

REB Volume 6 (2): 205-213, 2013

ISSN 1983-7682

**ENZIMAS β –GLUCANASES - APLICAÇÕES DA HIDRÓLISE DE
POLISSACARÍDEOS**

**β -GLUCANASES ENZYMES – APPLIANCE OF POLYSACCHARIDES
HYDROLISIS**

Rodrigo Arthur da Fonseca Costa¹ e Altino Branco Choupina²

1 Mestre em Biotecnologia, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal. 2 Doutor Professor Adjunto, Departamento de Biologia e Biotecnologia, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-854 Bragança, Portugal.

E-mail para contato: rodlion2000@msn.com

Resumo

A degradação enzimática dos polissacarídeos é realizada através da atuação de diversas hidrólases com diferentes especificidades e modos de ação. Devido isto, existe atualmente um crescente interesse no estudo destas enzimas relacionado com o seu potencial industrial. As enzimas β -Glucanases pertencem a este grupo de hidrólases por meioda sua capacidade de hidrolisar ligações β -D-glicosídicas de 1,3- β -glucanos e 1,6- β -glucanos. Suas aplicações mostram-se bastante abrangentes, com utilidade desde a indústria convencional até a indústria biotecnológica e farmacêutica.

Palavras-chave: Polissacarídeos; β -Glucanases; Biotecnologia; Hidrólise.

Abstract

The enzymatic degradation of polysaccharides is accomplished through the action of several hydrolases with different specificities and way of action. For this reason, there is now a growing interest in the study of these enzymes related to its potential industry. The β -glucanases enzymes belong to this group of hydrolases because of its ability to hydrolyze glycosidic linkages β -D-glucosides 1,3- β -glucans and 1,6- β -glucans. Its applications are fairly comprehensive, with utility from conventional industry to the biotechnology and pharmaceutical industry.

Keywords: Polysaccharides; β -Glucanases; Biotechnology; Hydrolisis.

INTRODUÇÃO

A degradação enzimática dos polissacarídeos é realizada através da atuação de diversas hidrólases com diferentes especificidades e modos de ação. Devido a isto, existe atualmente um crescente interesse no estudo destas enzimas relacionado com o seu potencial industrial. (Warren *et al.*, 1996; Giese *et al.*, 2003).

A atividade das β -glucanases na natureza ocorre em todos os estágios do ciclo de vida fúngico, incluindo a autólise, 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).

Estas enzimas são capazes de hidrolisar ligações β -D-glicosídicas de 1,3- β -glucanos e 1,6- β -glucanos (Warren, 1996; Kirket *et al.*, 2002). Os β -glucanos fazem parte de um grupo de polissacarídeos abundantes na natureza. Algumas são moléculas relativamente simples constituídas de cadeias lineares de resíduos glicosil, outras são complexas e podem ser constituídas de cadeias lineares ou ramificadas. A sua principal função é estrutural, porém a natureza e localização dos β -glucanos de parede indicam que eles também podem ser degradados e usados como fonte nutricional após a exaustão de nutrientes. Outra importante função é de proteger as células contra a desidratação, por formação de uma camada extracelular que encapsula a hifa (Pitson, Seviour e Mcdougall, 1993; Martin *et al.*, 2007).

As β -1,3-glucanases apresentam dois mecanismos de ação distintos: as (endo), constituindo ação hidrolítica aleatória na cadeia polissacarídica, resultando em oligossacarídeos de maior massa molar; as (exo), produzindo glucose como único produto

de hidrólise (Stone, 1957; Reese e Mandels, 1959). Estas enzimas são específicas para substratos contendo sequências lineares de três ou mais unidades de glucose unidas através de ligações glicosídicas do tipo (β -1,3) 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 -1,3 glucanos e β -1,6-glucanos, por exemplo (Manners *et al.*, 1976).

A produção de enzimas que degradam glucanos é uma característica atribuída a uma ampla variedade de organismos (Pitson, Seviour e Mcdougall, 19993; Martin *et al.*, 2006). As glucanases parecem estar presentes em uma grande variedade de fungos (Mouyna *et al.*, 2002). Muitas estão associadas com a parede celular, onde mostra sua importância em vários processos morfogênicos (Adams, 2004).

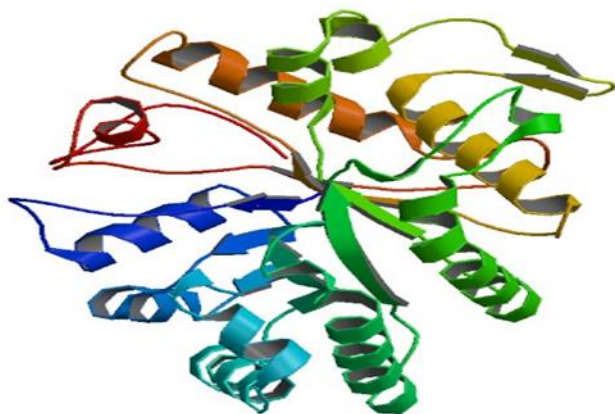


Figura 1. Estrutura tridimensional de *endo 1,3-beta-glucanase* para a banana (Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL).

Propriedades, atividade cinética e inibição de glucanases

Laminarina e postulana são geralmente usadas como substratos nos ensaios enzimáticos utilizados na determinação das atividades de β -1,3 e β -1,6- glucanases, respectivamente. Os parâmetros cinéticos destas polissacarídases variam de acordo com o microrganismo estudado.

A atividade cinética das β -glucanases pode ser inibida pela presença de compostos como clorofórmio, benzenóides, organofosfatos, quelantes, entre outros, podendo ocorrer inibição devido a concentrações elevadas de substratos e também dos

produtos reacionais (Rana *et al.*, 2003). Certos cations e anions assim como compostos e detergentes também podem inibir as glucanases em diferentes níveis.

Notario (1976) verificou que as β -glucanases são proteínas ácidas carregadas negativamente. A composição em aminoácidos revelou alta percentagem em aminoácidos ácidos além de glicina e alanina em grandes proporções.

Os microrganismos não produzem uma β -1,3-glucanase específica, e sim um conjunto de enzimas com propriedades diferentes (massa molar, pH e temperatura ótima), porém, com a mesma especificidade, ou seja, os organismos são capazes de produzir β -glucanases variadas (Jayuset *al.*, 2001; Bara; Lima; Ulhoa, 2003; Martin *et al.*, 2007). 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).

Os possíveis motivos da existência desta complexidade enzimática incluem a expressão de genes diferentes e as possíveis modificações pós traducionais (Jayuset *al.*, 2001). Noronha e Ulhoa (2000) purificaram uma β -1,3-glucanase de 29 KDa produzida por *Trichoderma harzianum*; compararam os parâmetros cinéticos e de inibição enzimática desta hidrólase com outras previamente purificadas e concluíram que cada enzima produzida por este microrganismo é diferente, e provavelmente, codificada por genes diferentes.

Aplicação biotecnológica das glucanases

Devido a sua habilidade peculiar de hidrolisar β -1,3-glucanos lineares e ramificados, que constituem as paredes celulares de organismos, as β -1,3-glucanases são bastante utilizadas no controle biológico (Hrmovaet *al.*, 1997).

A adição de β -glucanases nas rações destinadas aos animais permite aumentar a digestibilidade dos β -glucanos presentes nos grãos de trigo, cevada, aveia e centeio, entre outros (Kirk; Borchet; Fuglsang, 2002). Elas atuam hidrolizando β -glucanos, permitindo a ação das enzimas endógenas e a fermentação da flora microbiana (Cossonet *al.*, 1999; Yin *et al.*, 2001).

Estas hidrólases também têm sido utilizadas na preparação do mosto para a fabricação da cerveja (Mccarthyet *al.*, 2005). Além disso, estas enzimas hidrolíticas

podem ser utilizadas na obtenção de protoplastos em fungos e extratos livres de células e organóides usados em estudos bioquímicos (Bielecki; Galas, 1991; Muralidharet *al.*, 2003).

As β -1,3-glucanases também têm sido utilizadas na modificação e síntese de hidratos de carbono. Esta aplicação é decorrente da alta especificidade que lhe é peculiar e que colabora na elucidação de aspetos da estrutura de β -glucanos, e da composição de paredes celulares fúngicas pormenores não seriam reconhecidos por meio dos estudos químicos (Sutherland, 1984; Schmidet *al.*, 2001).

Estas enzimas são ainda muito utilizadas no processo de vinificação, onde a presença de β -1,3-glucanos e β -1,6-glucanos produzidos por *Botrytis cinérea* 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; Roldanet *al.*, 2006).

Aplicação das glucanases na obtenção de Oligossacarídeos

O uso de enzimas para modificar polissacarídeos extra celulares e ampliar seu potencial de aplicação biotecnológica tem sido muito utilizado devido à alta especificidade destas proteínas em relação aos seus substratos. A obtenção de gluco-oligossacarídeos e oligossacarídeos feita por meio de reações de hidrólise com β -1,3-glucanases está entre estas reações enzimáticas mais utilizadas (Vadamme&Soetaert, 1995; Gieseet *al.*, 2006; Grandpierreet *al.*, 2008).

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 agente imunomoduladores (Fármacos que alteram a resposta imune) e Pré-bióticos tem promovido a condução de novas pesquisas para viabilizar sua obtenção e elucidar suas propriedades biológicas e funcionais (Remaud-Simeonet *al.*, 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADANS, D.J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*, v. 150, p. 2029-2035. (2004).
2. ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, v. 22, p. 195-201, (2006).
3. BARA, M. T. F.; LIMA, A. L.; ULHOA, C.J. Purification and characterization of anexo- β -1,3-glucanase produced by *Trichodermaasperellum*. *FEMS Microbiology Letters*, v.219, p.81-85, (2003).
4. BIELAKI, S.; GALAS, E. Microbial β -glucanases different from cellulases. *Biotechnology*, v. 10, p. 275-304. (1991).
5. COSSON, T. et al. Enzymatic assays for xylanase and β -glucanase feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology*, v. 77, p. 345-353. (1999).
6. 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).
7. 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).
8. 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).
9. GRANDPIERRE, C. et al. Enzymatic and chemical degradation of curdlan targeting the production of β -(1,3) oligoglucans. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, p. 277-286. (2008).
10. WONG, C-H. Enzymatic and chemoenzymatic synthesis of carbohydrates. *Pure Applied Chemistry*, v. 67, p. 1609-1616. (1995).
11. HRMNOVA, 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).

12. JAYUS; MCDUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. Purification and properties of (1-6)- β -glucanase from *Acremonium sp.* IMI 383068. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, p.194-200, (2001).
13. KIRK, O.; BORCHET, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion Biotechnology*, v.13, p.345-351.(2002).
14. MANNERS, D. J. Y.; STARK, J. R.; WILSON, G.; BRODIE, J. Y. Some properties of a fungal β -D-glucanase preparation. *Carbohydrate Research*, v. 49, p. 383-388, (1976).
15. MARTIN, K. L. et al. The three β -1,3-glucanases from the fungus *Acremonium blochii* Strain C59 appear to be encoded by separate genes. *Mycol Res*, v. 110, p. 66-74, (2006).
16. MANTIN, K. et al. Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal α -(1,3)- and α -(1,6)-glucanases. *Fems Microbiol. Rev* 31, p. 168-192.(2007).
17. 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).
18. MOUYNA, I. et al. Molecular characterization of a cell wall-associated beta (1-3) endoglucanase of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*, v. 40, p. 455-464. (2002).
19. 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).
20. NOTARIO, V.; VILLA, T. G.; VILLANUEVA, J. R. Purification of exo- β -D-glucanase from cell free extracts of *Candida utilis*. *Biochemistry journal*, v. 159, p, 555-562.(1976).
21. NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, v.183, p.119-123.(2000).
22. 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).
23. RANA, D.S. Stability and Kinetics of β -1,3-glucanase from *TrichodermaHarzianum*. *Process Biochemistry*, v 39, p. 149-155. (2003).
 24. REMAUD-SIMEON, M. et al. Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. *Journal of Molecular Catalysis*, v. 10, p. 117-128.(2000).
 25. ROJO, F. G. et al. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusariumsolani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection*, v. 26, p. 549-555. (2007).
 26. ROLDAN, 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).
 27. SANTOS, T. et al. Derepression of β -1,3-glucanases in *Penicilliumitalicum*: Localisation of the various enzymes and correlation with cell wall mobilization an autolysis. *Journal of Bacteriology*, v. 137, p. 6-12.(1979).
 28. SCHIMID, F. et al. Structure of epiglucan, a highly side chain/branched (1,3-1,6)- β -glucan from the micro fungus *Epicoccumnigrum*Ehrenb. exScglecht. *Carbohydrate Research*, v. 331, p. 163-171.(2001).
 29. STONE, B. A. *Complexity of β -glucanases from Aspergillusniger*. In: Meeting of the Biochemical Society, 360, 1957, London. Proceed. Bichemical Society, (1957).
 30. REESE, E. T.; MANDELS, M. β -D-1,3glucanases in fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 5, p. 159-185, (1959).
 31. SUTHERLAND, I. W. Enzymes in the assay of microbialpolysaccharides. *Process Biochemistry*, p. 19-24.(1984).
 32. VANDAMME, E. J.; SOETARERT, W. Biotechnical modification of carbohydrates. *Microbiology Reviews*,v.16,p.163-186.(1995).
 33. VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS, S.; LEAL-MORALES, C. A.; HERRERA-ESTREL,A. Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent

- Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology, v.98, p.1442-1446.(1998).
34. WARREN, R. A.J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. Annual Reviews in Microbiology, v.50, p.183-212.(1996).
35. YIN, Y-L. Effects of supplementing diets containing hulless 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).