantajoso, para a hidrólise ácida parcial é extremamente valioso, pois diferentes condições de reação podem gerar fragmentos diferentes que auxiliam na determinação da estrutura macromolecular (CORRADI DA SILVA et al, 2005). Portanto, se a reação for controlada por curvas de hidrólise apropriadas, selecionando-se o tipo de ácido, tempo e temperatura de reação haverá geração de fragmentos de diferentes massas molares, que poderão ser separados por procedimentos cromatográficos como filtração em gel, troca-iônica, carvão-Celite e outros (BAO; FANG; LI, 2001; CORRADI DA SILVA et al, 2005), sendo que o uso de eletroforese capilar também vem se destacando (GONÇALVES et al., 2005).

Uma curva de hidrólise apropriada pode indicar o momento que a despolimerização deve ser interrompida e as condições devem ser controladas de modo a reduzir, ao mínimo, a destruição dos açúcares, ou mesmo impedir a re-polimerização dos

fragmentos pela reversão ácida, com a conseqüente formação de produtos indesejáveis (BIERMANN, 1988).

Os ácidos mais utilizados na hidrólise são sulfúrico, clorídrico e trifluoracético (JOHANSSON et al, 2006). Segundo BAO, FANG e LI (2001), a fragmentação parcial de um polímero original, pode ser efetuada com ácido trifluoracético. A vantagem na utilização deste ácido deve-se à sua remoção por evaporação sob pressão reduzida e à eliminação da etapa de neutralização por carbonato de bário, necessária quando o ácido sulfúrico é utilizado como catalizador da hidrólise (UKAI et al, 1982).

Segundo JOHANSSON et al (2006) fragmentos de oligossacarídeos com ligações β -(1 \rightarrow 3), alternados por ligações β -(1 \rightarrow 4) podem ser obtidos a partir dos polímeros originais, geralmente β -glucanas extraídas de cereais como aveia e cevada, a partir de hidrólise ácida em temperaturas elevadas. A extração de xilo-oligossacarídeos de xilana de semente de algodão foi realizada com ácido sulfúrico (0,125 M) a 90 °C (SUN et al., 2002).

A produção de oligossacarídeos a partir de polissacarídeos também é uma ferramenta essencial para determinar o padrão complexo de substituição mostrado por diversas galactanas, por exemplo. A hidrólise ácida parcial, desenvolvida na presença do complexo borano-4-metil morfolina, um agente redutor ácido estável, tem sido usada de forma eficiente na obtenção de oligossacarídeos a partir das galactanas. Este procedimento (hidrólise redutiva parcial) permite uma quebra seletiva das ligações 3,6-anidro galactopiranosídicas, enquanto grupos sulfato são retidos substancialmente (GONÇALVES et.al., 2002).

Um oligossacarídeo, caracterizado como gentiohexaose, foi obtido através da hidrólise ácida parcial da botriosferana, uma β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucana extracelular produzida pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*. A hidrólise foi realizada com a presença de ácido trifluoracético 0,2 M à 100 °C durante 4 horas (SILVA et al., 2008).

A despolimerização de polissacarídeos através do processo Fenton é uma alternativa à hidrólise ácida (Figura 2), porém a síntese de oligossacarídeos através deste método não é controlada. Neste método, a presença de íons cobre complexados com polissacarídeos favorecem a formação de radicais hidróxi (OH \cdot), sendo que estas espécies reativas podem atuar sobre os polissacarídeos causando a despolimerização. Esta reação ocorre naturalmente em paredes celulares de plantas e tem sido utilizada *in vitro* para obtenção de fragmentos polissacarídicos (FRY et al., 2001; BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006).

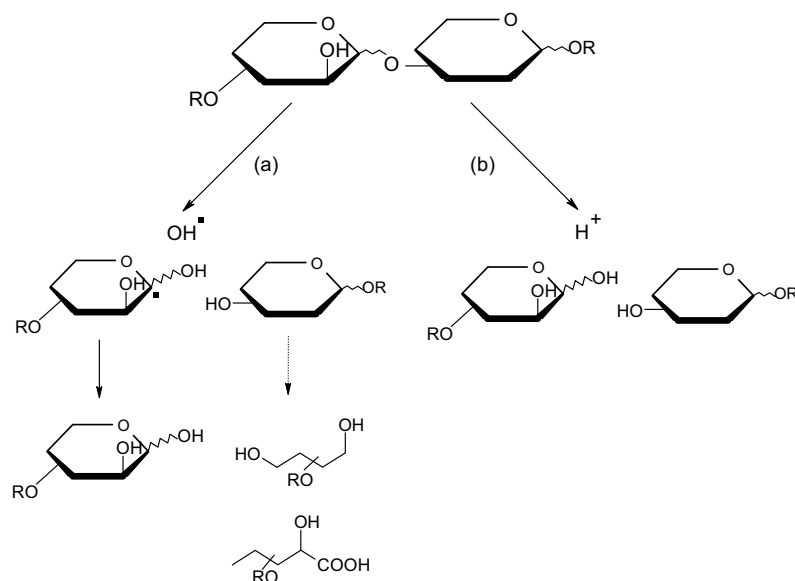


Figura 2. Mecanismo de reação da depolimerização via radical (a) e hidrólise ácida (b).

3.3.3 Processos enzimáticos

O uso de enzimas para modificar estes exopolissacarídeos e ampliar seu potencial de aplicação biotecnológica, tem representado uma alternativa devido à alta especificidade destas proteínas em relação aos seus substratos. Dentre as reações enzimáticas utilizadas na obtenção de oligossacarídeos tem se destacado as reações de hidrólise, transglicosilação e isomerização.

3.3.3.1 Hidrólise enzimática

As hidrolases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas e possuem ampla aplicação na indústria de alimentos constituindo uma ferramenta fundamental para a hidrólise de polissacarídeos ou oligossacarídeos (CRIMMINS; TABET, 2001). Apesar da alta especificidade sua aplicação ainda tem sido restrita, devido ao baixo rendimento. Entretanto, este constitui um problema que pode ser resolvido através do reciclo do substrato não utilizado na reação (MAITIN; RASTALL, 2004).

As reações de hidrólise enzimática consistem na remoção de prótons das moléculas de água para formar moléculas de oligossacarídeos e íons hidróxidos a partir de um polímero, tais como o amido ou a xilana, pela ação catalítica de enzimas hidrolases. A ação destas enzimas é classificada como exo-, quando atua a partir da extremidade terminal não-redutora; e endo-, constituindo uma ação hidrolítica randômica sobre o substrato, produzindo

mono-, di- e oligossacarídeos (VANDAMME; SOETAERT, 1995; RAMESH; THARANATHAN, 2003).

Dentre as hidrolases mais utilizadas na produção de oligossacarídeos não-celulolíticos se destacam as amilases, glucanases e inulinases. As α -amilases (EC 3.3.1.1; α -1 \rightarrow 4-glicano-4-glicanohidroxilase) produzidas por diferentes cepas de *Bacillus subtilis* têm sido extensivamente utilizadas na obtenção de malto-oligossacarídeos por α -amilase a partir de amido presente no bagaço-de-cana (KIMURA, 2000; NAGARAJAN; RAJAGOPALAN; KRISHNAN, 2006).

As exo-inulinases (EC 3.2.1.80; β -D-frutopiranosídeo-frutohidrolase) clivam ligações frutofuranosídicas seqüenciais a partir de ligações do tipo β -(2 \rightarrow 1), e as endo-inulinases (EC 3.2.1.7; β -D-frutano-frutanohidrolase) hidrolisam as ligações internas da inulina (polissacarídeo da frutose com uma unidade de glicose terminal) produzindo uma série de fruto-oligossacarídeos (KULMINSKAYA et al., 2003; CHENG; DUAN; SHEU, 2005).

A obtenção de gluco-oligossacarídeos a partir de β -(1 \rightarrow 3)-glucanas foi realizada através da ação de β -1,3-glucanases fúngicas (GIESE et al., 2006; GRANDPIERRE et al., 2008). Além de serem utilizadas na obtenção de oligossacarídeos, as reações de hidrólise enzimática de β -glucanas também auxiliam na caracterização estrutural, na determinação de suas propriedades reológicas e farmacológicas e de seus fragmentos (GIESE et al., 2003).

Outro tipo de hidrólise que apresenta grande potencial biotecnológico é a hidrólise enzimática de resíduos agrícolas. Através da ação de xilanases, xilo-oligossacarídeos podem ser obtidos a partir de espigas de milho (MOURA et al., 2007). Subprodutos da agroindústria, tais como derivados da mandioca e da cana, também têm sido utilizados para este fim (RAUPP et al., 2002).

3.3.3.2 Transglicosilação e hidrólise reversa

A síntese catalisada por enzimas representa uma alternativa interessante aos métodos químicos clássicos por permitir o controle da regioseletividade e da estereoquímica dos produtos finais de reação (PERUGINO et al., 2004). Este processo envolve duas classes de enzimas, as glicosidases e as glicosil transferases e tem contribuído para a obtenção de oligossacarídeos difíceis de serem produzidos pelos métodos convencionais de

despolimerização e hidrólise enzimática (MONSAN; PAUL, 1995; SHODA; FUJITA; KOBAYASHI; 1998).

As glicosil transferases participam tanto de reações de transferência intramolecular como de transferência intermolecular (AJISAKA; YAMAMOTO, 2002). Estas enzimas são produzidas por fungos, leveduras e bactérias e são utilizadas como biocatalisadores livres ou imobilizados, sendo que paredes celulares de leveduras como *S. cerevisiae* e *P. pastoris* também têm sido utilizadas como fontes de enzima (ABE; SHIMMA; JIGAMI, 2003; WATANABE et al., 2006).

As glicosidases ocorrem em todos os seres vivos e catalizam a clivagem hidrolítica de resíduos terminais de D-glicosil em polissacarídeos e glicoproteínas, bem como em seus derivados (REZENDE; GUIMARÃES, 2004). Nos microrganismos, as glicosidases fazem parte de um complexo enzimático de degradação da celulose, responsável pela hidrólise da celobiose e de outros oligossacarídeos pequenos utilizados como fonte de energia em processos de fitopatogenicidade (NAKKHARAT; HALTRICH, 2006).

Estas enzimas também podem atuar na síntese de ligações glicosídicas *in vitro*, em condições de reação de hidrólise reversa, sob condições termodinamicamente controladas em alta temperatura ou cineticamente controladas na presença de açúcares nucleotídeos ativados (DAVIES; CHARNOCK; HENRISSAT, 2001).

No primeiro caso, as reações requerem ainda concentrações elevadas de substrato e baixa atividade de água para a síntese imediata do produto (LIESHOUT et al., 2004; GAUR et al., 2006). Nas reações sob controle cinético há a formação de um composto intermediário enzima-doador glicosil, o qual é então retido pelos grupos nucleofílicos para o alongamento da cadeia do oligossacarídeo (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002).

Estas reações de condensação são de simples execução e, se a enzima for escolhida corretamente, pode apresentar seletividade absoluta (AJISAKA; YAMAMOTO, 2002; MAITIN; RASTALL, 2004). A regioseletividade destas reações pode ser controlada variando-se a fonte de enzima, sistema de solvente e a estrutura do acceptor glicosídeo (MURATA; USUI, 2000).

Os fruto-oligossacarídeos (FOs) podem ser obtidos a partir da transfrutossilagem da sacarose pela ação de β -frutosilfuranosídeses (PASSOS; PARK, 2003). A levedura *Scwhanniomyces occidentalis*, por exemplo, é produtora de uma enzima β -frutofuranosídesase capaz de atuar sobre a sacarose para produzir 6-cestose, um oligossacarídeo constituído por moléculas de frutose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(2 \rightarrow 6) (ÁLVARO-BENITO et al., 2007). Os FOs podem ser obtidos industrialmente por ação de β -

frutosilfuranosidases de *Aspergillus niger* sobre a beterraba (RIVERO-URGELL; SANTAMARIA-ORLEANS, 2001).

Os transgalacto-oligossacarídeos (TGOs) são obtidos através da transgalactosilação da lactose por ação das β -galactosidases. Os produtos finais desta reação apresentam uma grande variabilidade de ligações glicosídicas entre os monômeros de galactose e o terminal redutor de glucose, como as ligações β -(1 \rightarrow 2); β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 4); além da ocorrência de ramificações com resíduos de glucose ao longo da cadeia. Estas características estruturais são importantes, pois implica na baixa resistência à acidez gástrica (BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006).

As β -galactosidases também catalisam reações de transgalactosilação que apresentam como produto final galacto-oligossacarídeos (GOs), atuando na hidrólise da lactose e síntese do oligossacarídeo a partir do mesmo substrato (RABIU et al., 2001; TZORTZIS et al., 2005). O rendimento e algumas reações de transgalactosilação foi em torno de 70 % (LEE et al., 1997).

A produção de isomalto-oligossacarídeos, como a panose, envolve reações de transglicosilação catalisadas por α -glicosidases utilizando amido como substrato. O rendimento da produção destes açúcares pela ação da α -glicosidase de *Xantophyllomyces dendrohous* sobre a maltose foi 47 % (FERNANDÉZ-ARROJO et al., 2007).

A síntese de laminari-oligossacarídeos através de transglicosilação com β -glucosidases também tem sido descrita. β -(1 \rightarrow 6; 1 \rightarrow 3)-gluco-oligossacarídeos foram sintetizados a partir de celbiose utilizando-se duas preparações diferentes de β -glucosidases, uma de *Sclerotinia sclerotiorum* e outra de *Aspergillus niger*. Dentre os produtos de reação obtidos, o trissacarídeo β -Glc-(1 \rightarrow 6)- β -Glc-(1 \rightarrow 3)-Glc foi sintetizado preferencialmente pela β -glucosidase de *S. sclerotiorum* (KAWAI et al., 2004; SMAALI et al., 2004). Os gentio-oligossacarídeos foram obtidos através de reações de transglicosilação com β -glucosidases fúngicas a partir de uma alta concentração de glucose (UNNO et al., 2005; SANZ et al., 2006).

Através das reações de transglicosilação, alquil- β -xilósídeos e xilobiosídeos têm sido obtidos na presença de xilana e álcoois, sendo que os álcoois primários são melhores aceptores para este tipo de reação. JIANG et al (2004), utilizaram uma xilanase produzida por *Thermotoga maritima* MSB8 e obtiveram rendimentos de 33 % em alquil- β -xilósídeos e 50 % em xilobiosídeos como produtos finais da reação.

A endo- β -(1,4)-glucanase produzida por *A. niger* participa da reação de transferência de resíduos de celo-oligossacarídicos para moléculas de 1-octanol na presença

de celopentaose como oligossacarídeo doador, dando origem a 1-oetil-celotriosídeo (AKIBA; YAMAMOTO; KUMAGAI, et al., 1999). A *exo*-(1,5)- α -L-arabinanase produzida por *P. chrysogenum* quando na presença de grupos aceptores como álcoois alifáticos e alguns açúcares, apresentou atividade de trans-arabinosilação e sendo o glicerol foi um aceptor melhor para a formação de derivados arabino-oligossacarídicos (SAKAMOTO; FUJITA; KAWASAKI, 2004).

Estas reações também foram utilizadas como ferramenta na obtenção de polissacarídeos, como o caso da amilase de *Dictyoglomus thermophilum* que atuou sobre malto-oligossacarídeos e cicloamiloses e produziu uma cadeia de amilose de aproximadamente 200 kDa (NAKAJIMA et al., 2004).

O rendimento das reações catalisadas por glicosidases é baixo devido à possibilidade de reversão da reação, que promove não somente a glicosilação, como também a hidrólise dos produtos formados (SHODA; FUJITA; KOBAYASHI; 1998). Assim, uma nova alternativa de síntese de oligossacarídeos é o envolvimento de glicosil hidrolases mutantes que apresentam um aminoácido não-nucleofílico no sítio catalítico, em substituição ao aminoácido nucleofílico presente no sítio ativo das glicosidases (JAKEMAN; WITHERS, 2002).

Estas enzimas, denominadas glicosintases, catalisam eficientemente a condensação de monossacarídeos, mas não apresentam atividade hidrolítica. Possuem também alta régio- e estereoseletividade e podem ser facilmente obtidas, sendo amplamente utilizadas na produção de oligossacarídeos em escala industrial (MORACCI; TRINCONE; ROSSI, 2001; KOIZUMI, 2003; KIM et al., 2005).

Como exemplos de reações catalisadas pelas glicosiltransferases se destacam a produção de ciclomaltopentaose com ligações α -(1 \rightarrow 6) a partir da glucanotransferase produzida por *Bacillus circulans* e a obtenção de fruto-oligossacarídeos pela ação da frutossiltransferase sobre a sacarose (WATANABE et al., 2006; GHAZI et al., 2006).

3.3.3.3 Isomerização

A lactulose é um dissacarídeo semi-sintético constituído de galactose e frutose resultante da isomerização alcalina da lactose, para a forma de galactosil- β -(1 \rightarrow 4)-frutose (Figura 3). Este dissacarídeo está presente em concentrações significantes em alguns

produtos alimentícios, uma vez que a isomerização pode ocorrer naturalmente, durante o tratamento térmico do leite (BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006).

Entretanto a isomerização apresenta diversos inconvenientes e as etapas requeridas para a separação e purificação destes produtos apresenta alto custo e baixo rendimento. Diversos estudos para a viabilização da bioprodução de lactulose por via enzimática têm sido investigados (KIRK; BORCHET; FUGLSANG, 2006).

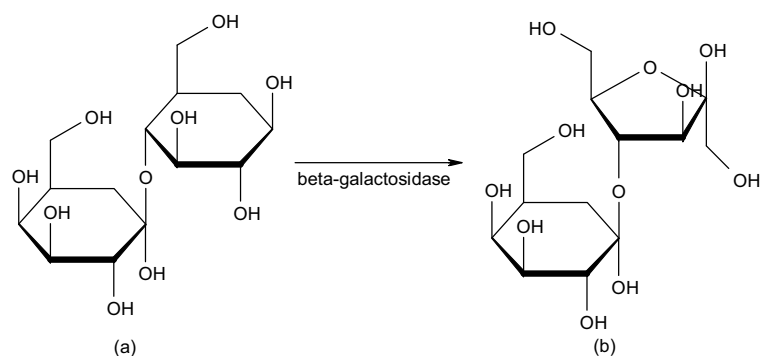


Figura 3. Reação de isomerização da lactose (a) para formar a lactulose (b) por ação da β -galactosidase.

3.3.3.4 Processos fermentativos utilizados na produção de oligossacarídeos

O uso de processos fermentativos para a produção *in vivo* de oligossacarídeos é uma alternativa interessante e viável, uma vez que dispensa o uso de extratos enzimáticos. A produção de galacto-oligossacarídeos a partir da fermentação da lactose por bactérias e leveduras lácticas é a mais utilizada industrialmente (ONISHI; TANAKA, 1998). Os TGOs encontrados em produtos fermentados como o iogurte é resultante da fermentação dos açúcares do leite (lactose e galactose) pelos microrganismos probióticos presentes no meio (HOUDIJK et al., 2002).

O fungo *Aureobasidium pullulans* DSM2404 produz ao menos cinco isoenzimas β -fructofuranosidases quando cultivado em sacarose como única fonte de carbono. Durante o crescimento microbiano, estas enzimas catalizam reações de transfrutossilacção das moléculas de sacarose formando FOs e glucose como produtos finais no meio de cultivo (YOSHIKAWA et al., 2006).

O uso de microrganismos imobilizados em suportes inertes também tem sido muito utilizado, como para a produção de FOs a partir de células imobilizadas de *Penicillium citrinum* KCCM 11663 (PARK et al., 2005).

O potencial de aplicação de sub-produtos e resíduos agrícolas como substratos para a conversão microbiana em produtos de interesse comercial, também tem sido investigado. O melaço de cana, rico em sacarose, tem sido avaliado como substrato para a produção de FOs por *Aspergillus japonicus*-FCL 119T e *Aspergillus niger* ATCC 20611 (DORTA et al., 2006).

A fermentação também constitui uma etapa de pré-purificação de oligossacarídeos formados através de reações de transglicosilação. As reações realizadas a partir de amido para a formação de isomalto-oligossacarídeos (IMOs) têm sido relacionadas aos processos fermentativos para a remoção de açúcares metabolizáveis por leveduras como a glucose, maltose, e maltotriose em detrimento dos oligossacarídeos de interesse (PAN; LEE, 2005).

3.4 Funções dos oligossacarídeos na dieta

Os oligossacarídeos vêm sendo utilizados comercialmente como ingredientes de cosméticos, medicamentos, produtos agrícolas e principalmente na indústria alimentícia (CANO et al., 2006; KIYOHARA et al., 2006). Estes compostos são muitas vezes substituintes do açúcar atuando como adoçantes em alimentos de baixa caloria, e também são adicionados em sucos e refrigerantes para melhorar suas propriedades organolépticas (NAKAKUKI, 2002; KAWASE et al., 2001; OKU; NAKAMURA, 2002). Também atuam como agentes anti-higroscópicos e umectantes, protegendo os alimentos da perda de água (LEE et al., 2004).

Recentemente, o desenvolvimento de novos alimentos/ingredientes alimentares funcionais impulsionou o estudo e a utilização de novos processos biotecnológicos na obtenção de oligossacarídeos visto que a procura vem aumentando gradativamente, devido suas propriedades peculiares (MOURE et al., 2006).

O termo “fibra da dieta” é utilizado para denominar as substâncias presentes nos alimentos que são resistentes às enzimas e que atuam no sistema digestivo (PHILLIPS; OGASAWARA; USHIDA, 2008). As fibras são importantes, pois auxiliam o bom funcionamento do sistema digestivo e evitam o aparecimento de doenças como a síndrome de intestino curto, que consiste de um estado mal absorptivo, bastante comum, após grandes ressecações intestinais (NONINO et al., 2001; MACHADO; SICHIERI, 2002).

A mudança dos hábitos alimentares, principalmente pela população brasileira, tem sido relacionada ao crescente aparecimento de doenças crônicas como a obesidade, aterosclerose, hipertensão, osteoporose e até mesmo alguns tipos de carcinomas.

Pesquisas recentes demonstraram que o *Diabetes mellitus* também está relacionado ao baixo consumo de fibras alimentares pela população adulta no Brasil (MATTOS; MARTINS, 2000).

A promoção da qualidade de vida desde a infância tem servido como apelo das indústrias alimentícias no desenvolvimento e comércio de novos produtos, em função do atual consumo de dietas ricas em gordura e pobres em fibras, entre as crianças e adolescentes (NEUTZLING et al., 2007; VITOLO; CAMPAGNOLO; GAMA, 2007). O uso de aditivos como os oligossacarídeos em alimentos, preferidos por esta faixa etária, como bolos (MOSCATTO; PRUDÊNCIO-FERREIRA; HAULY, 2004), bebidas lácteas (THAMER; PENNA, 2006), iogurtes de soja (FUCHS et al., 2005; HAULY; FUCHS; PRUDÊNCIO-FERREIRA, 2005) são uma alternativa para suprir estas necessidades.

Os prebióticos são constituídos por carboidratos complexos, considerados oligossacarídeos não digeríveis, resistentes às ações de enzimas salivares e intestinais. São ingredientes nutricionais que afetam benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e a atividade de uma ou mais bactérias intestinais benéficas, melhorando a saúde do hospedeiro (ANJO, 2004). Estimulam a proliferação de bactérias intestinais, que produzem ácidos orgânicos e contribuem para a diminuição do pH. Também apresentam benefícios à saúde pela sua atividade antiadesiva, visto que inibem infecções por patógenos entéricos impedindo a adesão destes às células epiteliais gastrointestinais (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2001; SHOAF et al., 2006). Estudos sobre os efeitos antiinflamatórios de prebióticos em inflamações do intestino, diminuição dos níveis de glucose no sangue, assim como dos níveis de colesterol sérico também têm sido relatados (TOSH et al., 2004; LARA-VILLOSLADA et al., 2006).

Os microrganismos intestinais viáveis que afetam benéficamente a saúde proporcionam um balanço da flora microbiana intestinal, são denominados probióticos. Os mais empregados são bactérias, leveduras e bifidobactérias, as que são utilizadas para prevenir ou tratar diversas disfunções gastrintestinais, tais como a intolerância à lactose, constipação, hipersensibilidade alimentar e gastroenterites (KLAENHAMMER, 2000; COPPOLA; TURNES, 2004).

Pesquisas recentes têm demonstrado os efeitos benéficos dos probióticos sobre o equilíbrio bacteriano intestinal, controle do colesterol e de diarreias. As bactérias probióticas atuam produzindo vitaminas, viabilizando a absorção de minerais e elementos traços, produzindo importantes enzimas digestivas, como as β -galactosidases, entre outros (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2001; RAMESH; THARANATHAN, 2003).

Portanto, a presença de bifidobactérias e lactobacilos constituem um critério de indicação de boa saúde por constituírem parte da microflora, sendo importante a ingestão de prebióticos para a sua manutenção. Também auxiliam na proteção contra infecções e alergias durante a infância (BRUZZESE et al., 2006). Os fruto-oligossacarídeos (FOs) são considerados os principais oligossacarídeos com ação prebiótica, sendo adicionados a vários produtos, tais como biscoitos, bebidas, iogurtes, cereais matinais, geléias e doces (YUN, 1996; ROBERFROID, 2002).

Os FOs promovem seletivamente o crescimento de *Acidophilus*, *Bifidus* e *Faecium*, que são bactérias benéficas do trato gastrintestinal (CAMPBELL; FAHEY; WOLF, 1997; PASSOS; PARK, 2003). Ao estimular a flora intestinal, os FOs contribuem para o aumento da produção de ácidos orgânicos e inibem a proliferação de patógenos sensíveis a estas condições (TEN BRUGGENCATE et al., 2003).

O equilíbrio produzido na flora gastrintestinal é responsável por outros benefícios ao metabolismo humano, como a redução da pressão sanguínea em pessoas hipertensas, alteração do metabolismo de ácidos gástricos, redução da absorção de carboidratos e lipídeos, normalizando a pressão sanguínea e lipídeos séricos, melhorando metabolismo de diabéticos (ZAFAR et al., 2004; DUCROS et al., 2005; BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006).

Os xilo-oligossacarídeos (XOs) também atuam como prebióticos, diminuem os níveis de açúcares no sangue e o metabolismo das gorduras (MONSAN; PAUL, 1995; ALONSO et al., 2003). Outros oligossacarídeos, como a lactosacarose, os isomalto-oligossacarídeos (IMOs), galacto-oligossacarídeos (GOs), transgalacto-oligossacarídeos (TGOs), rafinose, estaquiose também têm recebido atenção, visto que podem atuar como fatores de crescimento para bifidobactérias e são utilizados em vários alimentos (ONISHI; TANAKA, 1998; KIHARA; SAKATA, 2002; OKU; URA, 2003; ALMEIDA; PASTORE, 2004; YAMASHITA et al., 2005).

Os gentio-oligossacarídeos apresentam atividade bifidogênica (RYCROFT et al., 2001). Estudos recentes demonstraram que gentio-oligossacarídeos com grau de polimerização (GP) de 2 a 3 unidades glicosídicas, apresentaram melhor resposta como fator de crescimento para as bifidobactérias, que os que apresentavam GP igual a 4 e 5 (SANZ et al., 2006). Por sua vez, os laminari-oligossacarídeos também são capazes de estimular a proliferação de bifidobactérias do ceco (primeira porção do intestino grosso) (SHODA; FUJITA; KOBAYASHI, 1977).

A geração de gases pela microflora intestinal e o mal-estar algumas vezes causado pela ingestão de alimentos contendo prebióticos e probióticos, tende a ser minimizados pelo estudo da ação sinérgica de misturas de oligossacarídeos que parecem diminuir estes efeitos (GHODDUSI et al., 2007).

A eficiência de cada oligossacarídeo como prebiótico depende da sua estrutura e constituição químicas. Somente os neoagaro-oligossacarídeos com alto GP, por exemplo, tem demonstrado um efeito prebiótico similar aos dos FOs (HU et al., 2006).

O número de bifidobactérias no intestino de crianças amamentadas pela mãe é consideravelmente mais saudável, do que os encontrados nos alimentos destinados à crianças em lactação. O leite humano contém oligossacarídeos que promovem a proliferação de determinadas espécies de bifidobactérias. Nos últimos anos, a procura de uma fórmula ideal de probióticos e prebióticos em alimentos para crianças na fase de lactação tem sido crescente (PUCCIO et al., 2007).

3.5 Atividades biológicas dos oligossacarídeos

O conceito de alimento funcional surgiu no Japão, e foi regulamentado em 1991, tendo recebido a denominação "Foods for Specified Health Use" (FOSHU). Segundo a ANVISA, alimentos funcionais são aqueles que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos, através da atuação de um nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento, manutenção e em outras funções normais do organismo humano.

Definidos como produtos, os alimentos funcionais contêm em sua composição algumas substâncias biologicamente ativas, que ao serem adicionados à uma dieta usual, desencadeiam processos metabólicos ou fisiológicos, resultando na redução do risco de doenças e manutenção da saúde (NAGARAJAN; RAJAGOPALAN; KRISHNAN, 2006).

A adição de fibras nestes alimentos deve ser monitorada, para que ao serem ingeridas, não arrastem os nutrientes da dieta tais como lipídeos, minerais, proteínas e carboidratos digeríveis, para as fezes (RAUPP et al., 2002). Os produtos destinados à infância são especialmente controlados, uma vez que metabólitos como o colesterol é essencial para o metabolismo infantil, e alguns oligossacarídeos são utilizados como aditivos alimentares por apresentam ação hipocolesterolêmica (ALLIET et al., 2007).

Os fruto-oligossacarídeos (FOs) aumentam a absorção de cobre, cálcio, magnésio e ferro (ZAFAR et al., 2004; DUCROS et al., 2005; BARRETEAU; DELATTRE;

MICHAUD, 2006; OHTA, 2006; BORYCKA; STACHOWIAK, 2008). Também apresentam um efeito positivo no tratamento de hiperplasia no ceco (NZEUSSEU et al., 2006). As principais propriedades biológicas dos oligossacarídeos como ingredientes funcionais estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Propriedades biológicas dos oligossacarídeos presentes em alimentos funcionais.

Oligossacarídeo	Função
XOs	Promove a formação da vitamina B
Lactosacarose	Aumenta a absorção de cálcio pelo intestino
Hidrolisados de goma guar	Atuam no metabolismo de lipídios diminui a aterogênese
IMOs	Prevenção de cárie dentária
GOs	Aumenta a resistência contra fraturas
TGOs	Promove a absorção de cálcio pelo organismo de mulheres no período pós-menopausa
Lactulose	Atuam na síntese de ácidos graxos de cadeia curta em humanos e na diminuição dos níveis de triglicerídios séricos

XOs, xilo-oligossacarídeos; IMOs, isomalto-oligossacarídeos; GOs, galacto-oligossacarídeos; TGOs, transgalacto-oligossacarídeos.

As propriedades funcionais dos oligossacarídeos estão diretamente relacionadas com a estrutura tridimensional, a qual é responsável por interações com outras biomoléculas (ALMOND 2005; AL-ASSAF et al., 2006).

Os oligossacarídeos têm sido extensivamente utilizados por suas propriedades reológicas como espessantes em emulsões de glucose, aminoácidos e lipídios, administrados por via intravenosa, em pacientes pós-cirúrgicos (STEGINK et al., 1987). Também têm sido estudados na formulação de medicamentos que apresentam liberação controlada de princípios ativos, como agentes carreadores, por apresentarem resistência à ação de glicosidases e outras hidrolases que existem nos organismos (YUASA; HASHIMOTO, 2001; COVIELLO et al., 2005). Estes medicamentos apresentam vantagens sobre as terapias convencionais, as quais podem ser tóxicas por requererem uma alta quantidade do princípio ativo, ou até mesmo serem inefetivas (LANGER, 1995).

Os oligossacarídeos, tanto as ciclodextrinas como os que apresentam conformação em hélice tripla, podem ser utilizados como carreadores de pequenas moléculas como proteínas, peptídeos e ácidos nucléicos. Estas nanopartículas servem como proteção, transporte e entrega das drogas e, uma vez reconhecidas, são rapidamente eliminadas do “*bloodstream*” após a administração intravenosa (LEMARCHAND et al., 2006).

Os gluco-oligossacarídeos bioativos derivados das β -(1 \rightarrow 3)-glucanas estimulam a resposta antiinflamatória mediada pelas células do sistema imune, através da indução de mediadores pró- e antiinflamatórios, como a citocina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e também a isoleucina-1 (IL-1), entre outras. O mecanismo de ação anti-tumoral tem sido relacionado à indução das diversas respostas imunológicas do hospedeiro, principalmente pela ativação das células “*natural killer*” (NK) (PANG et al., 2005).

Os gluco-oligossacarídeos têm sido descritos por apresentarem excelente atividade como agentes imunomoduladores (PANG et al., 2005). A laminaritetraose e laminaripentaose estimularam a atividade fagocítica de granulócitos e macrófagos responsáveis pela fagocitose de tecidos necrosados e pela estimulação das células do sistema imune (JAMOIS et al., 2005). Os oligossacarídeos derivados da curdlana, uma β -(1,3)-glucana linear, aumentaram a produção de TNF- α pelos macrófagos (KATAOKA et al., 2002). Por sua vez, MIYANISHI et al (2003) verificaram a atividade citotóxica em mielomas humanos quando utilizaram uma mistura oligossacarídica de GP \geq 4 provenientes da hidrólise enzimática da laminarina.

O grau de polimerização dos gluco-oligossacarídeos também parece ser fundamental para sua aplicação farmacológica. A laminariheptose tem sido descrita por possui atividade biológica distinta da laminarihexose devido à conformação espacial que a presença de uma molécula de glucose a mais confere ao oligossacarídeo, o que parece favorecer a sua interação com as células imunes humanas (LOWE et al., 2001; BLAND; KESHAVARZ; BUCKE, 2004).

Oligossacarídeos que contêm ácidos e acetais pirúvicos são componentes de diversos fatores antigênicos bacterianos e são, conseqüentemente, alvos potenciais de estudos imunológicos e vacinas sintéticas (GONÇALVES et al., 2002; NABARLATZ et al. 2007). A introdução de grupos iônicos nestas moléculas não só aumentam a solubilidade em água como causam mudanças nas ligações intra- e intermoleculares de hidrogênio aumentando a repulsão entre as cadeias e mudando a sua conformação e suas atividades biológicas (ZHANG et al., 2003). Pesquisas recentes relataram que as maltodextrinas reduziram em até 52 % o câncer de cólon em ratos (VERGHESE et al., 2005). Por sua vez, os XOs tem sido descritos como mais eficientes no tratamento do câncer de cólon que os FOs (HSU et al., 2004).

Os oligossacarídeos constituem uma classe de biomoléculas ativas de grande importância para a saúde humana. Avanços da tecnologia utilizada nos processos de obtenção destes oligômeros são necessários para o desenvolvimento de produtos alimentícios funcionais. O uso de enzimas em detrimento aos processos químicos e físicos tem se tornado

possível, através do uso da engenharia genética na seleção de novas linhagens microbianas mutantes, para a produção destes catalisadores. A conscientização e a adequação dos hábitos alimentares se fazem necessárias para que todos os benefícios destes carboidratos se façam presentes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados no presente trabalho foram o ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, isolado de cancro eucalipto por Barbosa et al (1995), e o deuteromiceto *Trichoderma harzianum* Rifai, isolado de *Aspidosperma* sp. (peroba) por Barbosa (1992).

4.2 Métodos gerais

4.2.1 Meios de cultivo

4.2.1.1 Meio de batata-dextrose-agar (BDA)

Batata	200 g
Dextrose	20 g
Agar	15 g
Água destilada	1000 mL

4.2.1.2 Meio mínimo de sais de Vogel (1956)

O meio mínimo de sais de Vogel foi preparado utilizando-se:

Na ₃ citrato 5.H ₂ O	150,0 g
KH ₂ PO ₄ anidro	250,0 g
NH ₄ NO ₃ anidro	100,0 g
MgSO ₄ 7.H ₂ O	10,0 g
CaCl ₂ 2. H ₂ O	5,0 g
Solução de Elementos Traços	5,0 mL
Solução de Biotina	2,5 mL

A solução de biotina foi preparada dissolvendo-se 5 mg de biotina em 50 mL de água destilada. O volume final foi completado para 1 litro e o pH foi acertado para 5,8. Para preparar os meios de cultivo, esta solução foi diluída 50 vezes em água destilada.

Preparo da Solução de Elementos Traços:

Ácido cítrico	5,0 g
ZnSO ₄ 7.H ₂ O	5,0 g
Fe(NH ₄ SO ₄) ₂ 6.H ₂ O	1,0 g
CuSO ₄ 5.H ₂ O	0,25 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,25 g
H ₃ BO ₃ anidro	0,25 g
Na ₂ MoO ₄ 2.H ₂ O	0,25 g

O volume final da solução de elementos traços foi completado para 100 mL, sob agitação constante à temperatura ambiente.

4.2.1.3 Meio de Vogel-glucose-agar (VGA)

Solução de Vogel	20 mL
Glucose	10 g
Agar	20 g
Água destilada	1000 mL

4.2.1.4 Meio de Vogel-xilose-agar (VXA)

Solução de Vogel	20 mL
------------------	-------

Xilose	10 g
Agar	20 g
Água destilada	1000 mL

4.2.2 Manutenção dos microrganismos

O fungo *B. rhodina* MAMB-05 tem sido mantido em meio BDA inclinado e o fungo *T. harzianum* Rifai tem sido mantido em meio VXA inclinado, ambos a 4°C, com repiques trimestrais.

4.2.3 Produção do botriosferana (EPS)

4.2.3.1 Preparo do inóculo do *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05

Para o preparo do inóculo, o fungo *B. rhodina* MAMB-05 foi transferido para placas de Petri contendo meio VGA, as quais foram incubadas durante 5 dias a 28 °C em estufa bacteriológica. Pequenas porções de hifas foram transferidas para frascos de Erlenmeyer (125 mL), previamente modificados com quatro inserções laterais, contendo 25 mL de meio de Vogel e 5 g/L de glucose como fonte de carbono. Os cultivos foram mantidos sob agitação constante a 180 rpm, 28 °C durante 48 horas. Em seguida, os micélios foram transferidos, assepticamente, para um homogeneizador de células, previamente esterilizado, em seguida foram homogeneizados à velocidade máxima durante 30 segundos. O homogeinato foi centrifugado durante 10 minutos a 7000 x g, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos em uma solução de salina fisiológica estéril. Em seguida, a referida solução foi diluída até se obter um valor de absorvância entre 0,4 e 0,5 a 400 nm.

4.2.3.2 Produção de EPS pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05

Os cultivos foram desenvolvidos em frascos de Erlenmeyer de 2 L contendo 400 mL de meio de Vogel e 50 g/L de glucose (ou frutose, para os experimentos de determinação da conformação espacial) como fonte de carbono. Cada frasco foi inoculado com 16 mL da solução do homogeinato de células, previamente descrito no item 4.2.3.1. Os frascos foram mantidos sob agitação constante à 180 rpm e 28°C durante 72 horas. Os

cultivos foram interrompidos por centrifugação a 7000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados em banho de gelo e dialisados exaustivamente contra água deionizada. Em seguida, foram tratados com três volumes de etanol absoluto, previamente gelado a 4 °C, para precipitar o EPS. Depois de mantidos no mínimo por duas horas na câmara fria a 4 °C, os precipitados de EPS foram então dialisados exaustivamente contra água deionizada e então liofilizados.

4.2.4 Produção de β -glucanases pelos fungos *Trichoderma harzianum* Rifai e *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05

Para o preparo do inóculo, o fungo *T. harzianum* Rifai foi transferido para o meio sólido de VXA, permanecendo incubado durante 7 dias a 28 °C. Uma solução de concentração final igual a 10^7 esporos foi utilizada como inóculo. O fungo *B. rhodina* MAMB-05 foi transferido para o meio sólido de VGA, permanecendo incubado durante 5 dias, ambos a 28°C. Após este período, três discos de 0,7 cm de diâmetro foram utilizados para inocular os cultivos. Frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio de Vogel e diferentes fontes de carbono: extrato de levedura, micélio fúngico de *B. rhodina* MAMB-05 liofilizado (Giese et al., 2005), glucose ou lactose (10 g/L); laminarina ou botriosferana (1,5 g/L) foram inoculados com ambos os fungos, separadamente. Os frascos permaneceram incubados durante 7 dias, sob agitação constante de 180 rpm a 28 °C. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação durante 10 minutos a 7000 x g a 4 °C. O extrato livre de células foi dialisado exaustivamente contra água deionizada e utilizado para a determinação da atividade enzimática.

4.2.5 Otimização da produção de β -1,3-glucanases pelo fungo *Trichoderma harzianum* Rifai em fermentador de bancada

Para o preparo do inóculo, o fungo *T. harzianum* Rifai foi transferido para o meio sólido de VXA, permanecendo incubado durante 7 dias a 28 °C. Após este período, três frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio de Vogel e glucose (10 g/L) foram inoculados com uma solução de esporos, sendo a concentração final igual a 10^7 esporos. Os frascos permaneceram incubados durante 72 horas, sob agitação constante de 180 rpm a 28 °C. Em seguida, os cultivos foram centrifugados (10 minutos a 7000 x g) e o micélio

fúngico sedimentado foi ressuspenso em uma solução de salina fisiológica estéril e Tween-80 (0,1%, v/v), sendo posteriormente utilizado para inocular o fermentador.

A fermentação foi realizada em fermentador de bancada (Technal) com capacidade volumétrica de 2,4 L, equipado com eletrodo de pH, agitador e ar comprimido. A fermentação foi desenvolvida em 600 mL de meio de Vogel e botriosferana (1,5 g/L), como única fonte de carbono a 28 °C sob agitação constante de 120 rpm. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação durante 10 minutos a 7000 x g a 4 °C.

A aeração, o pH ótimo do meio e o tempo de cultivo para a produção de β -glucanases pelo *T. harzianum* Rifai foram otimizados utilizando-se da metodologia de superfície de resposta através de um planejamento fatorial 2^3 -central composto (Tabela 5). As variáveis independentes estudadas para a otimização da produção de β -glucanases (Y_1 = U/mL) foram: x_1 = aeração em vvm; x_2 = pH do meio de cultivo e x_3 = tempo de cultivo em horas. Também foram realizadas as análises de variância e de regressão múltipla utilizando-se o software STATISTICA versão 6.0 (www.statsoft.com) StatSoft Inc., 2001.

Tabela 5: Delineamento estatístico dos experimentos para três variáveis.

Experimentos	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	+1	0	+1
10	0	+1	+1
11	+1	+1	0
12-13	0	0	0

Variáveis independentes	Níveis de variação		
	-1	0	+1
x_1 , aeração em vvm	1,0	1,5	2,0
x_2 , pH inicial	3,0	5,5	8,0
x_3 , tempo de cultivo em dias	2	5	8

4.2.6 Avaliação da produção de β -1,3-glucanases pelos fungos *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 e *Trichoderma harzianum* Rifai através de planejamento de misturas

Para o preparo do inóculo, o fungo *T. harzianum* Rifai foi transferido para o meio sólido de VXA, permanecendo incubado durante 7 dias a 28 °C. Uma solução de concentração final igual a 10^7 esporos foi utilizada como inóculo. O fungo *B. rhodina* MAMB-05 foi transferido para o meio sólido de VGA, permanecendo incubado durante 5 dias, ambos a 28°C. Após este período, três discos de 0,7 cm de diâmetro foram utilizados

para inocular os cultivos. Frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio de Vogel e glucose, lactose e/ou EPS de acordo com o planejamento experimental da Tabela 6. Os frascos permaneceram incubados durante 8 dias, sob agitação constante de 180 rpm a 28 °C. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação durante 10 minutos a 7000 x g a 4 °C. O extrato livre de células foi dialisado exaustivamente contra água deionizada e utilizado para a determinação da atividade enzimática.

As variáveis independentes estudadas para a otimização da produção de β -1,3-glucanases ($Y_1 = U/mL$) foram: $x_1 =$ botriosferana (EPS); $x_2 =$ glucose e $x_3 =$ lactose. Também foram realizadas as análises de variância e de regressão múltipla utilizando-se o software STATISTICA versão 6.0 (www.statsoft.com) StatSoft Inc., 2001.

Tabela 6: Delineamento estatístico do planejamento de misturas.

Experimento *	x_1	x_2	x_3
1	2	0	0
2	0	10	0
3	0	0	10
4	1	5	0
5	0	5	5
6	1	0	5
7	0,7	3,3	3,3
8	0,13	1,7	1,7
9	0,03	6,7	1,7
10	0,03	1,7	6,7

4.2.7 Purificação parcial das β -1,3-glucanases produzidas pelo *T. harzianum* Rifai.

O extrato bruto (600 mL) foi concentrado através da liofilização do sobrenadante do meio de cultivo e ressuscitado em 20 mL de tampão acetato pH 5,0 (25 mM). A enzima bruta concentrada foi submetida à cromatografia de filtração em gel em coluna contendo gel Sephadex-G100 (Pharmacia), apresentando em seu leito um volume de

480 mL de gel. A coluna foi equilibrada com tampão acetato pH 5,0 (50mM), durante 36 horas. A enzima foi eluída com o mesmo tampão, com um fluxo de 15 mL/h, sendo coletadas amostras de 2,5 mL do eluído em cada tubo com o uso do coletor de frações BioRad. O perfil de eluição das proteínas foi acompanhado por leitura da absorvância a 280 nm. As atividades de β -1,3-glucanase, β -1,6-glucanase e β -glucosidase foram determinadas nas frações eluídas, conforme metodologia descrita a seguir. Para avaliar os efeitos do pH e temperatura na atividade das β -1,3-glucanases, as enzimas foram incubadas com tampão acetato ou fosfato 25mM em diferentes pH (3,0-8,0) e temperaturas (40-60 °C). O K_M aparente e a V_{max} foram determinados utilizando-se diferentes concentrações de laminarina (0,1-3,6 mg/mL) através de um programa de análise de dados por regressão não-linear (GraphPad PRISM).

4.2.8 Determinação da atividade de β -1,3-glucanases

A medida da atividade de β -1,3-glucanase foi desenvolvida pela quantificação dos açúcares redutores liberados de laminarina que foi utilizada como substrato. O volume final do ensaio foi igual a 0,5 mL, o qual era constituído por laminarina (4 mg/mL), e das soluções tampão no pH ótimo (tampão acetato 25 mM) de atividade para as preparações enzimáticas de *T. harzianum* Rifai (pH 4,5) e *B. rhodina* MAMB-05 (pH 5,0); à 50 °C durante 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 50 μ l de NaOH 1,0 M. A determinação dos açúcares redutores formados foi realizada de acordo com o método do cuproarsenato descrito por SOMOGYI (1945) e NELSON (1944). A unidade de atividade de β -1,3-glucanase foi definida como o número de μ mol de açúcares redutores liberados por minuto por mL de extrato enzimático nas condições de ensaio.

4.2.9 Determinação da atividade de β -1,6-glucanases

A medida da atividade de β -1,6-glucanase foi desenvolvida pela quantificação dos açúcares redutores liberados de pustulana (IACOMINI et al., 1988) que foi utilizado como substrato. O volume final do ensaio foi igual a 0,5 mL, o qual era constituído de pustulana (2 mg/mL), e das soluções tampão no pH ótimo de atividade para as preparações enzimáticas de *T. harzianum* Rifai (tampão acetato 25 mM, pH 5,0) e *B. rhodina* MAMB-05 (tampão fosfato 25 mM, pH 6,5), à 40 °C e 60 minutos. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 50 μ l de NaOH 1,0 M. A determinação dos açúcares redutores formados foi realizada de acordo com o método de SOMOGYI (1945) e NELSON (1944). A unidade de

atividade de β -1,6-glucanase foi definida como o número de μmol de açúcares redutores liberados por minuto por mL de extrato enzimático nas condições de ensaio.

4.2.10 Determinação da atividade de β -glucosidases

A medida da atividade de β -glucosidase foi desenvolvida através de um ensaio enzimático de volume final igual a 0,5 mL, o qual era constituído de *p*-NPG (*p*-nitrofenilglucopiranosídeo) (4 mg/mL), e das soluções tampão no pH ótimo (tampão acetato 25 mM) de atividade para as preparações enzimáticas de *T. harzianum* Rifai (pH 5,0) e *B. rhodina* MAMB-05 (pH 5,5), à 55 °C e 20 minutos. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 1 mL de Na_2CO_3 200 mM. A determinação dos açúcares redutores formados foi realizada pela medida do aumento da absorvância à 410 nm. A unidade de atividade de β -glucosidase foi definida como o número de μmol de *p*-nitrofenol liberados por minuto por mL de extrato enzimático nas condições de ensaio.

Quando o *p*-NPG foi substituído pelos substratos celobiose e gentiobiose, o volume final do ensaio foi igual a 0,5 mL, o qual era constituído de cada substrato (1 mg/mL), e das soluções tampão no pH ótimo de atividade para as preparações enzimáticas de *T. harzianum* Rifai (tampão acetato 25 mM, pH 5,0) e *B. rhodina* MAMB-05 (tampão fosfato 25 mM, pH 6,5), à 50 °C e 10 minutos. A determinação da glucose liberada foi realizada com o uso do kit enzimático de glucose oxidase-peroxidase. A unidade de atividade de β -glucosidase foi então definida como o número de μmol de glucose liberados por minuto por mL de extrato enzimático nas condições de ensaio.

4.2.11 Determinação da viscosidade

A viscosidade expressa em viscosidade centipoise (Cp), foi determinada utilizando-se um viscosímetro Brookfield (S-18 spindle a 5 rpm, 22 °C), o qual consiste de um viscosímetro rotativo que mede a viscosidade determinando a força exercida pelo deslocamento de um eixo, em forma de cilindro, no fluido em ensaio. O método está baseado no princípio de que a viscosidade é proporcional ao torque necessário para movimentar um fuso imerso no fluido (BORSATO; MOREIRA; GALÃO, 2004).

4.2.12 Análise da conformação espacial com vermelho congo

A análise de transição da conformação em hélice para a conformação ao acaso foi realizada segundo OGAWA et al (1972), através da formação de um complexo entre o corante Vermelho Congo (VC) (91 μ M) e os polissacarídeos avaliados (1 mg/mL): botriosferana, laminarina e paramilo. A dextrana (1 mg/mL) foi utilizada como modelo de conformação espacial ao acaso. As concentrações de NaOH testadas foram 0,05, 0,1, 0,15, 0,19, 0,21, 0,23, 0,25, 0,30 e 0,40 M. O Me₂SO foi testado em diferentes concentrações (v/v) em água.

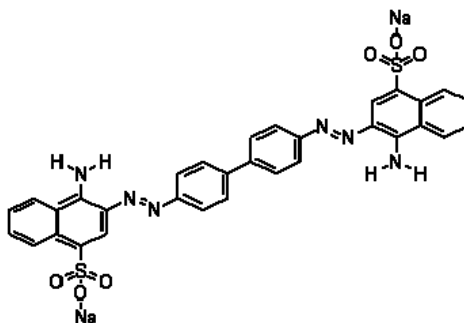


Figura 4 - Estrutura química do corante Vermelho Congo (ácido sulfônico-1-naftaleno-3,3-(4,4-bifenilabis(azo))-bis(4-amino-di-sódio)).

4.2.13 Análise de fluorescência

A análise de fluorescência foi realizada segundo ZHANG, ZHANG e CHENG (2000) utilizando o fenantreno (5 μ M) como composto para emissão de fluorescência. Os comprimentos de onda utilizados para excitação e emissão foram 252 e 364 nm, respectivamente. As concentrações de NaOH testadas foram 0,05, 0,1, 0,15, 0,19, 0,21, 0,23, 0,25, 0,30 e 0,40 M.

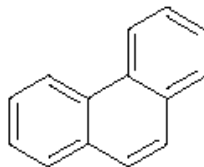


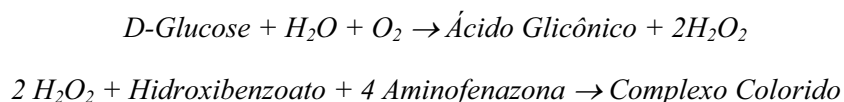
Figura 5 - Estrutura química do composto aromático fenantreno.

4.2.14 Determinação da biomassa fúngica

A biomassa foi determinada por gravimetria, através de secagem em estufa a 70 °C até peso constante, subtraindo-se o peso seco do inoculo previamente determinado.

4.2.15 Determinação da glucose residual

A glucose residual foi determinada através da técnica enzimática glucose oxidase-peroxidase (GOD-POD) utilizando-se o kit Glicose Enz Color (Bio Diagnóstica). O princípio da técnica está demonstrado a seguir:



O complexo colorido (vermelho) apresenta absorvância proporcional à concentração de glucose na amostra analisada, determinada a 500 nm.

4.2.16 Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados de acordo com o método do cuproarseniato descrito por SOMOGYI (1945) e NELSON (1944). O método consiste na formação de óxido cuproso a partir da redução do reativo de Somogyi pelos açúcares redutores presentes nas amostras. Na presença do reativo de NELSON ocorre a formação de um complexo de cor azul estável de óxido de molibdênio.

4.2.17 Determinação de açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados pelo método do fenol-sulfúrico descrito por DUBOIS et al. (1956). O método consiste na formação do derivado hidroximetil furfural a partir de hexoses ou furfural, a partir de pentoses, pela presença do ácido sulfúrico concentrado, que reage com o fenol, formando um complexo de cor amarela.

4.2.18 Determinação de proteínas

A determinação da concentração de proteínas extracelulares foi efetuada através do método de LOWRY modificado de acordo com HARTREE (1972). O método consiste na formação de um complexo entre a proteína e o reativo cupro-alcalino seguida da redução de sais de fosfomolibdato e fosfotungstato do reativo de Folin Ciocalteu pela tirosina presente nas moléculas de proteína. A concentração de proteínas foi calculada através da

curva de calibração com albumina bovina (BSA), na faixa de concentração que variou de acordo com o teor protéico estimado para as amostras.

4.2.19 Hidrólise enzimática dos polissacarídeos pelas β -glucanases parcialmente purificadas de *Trichoderma harzianum* Rifai

A hidrólise dos polissacarídeos laminarina, botriosferana, paramilo e pustulana foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 50 mL contendo 1,0 g/L de cada substrato, separadamente, em tampão acetato pH 5,0 (25 mM). A hidrólise foi realizada com as duas frações com atividade enzimática de 1 U para β -1,3-glucanase previamente obtida através da filtração em Sephadex-G100 do extrato bruto do cultivo de *T. harzianum* Rifai. Os frascos foram mantidos sob agitação a 40°C. Amostras de 1,0 mL foram recolhidas em diferentes intervalos de tempo (5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos) e submetidas a banho-Maria fervente durante 10 minutos. Os produtos da hidrólise foram monitorados através do método de NELSON e SOMOGYI, glucose oxidase-peroxidase e cromatografia líquida de alta pressão em cromatógrafo de íons (HPAEC).

4.2.20 Cromatografia Líquida de Alta Pressão em Cromatógrafo de Íons (HPAEC/PAD)

As soluções hidrolisadas foram precipitadas com etanol, centrifugadas, evaporadas a vácuo e dissolvidas em 0,4 mL de água deionizada. As amostras, contendo aproximadamente 1 μ g de açúcares totais, foram injetadas num sistema de cromatografia líquida de íons Dionex DX 500 acoplado a um detector de amperometria integrada. Os cromatogramas foram registrados em um integrador modelo 4600. Durante a cromatografia, os oligossacarídeos foram separados através da utilização de um gradiente de acetato de sódio (3 a 40 %) em uma coluna analítica CarboPac PA100 (4 x 250 mm) à velocidade de fluxo de 1,0 mL/min. As condições de eluição foram produzidas utilizando-se soluções de acetato de sódio 500 mM e NaOH 100 mM (RICE; CORRADI DA SILVA, 1996; FIDÉLIS et al., 2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este item foi organizado em três capítulos, os quais estão redigidos em inglês e se encontram em formato para publicação em revistas científicas especializadas internacionais.

No primeiro capítulo estão apresentados os resultados da otimização da produção de β -1,3-glucanases pelo fungo *T. harzianum* Rifai em fermentador de bancada, utilizando o EPS como única fonte de carbono. Este estudo foi conduzido utilizando-se da metodologia de superfície de resposta através de um planejamento fatorial 2^3 -central composto. As enzimas produzidas na condição ótima foram parcialmente purificadas através de cromatografia de exclusão em gel Sephadex G-100, a qual resultou em duas frações com atividades enzimáticas distintas. Alguns parâmetros cinéticos destas frações foram determinados, assim como a atuação destas enzimas sobre diferentes substratos. As duas frações obtidas foram utilizadas em reações de hidrólise com botriosferana e laminarina (β -D-(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucanas), paramilo (β -D-(1 \rightarrow 3)-glucana) e pustulana (β -D-(1 \rightarrow 6)-glucana). Os oligossacarídeos produzidos foram analisados através de cromatografia líquida de alta pressão em cromatógrafo de íons (HPAEC/PAD).

No segundo capítulo estão relatados os estudos referentes ao crescimento e produção do exopolissacarídeo botriosferana e de β -1,3-glucanases pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, bem como a comparação da produção de diferentes enzimas pertencentes ao complexo glucanolítico do referido microrganismo com o fungo *Trichoderma harzianum* Rifai, ambos cultivados em diferentes fontes de carbono. A avaliação das melhores fontes de carbono (glucose e lactose) para a produção de β -1,3-glucanases pelos fungos *B. rhodina* MAMB-05 e *T. harzianum* Rifai foi realizada através de um planejamento de misturas e análise por superfície de resposta utilizando-se o EPS como fonte de carbono.

O terceiro capítulo relata a avaliação da conformação espacial do botriosferana através de diferentes metodologias. O EPS formou um complexo com o corante Vermelho Congo em solução aquosa, demonstrando apresentar conformação espacial em hélice tripla, o que foi confirmado por análise de fluorescência. Também foi avaliado o efeito da adição de diferentes concentrações uréia, NaCl, NaOH e Me₂SO₃ na viscosidade de soluções de EPS. O capítulo foi aceito para publicação no periódico *Carbohydrate Polymers*.

Capítulo I

**The potential of a β -glucanolytic complex from *Trichoderma harzianum* Rifai on 1,3;1,6-
 β -D-glucans for the production of gluco-oligosaccharide fragments**

The potential of a β -glucanolytic complex from *Trichoderma harzianum* Rifai on 1,3;1,6- β -D-glucans for the production of gluco-oligosaccharide fragments

Ellen C. Giese¹, Robert F. H. Dekker², Osvaldo dos Santos Junior³, Maria de Lourdes Corradi da Silva³, Eleni Gomes¹, Roberto da Silva¹, and Aneli M. Barbosa*⁴

¹ *Universidade Estadual Paulista, IBILCE, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.*

² *Universidad de Castilla-La Mancha, IRICA, Ciudad Real, Spain.*

³ *Universidade Estadual Paulista, FCT, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.*

⁴ *Universidade Estadual de Londrina, CCE, Londrina, Paraná, Brazil.*

Abstract

Conditions for β -1,3-glucanase production by *Trichoderma harzianum* Rifai grown on a botryosphaeran as sole carbon source in a bench-fermenter were developed using a statistical factorial design which showed maximal enzyme production at 5 days, at an initial pH 5.5 and 1.5 vvm of aeration. A β -glucanolytic enzyme complex was partially-purified by gel filtration and used to hydrolyse fungal botryosphaeran, algal laminarin, algal paramylon and lichen pustulan. Botryosphaeran was 66 % hydrolysed by the Fraction-I, and 98 % by fraction Fraction-II, within 30 min. The main products of hydrolysis were gluco-oligosaccharides (DP \geq 4). The actions of both enzymes fractions on laminarin resulted in 15 % conversion to glucose, while the percentage of saccharification was radically different (70 % for Fraction-I and 25 % for Fraction-II). On paramylon, both enzyme fractions resulted in 20 % degradation after 30 min, and only 0.5 % corresponded to gluco-oligosaccharides (DP \geq 4). Only Fraction-I

could act on pustulan resulting in 25 % of hydrolysis. The difference in the hydrolysis products of each polysaccharide can be explained by the enzyme specificities of each fraction, the structural difference and complexity of the polysaccharides studied, including the β -glycosidic linkages.

Keywords: Trichoderma harzianum Rifai; β -glucanases; botryosphaeran; enzymatic hydrolysis; gluco-oligosaccharides.

1. Introduction

Modification of polysaccharides has contributed for the development of new industrial applications for these compounds in a variety of economical sectors such as pharmaceuticals and foods [1,2]. Replacing chemical and physical procedures, the use of enzymes as biocatalysts of reactions involving degradation or polymerisation represents an excellent tool in biotechnology processes [3,4]. In this respect, hydrolases are an important group of enzymes to produce oligosaccharides derived from non-cellulosic polysaccharides. β -1,3-Glucanases have been used to depolymerise 1,3;1,6- β -D-glucans to obtain degraded fragments possessing biotechnological properties such as pharmaceuticals and functional compounds [5,6]. β -1,3-Glucanases are predominantly of two types: exo- (EC 3.2.1.58) and endo- (EC 3.2.1.39), and specifically degrade the β -1,3-linked glycosidic linkages [7]. The other hydrolases that complement the key enzymes involved in the degradation of 1,3;1,6- β -D-glucans are the β -1,6-glucanases and β -glucosidases; each are found in several fungal species [8,9].

*Corresponding author. aneli@uel.br (AM Barbosa)

Trichoderma species have been investigated as bio-control agents and produce large amounts of glucanolytic enzymes that can act synergistically on cell-wall and extracellular 1,3;1,6- β -D-glucans [10]. In this work, we examined the enzymatic hydrolysis of 1,3;1,6- β -D-glucans to understand the nature of these reactions using partially-fractionated enzymes of the β -glucanolytic complex produced by *T. harzianum* Rifai.

2. Material and methods

2.1. Materials

Sephadex G-100 was obtained from Pharmacia Biotech Sweden. Botryosphaeran was obtained from *B. rhodina* MAMB-05 according to the procedure of Barbosa et al. [11]. Pustulan, isolated from the lichen, *Actinogyra muehlenbergii* [12], was kindly donated by P.A.J. Gorin, UFPR, Brazil. Laminarin (*Laminaria digitata*), laminaribiose, laminaritriose, gentiobiose and *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*-NPG) were purchased from Sigma-Aldrich. Paramylon was purchased from Fluka.

2.2. Microorganism and culture conditions

Trichoderma harzianum Rifai strain isolated from decaying peroba wood (*Aspidosperma* sp.) was maintained at 4 °C on xylose-agar [13] incorporating Vogel minimal salts medium (VMSM) [14]. *T. harzianum* Rifai conidia were used to inoculate (1×10^8 spores/flask) three 125 ml Erlenmeyer flasks containing liquid medium comprising VMSM and glucose (10 g/l) during 72 h, 180 rpm at 28 °C. The biomass resultant was used as inoculum for further experiments. Cultures were developed in bench fermenter (Technal) with 2.4 l of capacity equipped with pH electrode, agitation and comprised air. Fermentation was carried in VMSM and botryosphaeran (1.5 g/l) as sole carbon source at 28° C at 120 rpm. The

aeration, optimum initial pH and time of cultures for the production of β -1,3-glucanases by *T. harzianum* Rifai, were used as variable in an statistical experimental design outlined in section 2.4. Extracellular fluid (ECF) was recovered following centrifugation (7000 x g/10min) at 4° C, exhaustively dialyzed against deionised water, and used as the source of enzyme.

2.4. Factorial design and analysis

Fermentation conditions to optimise β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* Rifai was studied as variables in a factorial design and analysis by the response-surface method. A 2^3 -factorial central-composite experimental design, with five replicates at the central-point, summarizing 13 experimental runs was conducted in duplicate (Table 1). The independent variables studied were x_1 = aeration vvm, x_2 = initial pH, and x_3 = time of growth. The level of these variables and the variation levels for experimental studies of β -1,3-glucanase production (Y_1 = U/ml) are shown in Table 1. Analysis of variance (ANOVA) and multiple regression analysis were performed using STATISTICA (data analysis software system) Version 6. www.statsoft.com (StatSoft, Inc. 2001).

2.4. Partial purification and characterization of glucanolytic complex from *T. harzianum* Rifai

All extracellular fluids (ECF) were and lyophilized, and all steps were performed at 4°C. Each fraction was dissolved in 20 mM acetate buffer (pH 5.0) and applied to a column of Sephadex G-100 (1.5 x 90 cm, Pharmacia Biotech Sweden), eluted with 20 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) at a flow rate of 15 ml/h. Fractions of 2.5 ml were collected and analyzed for β -1,3-glucanase, β -1,6-glucanase and β -glucosidase activities. To evaluate the effect of pH and temperature for enzyme activity, the ECF was incubated in buffers

comprising 25 mM sodium acetate buffers (pH 3.0 – 5.0) and 25 mM sodium phosphate buffers (pH 6.0 – 8.0) at 35 °C, and at various temperatures (35 – 60 °C) at the optimum pH, during 10 min (the reaction was linear over 1 h for each polysaccharide substrate). Maximum activity (V_{\max}) and apparent Michaelis-Menten constant (K_m) were calculated using GraphPad software.

2.5. Assay of β -1,3- and β -1,6- glucanase and β -glucosidase activity

β -Glucanase activity was determined against the polysaccharides laminarin (4 g/l) and pustulan (2 g/l) in a final volume of 0.5 ml that comprised enzyme (ECF) and 25 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). The hydrolysis products released were measured as reducing sugars by the cuproarsenate method of Nelson [15] and Somogyi [16]. β -1,3-Glucanase activity was measured at 50 °C for 10 min, while β -1,6-glucanase activity at 50 °C for 20 min. The unit of each β -glucanase activity was defined as the number of μmol reducing sugars produced/min/ml. β -Glucosidase activity was measured with *p*-NPG (15 mM) as substrate, and was incubated at 55 °C for 20 min [17]. The unit of β -glucosidase activity was defined as the number of μmol *p*-nitrophenol liberated/min/ml.

2.6. Enzymatic hydrolysis experiments

Enzymatic hydrolysis of botryosphaeran, laminarin, paramylon and pustulan (1 g/l) were conducted in 10 ml solutions (pH 5.0) using 1.0 unit of each enzyme fraction (activity measured against laminarin), and incubated at 40 °C. Aliquot samples (1.0 ml) were withdrawn at various intervals (5, 10, 15, 20, 25, 30 min) and heated for 10 min/100 °C to arrest enzyme activity. The hydrolysis products were measured by the Nelson-Somogyi method, and total sugars by the phenol-sulphuric acid method [18] using glucose as the standard, and analysed by High Performance Anionic Exchange Chromatography with Pulsed

Amperometric Detection (HPAEC/PAD). Glucose was measured by the glucose oxidase method using a Glicose Enz Color reagent kit (Bio Diagnóstica, Curitiba, Brazil).

2.7. *HPAEC/PAD analysis of enzymatic hydrolysis products*

Polymeric material in the enzymatic hydrolysates was precipitated with ethanol (4 volumes) and removed by centrifugation (8500 x g/15 min). The supernatants were evaporated under reduced pressure and the resulting syrup re-dissolved in 0.4 ml of deionised water. Samples of 0.025 ml were used for sugar analysis by HPAEC/PAD using a Dionex Chromatograph DX 500. Mono- and oligo- saccharides were separated on a CarboPac PA100 (Dionex Chromatography) column (4 x 250 mm) equipped with a PA-100 guard column at a flow rate of 1.0 ml/min. The column was equilibrated in 0.1 M NaOH (97 %) and 0.5 M sodium acetate (3 %). After 15 min, a linear 0 - 0.25 M concentration gradient of sodium acetate was applied over a 70 min interval while the concentration of NaOH remained at 0.1 M. Sugar quantification was carried out from peak area measurements using response factors obtained from standard sugars, and were identified by their retention times ($T_R \pm SD$ min): glucose (2.93 ± 0.06 min), gentiobiose (4.57 ± 0.21 min), laminaribiose (7.12 ± 0.80 min) and laminaritriose (17.34 ± 0.20 min).

2. **Results and discussion**

3.1. *Optimization of β -1,3-glucanases production by *T. harzianum* Rifai using *Botryosphaeran* as sole carbon source*

Production of β -1,3-glucanase is strongly influenced by β -glucan levels present as inducer, and the type of glycosidic linkages present in the β -glucans used as carbon source.

Botryosphaeran, a 1,3;1,6- β -D-glucan produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 [11], was chosen as carbon source for these experiments as it is known to support the production of 1,3- β -glucanases by *Trichoderma harzianum* [17,19].

Through multiple regression analysis of the experimental data, a second-order polynomial equation was obtained for β -1,3-glucanase production and is given by Equation 1.

$$\hat{Y}_1 = 3.71294 + 0.42793 x_3 - 1.89259 x_2^2 \quad (1)$$

Linear effect terms of the variables x_1 and x_2 , and squared effect terms of the variables x_1 and x_2 were discarded as being non-significant. According to the results, an intercept was significant indicating that the central-points (aeration of 1.5 vvm, initial pH of 5.5, 5 days of growth) were correctly chosen. The variable more important for β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* Rifai was initial pH, following time of growth. The analysis of variance (ANOVA, Table 2) showed the lack-of-fit ($p > 0.05$) was not significant, indicating that the model was predictive. The experimental and predicted β -1,3-glucanase activities were in agreement (Table 1). The R-squared value implies 97 % of the variability in the observed response values can be explained by the model, or by experimental factors and their interactions. The pure error was low, indicating good reproducibility of the experimental data.

These kind of statistical analysis by the response surface methodology has also been successfully employed recently by Giese et al. [17] and Donzelli et al. [20] to optimise the production of β -1,3-glucanases by *Trichoderma* strains on shaker flasks using different 1,3;1,6- β -D-glucans as sole carbon sources. According to our experimental data, maximum β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* occurred within 5 days of growth, initial pH of 5.5 and 1.5 vvm of aeration. The response-surface plot 3-dimensional surface is showed in Figure 1.

There were not observed significative alterations ($p < 0.05$) between initial and final pH in the experimental runs. This behavior was also observed by Theodóre and Panda [21] to

cultures of a *T. harzianum* strain using glucose as sole carbon source and an initial pH of 4.7 was chosen as the best to β -1,3-glucanases production. Donzelli et al. [20] evaluated growth and β -1,3-glucanases production by *T. atroviride* grown on scleroglucan (1,3;1,6- β -D-glucan from *Sclerotium gluconicum*) and glucose as carbon sources, and verified a relationship between β -1,3-glucanases activities and initial pH. An increase from 5.5 to 6.5 in initial pH increased enzyme production into 16-fold depending on other factors applied.

3.2. Partial purification and characterization of β -1,3-glucanases from *T. harzianum* Rifai

About 600 ml of ECF was concentrated by freeze-drying procedure and enzymes were partially-purified by chromatography on Sephadex G-100 (data not shown). Fractionation revealed the presence of at least two different fractions hydrolyzing laminarin and botryosphaeran (F-I and F-II). The elution pattern showed a first peak (F-I) of β -1,3-glucanase activity in the fractions 84 to 160 constituted also by β -glucosidase and β -1,6-glucanase activity. A second one (F-II) in the fractions 170 to 188 that correspondent to small amounts of β -1,3-glucanase activity.

Comparing a release of reducing equivalents from laminarin to the activity based on the release of glucose from the same substrate it appeared that F-II had the highest ratio, may be presenting endoglucanase. In the F-I this ratio was much lower (data not show). The purification factors and yields of the glucanolytic complex from *T. harzianum* Rifai grown on botryosphaeran as sole carbon source at each step are summarized in Table 3.

F-I presented maximum activity in 50 °C, dropped to only 49 % of the maximal value at 70 °C during 120 min. A 55 °C was the best temperature to F-II, which presented only 25 % of activity remained at 70 °C in 120 min. Fungal β -1,3-glucanases have been describe as exhibit temperature optima ranging 45 and 55 °C [22]. Major thermostable β -1,3-glucanase

described is from *Thermotoga neapolitana* which remained 82 % of activity after 30 min at 95 °C [23].

Maximum activity was found at pH 5.0 to both partially-purified fractions, which have been observed to other β -1,3-glucanases [24]. Metal ion Mn^{2+} was a strong inhibitor of β -1,3-glucanase activity. However, Zn^{2+} , Cu^{2+} and Na^+ did not affect enzyme activity. F-I and F-II exhibited a broad specificity and hydrolysed laminarin. The enzymatic fractions had no activity on carboxymethylcellulose and dextran. F-II was not able to hydrolyse pustulan and the oligosaccharides cellotriose and cellotetrose. Both fractions preferred laminaribiose and laminaritriose as substrates than laminarin, while F-I showed highest activity on cellobiose and gentiobiose (Table 4). The partially-purified fractions of β -1,3-glucanases obeyed Michaelis-Menten kinetics in concentration range 0 - 2 mg/ml of laminarin. A K_m of 0.08 mg/ml was obtained to F-I and a K_m value of 0.1 mg/ml to F-II, demonstrating high affinity with his substrate.

3.3. Enzymatic hydrolysis of botryosphaeran

Botryosphaeran is a new extracellular 1,3;1,6- β -D-glucan produced by *B. rhodina* MAMB-05 [11,25,26,27] that presents anticlastogenic activity [28]. The hydrolysis of botryosphaeran by partially-fractionated enzymes of the β -glucanolytic complex (F-I) from *T. harzianum* Rifai grown on botryosphaeran as sole carbon source, resulted in 66 % saccharification in 30 min that corresponded to 68 % of gluco-oligosaccharides with $DP \geq 4$ as products by HPAEC/PAD analysis (Figure 3a). By contrast, the F-II enzymatically-degraded botryosphaeran was less extensively degraded over the same hydrolysis period, with a degree of hydrolysis of ~ 10 % at 30 min (Figure 3b). By 30 min, hydrolysis by F-II leveled-off and hydrolysates showed minor quantities of glucose, gentiobiose, laminaribiose and

laminaritriose. A time course profile for the hydrolysis of botryosphaeran by the two enzyme fractions (F-I and F-II) under the chosen conditions revealed that hydrolysis was linear over the 30 min.

The crude enzyme preparation from *T. harzianum* Rifai revealed that these enzymes were able to produce a broad range of products from botryosphaeran in short incubation times [19] with only tetrasaccharides as the highest DP. Grandpierre et al. [3] observed that a fast release of glucose could inhibit enzyme action on 1,3- β -D-glucan curdlan. In the present work, gentiobiose and laminaribiose appeared in approximate proportions (Table 5), and laminaritriose was present in the hydrolysates in very small amounts. F-I revealed 1,3- β -glucanase, 1,6- β -glucanase and β -glucosidase activities, while F-II only demonstrated action on 1,3;1,6- β -D-glucans.

Compared to botryosphaeran hydrolysis by the partially-fractionated enzymes, the product array from the enzymatic hydrolysis using F-II was very different. Approximately only 10 % of botryosphaeran was hydrolyzed within 30 min. A low amount of glucose was detected during the stages of hydrolysis, as well as gentiobiose, and only small amounts of laminaribiose and laminaritriose were detectable by HPAEC/PAD analysis. Major oligosaccharides were detected, however, in lesser degree than those detected through the action of F-I.

3.4. *Enzymatic hydrolysis of laminarin*

At the stage of 30 min hydrolysis, ~ 70 % of laminarin had been hydrolysed through the action of F-I, which represented a conversion into glucose of 15 %. The high degree of hydrolysis was representative of oligosaccharides presenting $DP \geq 4$. HPAEC/PAD analysis (Figure 4a) revealed a difference in the product array from the hydrolysis of laminarin for

each enzyme fraction (Table 6). The trend in hydrolysis of laminarin resulted in a lower degree of conversion into glucose during 30 min. Gluco-oligosaccharides with $DP \geq 4$ were the major hydrolysis products, followed next by gentiobiose and minor amounts of oligosaccharides of DP ranging from 2 to 4. The product array in hydrolysates of laminarin by F-II (Figure 4b) was similar to that obtained by F-I, but the amounts of gluco-oligosaccharides of $DP \geq 4$ were vastly greater. Some tetrasaccharides and possibly pentasaccharides also appeared but were not identified.

The action of partially-fractionated enzymes of the β -glucanolytic complex from *T. harzianum* Rifai on laminarin was somewhat different than towards botryosphaeran, and reflects a difference in the molecular structure between the two polysaccharide types, and the complexity of botryosphaeran. The specificity on the different β -glucanolytic enzyme fractions too will have an effect on the product array in hydrolysis of botryosphaeran and laminarin.

3.5. Enzymatic hydrolysis of paramylon and pustulan

The potential hydrolysis of F-I and F-II fractions was also evaluated to paramylon and pustulan. Paramylon is a storage 1,3- β -D-glucan from *Euglena gracilis* algae and is constituted by a non-ramified chains constituted by glucose units [30]. Both F-I and F-II treatments resulted in approximately 20 % paramylon degradation after 30 min, and only 0.5 % corresponded to gluco-oligosaccharides with $DP > 4$ as products by HPAEC/PAD analysis (Table 7). Curdlan was also hydrolyzed by β -1,3-glucanases from unpurified extract from *T. harzianum*, but in that conditions 80 % of this polysaccharide was hydrolyzed [3]. Glucanases from *Streptomyces* sp. degraded curdlan to mono, di and lower oligosaccharides [31].

F-I fraction was the only one with β -1,6-glucanase activity, then it was tested on pustulan, a linear 1,6- β -D-glucan energy storage from *Actinogyra muehlenbergii* liquen [12]. F-I presented 25 % of hydrolysis products after 30 min that corresponded to 49 % of gluco-oligosaccharides with $DP \geq 4$ (Table 8). Fungal β -1,6-glucanases are associated to β -1,3-glucanase activities in many microorganisms [32]. Reese et al. [33] observed gentiotetraose, gentiotriose, gentiobiose and glucose as products array and verified that these enzymes act as an endoglucanase. The analysis of the products obtained after incubation of these β -D-glucans with β -glucanases gives more information about the specificity of the enzymes and could be useful in further experiments to optimize gluco-oligosaccharides production.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES, FAPESP and Fundação Araucária do Paraná (Brazil) for a research grant. FAPESP is gratefully acknowledged for a post-graduate scholarship (EC Giese).

References

- [1] Maltese A, Borzacchiello A, Mayol L, Bucolo C, Maugeri F, Nicolais L, Ambrosio L. Novel polysaccharides-based viscoelastic formulations for ophthalmic surgery: Rheological characterization. *Biomaterials* 2006, 27: 5134-5142.
- [2] Viñarta SC, Molina OE, Figuero LIC, Fariña JI. A further insight into the practical applications of exopolysaccharides from *Sclerotium rolfsii*. *Food Hydrocolloids* 2006; 20: 619-629.

- [3] 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. *Carbohydr Pol* 2008;71:277-86.
- [4] Kadi N, Crouzet J. Transglycosylation reaction of endoxylanase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Food Chem* 2008; 106: 466-474.
- [5] Pang Z, Otaka K, Maoka T, Hidaka K, Isijima S, Oda M et al Structure of β -glucan oligomer from laminarin and its effect on human monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells. *Biosc Biotechnol Biochem* 2005; 69: 553-558.
- [6] Jaehrig SC, Rohn S, Kroh LW, Wildenauer FX, Lisdat F, Fleischer L-G, Kurz T. Antioxidative activity of (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- β -d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. *LWT - Food Sci Technol* 2008; 41: 868-877.
- [7] Sutherland IW. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydr Res* 1999; 38: 319-328.
- [8] Pitson SM, Seviour RJ, McDougall BM. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role β -glucan degradation. *Enz Microbial Technol* 1997; 21: 182-190.
- [9] **Bryant MK**, May KJ, Bryan GT, Scott B. Functional analysis of a β -1,6-glucanase gene from the grass endophytic fungus *Epichloë festucae*. *Fungal Gen Biol* 2007; 44: 808-817.
- [10] Monte E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol* 2001; 4: 1-4.
- [11] Barbosa AM, Steluti RM, Dekker RFH, Cardoso MS, Corradi da Silva ML. Structural characterization of botryosphaeran: a (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucan produced by ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydr Res* 2003; 338: 1691-1698.

- [12] Iacomini M, Gorin PJG, Baron M, Tulloch AP, Mazurek M. Novel D-glucans obtained by dimethyl sulfoxide extraction of the lichens *Letharia vulpina*, *Actinogyra muehlenbergii*, and an *Usnea* sp. Carbohydr Res 1988; 176: 117-126.
- [13] Barbosa AM. Seleção de microrganismos xilanolíticos e produção de xilanases pelo *Trichoderma harzianum* Rifai em bagaço de cana. 1992. (Doctoral thesis) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba (in Portuguese).
- [14] Vogel HJ. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. Microbial Genet Bull 1956; 13: 42-43.
- [15] Nelson NA. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. J Biol Chem 1944; 153: 376-380.
- [16] Somogyi MA. A new reagent for determination of sugars. J Biol Chem 1945; 160: 61-68.
- [17] 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 Biochem, 2005; 40: 3783-5788.
- [18] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Reber PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956; 28: 350-356.
- [19] Giese EC, Covizzi LG, 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 Biochem 2006; 41; 1265-1271.
- [20] Donzelli BGG, Siebert KJ, Harman GE. Response surface modeling of factors influencing the production of chitinolytic and beta-1,3-glucanolytic enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1. Enz Microb Technol 2005; 37: 82-92.

[21] 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*. *Enz Microb Technol* 1995; 17: 1043-1049.

[22] Pitson SM, Seviour RJ, McDougall BM. Noncellulolytic fungal β -glucanases: Their physiology and regulation. *Enz Microb Technol* 1993; 15: 178-192.

[23] Zverlov VV, Volkov IY, Velikodvorskaya TV, Schwarz WH. Highly thermostable endo-1,3-beta-glucanase (laminarinase) LamA from *Thermotoga neapolitana*: nucleotide sequence of the gene and characterization of the recombinant gene product. *Microbiology* 1997; 143: 1701-1708.

[24] Suzuki K, Yabe T, Maruyama Y, Abe K, Nakajima T. Characterization of recombinant yeast exo- β -1,3-glucanase (exg 1p) expressed in *Escherichia coli* cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; 65: 1310-1314.

[25] Steluti RM, Giese EC, Piggato MM, Sumiya AFG, Covizzi LG, Job AE, Cardoso MS, Corradi da Silva ML, Dekker RFH, Barbosa AM. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. *J Basic Microbiol* 2004; 44: 480-486.

[26] Corradi da Silva ML, Izeli NL, Martinez PF, Silva IR, Constantino CJL, Cardoso MS, Barbosa AM, Dekker RFH, Silva GVJ. Purification and structural characterization of (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. *Carbohydr Polym* 2005; 61: 10-17.

[27] Silva IR, Martinez PF, Izeli NL, Monteiro NK, Vasconcelos AFD, Barbosa AM, Dekker RFH, Cardoso MS, Silva GVJ, Moraes LAB, Corradi da Silva ML. Purificação e

caracterização de uma gentiohexaose obtida de botriosferana por hidrólise ácida parcial. Química Nova, *in press*.

[28] Miranda CCBO, Dekker RFH, Serpeloni JM, Fonseca EAI, Cólus IMS, Barbosa AM. Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Inter J Biological Macromol 2008; 42: 172-177.

[29] Read SM, Currie G, Bacic A. Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry. Carbohydr Res 1996; 281:187-201.

[30] Barsanti L, Vismara R, Passarelli V, Gualtieri P. Paramylon content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. J Appl Phycol 2001; 13: 59-65.

[31] Bielecki S, Galas E. Microbial β -glucanases different from cellulases. Biotechnol 1991; 10: 275-304.

[32] Pitson S, Seviour RJ, Bott J, Stasinopoulos SJ. Production and regulation of β -glucanases in *Acremonium* and *Cephalosporium* species. Mycol Res 1991; 95: 352-356.

[33] Reese ET, Parrish FW, Mandels M. β -D-1,6 glucanases in fungi. Can J Microbiol 1961; 8: 327-334.

Table 1

Central-composite experimental-design matrix defining conditions for the aeration, initial pH and time of growth on β -1,3-glucanase production by *Trichoderma harzianum* Rifai.

Experimental run	Variables in coded levels			β -1,3-Glucanase activity (U/ml)	
	x_1	x_2	x_3	Experimental	Predicted
1	-1	-1	-1	0.695	0.622
2	-1	-1	+1	1.875	1.884
3	-1	+1	-1	0.923	0.932
4	-1	+1	+1	1.523	1.578
5	+1	-1	-1	0.944	0.953
6	+1	-1	+1	1.963	2.018
7	+1	+1	-1	0.603	0.658
8	+1	+1	+1	0.715	1.108
9	+1	0	+1	3.712	3.456
10	0	+1	+1	1.625	1.369
11	+1	+1	0	1.715	1.459
12	0	0	0	3.652	3.713
13	0	0	0	3.518	3.713
Factor	Real Levels				
	-1	0	+1		
x_1 , aeration (vvm)	1.0	1.5	2.0		
x_2 , initial pH	3.0	5.5	8.0		
x_3 , time of growth (days)	2	5	8.0		

Table 2

Summary of partial purification and yields of the β -1,3-glucanase from *T. harzianum* Rifai.

Factors	Coefficients	SE ^a	t-value	p-value
Intercept	3.71294	0.064251	57.7876	0.011015
x_2 quadratic	-1.89259	0.090202	-20.9815	0.030319
x_3 linear	0.42793	0.032126	13.3206	0.047703

^a Standard error

Table 3

Summary of partial purification and yields of the β -1,3-glucanase from *T. harzianum* Rifai.

Purification step	Total Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification factor
Crude culture filtrate	288	306	1.1	100	1
Freeze-drying	276	297	1.1	96	1
Sephadex G-100 F-I	96	267	2.8	89	2.5
F-II	4.4	36	8.2	13	2.9

Table 4

Relative rates of hydrolysis of glucans and glucooligosaccharides by partially-purified β -glucanases from *T. harzianum* Rifai.

Compounds	Linkage type	Enzyme activity (%)	
		Fraction-I	Fraction-II
<i>Polysaccharides</i>			
Laminarin	β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)	100	100
Botryosphaeran	β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)	32	25
Pustulan	β -(1 \rightarrow 6)	20	0
Paramylon	β -(1 \rightarrow 3)	27	31
CMC ^a	β -(1 \rightarrow 4)	0	0
Dextran	α -(1 \rightarrow 6)	0	0
<i>Oligosaccharides</i>			
Laminaribiose	β -(1 \rightarrow 3)	140	138
Laminaritriose	β -(1 \rightarrow 3)	133	121
laminaritetraose	β -(1 \rightarrow 3)	98	90
Gentiobiose	β -(1 \rightarrow 6)	124	11
Celobiose	β -(1 \rightarrow 4)	127	5
Celotriose	β -(1 \rightarrow 4)	48	0
Celotetraose	β -(1 \rightarrow 4)	40	0

^a carboxymethylcellulose

Table 5

HPAEC-PAD analysis of the enzymatic hydrolysates of botryosphaeran using partially-fractionated enzymes of the β -glucanolytic complex from *Trichoderma harzianum* Rifai.

β - Glucanase fraction	Time of hydrolysis (min)	RRS ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Hydrolysis products* (Relative amounts, %)				
			G ₁	G _{2G}	G _{2L}	G _{3L}	DP \geq 4
<i>Fraction I</i>	5	213 \pm 13	12	7	5.5	1.6	73.9
	10	288 \pm 15	18	9	7.2	1.8	64.0
	15	302 \pm 14	19	11	6.9	1.8	61.3
	20	497 \pm 19	23	11	6.6	1.5	57.9
	25	522 \pm 18	24	11	6.3	1.6	57.1
	30	662 \pm 16	29	11	5.4	1.6	53.0
<i>Fraction II</i>	5	55 \pm 10	7	3	3.2	1.2	85.6
	10	80 \pm 10	7	11	2.4	1.9	77.7
	15	87 \pm 9	11	12	2.2	2.2	72.6
	20	91 \pm 11	12	13	2.2	2.4	69.4
	25	94 \pm 9	12	13	3.2	2.8	69.0
	30	99 \pm 9	13	13	5.1	3.3	65.6

* G₁, glucose; G_{2G}, gentiobiose; G_{2L}, laminaribiose; G_{3L}, laminaritriose DP, degree of polymerization; RRS, residual reducing sugars.

Table 6

HPAEC-PAD analysis of the enzymatic hydrolysates of laminarin using partially-fractionated enzymes of the β -glucanolytic complex from *Trichoderma harzianum* Rifai.

β - Glucanase fraction	Time of hydrolysis (min)	RRS ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Hydrolysis products* (Relative amounts, %)				
			G ₁	G _{2G}	G _{2L}	G _{3L}	DP \geq 4
<i>Fraction I</i>	5	204 \pm 12	11	12	1.4	2.3	73.3
	10	232 \pm 14	12	11	2.0	2.5	72.5
	15	257 \pm 14	12	11	2.0	2.5	72.5
	20	355 \pm 14	13	11	2.1	2.6	71.3
	25	557 \pm 11	14	14	2.1	3.0	66.9
	30	689 \pm 13	15	15	2.3	3.2	64.5
<i>Fraction II</i>	5	143 \pm 10	1	4	2.3	3.4	89.3
	10	172 \pm 10	5	5	3.2	4.4	82.4
	15	184 \pm 11	8	7	3.4	4.5	77.1
	20	192 \pm 9	11	8	3.7	5.3	72.0
	25	203 \pm 10	11	12	3.2	4.8	69.0
	30	253 \pm 7	12	19	2.9	5.0	61.1

* G₁, glucose; G_{2G}, gentiobiose; G_{2L}, laminaribiose; G_{3L}, laminaritriose DP, degree of polymerization; RRS, residual reducing sugars.

Table 7

HPAEC-PAD analysis of the enzymatic hydrolysates of paramylon using partially-fractionated enzymes of the β -glucanolytic complex from *Trichoderma harzianum* Rifai.

β -Glucanase fraction	Time of hydrolysis (min)	RRS ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Hydrolysis products* (Relative amounts, %)				
			G ₁	G _{2G}	G _{2L}	G _{3L}	DP \geq 4
<i>Fraction I</i>	5	110 \pm 8	50	ND	10	0.2	39.8
	10	140 \pm 11	54	ND	9	0.2	36.8
	20	142 \pm 10	55	ND	14	0.2	30.8
	30	218 \pm 6	58	ND	18	0.3	23.8
<i>Fraction II</i>	5	82 \pm 8	25	ND	8	0.2	66.8
	10	121 \pm 11	35	ND	9	0.2	55.8
	20	131 \pm 12	66	ND	16	ND	18.0
	30	168 \pm 7	71	ND	18	ND	11.0

* G₁, glucose; G_{2G}, gentiobiose; G_{2L}, laminaribiose; G_{3L}, laminaritriose DP, degree of polymerization; RRS, residual reducing sugars.

Table 8

HPAEC-PAD analysis of the enzymatic hydrolysates of pustulan using partially-fractionated enzymes of the β -glucanolytic complex from *Trichoderma harzianum* Rifai.

β -Glucanase fraction	Time of hydrolysis (min)	RRS ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Hydrolysis products* (Relative amounts, %)				
			G ₁	G _{2G}	G _{2L}	G _{3L}	DP \geq 4
<i>Fraction I</i>	5	8 \pm 0.5	49	16	ND	ND	35
	10	15 \pm 0.9	33	5	ND	ND	62
	15	18 \pm 1.0	32	6	ND	ND	62
	20	19 \pm 0.9	35	8	ND	ND	57
	25	22 \pm 0.8	33	7	ND	ND	60
	30	25 \pm 0.8	32	15	ND	ND	53

* G₁, glucose; G_{2G}, gentiobiose; G_{2L}, laminaribiose; G_{3L}, laminaritriose DP, degree of polymerization; RRS, residual reducing sugars.

Legends of Figures

Figure 1.

Response-surface plots depicted as a 3-dimensional surface for β -1,3-glucanase production (Y_1) by *Trichoderma harzianum* Rifai as a function of initial pH (X_2) and time of growth (X_3) according to a 2^3 -factorial central-composite experimental design.

Figure 2.

HPAEC/PAD analysis of hydrolysis products arising from botryosphaeran through the action of partially-fractionated enzymes of the β -glucanolytic complex from *Trichoderma harzianum* Rifai. (a) Fraction-I and (b) Fraction-II. Hydrolysis conditions: β -1,3-glucanase 1.0 U; 40 °C. HPAEC/PAD column: CarboPac PA 100.

Figure 3.

HPAEC/PAD analysis of hydrolysis products arising from laminarin through the action of partially-fractionated enzymes of the β -glucanolytic complex from *Trichoderma harzianum* Rifai. (a) Fraction-I and (b) Fraction-II. Hydrolysis conditions: β -1,3-glucanase 1.0 U; 40 °C. HPAEC/PAD column: CarboPac PA 100.

Figure 1

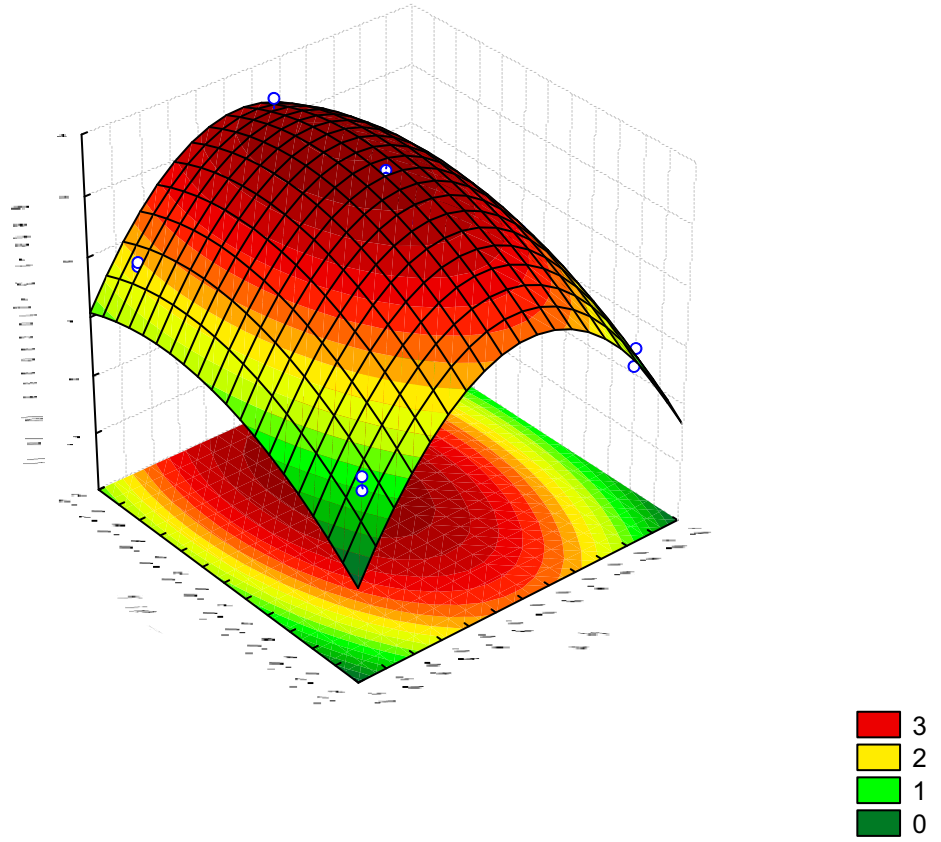
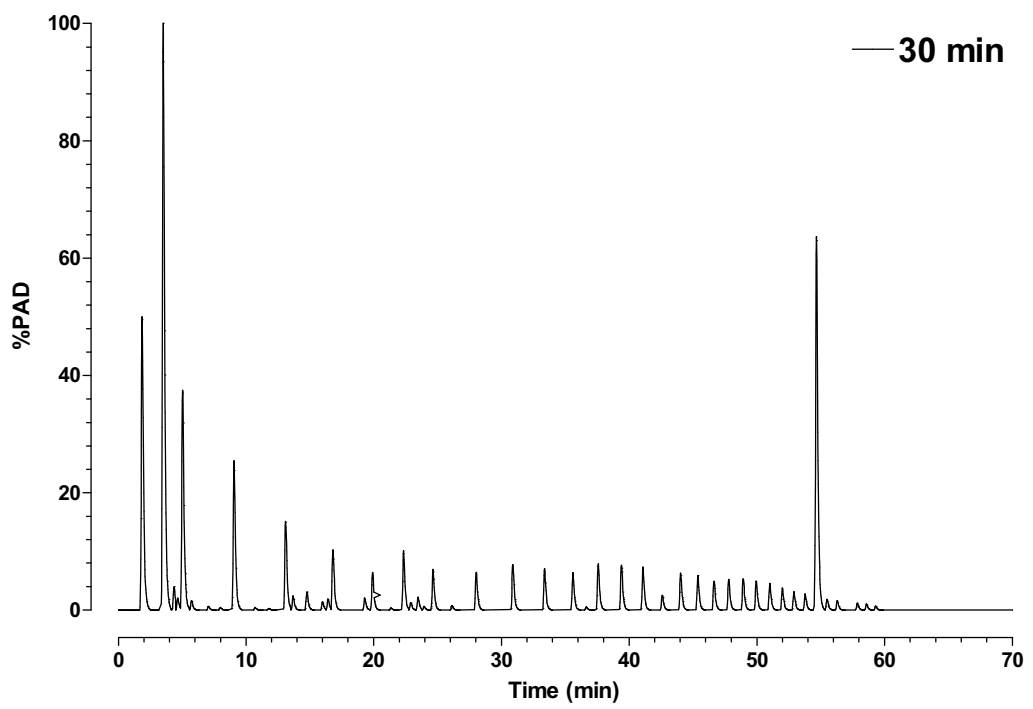
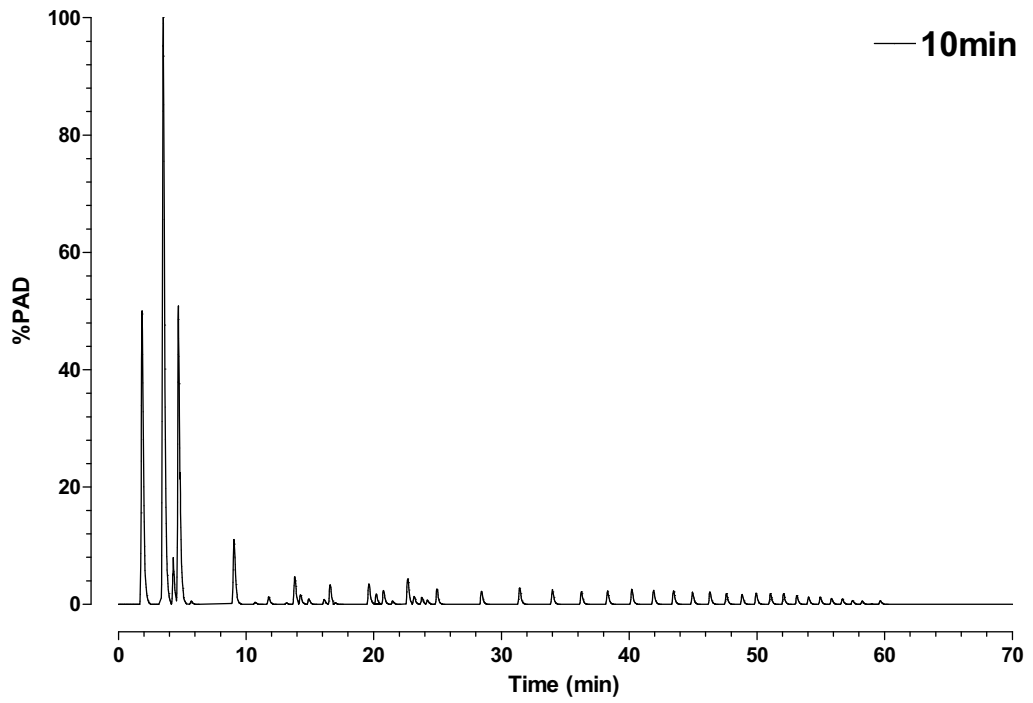


Figure 2

(a)



(b)

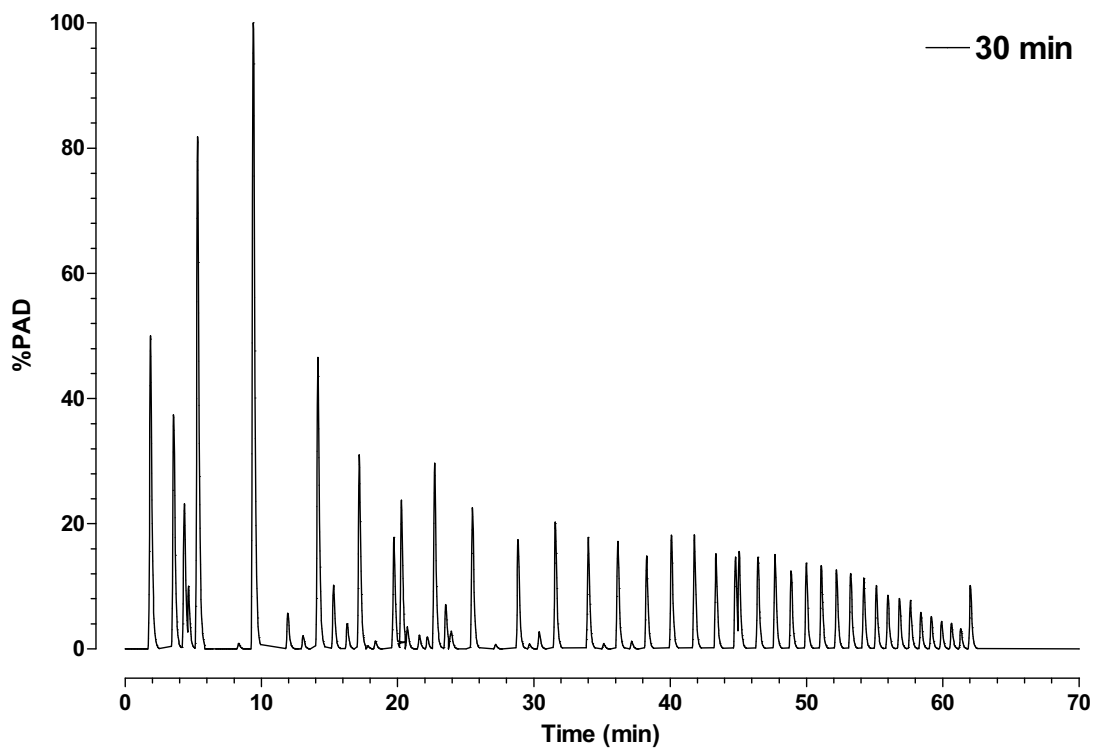
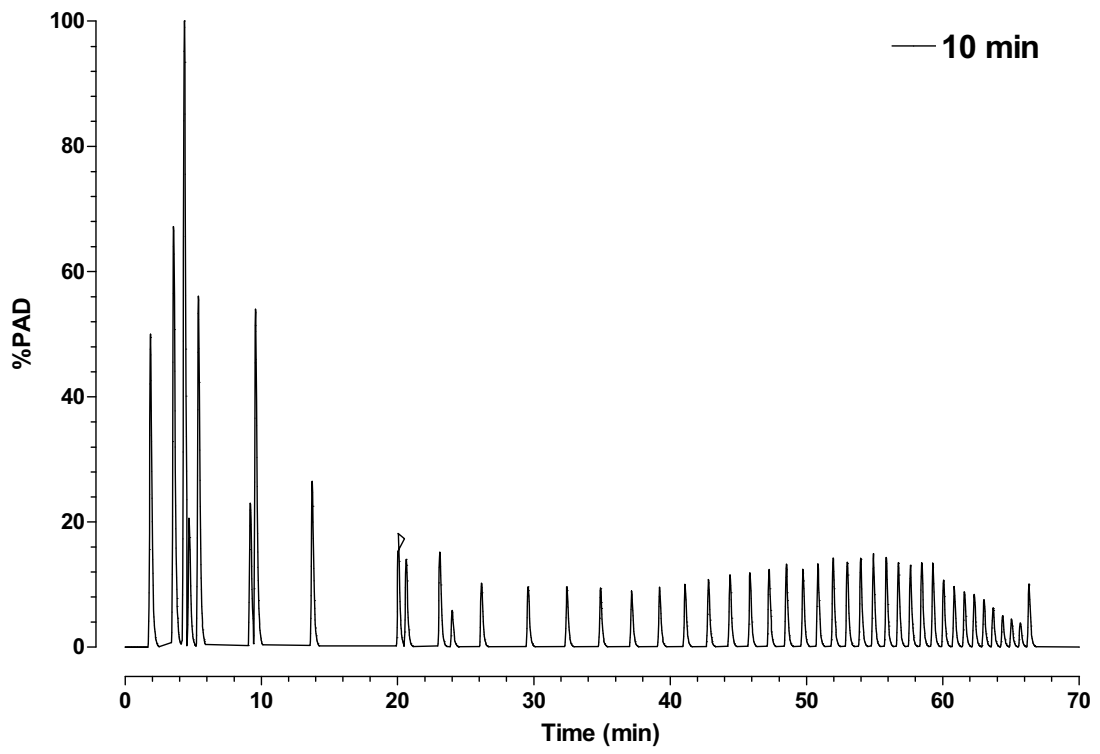
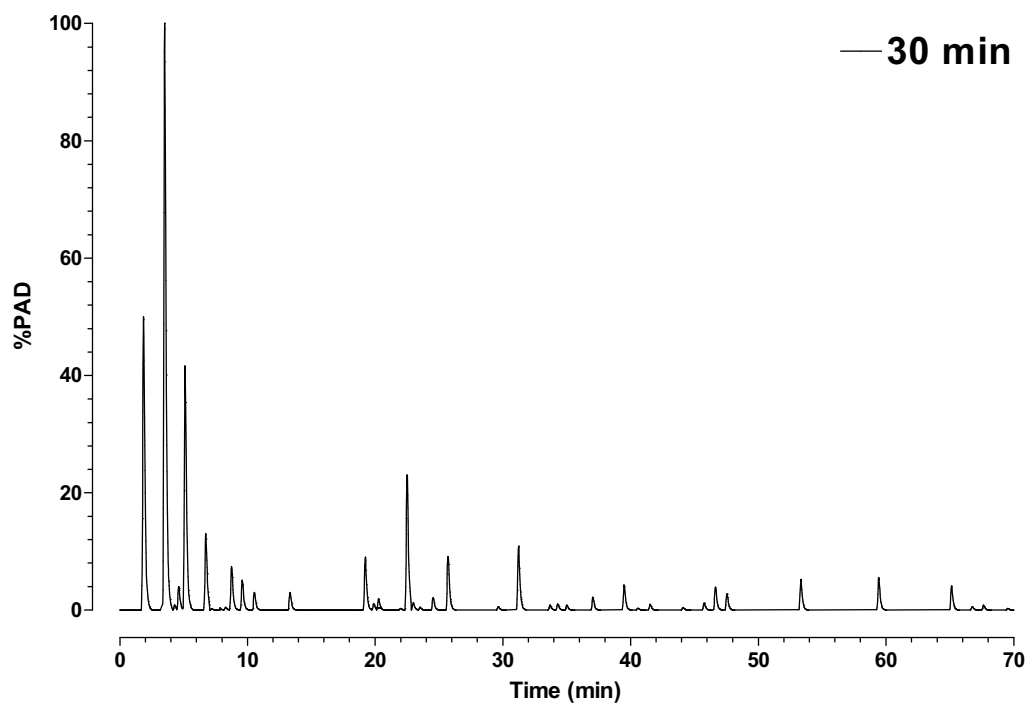
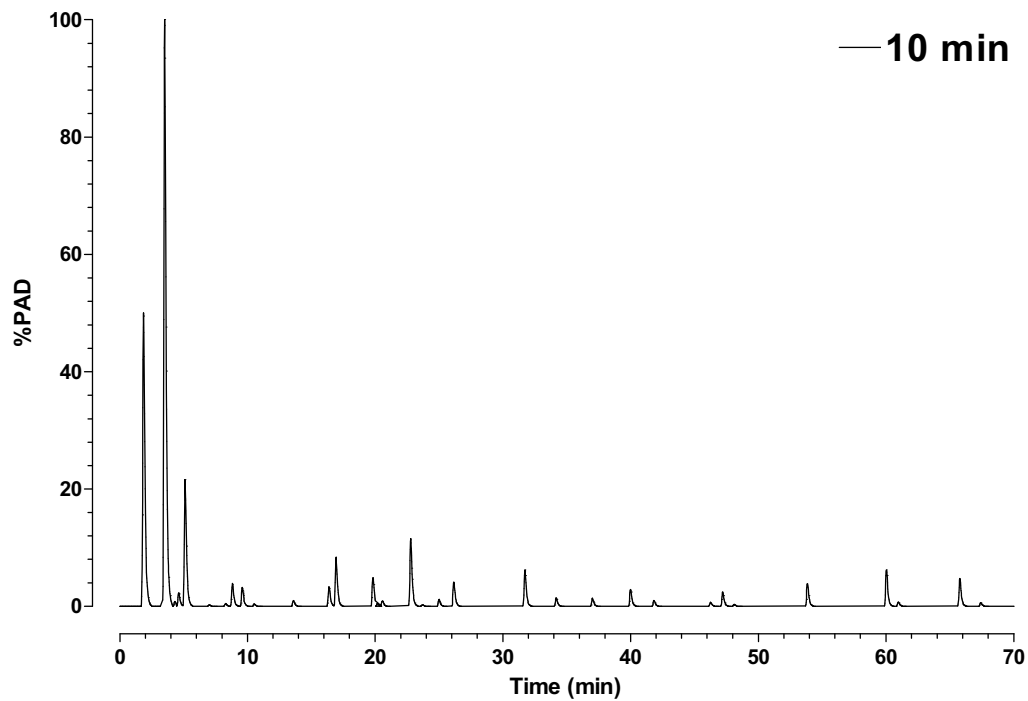
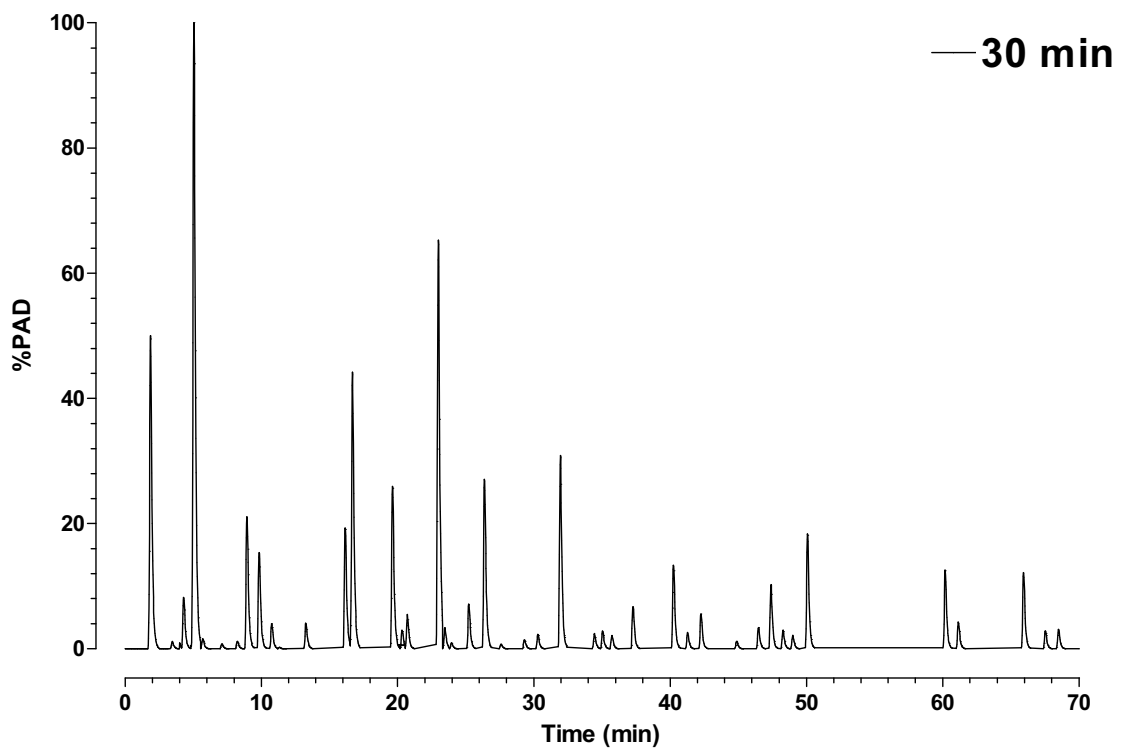
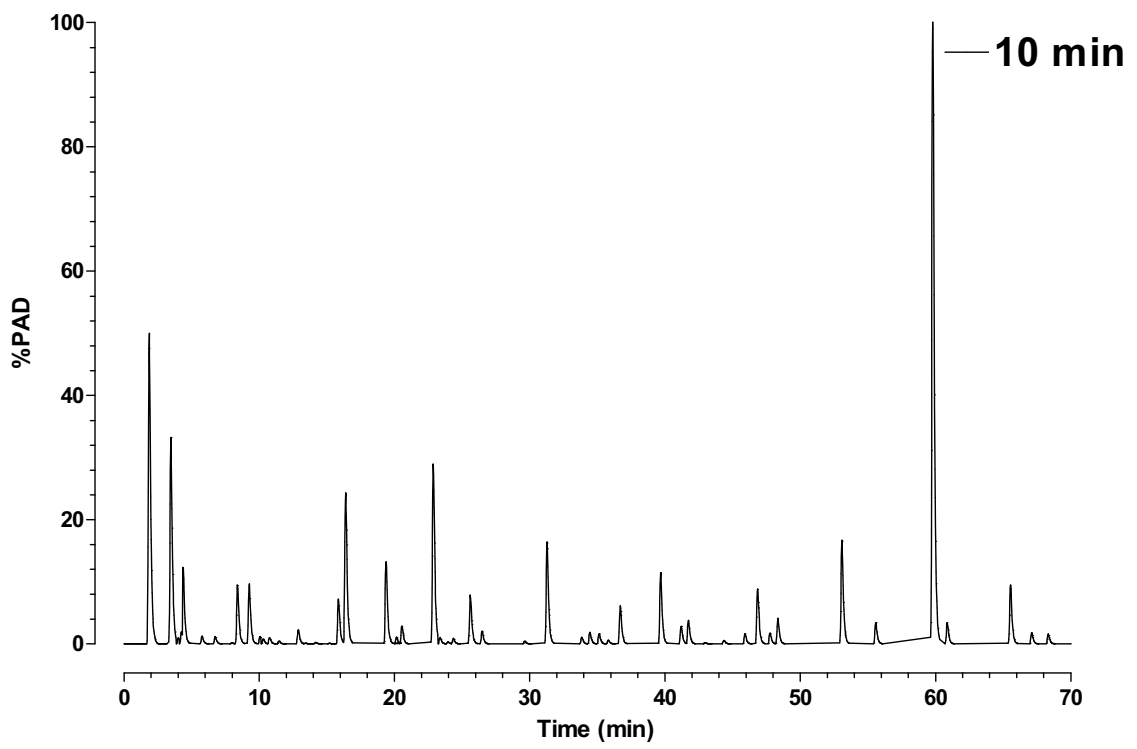


Figure 3

(a)



(b)



Capítulo II

Production of β -glucanase by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-5: a comparison with *Trichoderma harzianum* Rifai and optimization of carbon sources by statistical mixture design

Production of β -Glucanase by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-5: a Comparison with *Trichoderma harzianum* Rifai and Optimization of Carbon Sources by Statistical Mixture Design

Ellen C. Giese¹, Robert F. H. Dekker², Luiz G. Covizzi¹, Ieda S. Scarminio³, Roberto da Silva¹, Aneli M. Barbosa^{4*}

¹*Departamento de Química e Ciências Ambientais, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, R. Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto-SP, Brazil.*

²*Universidad de Castilla-La Mancha, IRICA, 13071 Ciudad Real, España.*

³*Departamento de Química e* ⁴*Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Cx.P. 6001, CEP: 86051-990, Londrina-PR, Brazil.*

Abstract

The correlation between botryosphaeran and β -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 was evaluated following the exopolysaccharide (EPS) formation and the glucose consumption during 300 hours. A growth profile on glucose and botryosphaeran as sole carbon source were compared to produce β -1,3-glucanase by *B. rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai as well as glucohydrolases on different carbon sources (glucose, lactose, laminarin, botryosphaeran, yeast extract and *Botryosphaeria rhodina* mycelium). Both microorganisms grew and produced β -glucanolytic enzymes in all substrates evaluated. A statistical mixture design was used to evaluate concentrations of botryosphaeran, glucose and lactose as carbon sources on β -1,3-glucanase production by both fungi. To *B. rhodina* MAMB-05, glucose and lactose promoted enzyme production in same

* Corresponding author: Dr. Aneli M. Barbosa. E-mail: aneli@uel.br

levels. A synergic effect existent between botryosphaeran with each others substrates is favourable to β -glucanase production by *T. harzianum* Rifai.

Keywords: enzyme production; submerged culture; optimisation; filamentous fungi; exopolisaccharides; β -1,3-glucanases.

Introduction

Botryosphaeria rhodina MAMB-05 is an ascomyceteous fungus which secretes an exopolysaccharide (EPS) named botryosphaeran, in liquid culture medium. This EPS consists of a linear backbone chain comprising (1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl groups to which are attached branched chains of (1 \rightarrow 6)-linked β -glucosyl and diglucosyl residues in different frequency (Dekker and Barbosa, 2001; Barbosa et al., 2003; Corradi da Silva et al., 2005). This fungus is also able to produce specific β -glucanases that can act on β -D-glucans and its own EPS releasing oligosaccharides (Giese et al., 2005; 2006).

β -Glucanases (E.C. 3.2.1.14; E.C. 3.2.1.6; E.C. 3.2.1.39; E.C. 3.2.1.58) are widely distributed among microorganisms where have interesting and important physiological roles. Especially in fungi these enzymes are related to cell wall differentiation and extension where β -glucans belonging to the cell wall are substrates to their action. These hydrolases have been applied especially in preparation of protoplasts, analysis of fungal cell wall structures, brewing process and also in the treatment of fungal diseases. Both β -1,3 and β -1,6-glucanases have been shown as constitutive enzymes in fungi, and their production are controlled by several regulatory mechanisms according to a variety of parameters in the growth profile (Bielecki and Galas, 1991; Pitson et al., 1993; Marco and Felix, 2007; Koizumi et al., 2007).

Previous reports have described that biological functions and expression of these enzymes seem to be subjected both to substrate induction and catabolite repression, depending on the carbon source used as substrate (Soler et al., 1999; Jayus et al., 2005). These differences implies on mode of action, substrates they attack as well as their cellular location (Pitson et al., 1993; Pitson et al., 1997).

Some studies have attempted to explain the regulation of β -glucanases synthesis in fungi, particularly in *Trichoderma* spp. (Noronha et al., 2000; Noronha and Ulhoa, 2000), a deuteromyceteous fungus which does not produces EPS. Recently, the production of β -1,3-glucanases by some strains of *Botryosphaeria* have been described (Giese et al., 2005; Crognale et al., 2007; Saldanha et al., 2007), and also their mode of action on β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucans (Giese et al., 2006). However, the correlation between the exopolysaccharide (botryosphaeran) and β -glucanases synthesis to degrade botryosphaeran by *Botryosphaeria* needs more investigations. Statistical analysis by the response surface methodology has also been successfully employed in cultures of *B. rhodina* MAMB-05 to optimise laccase production under submerged conditions (Vasconcelos et al., 2000) and also botryosphaeran production (Silva et al., 2007).

In this work the production of botryosphaeran and β -glucanases by *B. rhodina* MAMB-05 was studied during 300 hours, on glucose as sole carbon source, and a growth profile for production of β -1,3-glucanase was compared between *B. rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai on botryosphaeran as carbon source. The influence of different carbohydrate carbon sources (glucose, lactose, laminarin, botryosphaeran, yeast extract and fungal mycelium) to produce glucohydrolases by both fungi was also compared. A statistical mixture design was developed using botryosphaeran, glucose and lactose to optimize the production of β -glucanases by *B. rhodina* MAMB-05 and *T. harzianum* Rifai.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Botryosphaeran was obtained from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 by the procedure outlined by Barbosa et al. (2003). *B. rhodina* MAMB-05 mycelium was prepared according Giese et al., (2006). Pustulan, isolated from the lichen *Actinogyra muehlenbergii* (Iacomini et al., 1988), was a kind gift donated by Professor P.J. Gorin, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brazil. Laminarin (*Laminaria digitata*) and *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*-NPG) were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Microorganism and cultivation

2.2.1. Microorganisms

B. rhodina MAMB-5 (Barbosa et al., 1996) was maintained through periodic transfer on potato dextrose agar at 4 °C. *T. harzianum* Rifai strain, isolated from decayed wood of *Aspidosperma* sp. (Barbosa et al., 1992), was maintained through periodic transfer at 4 °C on xylose-agar incorporating Vogel minimal salts medium (VMSM) (Vogel, 1956).

2.2.2. Culture conditions and enzyme production

Inoculum of *B. rhodina* MAMB-05 was prepared by growing the fungus on agar plates containing VMSM, agar (20 g l⁻¹) and glucose (10 g l⁻¹) for 96 h at 28 °C. Each flask was inoculated with three 7 mm-diameter plugs taken from an agar plate colonised with freshly grown mycelium, and for growth profile experiments the inocula were developed according to Barbosa et al. (2003). Conidia were harvested from cultures of *T. harzianum* Rifai grown on agar plates containing VMSM, agar (20 g l⁻¹) and xylose (10 g l⁻¹) for 7 days at 28 °C and used to inoculate (1 x 10⁸ spores/flask) liquid medium. Microorganisms were grown in submerged liquid culture in Erlenmeyer flasks containing VMSM and one of each carbon

sources: glucose, lactose, yeast extract, *B. rhodina* MAMB-05 mycelium (10 g l⁻¹), botryosphaeran and laminarin (1 g l⁻¹). Cultures were incubated at 28 °C on a rotary shaker at 180 rpm for 8 days. All experiments were carried out in triplicate, and values reported represent average values ± SD.

The effect of three carbon sources (botryosphaeran, glucose and lactose) on β-1,3-glucanases production by *B. rhodina* MAMB-05 and *T. harzianum* Rifai was studied using the methodology of mixtures (Barros Neto et al. 1995) and response surface were applied. The experimental region was delimited by the range values of each component as follows (Table 1).

2.3. Enzymatic Assays

β-Glucanase activity was determined against the polysaccharides laminarin (4 g l⁻¹) and pustulan (2 g l⁻¹) in a final volume of 0.5 ml that comprised enzyme (ECF) and 25 mM sodium acetate buffers. The hydrolysis products released were measured as reducing sugars by the cuproarsenate method of Nelson (1944) and Somogyi (1945). β-1,3-Glucanase activity was measured against laminarin at 50 °C for 10 min, while pustulan (a β-1,6-glucan) was the substrate for determining β-1,6-glucanase activity in a hydrolysis time of 20 min at 50 °C. The unit of each β-glucanase activity was defined as the number of μmol reducing sugars produced min⁻¹ ml⁻¹ under the standard assay conditions.

β-Glucosidase activity was measured against *p*-NPG according Giese et al. (2006). The unit of β-glucosidase activity was defined as the number of μmol product liberated min⁻¹ ml⁻¹ under the standard assay conditions.

2.4. Analytical techniques

Reducing sugars were determined by the cuproarsenate method of Nelson (1944) and Somogyi (1945). Total sugars were measured by the phenol-sulphuric acid method of Dubois et al. (1956). Fungal biomass was determined gravimetrically by drying to constant weight at 70 °C. Protein was determined by a modified Lowry procedure according to Hartree (1972) using bovine serum albumin as standard.

2.5. *Statistical Mixture Design*

The conditions to optimise β -1,3-glucanase production by *B. rhodina* MAMB-05 and *T. harzianum* Rifai were performed using a mixture design with three components with 9 experimental runs, conducted in duplicate. The three variables used for optimisation of β -1,3-glucanases (Y_1 , U ml⁻¹) were x_1 (glucose g l⁻¹); x_2 (lactose g l⁻¹), and x_3 (EPS g l⁻¹) as described in Table 1. Analysis of variance (ANOVA) and multiple regression analysis were performed using STATISTICA Version 6. www.statsoft.com (StatSoft, Inc. 2001).

3. Results and Discussion

3.1. *Comparison of β -glucanase production by Botryosphaeria rhodina MAMB-05 and Trichoderma harzianum Rifai grown on glucose as sole carbon source*

Botryosphaeria rhodina MAMB-05 secretes an exopolysaccharide (EPS) named botryosphaeran, in liquid culture medium. The relationship between EPS and β -glucanases formation by *B. rhodina* MAMB-05 was evaluated growing this fungus on glucose 10 g l⁻¹ (Figure 1a). Steluti et al. (2004) observed that during the stationary growth phase (72 h) of *B. rhodina* MAMB-05 occurred maximum botryosphaeran production when this fungus was grown on glucose 50 g l⁻¹ (w/v). However, at this time glucose had been almost totally consumed and some EPS was still detected after 144 h of growth.

In this work *B. rhodina* MAMB-05 exhibited β -glucanase activity in the extra-cellular fluid (ECF) only when free glucose could not be detected (48 h). Considering that glucose concentration was 10 g l^{-1} (w/v), the fungal achieved the stationary growth phase concomitantly to an increase of botryosphaeran production (Figure 1a). The highest β -glucanase activity (1.3 Uml^{-1}) was detected in 192 hours (8 days) of culture, when the microorganism was in the death phase. The results showed that probably the derepression of β -glucanase is related to mycelium autolysis (observed by decreasing fungal biomass), and also to the degradation of both botryosphaeran (EPS) and fungal biomass. Rapp (1989) also described the same observation for *Sclerotium gluconicum* that produced 1,3- β -glucanase, 1,6- β -glucanase, β -glucosidase, and also the EPS scleroglucan (1,3;1,6- β -D-glucan).

The production and regulation of β -1,3-glucanases synthesis in fungal species occur typically in two different modes induction or catabolite repression. In the case of *B. rhodina* MAMB-05 the production of β -1,3-glucanases only occurred in the presence of low levels of glucose, being regulated under catabolite repression. The same observations were noticed to *Neurospora crassa* (Del Rey et al., 1979), *Botrytis cinerea* (Stahmann et al., 1992) and *Acremonium persicinium* (Pitson et al. 1991). Minato et al. (2004) described that lentinan concentration decreased when fruit bodies of *Lentinus edodes* were storage while β -1,3-glucanase activity increased at the same time.

In contrast, others microorganisms produce β -glucanases that were not repressed by glucose and were detected in the exponential growth phase, such as the β -1,3-glucanases produced by *T. viride* and *Saccharomyces cerevisiae* (Bielecki and Galas, 1991).

The growth profile and β -1,3-glucanase production by *T. harzianum* Rifai on glucose 10 g l^{-1} showed a distinct metabolism in comparison to *B. rhodina* MAMB-05 (Figure1b). The β -1,3-glucanase was secreted to culture fluid during the exponential growth phase, and glucose did not repress the production of this enzyme. This is in agreement with some results

described previously for *T. harzianum* strains (De La Cruz et al., 1993; Vásquez-Garcidueñas et al., 1998). While *B. rhodina* MAMAB-05 produced botryosphaeran in the exponential phase, and β -1,3-glucanase seems to be repressed, *T. harzianum* Rifai does not produce EPS, and this enzyme production occurred earlier (12 hours). Probably β -1,3-glucanase has an important lytic action involved in the process of cell wall formation during this exponential phase as suggested by Del Rey et al., 1969, when studied *T. viride*. The maximum production of β -1,3-glucanases (2.7 U ml^{-1}) by *T. harzianum* Rifai on glucose 10 g l^{-1} occurred in 144 hours (7 days) and it was two times higher than *B. rhodina* MAMB-05.

The production of β -1,3-glucanase at concentration of 20 g l^{-1} glucose was repressed by *T. hamatum* (Maj et al., 2002), however this enzyme was not detectable in the cultures of *T. harzianum*, when it was grown on 100 g l^{-1} of this same carbon source (de la Cruz et al., 1993). Then it seems that each species of *Trichoderma* has the enzyme regulated by different glucose concentration.

3.2. Comparison of β -glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai grown on botryosphaeran as sole carbon source

B. rhodina MAMB-05 was able to grow on botryosphaeran as sole carbon source and produce β -1,3-glucanase. Under this condition the liquid culture medium had its viscosity decreased as described by Giese et al (2005). The β -1,3-glucanase was detected during the exponential phase as it was also observed by Rapp (1989) when studied the production of β -1,3-glucanase by *Sclerotium glucanicum* on scleroglucan as carbon source. In the case of *B. rhodina* MAMB-05 the presence of β -1,3-glucanase was still detected at 300 hours (2.1 U ml^{-1}) of culture, and the activity did not decrease in comparison with the values obtained in 36 hours (0.07 U ml^{-1}) during the growth phase. Botryosphaeran induced a β -1,3-glucanase type

that did not hydrolyzed the alive *B. rhodina* MAMB-05 cells once β -(1 \rightarrow 3) and β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucans do belong to the mycelium composition (Corradi da Silva et al., 2008).

When *B. rhodina* MAMB-05 and *T. harzianum* Rifai were cultivated on botryosphaeran 1.5 g l⁻¹ as sole carbon source, both microorganisms secreted β -1,3-glucanases in the exponential growth phase (Figure 2). However, the microorganisms demonstrated different metabolic capacity. While for *B. rhodina* MAMB-05 the highest β -1,3-glucanase activity (0.3 U ml⁻¹) was obtained in 120 hours of culture, for *T. harzianum* Rifai was 2.3 U ml⁻¹ in 168 hours. The level of residual reducing sugar determined in each time during the growth profile was maintained low demonstrating an equilibrium between the β -1,3-glucanase hydrolysis on botryosphaeran and glucose consumption by both microorganisms. Giese et al (2006) showed that β -1,3-glucanases produced by these both microorganism on botryosphaeran as sole carbon source presented different hydrolysis products after incubation *in vitro* with botryosphaeran or laminarin. Then, probably, this different mechanism of action is related to the metabolic difference showed in this work.

3.3 Effect of different carbon sources on Botryosphaeria rhodina MAMB-05 and Trichoderma harzianum Rifai growth and β -glucanase production

Different carbon sources (monosaccharides, disaccharides and polysaccharides) were evaluated to produce β -glucanases by *B. rhodina* MAMB-05 and *T. harzianum* Rifai. *Trichoderma* has been described as a antagonistic fungi able to control phytopatogenic fungi. It is not an EPS producer, however presents higher levels of β -1,3-glucanases secretion (Ait-Lahsen et al., 2001).

Both microorganisms studied herein were able to grow on all carbon sources (Table 2), however the biomass and β -glucanase production were distinct. *B. rhodina* MAMB-05

produced higher biomass on lactose (4.7 g l⁻¹) and glucose (3.9 g l⁻¹) as sole carbon sources after 8 days of culture. Cunha et al. (2003) also evaluated the production of *B. rhodina* MAMB-05 biomass on different carbon sources and observed 6 g l⁻¹ on glucose after 4.5 days. The highest biomass production by *T. harzianum* Rifai was 7.88 g l⁻¹ on glucose and 7.17 g l⁻¹ on mycelium of *B. rhodina* MAMB-05 as sole carbon sources. The lowest biomass production was observed on botryosphaeran (1.61 g l⁻¹). Reducing sugars were detected in the medium controls containing mycelium and yeast extract as carbon sources (data not shown), and probably they promoted growth and also β -glucanase production by both microorganisms evaluated (Table 2 and Figure 3).

A major activity of β -1,3-glucanases to *B. rhodina* MAMB-05 (Figure 3a) was detected on glucose (3.1 U ml⁻¹). *B. rhodina* MAMB-05 appears to use glucose for growth and EPS production, which acted as inducer for enzyme production. Three β -D-glucans were also isolated from the mycelium of this fungus (Corradi da Silva et al., 2008), which could act as inducer of β -1,3-glucanase.

A higher β -1,3-glucanase activity was detected in the ECF of *T. harzianum* Rifai (Figure 3b) on *B. rhodina* MAMB-05 mycelium (2.8 U ml⁻¹) and laminarin (2.4 U ml⁻¹) cultures. The induction of β -1,3-glucanases by substrates containing glycosidic linkages like β -(1 \rightarrow 3) and microbial cell wall has been extensively described (Noronha and Ulhoa, 2000; Noronha et al., 2000; Giese et al., 2005; Donzelli et al., 2005).

Trichoderma spp. appears to synthesize more β -1,3-glucanases when grown on reductive disaccharide as the carbon source (Göhl et al., 1998). Lactose was chosen as the best carbon source for β -glucanase production by a genetically modified recombinant *Escherichia coli* (Beshay et al., 2003). Similar effects were also observed for *Penicillium italicum* (Santos et al., 1979).

Low levels of β -1,6-glucanase and β -glucosidase activities were produced by *B. rhodina* and *T. harzianum*. The β -1,6-glucanase is less commonly found and seems to be associated with β -1,3-glucanase activity, which appears to be synthesized into the cell at the exponential phase and only released to the medium at onset cell autolysis (Jayus et al., 2005). β -glucosidase has non-specific activity and releases glucose as the only hydrolysis product. It is common a synergistic action where β -glucans can be degraded by enzymes with different modes of action (Pitson et al., 1993).

3.4. Evaluation of β -glucanase production by *B. rhodina* MAMB-05 and *T. harzianum* Rifai on glucose, lactose and EPS by statistical mixture design

To evaluate the best composition using EPS, glucose, lactose as carbon sources, in the culture medium, to produce β -1,3-glucanases by *B. rhodina* MAMB-05 and *T. harzianum* Rifai, a statistical mixture design were developed, and the response was obtained in function of proportions of the mixture components (Table 1). To *B. rhodina* MAMB-05, the quadratic model is given by

$$A = 0.08\text{eps} + \mathbf{2.32}\text{glu} + \mathbf{2.24}\text{lac} - 0.03\text{eps}\text{lac} - 0.026\text{eps}\text{lac} - \mathbf{2.43}\text{glu}\text{lac} \quad (1)$$

(± 0.046) (± 0.046) (± 0.046) (± 0.53) (± 0.53) (± 0.53)

where *eps*, *glu*, and *lac* are the proportions of EPS, glucose and lactose. Standard error estimates are presented in parenthesis directly below their corresponding model coefficient. Bold face coefficients indicate those that are significant at the 95% confidence level. The equation shows that addition of EPS in the culture medium was not significant to enhance the production of β -1,3-glucanase by *B. rhodina* MAMB-05.

The equation shows also that $b_2 \approx b_3$ indicating that glucose and lactose promoted enzyme production in same levels. There is an antagonist effect between these both substrates, which decreased β -glucanase production by *B. rhodina* MAMB-05. The ANOVA of the

regression results are presented in Table 3. The mean square lack of fit/ pure error ratio of 0.0778 is much smaller than the $v_1 = 1, v_2 = 7$ 95% confidence F-distribution value of 5.59 indicating no significant lack of fit. Furthermore the mean square regression/residual ratio of 354.31 is much larger than the $v_1 = 5, v_2 = 8$ 95% confidence F-distribution value of 3.69 showing that the regression is highly significant. The response-surface plots are depicted as a contour and a 3-dimensional surface (Figure 4a). The maximum enzyme production value is predicted to occur for a pure glucose or pure lactose mixture.

A special cubic model as obtained to *T. harzianum* Rifai, which shows that $b_3 > b_2 > b_1$ where lactose promoted highest enzyme production than glucose and botryosphaeran, respectively (Equation 2).

$$A = \mathbf{2.97}eps + \mathbf{3.85}glu + \mathbf{4.24}lac + \mathbf{7.09}epsglu + \mathbf{5.28}epslac + 1.99glulac - \mathbf{45.03}epsglulac \quad (2)$$

$(\pm 0.102) \quad (\pm 0.102) \quad (\pm 0.102) \quad (\pm 1.49) \quad (\pm 1.49) \quad (\pm 1.49) \quad (\pm 10.52)$

where *eps*, *glu*, and *lac* are the proportions of EPS, glucose and lactose. Standard error estimates are presented in parenthesis directly below their corresponding model coefficient. Bold face coefficients indicate those that are significant at the 95% confidence level. A synergic effect existent between botryosphaeran with each others substrates is favourable to β -glucanase production by *T. harzianum* Rifai. A combined effect of all substrates evaluated resulted in a high decrease in β -glucanase activity. Addition of EPS on lactose or glucose substrates in culture medium promoted the enzyme production in conditions tested as shows in Figure 4b. The r^2 value implies 93 % of the variability in the observed response values can be explained by the model. The pure error was low indicating good reproducibility of the experimental data (Table 4).

The production of hydrolytic enzymes such as β -1,6-glucanases and β -glucosidases by both *B. rhodina* MAMB-05 and *T. harzianum* Rifai did not presented significant differences ($p < 0.05$) in conditions of fungal growth evaluated (data not shown). In conclusion, β -glucanases production by *T. harzianum* Rifai was not repressed by mono- and di-saccharides

evaluated. The synthesis of β -glucanases by *B. rhodina* MAMB-05 appears to be regulated by catabolite repression and increases significantly after growth phase in function of EPS presence. A possible relationship between onset of glucanases activity and EPS synthesis or disappearance needs more investigations to further biotechnological applications.

Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESP and Fundação Araucária do Paraná (Brazil) for a research grant. FAPESP is gratefully acknowledged for a post-graduate scholarship (EC Giese and LG Covizzi).

References

- [1] S. Bielecki, E. Galas, Microbial β -glucanases different from cellulases, *Biotechnol.*, 10 (1991) 275-304.
- [2] S.M. Pitson, R.J. Seviour, B.M. McDougall, Non-cellulolytic fungal β -1,3-glucanases: Their physiology and regulation, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 178-192.
- [3] J.L. Marco, C.R. Felix, Purification and characterization of a β -glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 50 (2007) 21-29.
- [4] N. Koizumi, Y. Isoda, K. Maeda, S. Masuda, G. Fibriansah, T. Kumasaka, R. Yatsunami, T. Fukui, S. Nakamura, Characterization of *Nocardopsis* β -1,3-glucanase with additional carbohydrate-binding domains, *Nucleic Acids Symp. Series*, 51 (2007) 459-460.
- [5] A. Soler, J. de la Cruz, A. Llobell, Detection of β -1,6-glucanase isozymes from *Trichoderma* strains in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectrofocusing gels, *J. Microbiol. Methods* 35 (1999) 245-251.

- [6] Jayus, O. Jumadi, B.M. McDougall, R.J. Seviour, Synthesis of extracellular (1→3)- and (1→6)- β -glucanase activities in carbon limiting chemostat culture by the fungus *Acremonium* sp. IMI 383068, *Enz. Microb. Technol.* 36 (2005) 680-686.
- [7] S.M. Pitson, R.J. Seviour, B.M. McDougall, Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role β -glucan degradation, *Enz. Microb. Technol.* 21 (1997) 182-190.
- [8] E.F. Noronha, C.J. Ulhoa, Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*, *FEMS Microbiol. Lett.* 183 (2000) 119-123.
- [9] E.F. Noronha, A. Kipnis, A.P. Junqueira-Kipnis, C.J. Ulhoa, Regulation of 36-kDa β -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*, *FEMS Microbiol. Lett.* 188 (2000) 19-20.
- [10] E.C. Giese, L.G. Covizzi, D. Borsato, R.F.H. Dekker, M.L. Corradi da Silva, A.M. Barbosa, Botryosphaeran, a new substrate for the production of β -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai, *Process Biochem.* 40 (2005) 3783-3788.
- [11] S. Crognale, M. Bruno, M. Fidaleo, M. Moresi, M. Petruccioli, Production of β -glucan and related glucan-hydrolases by *Botryosphaeria rhodina*, *J. Appl. Microbiol.* 102 (2007) 860-871.
- [12] R.L. Saldanha, A.M. Barbosa, J.E. Garcia, R.F.H. Dekker, L.A. Villas-Boas, Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production, *Braz. J. Microbiol.* 38 (2007) 259-264.
- [13] E.C. Giese, L.G. Covizzi, R.F.H. Dekker, N.K. Monteiro, M.L. Corradi da Silva, A.M. Barbosa, Enzymatic hydrolysis of botryosphaeran and laminarin by β -1,3-glucanases produced by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai, *Process Biochem.* 41(2006) 1265-1271.

- [14] A.M. Barbosa, R.M. Steluti, R.F.H. Dekker, M.S. Cardoso, M.L. Corradi da Silva. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3;1→6)-β-D-glucan produced by the fungus, *Botryosphaeria* sp. Carbohydr. Res. 338 (2003) 1691-1698.
- [15] M. Iacomini, P.J.G. Gorin, M. Baron, A.P. Tulloch, M. Mazurek. Novel D-glucans obtained by dimethyl sulfoxide extraction of the lichens *Letharia vulpina*, *Actinogyra muehlenbergii*, and an *Usnea* sp. Carbohydr. Res. 176 (1988) 117-126.
- [16] A.M. Barbosa, R.F.H. Dekker, G.E. Hardy, Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478, Lett. Appl. Microbiol. 23 (1996) 93-96.
- [17] A.M. Barbosa, Seleção de microrganismos xilanolíticos e produção de xilanases pelo *Trichoderma harzianum* Rifai em bagaço de cana, 1992, (Doctoral thesis) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba (in Portuguese).
- [18] H.J. Vogel, A convenient growth medium for *Neurospora crassa*, Microbiol. Genet. Bull. 13 (1956) 42-43.
- [19] B. Barros Neto, I.S. Scarminio, R.E. Bruns. Planejamento e Otimização de Experimentos. 2. ed. UNICAMP - Campinas: UNICAMP, 1995. v. 1. 299 p. (in Portuguese).
- [20] N.A. Nelson, Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose, J. Biochem. 153 (1944) 376-380.
- [21] M.A. Somogyi. A new reagent for determination of sugars, J. Biol. Chem. 160 (1945) 61-68.
- [22] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Reber, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Anal. Chem. 28 (1956) 350-356.
- [23] E.F. Hartree, Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response, Anal. Biochem. 48 (1972) 422-427.

- [24] R.F.H. Dekker, A.M. Barbosa, The effect of aeration and veratryl alcohol on the production of 2 laccases by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp, *Enz. Microb. Technol.* 28 (2001) 81-88.
- [25] M.L. Corradi da Silva, N.L. Izeli, P.F. Martinez, I.R. Silva, C.J.L. Constantino, M.S. Cardoso, A.M. Barbosa, R.F.H. Dekker, G.V.J. Silva, Purification and structural characterisation of (1→3;1→6)-β-D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study, *Carbohydr. Pol.* 61 (2005) 10-17.
- [26] R.M. Steluti, E.C. Giese, M.M. Piggato, A.F.G. Sumiya, L.G. Covizzi, A.E. Job, M.S. Cardoso, M.L. Corradi da Silva, R.F.H. Dekker, A.M. Barbosa, Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features, *J. Basic Microbiol.* 44 (2004) 480-486.
- [27] F. Del Rey, I. García-Acha, C. Nombela. The regulation of β-glucanase synthesis in fungi and yeast. *J. Gen. Microbiol.* 110 (1979) 83-89.
- [28] K.P. Stahmann, P. Pielken, K-L. Schimz, H. Sahn, Degradation of extracellular I-(1,3)(1,6)-D-glucan by *Botrytis cinerea*, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 3347-3354.
- [29] S. Pitson, R.J. Seviour, J. Bott, S.J. Stasinopoulos, Production and regulation of β-glucanases in *Acremonium* and *Cephalosporium* species, *Mycol. Res.* 95 (1991) 352-356.
- [30] P. Rapp, 1,3-β-glucanase, 1,6-β-glucanase and β-glucosidase activities of *Sclerotium glaucicum*: Synthesis and properties, *J. Gen. Microbiol.* 135 (1989) 2847-2858.
- [31] H. Ait-Lahsen, A. Soler, M. Rey, J. de la Cruz, E. Monte, A. Llobell. An antifungal exo-α-1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 5833-5839.

- [32] M.A.A. Cunha, A.M. Barbosa, E.C. Giese, R.F.H. Dekker, The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp, J. Basic Microbiol. 43 (2003) 385-392.
- [33] M.L. Corradi da Silva, E.K. Fukuda, A.F.D. Vasconcelos, R.F.H. Dekker, A.C. Matias, N.K. Monteiro, M.S. Cardoso, A.M. Barbosa, J.L.M. Silveira, G.L. Sasaki, E.R. Carbonero, Structural characterization of the cell wall D-glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, Carbohydr. Res. 343 (2008) 793-798.
- [34] G.G. Donzelli, K.J. Siebert, G.E. Harman, Response surface modeling of factors influencing the production of chitinolytic and beta-1,3-glucanolytic enzymes in *Trichoderma atroviride* strain P1, Enz. Microb. Technol. 37 (2005) 82-92.
- [35] M. Göhl, R. Srinivas, W. Dammertz, M.R. Udupa, T. Panda, Localization of b-1,3-glucanase in *Trichoderma harzianum*, Bioprocess Eng. 19 (1998) 237-241.
- [36] U. Beshay, H. El-Enshasy, 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.
- [37] T. Santos, M. Sanchez, R. Villanueva, N. Nombela, Derepression of β -1,3-glucanases in *Penicillium italicum*: Localization of the various enzymes and correlation with cell wall mobilization an autolysis, J Bacteriol. 137 (1979) 6-12.
- [38] A. Maj, D. Witkowska, M. Robak, Biosynthesis and properties of beta-1,3-glucanases of *Trichoderma hamatum*, Electr. J. Pol. Agric. Univ. 5 (2002) art.01.
- [39] J. De La Cruz, M. Rey, J.M. Lora, A. Hidalgo-Gallego, F. Domínguez, J.A. Pintor-Toro, A. Llobel, T. Benítez, Carbon source control on β -glucanases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*, Arch. Microbiol. 159 (1993) 316-322.

- [40] Jayus, B.M. McDougall, R.J. Seviour, Factors affecting the synthesis of (1→3) and (1→6)-β-glucanases by the fungus *Acremonium* sp. IMI 383068 grown in batch culture, *Enz. Microb. Technol.* 31 (2002) 289-299.
- [41] Jayus, B.M. McDougall, R.J. Seviour, The effect of dissolved oxygen concentrations on (1→3)- and (1→6)-β-glucanase production by *Acremonium* sp. IMI 383068 in batch culture, *Enz. Microb. Technol.* 36 (2005) 176-181.
- [42] C.C. Silva, R.F.H. Dekker, R.S.F. Silva, M.L. Corradi da Silva, A.M. Barbosa, Effect of soybean oil and Tween 80 on the production of botryosphaeran by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, *Process Biochem.* 42 (2007) 1254-1258.
- [43] A.F.D. Vasconcelos, A.M. Barbosa, R.F.H. Dekker, I.S. Scarmínio, M.I. Rezende, Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method, *Process Biochem.* 35 (2000) 1131-1138.
- [44] S. Vásquez-Garcidueñas, C.A. Leal-Morales, A. Herrera-Estrella, Analysis of the β-1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 98 (1998) 1442-1446.

Table 1

Statistical mixture design matrix defining conditions for the time of growth and botryosphaeran concentration on β -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai.

Exp.	Carbon sources (g l ⁻¹)			β -1,3-glucanase activity (U ml ⁻¹)	
	EPS	Glucose	Lactose	<i>B. rhodina</i>	<i>T. harzianum</i>
1	2	0	0	0.079 \pm 0.01	2.979 \pm 0.09
2	0	10	0	2.318 \pm 0.07	3.853 \pm 0.19
3	0	0	10	2.238 \pm 0.08	4.243 \pm 0.07
4	1	5	0	0.816 \pm 0.02	3.289 \pm 0.20
5	0	5	5	2.218 \pm 0.01	4.247 \pm 0.21
6	1	0	5	0.837 \pm 0.02	4.006 \pm 0.07
7	0.7	3.3	3.3	1.259 \pm 0.01	3.621 \pm 0.08
8	0.13	1.7	1.7	0.744 \pm 0.01	3.932 \pm 0.01
9	0.03	6.7	1.7	1.664 \pm 0.06	4.095 \pm 0.11
10	0.03	1.7	6.7	1.624 \pm 0.05	4.139 \pm 0.05

Table 2

Production of fungal biomass by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai grown on different carbon sources ^a.

Carbon sources	<i>B. rhodina</i> MAMB-05	<i>T. harzianum</i> Rifai
Glucose ^b	3.91 ±0.22	7.88 ±0.00
Lactose ^b	4.66 ±0.43	3.98 ±0.17
Botryosphaeran ^c	0.84 ±0.12	1.61 ±0.11
Laminarin ^c	1.19 ±0.05	3.31 ±0.10
Yeast extract ^b	3.55 ±0.34	4.42 ±0.22
<i>B. rhodina</i> mycelium ^b	2.93 ±0.75	7.17 ±0.24

^a Results represent the average of triplicate analyses ± SD, ^b 10g/l; ^c 1g/l

Table 3ANOVA data for the production of β -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>
Regression	7.71541	5	1.54308	354.3137 ^a	0.000000
Residual	0.03484	8	0.00435		
Lack of fit	0.00038	1	0.00038	0.0778 ^b	0.788343
Pure error	0.03445	7	0.00492		
Total	7.75025	13	0.59617		

^a *F* – ratio (regression/residual)^b *F* – ratio (lack of fit/pure error)

Table 4

ANOVA data for the production of β -1,3-glucanases by *Trichoderma harzianum* Rifai.

Source of variation	Sum of Squares	Degrees of freedom	Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>
Regression	2.23023	6	0.37170	17.95182 ^a	0.00063
Residual	0.14494	7	0.02070		
Lack of fit	0.00000	0	0.00000		
Pure error	0.14494	7	0.02070		
Total	2.37517	13	0.18270		

^a *F* – ratio (regression/residual)

Legend to Figures

Figure 1

Growth profile for production of β -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai on glucose as sole carbon source. RRS, residual reducing sugars.

Figure 2

Growth profile for production of β -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai on botryosphaeran as sole carbon source. RRS, residual reducing sugars.

Figure 3

β -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 (a) and *Trichoderma harzianum* Rifai (b) cultivated in different carbon sources.

Figure 4

Response-surface plot for β -1,3-glucanase production (Y_1) by (a) *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and (b) *Trichoderma harzianum* Rifai as a function of EPS (x_1), glucose (x_2) and lactose (x_3) concentration.

Figure 1

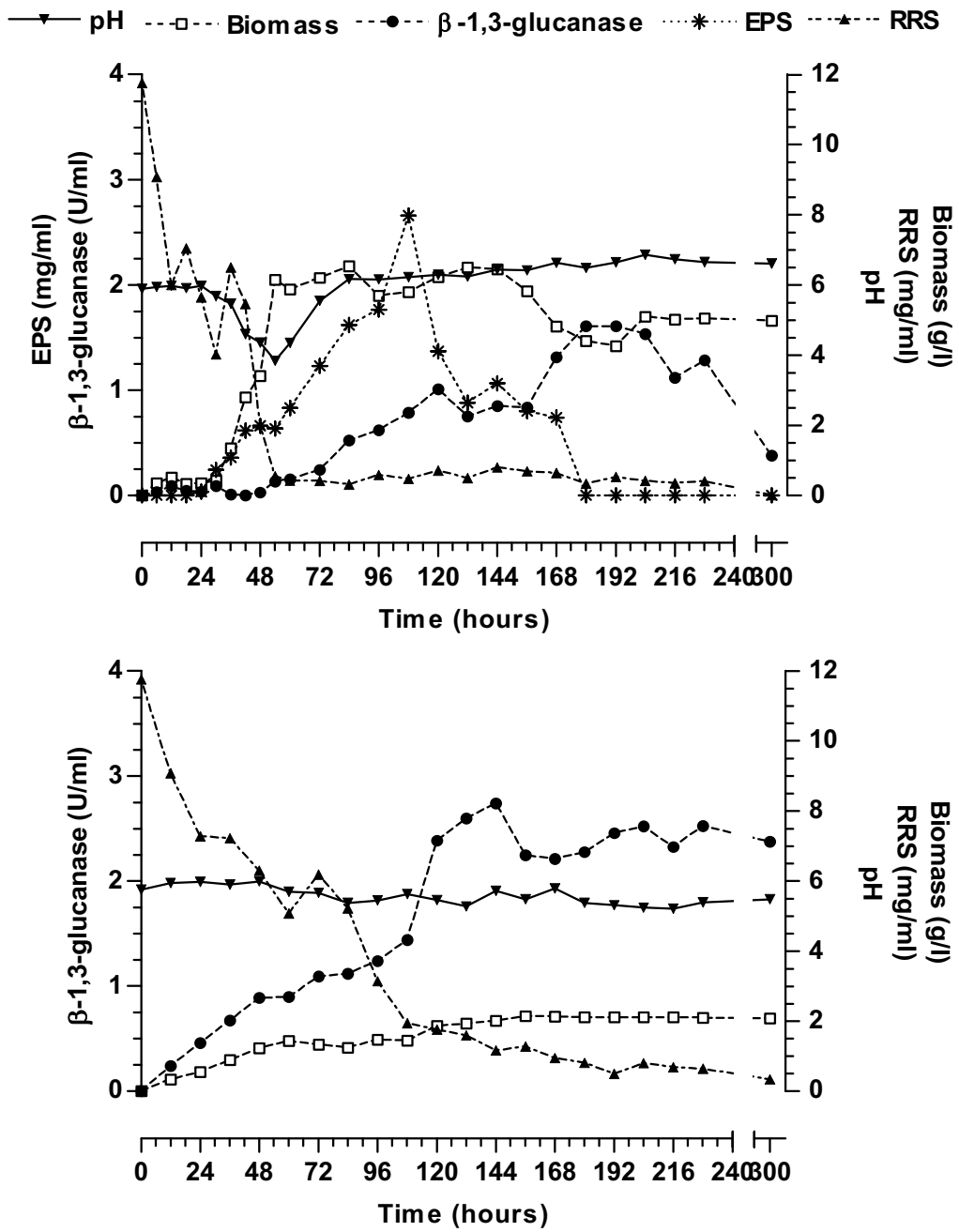


Figure 2

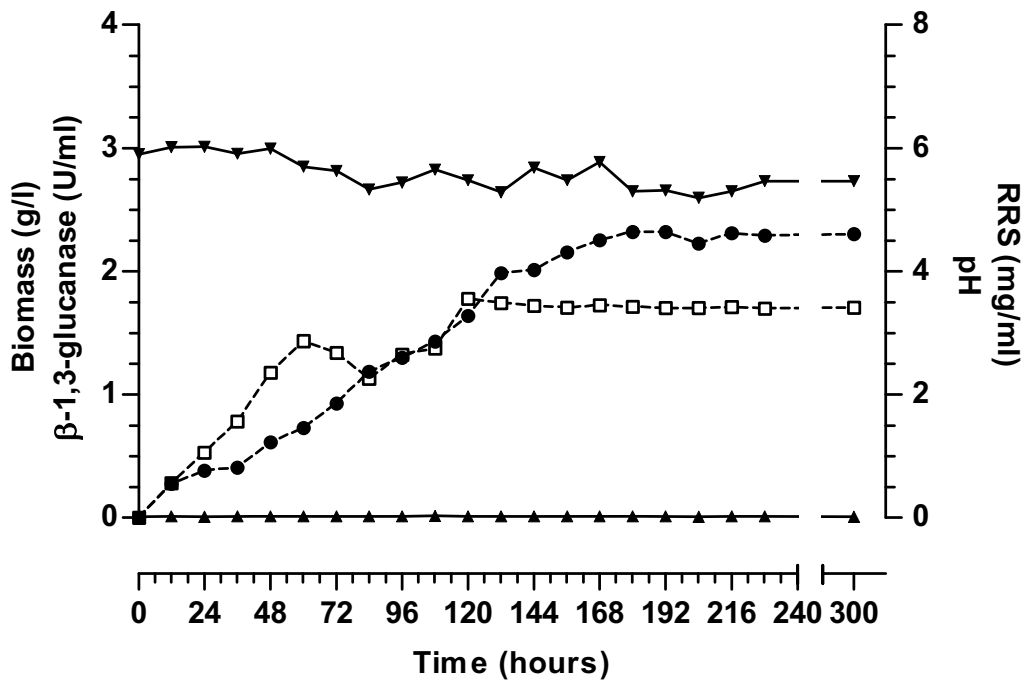
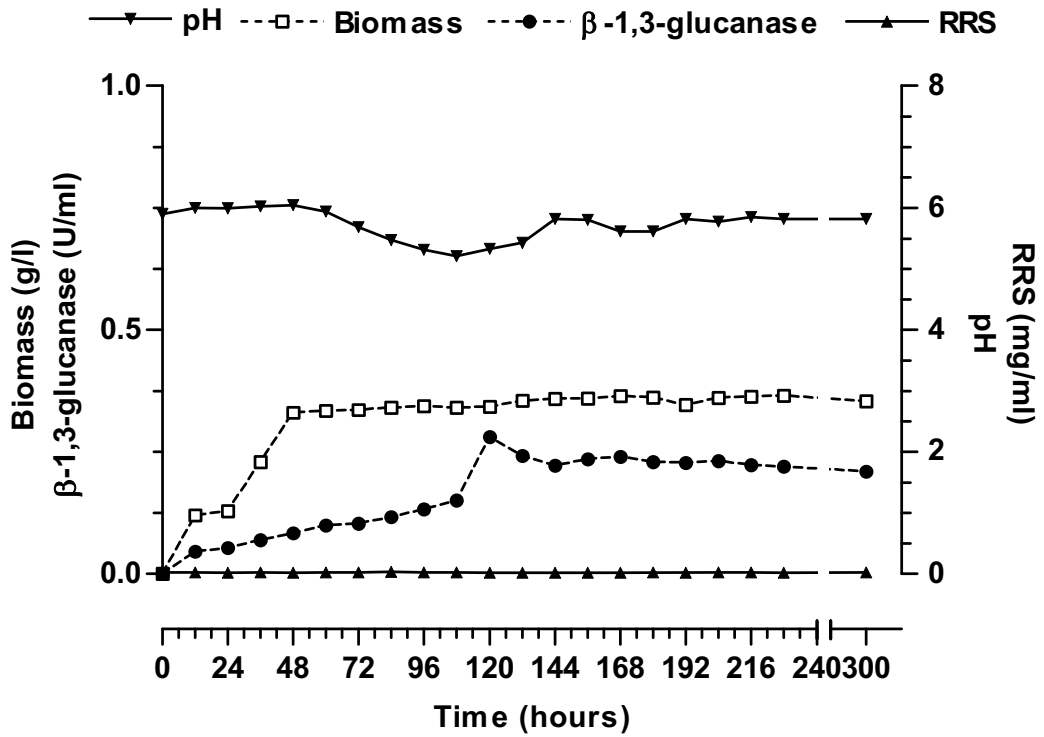
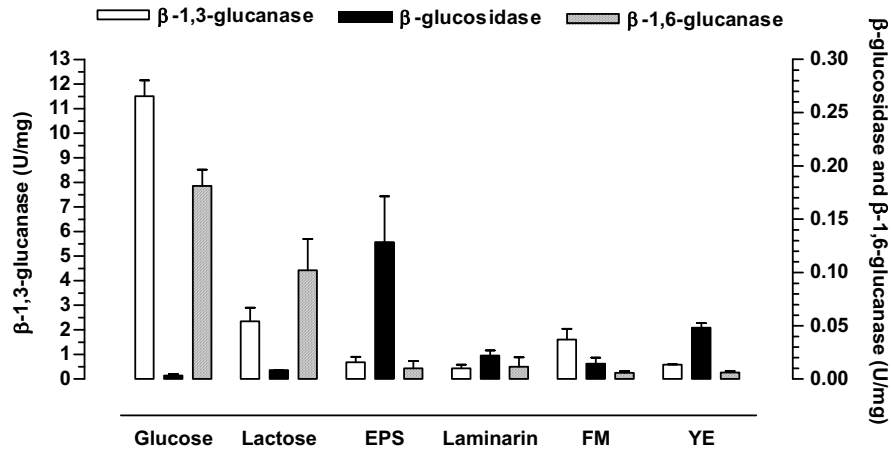
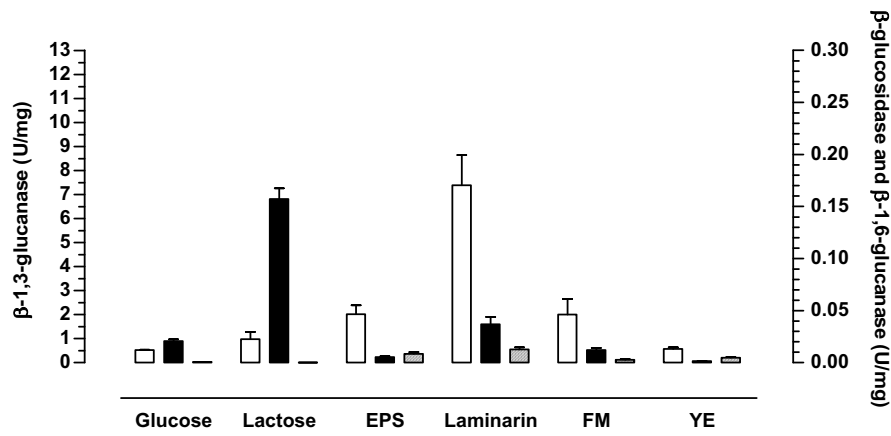


Figure 3

(a)



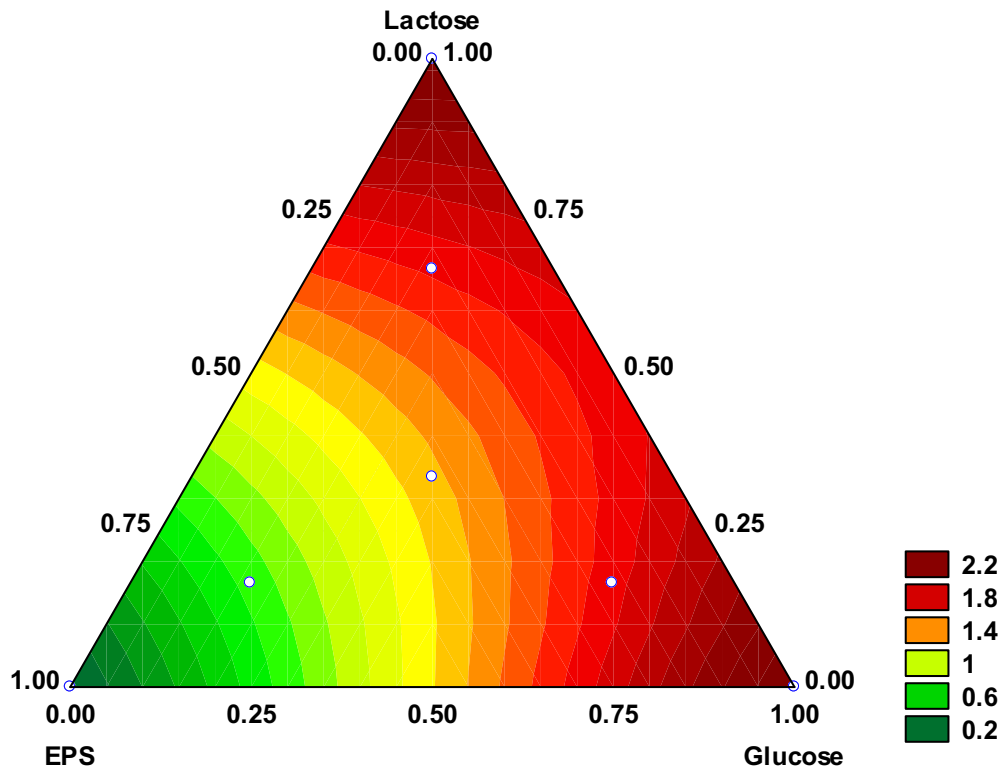
(b)



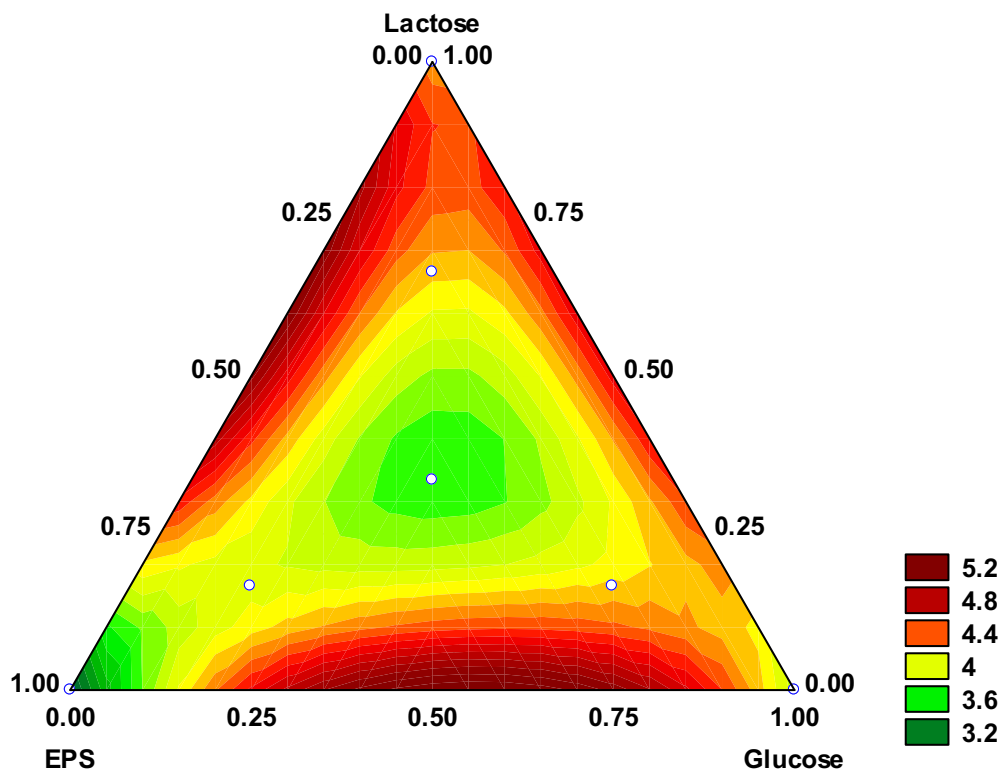
^a, exopolysaccharide botryosphaeran; ^b, fungal mycelium; ^c, yeast extract

Figure 4

(a)



(b)



Capítulo III

**Triple helix conformation of botryosphaeran, a (1→3;1→6)-β-D-glucan produced by
Botryosphaeria rhodina MAMB-05**

**Triple helix conformation of botryosphaeran, a (1→3;1→6)-β-D-glucan
produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05**

Ellen C. Giese^{1*}, Robert F.H. Dekker², Aneli M. Barbosa³, Roberto da Silva¹

¹ *Departamento de Química e Ciências Ambientais, IBILCE,*

Universidade Estadual Paulista, 15054-000, São José do Rio Preto-SP, BRAZIL

² *Universidad de Castilla - La Mancha, Instituto de Regional Investigación Científica*

Aplicada (IRICA), 13071 Ciudad Real, SPAIN

³ *Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, CCE,*

Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina-PR, BRAZIL

Abstract

Botryosphaeran, a (1→3;1→6)-β-D-glucan produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, was found to be present in a triple helix conformation from helix-coil transition studies using Congo Red. The triple helix conformation was disrupted at increasing alkali concentrations. Conformational changes were also observed using phenanthrene as a fluorescent probe, and the fluorescence intensity decreased 80 % in the presence of dimethyl sulfoxide. The results confirmed the triple helix conformation of botryosphaeran, an important property manifesting biological response modifying activity.

Keywords: Botryosphaeran; (1→3;1→6)-β-D-Glucans; Botryosphaeria rhodina MAMB-05;

Triple Helix Conformation

1. Introduction

Botryosphaeran, a water-soluble exopolysaccharide (EPS) produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 consists of a linear backbone chain comprising (1→3)-β-D-glucopyranosyl groups to which are attached branched chains of (1→6)-linked β-glucosyl and diglucosyl residues (Barbosa et al., 2003). Botryosphaeran can present more or less ramification points along the backbone chain according to the substrates used during fermentation (Corradi da Silva et al., 2005). This biomacromolecule was found to be non-mutagenic by the micronucleus test, and in animal studies botryosphaeran exhibited strong antimutagenic activity (Miranda et al. 2007). In the sulfonated form, this biopolymer presented anticoagulation activity (unpublished data).

The structure-functional relationships of biological response modifying activities are related to molecular conformation, the degree of branching, and molecular weight of the biopolymer (Bohn and BeMiller, 1995; Leung et al. 2006). Three conformers of soluble β-1,3-glucans are known; single helix, triple helix, and random coil. Some related fungal (1→3;1→6)-β-D-glucans, such as scleroglucan and schizophyllan, adopt a triple helix conformation that strongly influences biological activity (Yoshitomi et al., 2005).

The objectives of the work reported here were to examine whether botryosphaeran, because of its biological activity, also exhibited conformational structure as a triple helix by helix-coil transition studies, and to determine the conformational properties of the triple helix as a function of the solvent nature, and the influence of salts on chain flexibility.

2. Materials and Methods

2.1. Cultivation and production of botryosphaeran

Botryosphaeria rhodina MAMB-05 was maintained at 4 °C on potato dextrose agar. Inoculum was prepared and fungal cultures grown on media containing glucose or fructose (50 g l⁻¹) in submerged cultivation at 28 °C for 72 h as previously described (Steluti et al. (2004). Fungal cultures were harvested and the supernatant containing EPS (EPS_{GLC}, EPS_{FRU} for glucose- and fructose- grown cultures, respectively) recovered by centrifugation (3000 x g/15 min at 4 °C). Absolute ethanol (4 volumes) was added, the EPS allowed to precipitate overnight at 4 °C and recovered. It was then dissolved in water, exhaustively dialysed at 4 °C against several changes of water over 48 h, and the dialysate lyophilised.

2.2. Helix-coil transition analyses

Lyophilised EPS was dissolved in de-ionised water, or in aqueous salt solutions (Table 1) at the desired concentration, by prolonged stirring at 37 °C. For studies on the effect of alkali concentration and dimethyl sulfoxide (Me₂SO), solutions of EPS were adjusted with a few drops of 5 M NaOH solution, or Me₂SO, so as to maintain a constant EPS concentration.

Helix-coil transition experiments using Congo Red dye (CR, Sigma) were performed according to Ogawa et al. (1972). An equal volume of solutions of EPS (1 g l⁻¹) and CR (91 μM solution) was mixed in sodium hydroxide or Me₂SO, and the absorption maximum of the resulting solution immediately measured. The CR-complexes formed with dextran and laminarin (Sigma), and paramylon (Fluka) were also examined for comparative purposes.

Fluorescence spectral analyzes were performed as described by Zhang et al. (2000). EPS_{GLC} was first dissolved in water and a phenanthrene-MeOH (Sigma) stock solution added as a fluorescence probe. The EPS and fluorescence probe concentration was adjusted to 1 g l⁻¹

and 5 μM , respectively. Excitation and emission slits were set at 5.0 and 3.0 nm on a fluorimeter at wavelengths of 252 and 364 nm, respectively. Viscosity was determined with a Brookfield Viscometer (Model ED-II equipped with an S-18 spindle operated at 2 rpm).

The Tukey test was performed to confirm statistical significance of all data using Statistica Version 6.0. (www.statsoft.com; StatSoft, Inc. 2001).

3. Results and discussion

3.1. Helix-coil transition of botryosphaeran in NaOH solution

In the presence of alkali (NaOH), coil chains of EPS can affect the stability of inter- and intra- molecular hydrogen bonds and a conformational transition is observed (Young et al., 2000). Helix or random coil conformational states have been detected by a simple method that consists of the formation of a complex between the biopolymer and the dye CR, which shows a red shift of the λ_{max} in the visible spectrum. Ogawa et al. (1972) proposed this finding to determine the conformation of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans based on the ability of dye to interact with the carbohydrate possibly due to hydrogen bond formation with innate free hydroxyl linkages in a triple helix molecular form.

A complex of dye and botryosphaeran (CR-EPS_{GLC}) was formed in aqueous solution, demonstrating that the EPS from *B. rhodina* MAMB-05 has a native conformational state as a triple helix (Figure 1). CR-EPS_{GLC} formation can be explained by enhancement of λ_{max} from 495 to 511 nm. A decrease in the maximum wavelength from 510 to 492 nm in the range of 0.2-0.25 M NaOH could be explained as resulting from disruption of the triple helix, and was in agreement with observations by Moresi et al. (2003). This behavior has frequently been observed in (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucans, and triple helix resistance to NaOH incrementally

varies according to the kind of polysaccharide. For example, a β -D-glucan produced by *Pleurotus tuber-regium* presented a maximum absorption at λ_{530} that declined after addition of NaOH in the range from 0.1-0.16 M (Chenghua et al., 2000). In *Pleurotus florida*, however, the conformational transition of a similar β -D-glucan occurred at lower concentrations of alkali (0.05 M), and the dye-inclusion complex formed showed a λ_{\max} at 511 nm (Rout et al., 2005). Gradual addition of alkali instigates the helix-coil transition without contributing to hydrolysis of the β -linked glucosidic chains. The native conformation is easily restored through neutralization and dialysis (Young et al., 2000).

Conformational changes in EPS_{GLC} solutions were also observed in fluorescence analyses with phenanthrene as an indicator of conformational state, as it specifically associates with a partially-opened triple helix, a simple helix or stretched/random coils (Young et al., 2003). Interaction of phenanthrene with EPS_{GLC} entailed a significant ($p < 0.05$) decrease of fluorescence intensity in the presence of NaOH concentrations higher than 0.2 M (Figure 2).

3.2. Helix-coil transition of different botryosphaerans in NaOH solution

B. rhodina MAMB-05 produces a family of extracellular botryosphaerans when grown on different substrates (Steluti et al., 2004) that possess different degrees of ramification at C-6; EPS_{FRU} was more ramified (31 %) than EPS_{GLC} (22 %) (Corradi da Silva et al., 2005). Laminarin (*Laminaria digitata*) are lesser-branched (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)- β -D-glucans having 5-10 % ramification (Young et al., 2000), while paramylon (*Euglena gracilis*) is a linear (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan with no branching at C-6 (Barsanti et al., 2001).

EPS_{FRU} presented more resistance than EPS_{GLC} to conformational transitions in alkali medium as verified by a decrease in maximum wavelength (λ_{507} to λ_{495}) between 0.25- 0.35 M

NaOH. By comparison, the structural feature of less-ramified laminarin could be responsible for changes in its triple helix conformation at lower NaOH concentration (0.15 M; Figure 1a), in agreement with the finding by Ogawa et al., (1972). In the case of paramylon, a transition form was observed between 0.2-0.4 M NaOH. A similar behavior was also described for a linear (1→3)-β-D-glucan extracted from the cell wall of an *Aspergillus* sp. (Ishibashi et al., 2004). The presence of ramification at C-6 appears to contribute to the enhancement of water solubility as the ramified chains are outside the triple helix thus avoiding the formation of insoluble aggregates (Bot et al., 2001).

3.3. Effect of organic and inorganic salts on botryosphaeran conformation and viscosity

Denaturation of the triple helix can also occur through electrostatic interactions by the addition of salts that destabilize intra-molecular interactions between the carbohydrate chains (Fariña et al. 2001). An enhancement of ionic forces can also act on hydrogen bonds and disrupt the triple helix, as hydrogen bonds play a role in the stabilisation of conformation.

Figure 1b shows the effect of Me₂SO increment on EPS_{GLC} conformational state in aqueous solution. Me₂SO concentrations greater than 85 % (v/v) instigated a dissociation of CR-EPS formed at a lower solvent content. Yanaki et al. (1981) observed that the triple helix structure of scleroglucan was disrupted in 87 % (v/v) Me₂SO as confirmed through intrinsic viscosity observations.

The effect of urea and NaCl additions on the relative viscosity of different aqueous solutions of EPS_{GLC} was also evaluated. The viscosity depends upon the conformational structure, degree of polymerization and molecular mass of the polysaccharide. Usually addition of a simple electrolyte protects the intermolecular electrostatic interactions and

affects water mobility, decreasing the viscosity and the biopolymer assumes a more flexible configuration (Funami, Nishinari, 2007).

The viscosity decrement of EPS_{GLC} solutions in the presence of salts (urea and NaCl) was observed (Table 1), and similar results have been described for a diverse range of polysaccharides (Fariña et al., 2001). The presence of alkali (NaOH) at different concentrations, also promoted a loss of viscosity of a solution of EPS_{GLC}, and this effect was more pronounced at higher concentrations of EPS (data not shown). Botryosphaeran showed non-Newtonian pseudoplastic behaviour in aqueous solutions, and viscosity decreased with increasing shear rates (unpublished data). A triple helical structure of EPS_{GLC} in solution appears to be responsible for the pseudoplasticity. A small decrease of viscosity was observed in the presence of salts, and we conclude from this that the conformational state of EPS_{GLC} was not changed under these conditions. Sodium hydroxide as reported by Fariña et al. (2001), induces a structural denaturation of β -D-glucan generating changes in the viscoelastic behavior of these biopolymer solutions.

Acknowledgements

CAPES, FAPESP and Fundação Araucária do Paraná-Projeto N° 5777 (Brazil) are acknowledged for financial support. LG Covizzi is thanked for experimental assistance. EC Giese is grateful to FAPESP for a scholarship.

References

Barbosa, A. M., Steluti, R. M., Dekker, R. F. H., Cardoso, M. S., & Corradi da Silva, M. L. (2003). Structural characterization of botryosphaeran: a (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)- β -D-glucan produced by the fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydrate Research*, 338, 1691-1698.

Barsanti, L., Vismara, R., Passarelli, V., & Gualtieri, P. (2001). Paramylon content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *Journal of Applied Phycology*, 13, 59-65.

Bohn, J. A., & BeMiller, J. N. (1995). (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: A review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, 28, 3-14.

Bot, A., Smorenburg, H. E., Vreeker, R., Pâques, M., & Clark, A. H. (2001). Melting behavior of schizophyllan extracellular polysaccharide gels in the temperature range between 5 and 20°C. *Carbohydrate Polymers*, 45, 363-372.

Chenghua, D. Xiangliang, Y., Xiaoman, G. Yan, W., Jingyan, Z., & Huibi, X. (2000). A β-D-glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. *Carbohydrate Research*, 328, 629-633.

Corradi da Silva, M. L., Izeli, N. L., Martinez, P. F., Silva, I. R., Constantino, C. J. L., Cardoso, M. S., Barbosa, A. M., Dekker, R. F. H., & Silva, G. V. J. (2005). Purification and structural characterisation of (1→3,1→6)-β-D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. *Carbohydrate Polymers*, 61, 10-17.

Fariña, J. I., Siñeriz, F., Molina, O. E., & Perotti, N. I. (2001). High scleroglucan production by *Sclerotium rolfsii*: Influence of medium composition. *Biotechnology Letters*, 20, 825-831.

Funami, T., & Nishinari, K. (2007). Gelling characteristics of curdlan aqueous dispersions in the presence of salts. *Food Hydrocolloids*, 21, 59-65.

Ishibashi, K-I., Miura, N. N., Adachi, Y., Tamura, H., Tanaka, S., & Ohno, N. (2004). The solubilization and biological activities of *Aspergillus* (1→3)-β-D-glucan. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 42, 155-166.

Leung, M. Y. K., Liu, C., Koon, J. C. M. & Fung, K. P. (2006). Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters* 105, 101-114.

Miranda, C. C. B. O., Dekker, R. F. H, Serpeloni, J. M., Fonseca, E. A. I., Cólus, I. M. S., & Barbosa, A. M. (2008). Anticlastogenic activity exhibited by botryosphaeran, a new exopolysaccharide produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *International Journal of Biological Macromolecules* 42, 172-177.

Moresi, M., Bruno, M., Crognale, S., & Petruccioli, M. (2003). Rheological behaviour of β -glucan from *Botryosphaeria rhodina* in aqueous dispersions. In: Fischer P, Marti I, Windhab EJ (ed) *Proceedings: Third International Symposium on Food Rheology and Structure*. Lappersdorf (D): Kerschensteiner Verlag GmbH.

Ogawa, K., Watanabe, T., Tsurugi, J., & Ono, S. (1972). Conformational behaviour of a gel-forming (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucan in alkaline solutions. *Carbohydrate Research*, 23, 399-405.

Rout, D., Mondal, S., Chakraborty, I., Pramanik, M., & Islam, S. S. (2005). Chemical analysis of a new (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Research*, 340, 2533-2539.

Steluti, R. M., Giese, E. C., Piggato, M. M., Sumiya, A. F. G., Covizzi, L. G., Job, A. E., Cardoso, M. S., Corradi da Silva, M. L., Dekker, R. F. H., & Barbosa, A. M. (2004). Comparison of botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. *Journal of Basic Microbiology*, 44, 480-486.

Yanaki, T., Kojima, T., & Norisuye, T. (1981). Triple helix of scleroglucan in dilute aqueous sodium hydroxide. *Polymers Journal*, 13, 1135-1143.

Yoshitomi, H., Sakaguchi, N., Kobayashi, K., Brown, G. D., Tagami, T., Sakihama, T., Hirota, K., Tanaka, S., Nomura, T., Miki, I., Gordon, S., Akira, S., Nakamura, T., & Sakaguchi, S. (2005). A role for fungal β -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction

of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *Journal of Experimental Medicine*, 201, 949-960.

Young, S-H., Dong, W. J., & Jacobs, R. R. (2000). Observation of a partially opened triple-helix conformation in (1→3)- β -glucan by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 11874-11879.

Young, S-H., Robinson, V. A., Barger, M., Frazer, D. G., Castranova, V., & Jacobs, R. R. (2003). Partially opened triple helix is the biologically active conformation of (1→3)- β -glucans that induces pulmonary inflammation in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 66, 551-563.

Zhang, P., Zhang, L., & Cheng, S. (2000). Effects of urea and sodium hydroxide on the molecular weight and conformation of α -(1→3)-D-glucan from *Lentinus edodes* in aqueous solution *Carbohydrate Research*, 327, 431-438.

Table 1. The effect of urea and NaCl on the viscosity loss of botryosphaeran (EPS_{GLC}) in aqueous solution.

Botryosphaeran ^a (g l ⁻¹)	Urea		NaCl	
	Concentration (M)	Viscosity (Cp) ^b	Concentration (M)	Viscosity (Cp) ^b
1	0.2	57.6 ± 1.23	0.005	36.0 ± 1.37
	0.5	52.0 ± 0.89	0.05	22.8 ± 0.64
	1.0	48.6 ± 1.46	0.1	20.4 ± 0.89
2	0.2	84.8 ± 2.32	0.005	42.6 ± 1.28
	0.5	72.8 ± 2.16	0.05	38.4 ± 1.29
	1.0	67.2 ± 1.98	0.1	35.6 ± 2.01
3	0.2	345.0 ± 5.89	0.005	254.4 ± 3.54
	0.5	326.4 ± 4.65	0.05	148.8 ± 3.86
	1.0	312.8 ± 3.23	0.1	145.2 ± 3.73
4	0.2	441.6 ± 6.32	0.005	346.2 ± 3.96
	0.5	438.0 ± 4.59	0.05	253.4 ± 2.98
	1.0	380.4 ± 3.29	0.1	230.8 ± 3.86

^a EPS_{GLC}; ^b mean ± SEM

Legend to Figures

Figure 1

Helix-coil transition analysis of **(a)** botryosphaerans (EPS_{FRU} and EPS_{GLC}), laminarin and paramylon in the presence of different concentrations of NaOH, and **(b)** botryosphaeran (EPS_{GLC}) in the presence of different concentrations of Me_2SO . Dextran was used as random coil model.

Figure 2

Fluorescence analysis of botryosphaeran (EPS_{GLC}) in the presence of different concentrations of NaOH. Phenanthrene was used as a probe.

Figure 1

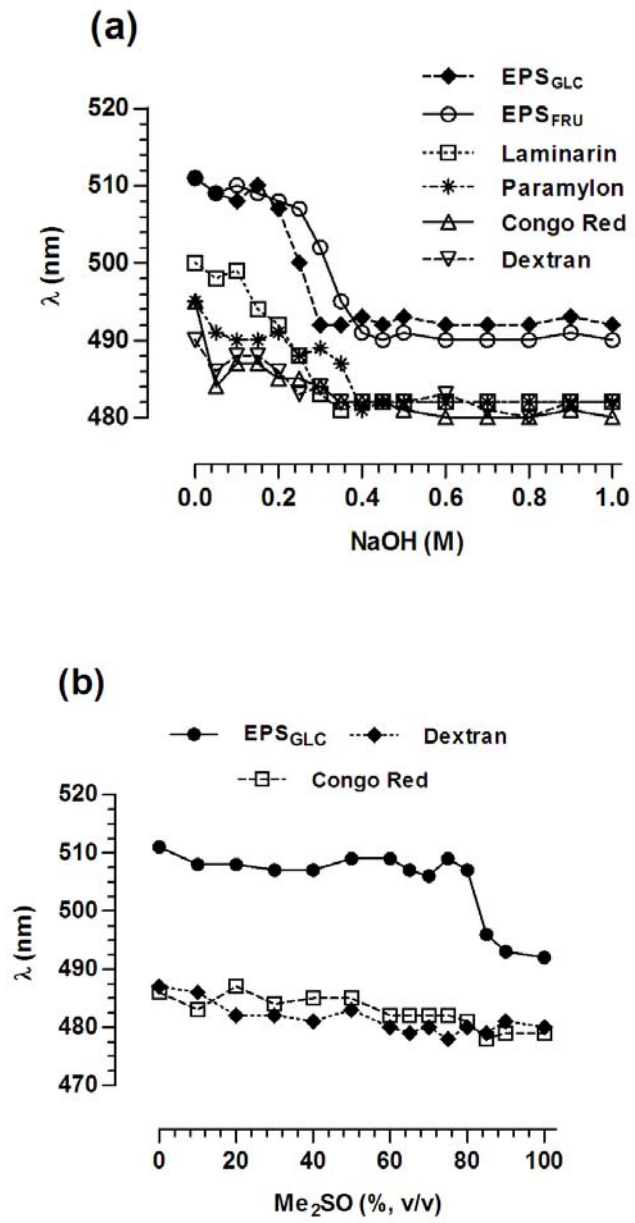
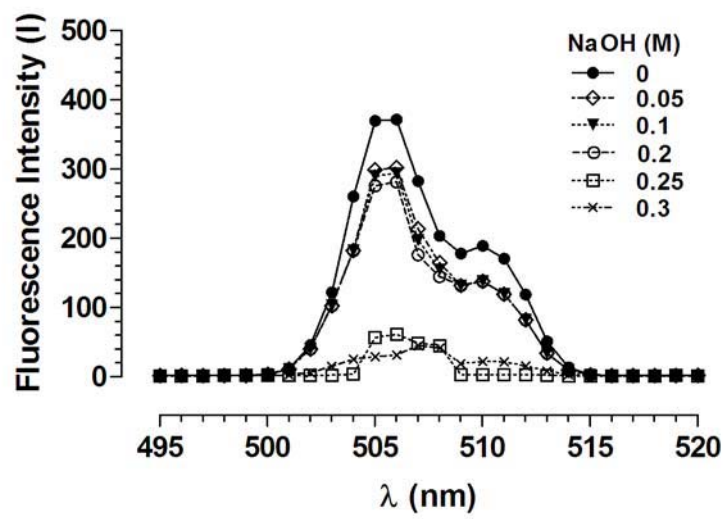


Figure 2



5 CONCLUSÕES

- A condição ótima para a produção de β -1,3-glucanases em fermentador de bancada pelo *T. harzianum* Rifai foi 5 dias de cultivo, pH inicial igual a 5,5 e aeração de 1,5 vvm.
- A cromatografia de filtração em gel Sephadex G-100 resultou em duas frações distintas (F-I e F-II) com atividade sobre botriosferana e laminarina. Estas frações parcialmente purificadas hidrolisaram outros substratos que apresentaram ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow3;1\rightarrow6)$ e não apresentaram atividade sobre carboximetilcelulose e dextrana.
- Os perfis de hidrólise da laminarina, botriosferana e paramilo com as frações separadas na filtração em gel determinado por HPAEC/PAD foram diferentes, e somente a Fração I apresentou atividade sobre o substrato pustulana.
- O botriosferana formou um complexo com o corante Vermelho Congo em solução aquosa, demonstrando apresentar conformação espacial em hélice tripla.
- Os fungos *T. harzianum* Rifai e *B. rhodina* MAMB-05 cresceram e produziram β -glucanases em todas as fontes de carbono avaliadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; SHIMMA, T-I.; JIGAMI, Y. *In vitro* oligosaccharide synthesis using intact yeast cells that display glycosyltransferases at the cell surface through cell wall-anchored protein Pir. **Glycobiology**, v. 13, p. 87-95, 2003.
- AJISAKA, K; YAMAMOTO, Y. Control of the regioselectivity in the enzymatic syntheses of oligosaccharides using glycosidases. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 14, p. 1-11, 2002.
- AKIBA, S.; YAMAMOTO, K.; KUMAGAI, H. Transglycosylation activity of the endo- β -1,4-glucanase from *Aspergillus niger* IFO31125 and its application. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, p. 576-580, 1999.
- AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Controlling the molecular structure of food hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 369-377, 2006.
- ALLIET, T. et al. Effect of prebiotic galacto-oligosaccharide, long-chain fructo-oligosaccharide infant formula on serum cholesterol and triacylglycerol levels. **Nutrition**, v. 23, p. 719-723, 2007.
- ALMEIDA, M. M.; PASTORE, G. M. Açúcares funcionais: Produção de galactooligosacarídeos por β -galactosidases utilizando metodologia de superfície de resposta. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 10-14, 2004.
- ALMOND, A. Towards understanding the interaction between oligosaccharides and water molecules. **Carbohydrate Research**, v. 340, p.907-920, 2005.
- ALONSO, J. L. et al. Xylooligosaccharides: Properties and production technologies. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, p. 230-232, 2003.
- ÁLVARO-BENITO, M. et al. Characterization of a β -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. **Journal of Biotechnology**, v. 132, p. 75-81, 2007.
- AMEY, R. C. et al. Investigating the role of a β -1,6-glucanase *Verticillium fungicola* during infection of *Agaricus bisporus* using targeted gene disruption. **Fungal Genetic and Biology**, v. 39, p. 264-275, 2003.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, p. 145-154, 2004.
- BAO, X.; FANG, J.; LI, X. Structural characterization and immunomodulating activity of a complex glucan from spores of *Ganoderma lucidum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, p. 2384-2391, 2001.

BARBOSA, A. M. **Seleção de microrganismos xilanolíticos e produção de xilanases pelo *Trichoderma harzianum* Rifai em bagaço de cana.** 1992. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BARBOSA, A. M. et al. In vivo decolorization of poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation. **Proc. 4th Pacific Rim Biotechn. Conference.** Melbourne, Australia, p. 88-90, 1995.

BARBOSA, A. M. et al. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3; 1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1691-1698, 2003.

BARBOSA, A. M. et al. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina**, v. 25, p. 29-42, 2004.

BARRETEAU, H.; DELATTRE, C.; MICHAUD, P. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 323-333, 2006.

BARSANTI, L. et al. Paramylon (β-1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p. 59-65, 2001.

BEKERS, M. et al. Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1535-1539, 2005.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β-glucosidases: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p.375-407, 2002.

BIELECKI, S.; GALAS, E. Microbial β-glucanases different from cellulases. **Biotechnology**, v. 10, p. 275-304, 1991.

BIERMANN, C. Hydrolysis and other cleavages of glycosidic linkages in polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 46, p. 251-271, 1988.

BLAND, E. J.; KESHAVARZ, T.; BUCKE, C. The influence of small oligosaccharides on the immune system. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 1673-1678, 2004.

BORSATO, D.; MOREIRA, I.; GALÃO, O. F. *Detergentes Naturais e Sintéticos – Um guia.* Eduel, 2ª ed., p.166-167, 2004.

BORYCKA, B.; STACHOWIAK, J. Relations between cadmium and magnesium and aronia fractional dietary fibre. **Food Chemistry**, v. 107, p. 44-48, 2008.

BRUZZESE, M. et al. Impact of prebiotics on human health. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, p. S283-287, 2006.

CAMPBELL, J. M.; FAHEY, G. C.; WOLF, B. W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 130-136, 1997.

CANO, A. et al. Optimization of the xylan degradation activity of monolithic enzymatic membranes as a function of their composition using design of experiments. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 29, p. 261-268, 2006.

CHENG, T-C.; DUAN, K-J.; SHEU, D-C. Immobilization of β -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus* on chitosan using tris(hydroxymethyl)phosphine or glutaraldehyde as a coupling agent. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 335-338, 2005.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1297-1303, 2004.

CORRADI DA SILVA, M. L. et al. Purification and structural characterisation of (1,3; 1,6) beta-D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 10-17, 2005.

CORRADI DA SILVA, M. L. et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 85-92, 2006.

COSSON, T. et al. Enzymatic assays for xylanase and β -glucanase feed enzymes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 77, p. 345-353, 1999.

COVIELLO, T. et al. A new scleroglucan/borax hydrogel: swelling and drug release studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 95-107, 2005.

CRIMMINS, M. T.; TABET, E. Total synthesis of (-)-trehazolin via an asymmetric aldol-ring closing metathesis strategy. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 4012, 2001.

CROGNALE, S. et al. Production of β -glucan and related glucan-hydrolases by *Botryosphaeria rhodina*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 860-871, 2007.

DAVIES, G. J.; CHARNOCK, S. J.; HENRISSAT, B. The Enzymatic Synthesis of Glycosidic Bonds: "Glycosynthases" and Glycosyltransferases. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 13, p. 105-120, 2001.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 28, p. 81-88, 2001.

DEL REY, F.; GARCÍA-ACHA, I.; NOMBELA, C. The regulation of β -glucanase synthesis in fungi and yeast. **Journal of General Microbiology**, v. 110, p. 83-89, 1979.

DORTA, C. et al. Sugarcane molasses and yeast powder used in the Fructooligosaccharides production by *Aspergillus japonicus*-FCL 119T and *Aspergillus niger* ATCC 20611. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p.1003-1009, 2006.

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

DUCROS, V. et al. Influence of short-chain fructo-oligosaccharides (sc-FOS) on absorption of Cu, Zn, and Se in healthy postmenopausal women. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 24, p. 30-37, 2005.

ELVING, S. G.; PEDERSEN, P. B. Safety evaluation of a glucanase preparation intended for use in food including a subchronic study in rats and mutagenicity studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 37, p. 11-19, 2003.

ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T., BOUDART, G.; DUMAS, B. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 157-163, 2000.

FRY, S. C. et al. Purification and analysis of growth-regulating xyloglucan-derived oligosaccharides by high-pressure liquid chromatography. **Carbohydrate Research**, v. 219, p. 123-132, 1991.

FUCHS, R. H. B. et al. "Iogurte" de soja suplementado com oligofrutose e inulina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 175-179, 2005.

GAUR, R. et al. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. **Food Chemistry**, v. 97, p. 426-430, 2006.

GHAZI, I. et al. Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 35, p. 19-23, 2005.

GHODDUSI, H. B. et al. In vitro study on gas generation and prebiotic effects of some carbohydrates and their mixtures. **Anaerobe**, v. 13, p. 193, 1997.

GIESE, E. C.; CORRADI DA SILVA, M. L.; BARBOSA, A. M. Glucanases fúngicas: Produção e aplicações das β -1,3- e β -1,6-glucanases. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 97-103, 2003.

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

GONÇALVES, A. G. et al. Sulfated and pyruvylated disaccharide alditols obtained from a red seaweed galactan: ESIMS and NMR approaches. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 2443-2453, 2002.

GRANDPIERRE, C. et al. Enzymatic and chemical degradation of curdlan targeting the production of β -(1,3) oligoglucans. **Carbohydrate Polymers**, 2008, v. 71, p. 277-286.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HAULY, M. C. O.; FUCHS, R. H. B.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligosacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Revista de Nutrição**, v. 18, p. 32-35, 2005.

HE, H.; YANG, F.; DU, Y. Synthesis of natural β -D-(1 \rightarrow 3)-glucopyranosyl oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1673-1678, 2002.

HIRAYAMA, M. Novel physiological functions of oligosaccharides. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 1271, 2002.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v. 35, p. 109-116, 2002.

HOUDIJK, J. G. M. et al. Dietary fructooligosaccharides and transgalactooligosaccharides can affect fermentation characteristic in gut contents and portal plasma of growing plasma. **Livestock Production Science**, v. 73, p. 175-184, 2002.

HRMOVA, M. et al. Polysaccharide hydrolases in germinated barley and their role in the depolymerization of plant and fungal cell walls. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 67-72, 1997.

HSU, C-K. et al. Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 1523-1528, 2004.

HU, B. et al. Prebiotic effects of neoagaro-oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. **Anaerobe**, v. 12, p. 260-266, 2006.

IACOMINI, M. et al. Novel D-glucans obtained by dimethyl sulfoxide extraction of the lichens *Letharia vulpina*, *Actinogyra muehlenbergii*, and an *Usnea* sp. **Carbohydrate Research**, v. 176, p. 117-126, 1988.

JAKEMAN, D. L.; WITHERS, S. G. Glycosynthases: New tools for oligosaccharide synthesis. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 14, p. 13-25, 2002.

JAMOIS, F. et al. Glucan-like synthetic oligosaccharides: iterative synthesis of linear oligo- β -(1,3)-glucans and immunostimulatory effects. **Glycobiology**, v. 15, p. 393-407, 2005.

JAYUS; MCDOUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. Purification and properties of (1 \rightarrow 6)- β -glucanase from *Acremonium* sp. IMI 383068. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 194-200, 2001.

JAYUS; MCDOUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. Factors affecting the synthesis of (1 \rightarrow 3) and (1 \rightarrow 6)- β -glucanases by the fungus *Acremonium* sp. IMI 383068 grown in batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 289-299, 2002.

JIANG, Z. et al. Transglycosylation reaction of xylanase B from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* with the ability of synthesis of tertiary alkyl β -D-xylobiosides and xylosides. **Journal of Biotechnology**, v. 114, p. 125-134, 2004.

JOHANSSON, L. et al. **Food Chemistry** 2006, 97, 71.

KATAOKA, K. et al. Activation of macrophages by linear (1,3)- β -D-glucans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 36825-36831, 2002.

KAWAI, R. et al. Kinetics of substrate transglycosylation by glycoside hydrolase family 3 glucan (1,3)- β -glucosidase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2851-2857, 2004.

KAWASE, M. et al. Lactosucrose production using a simulated moving bed reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 56, p. 453-458, 2001.

KIHARA, M.; SAKATA, T. Production of short-chain fatty acids and gas from various oligosaccharides by gut microbes of carp (*Cyprinus carpio* L.) in micro-scale batch culture. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, p. 333-340, 2002.

KIM, Y-S.; PARK, C-S.; OH, D-K. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable-galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p.903-908, 2006.

KIMURA, A. New horizons of carbohydrate bioengineering. molecular anatomy of α -glucosidase. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 12, p. 373-380, 2000.

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

KIYOHARA, M. et al. Structure of β -1,3-xylooligosaccharides generated from *Caulerpa racemosa* var. *laete-virens* β -1,3-xylan by the action of β -1,3-xylanase. **Journal of Biochemistry**, v. 140, p. 369-373, 2006.

KLAENHAMMER, T. R. Probiotic Bacteria: Today and Tomorrow. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 415-416, 2000.

KOIZUMI, S. Large-scale production of oligosaccharides using bacterial functions. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 15, p. 65-74, 2003.

KULMINSKAYA, A. A. et al. Biochemical characterization of *Aspergillus awamori* exoinulinase: substrate binding characteristics and regioselectivity of hydrolysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1650, p. 22-29, 2003.

LANGER, R. Biomaterials and biomedical engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 30, p. 2-10, 1995.

LARA-VILLOSLADA, F. et al. Short-chain fructo-oligosaccharides, in spite of being fermented in the upper part of the large intestine, have anti-inflammatory activity in the TNBS model of colitis. **European Journal of Nutrition**, v. 45, p. 418-425, 2006.

LEE, C. Y. et al. Production of glucooligosaccharides by an acceptor reaction using two types of glucansucrase from *Streptococcus sobrinus*. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 1227-1230, 1997.

LEE, G. et al. Molecular dynamics simulations of forced conformational transitions in 1,6-linked polysaccharides. **Biophysical Journal**, v. 87, p. 1456-1465, 2004.

LEE, S. G. et al. Enhanced cell affinity of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (50/50) by plasma treatment with β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucan. **Surface and Coatings Technology**, v. 201, p. 5128-5131, 2007.

LEMARCHAND, C. et al. Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems. **Biomaterials**, v. 27, p. 108-118, 2006.

LIESHOUT, J. V. et al. Hydrolase and glycosynthase activity of endo-1,3- β -glucanase from the thermophile *Pyrococcus furiosus*. **Archaea**, v. 1, p. 285-292, 2004.

LOWE, E. et al. A (1,3)- β -D-linked heptasaccharide is the unit ligand for glucan pattern recognition receptors on human monocytes. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 789-797, 2001.

MACHADO, P. A. N.; SICHIERI, R. Relação cintura-quadril e fatores de dieta em adultos. **Revista Saúde Pública**, v. 36, p. 29-33, 2002.

MANNERS, D. J. et al. Some properties of a fungal β -D-glucanase preparation. **Carbohydrate Research**, v. 49, p. 383-388, 1976.

MAITIN, V.; RASTALL, R. A. Enzyme glycation influences product yields during oligosaccharide synthesis by reverse hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 195-202, 2004.

MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, p. 287-298, 2004.

MARTIN, K. L. et al. Purification and characterization of the extracellular β -1,6-glucanases from the fungus *Acremonium* strain OXF C13 and isolation of the gene/s encoding these enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 351-357, 2006a.

MARTIN, K. L. et al. 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, 2006b.

MATTOS, L. L.; MARTINS, I. S. Consumo de fibras alimentares em população adulta. **Revista Saúde Pública**, v. 34, p. 13-16, 2000.

McCARTHY, T. C. et al. Comparison of wild-type and UV-mutant β -glucanase-producing strains of *Talaromyces emersonii* with potential in brewing applications. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 125-134, 2005.

MIYANISHI, N. et al. Induction of TNG- 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.

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

MORACCI, M.; TRINCONE, A.; ROSSI, M. Glycosynthases: new enzymes for oligosaccharide synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 155-163, 2001.

MOSCATTO, J. A.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S. H.; HAULY, M. C. O. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 634-639, 2004.

MOURA, P. et al. In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. **LWT Food Science Technology**, v. 40, p. 963-972, 2007.

MOURE, A. et al. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1913-1923, 2006.

MURALIDHAR, R. et al. Statistical analysis on some critical parameters affecting the formation of protoplasts from the mycelium of *Penicillium griseofulvum*. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 28, p. 403-410, 2003.

MURATA, T.; USUI, T. Enzymatic synthesis of important oligosaccharide units involved in N- and O-linked glycans. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 12, p. 161-174, 2000.

NABARLATZ, D. et al. Almond shell xylo-oligosaccharides exhibiting immunostimulatory activity. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 1122-1128, 2007.

NAGARAJAN, D. R.; RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C. Purification and characterization of a maltooligosaccharide-forming α -amylase from a new *Bacillus subtilis* KCC103. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 73, p. 591-597, 2006.

NAKAJIMA, M. et al. Transglycosylation Activity of *Dictyoglomus thermophilum* Amylase A. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, p. 2369-2373, 2004.

NAKAKUKI, T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 1245-1251, 2002.

NAKKHARAT, P.; HALTRICH, D. *Journal of Biotechnology*, v. 123, p. 304, 2006.

NELSON, N. A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 376-380, 1944.

NEUTZLING, M. B. et al. Frequência de consumo de dietas ricas em gordura e pobres em fibra entre adolescentes. **Revista Saúde Pública**, v. 41, p. 17-21, 2007.

NING, J. et al. Synthesis of β -(1 \rightarrow 6)-branched β -(1 \rightarrow 3) glucohexaose and its analogue containing an α -(1 \rightarrow 3) linked bond with antitumor activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2193-2203, 2003.

NONINO, C. B. et al. Terapia nutricional oral em pacientes com síndrome do intestino curto. **Revista de Nutrição**, v. 14, p. 201-205, 2001.

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

NZEUSSEU, A. et al. Inulin and fructo-oligosaccharides differ in their ability to enhance the density of cancellous and cortical bone in the axial and peripheral skeleton of growing rats. **Bone**, v. 38, p. 394-399, 2006.

OHTA, A. Prevention of osteoporosis by foods and dietary supplements. The effect of fructooligosaccharides (FOS) on the calcium absorption and bone. **Clinical Calcium**, v. 16, p. 81-88, 2006.

OGAWA, K. et al. Conformational behaviour of a gel-forming (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucan in alkaline solutions. **Carbohydrate Research**, v. 23, p. 399-405, 1972.

OKU, T.; NAKAMURA, S. Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 1253-1261, 2002.

OKU, T.; URA, S. Comparison of digestibility and breath hydrogen gas excretion of fructo-oligosaccharide, galactosyl-sucrose, and isomalto-oligosaccharide in healthy human subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 1150-1156, 2003.

ONISHI, N.; TANAKA, T. Galacto-oligosaccharide production using a recycling cell culture of *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 136-140, 1998.

PAN, Y-C.; LEE, W-C. Production of high-purity isomalto-oligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, p. 797-804, 2005.

PANG, Z. et al. Structure of β -glucan oligomer from laminarin and its effect on human monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells. **Bioscience and Biotechnology Biochemistry**, v. 69, p. 553-558, 2005.

PARK, M. C. et al. Continuous production of neo-fructooligosaccharides by immobilization of whole cells of *Penicillium citrinum*. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 127-130, 2005.

PASANEN, S.; JÄNIS, J.; VAINIOTALO, P. **Inter. J. Mass Spectr.** 2007, v. 263, p. 22, 2007.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Fructooligosaccharídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, p. 385-390, 2003.

PAZUR, J. H. Em *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*, Chaplin, M. F.; Kennedy, J. F., eds.; 2th ed., Oxford–U.K.: Oxford University Press, 1994, 181.

PERUGINO, G. et al. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 31-37, 2004.

PHILLIPS, G. O.; OGASAWARA, T.; USHIDA, K. The regulatory and scientific approach to defining gum arabic (*Acacia senegal* and *Acacia seyal*) as a dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 24-35, 2008.

PITSON, S. et al. Production and regulation of β -glucanases in *Acremonium* and *Cephalosporium* species. **Mycology Research**, v. 95, p. 352-356, 1991.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; McDOUGALL, B. M. Noncellulolytic fungal β -glucanases: Their physiology and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 178-192, 1993.

PITSON, S. M.; et al. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role β -glucan degradation. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 21, p. 182-190, 1997.

PUCCIO, G. et al. Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 and prebiotics. **Nutrition**, v. 23, p. 1, 2007.

RABIU, B. A. et al. Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by β -Galactosidases from *Bifidobacterium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2526-2530, 2001.

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

RAPP, P. 1,3- β -glucanase, 1,6- β -glucanase and β -glucosidase activities of *Sclerotium gluconicum*: Synthesis and properties. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 2847-2858, 1989.

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

RAUPP, D. S. et al. Arraste via fecal de nutrientes da ingestão produzido por bagaço de mandioca hidrolisado. **Scientia Agricola**, v. 59, p. 235-238, 2002.

REESE, E. T.; MANDELS, M. β -D-1,3 glucanases in fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 5, p. 159-185, 1959.

REESE, E. T.; PARRISH, F. W.; MANDELS, M. β -D-1,6 glucanases in fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 8, p. 327-334, 1961.

REMAUD-SIMON, M. et al. Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 10, p. 117-128, 2000.

REZENDE, S. T.; GUIMARÃES, V. M. Em *Enzimas como Agentes Biotecnológicos*; Said, S.; Pietro, R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004, 271.

RICE, K. G.; CORRADI DA SILVA, M. L. Preparative purification of tyrosinamide N-linked oligosaccharides. **Journal of Chromatography**, v. 720, p. 235-249, 1996.

RICE, P. J. et al. Oral Delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, p. 1079-1086, 2005.

RIVERO-URGELL, M.; SANTAMARIA-ORLEANS, A. Oligosaccharides: application in infant food. **Early Human Development**, v. 65, p. 43-52, 2001.

ROBERFROID, M. B. Fructo-oligosaccharide mal absorption: benefit for gastrointestinal functions. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 16, p. 173-177, 2002.

ROJO, F. G. et al. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. **Crop Protection**, v. 26, p. 549-555, 2007.

ROLDÁN, A. et al. Use of *Trichoderma* enzymatic extracts on vinification of *Palomino fino* grapes in the sherry region. **Journal of Food Engineering**, v. 75, p. 375-382, 2006.

RYCROFT, C. E. et al. Fermentation properties of gentio-oligosaccharides. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 156-161, 2001.

SAKAMOTO, T.; FUJITA, T.; KAWASAKI, H. Transglycosylation catalyzed by a *Penicillium chrysogenum* exo-1,5- α -L-arabinanase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1674, p. 85-90, 2004.

SALAZAR, O. et al. Overproduction, Purification, and Characterization of β -1,3-Glucanase Type II in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 23, p. 219-225, 2001.

SANTOS, T.; VILLANUEVA, R.; NOMBELA, N. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* β -glucanases. **Journal of Bacteriology**, v. 129, p. 52-58, 1977.

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

SALYERS, A. A.; PALMER, J. K.; WILKINS, T. D. Laminarinase (β -glucanase) activity in bacteroides from the human colon. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, p. 1118-1124, 1977.

SANZ, M. L. et al. Selective fermentation of gentiobiose-derived oligosaccharides by human gut bacteria and influence of molecular weight. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, p. 383-388, 2006.

SCHMID, F. et al. Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1,3; 1,6)- β -glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb. ex Scglecht. **Carbohydrate Research**, v. 331, p. 163-171, 2001.

SHOAF, K. et al. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 6920-6928, 2006.

SHODA, S.; FUJITA, M.; KOBAYASHI, S. Glycanase-catalyzed synthesis of non-natural oligosaccharides. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 10, p. 279-289, 1998.

SILVA, I. R. et al. Purificação e caracterização de uma gentioexaose obtida de botriosferana por hidrólise ácida parcial. **Química Nova**, publicado na web em 9/4/08, 2008.

SMAALI, M. I. et al. 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.

SMIRICKY-TJARDES, M. R. et al. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2535-2545, 2005.

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

STEGINK, L. D. et al. Oligosaccharides as an intravenous energy source in postsurgical patients: utilization when infused with glucose, amino acids, and lipid emulsion. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 46, p. 461-466, 1987.

STELUTI, R. M. et al. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, p. 480-486, 2004.

STONE, B. A. *Complexity of β -glucanases from *Aspergillus niger**. In: Meeting of the Biochemical Society, 360, 1957, London. Proceed. Biochemical Society, 1957.

SUN, H-J. et al. Preparation of (1 \rightarrow 4)- β -D -xylooligosaccharides from an acid hydrolysate of cotton-seed xylan: suitability of cotton-seed xylan as a starting material for the preparation of (1 \rightarrow 4)- β -D -xylooligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 657-661, 2002.

SUTHERLAND, I. W. Enzymes in the assay of microbial polysaccharides. **Process Biochemistry**, p. 19-24, 1984.

TEN BRUGGENCATE, S. J. M. et al. Dietary fructo-oligosaccharides dose-dependently increase translocation of salmonella in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2313-2318, 2003.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 589-596, 2006.

TOLSTOGUZOV, V. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 571-578, 2004.

TOSH, S. M. et al. Evaluation of structure in the formation of gels by structurally diverse (1→3)(1→4)-β-D-glucans from four cereal and one lichen species. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 249-259, 2004.

UKAI, S. et al. Structure of an alkali-soluble polysaccharide from the fruit body of *Ganoderma japonicum* Lloyd. **Carbohydrate Research**, v. 105, p. 237-243, 1982.

UNNO, T. et al. Industrial production and higher application of functional β-glucooligosaccharides having a bitter taste. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 52, p. 59-64, 2005.

VANDAMME, E. J.; SOETAERT, W. Biotechnical modification of carbohydrates. **FEMS Microbiology Reviews**, v.16, p.163-186, 1995.

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

VERGHESE, M. et al. Inhibitory effects of nondigestible carbohydrates of different chain lengths on azoxymethane-induced aberrant crypt foci in Fisher 344 rats. **Nutritional Research**, v. 25, p. 859-868, 2005.

VESSELS, J. M.; RADDING, J. A. Oligosaccharide mapping of fungal glucan synthase product by high-performance anion-exchange chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 215, p. 150-155, 1993.

VITOLO, M. R.; CAMPAGNOLO, P. D. B.; GAMA, C. M. Factors associated with a risk of low dietary fiber intake in adolescents. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. 32-37, 2007.

VODENICAROVÁ, M. et al. Xyloglucan degradation using different radiation sources: A comparative study. **Ultrasonic Sonochemistry**, v. 13, p. 157-164, 2006.

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

WARRANT, J.; JANSSEN, H.-G. Controlled production of oligosaccharides from amylose by acid-hydrolysis under microwave treatment: Comparison with conventional heating. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 353-362, 2007.

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

WATANABE, H. et al. Cloning, sequencing, and expression of the genes encoding an isocyclomaltooligosaccharide glucanotransferase and an alpha-amylase from a *Bacillus circulans* strain. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 70, p. 1954-1960, 2006.

WONG, C-H. Enzymatic and chemoenzymatic synthesis of carbohydrates. **Pure Applied Chemistry**, v. 67, p. 1609-1616, 1995.

YAMASHITA, A. et al. Reverse reaction of *Aspergillus niger* AP-9319 β -Galactosidase in a supersaturated substrate solution: production of β -linked galacto-oligosaccharide (β -GOS). **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 69, p. 1381-1388, 2005.

YANG, G., KONG, F. Synthesis of heptasaccharide and nonasaccharide analogues of the lentinan repeating unit. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 39-48, 2005.

YIN, Y-L. et al. Effects of supplementing diets containing hulles barley varieties having different levels of non-starch polysaccharides with β -glucanase and xylanase on the physiological status of the gastrointestinal tract and nutrient digestibility of weaned pigs. **Livestock Production Science**, v. 71, p. 97-107, 2001.

YOUNG, S-H.; DONG, W. J.; JACOBS, R. R. Observation of a partially opened triple-helix conformation in 1,3- β -glucan by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 11874-11879, 2000.

YOSHIKAWA, J. et al. Multiple β -fructofuranosidases by *Aureobasidium pullulans* DSM2404 and their roles in fructooligosaccharide production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 265, p. 159-163, 2006.

YUASA, H.; HASHIMOTO, H. Recent advances in the development of unnatural oligosaccharides: Conformation and Bioactivity. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 13, p. 31-55, 2001.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation, and application. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 19, p. 107-117, 1996.

ZAFAR, T. A. et al. Nondigestible oligosaccharides increase calcium absorption and suppress bone resorption in ovariectomized rats. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 399-402, 2004.

ZHANG, P.; ZHANG, L.; CHENG, S. Effects of urea and sodium hydroxide on the molecular weight and conformation of α -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from *Lentinus edodes* in aqueous solution. **Carbohydrate Research**, v. 327, p. 431-438, 2000.

ZHANG, M. et al. Chain conformation of sulfated derivates of β -glucan from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. **Carbohydrate Research**, v. 338, p.2863-2870, 2003.

ZHANG, L. et al. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1515-1521, 2005.