

# CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS $\beta$ -1,3-GLUCANASES PRODUZIDAS POR *Trichoderma asperellum*

SILVA, Regiane Christine<sup>1</sup>; ULHOA, Cirano José<sup>2</sup>.

Palavras-chave: controle biológico, *Trichoderma*,  $\beta$ -1,3-glucanase.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Trichoderma* compreende um grupo de fungos filamentosos saprófitas de solo, encontrados sobre matéria orgânica em decomposição e na rizosfera de algumas plantas. Atualmente espécies do gênero *Trichoderma* têm sido usadas como agentes de controle biológico, contra diferentes tipos de fungos tais como *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Pythium spp* (Herrera-Estrella & Chet, 1998). O controle biológico destes fitopatógenos pode ocorrer através de vários mecanismos, dentre os quais os mais relevantes são: competição por nutrientes, produção de antibióticos voláteis e não voláteis e produção de enzimas hidrolíticas capazes de hidrolisar parede celular (Sivan & Chet, 1992). O entendimento do modo de ação das hidrolases, principalmente quitinases, N-acetilglucosaminidases e  $\beta$ -1,3-glucanases, na degradação da parede celular do fitopatógeno sua regulação, e a ação das lecitinas, são mecanismos que se elucidados permitirão o melhoramento genético gerando espécies de alto potencial em biocontrole. Considerando a importância das  $\beta$ -1,3-glucanases no mecanismo de micoparasitismo e o potencial de utilização de *Trichoderma asperellum* em controle biológico, estamos propondo neste trabalho um estudo bioquímico desta hidrolases, tendo como objetivos principais: 1 – Avaliação da produção de  $\beta$ -1,3-glucanases por *T. asperellum* utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio; 2 – Identificar através de gel de eletroforese não desnaturante, o número de isoformas produzidas, através da determinação da atividade enzimática. 3 – Fazer um estudo dos mecanismos de regulação das duas  $\beta$ -1,3-glucanases produzidas por *T. asperellum*.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 - Manutenção do fungo

Os isolados de *Trichoderma asperellum*., da Coleção do Laboratório de Enzimologia / UFG, são mantidos com repiques periódicos em meio MYG (0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2% de ágar) e estocado a 4°C.

### 2.2 – Produção de Enzimas

Esporos dos isolados de *Trichoderma asperellum* ( $10^7$  mL<sup>-1</sup>), foram inoculados em frascos de 250 mL contendo 25 mL de meio de TLE composto por: 1g/L de bactotripton, 0,3g/L de uréia, 2,0g/L de KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 1,4g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,3g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,3g/L de CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e solução de elementos traços; suplementado com 0,5% de quitina como indutor. Os frascos foram incubados em agitador rotatório à 28°C e velocidade de 140 rpm. Após 24 horas de incubação o sobrenadante foi coletado e utilizado como fonte de enzimas (Bara 2002).

### 2.3 – Atividade Enzimática

A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi determinada utilizando laminarina (Sigma.Co) na concentração de 0,25%, em tampão acetato de sódio 50mM.L<sup>-1</sup> pH 5,0, de acordo com a metodologia descrita por Noronha & Ulhoa (1996).

#### 2.4 – Determinação de Proteína

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina bovina (Sigma-Co) como padrão.

#### 2.5 – Determinação da atividade de $\beta$ -1,3-glucanase em eletroforese, sob condições não desnaturante

Para análise do perfil de proteínas secretadas no meio de cultura foi utilizado um sistema de eletroforese (MiniGel-Sigma) em gel de poliacrilamida 8% em condições não- desnaturantes. A atividade enzimática foi determinada pelo método descrito por PAN *et al.*, 1989.

#### 2.6 – Purificação de $\beta$ -1,3-glucanases de *T. asperellum*

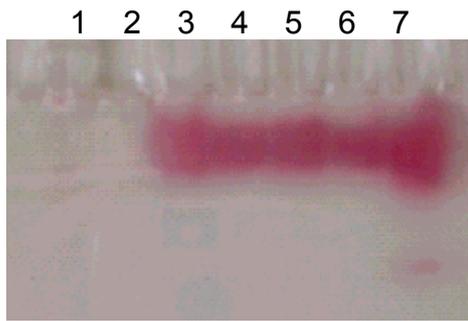
O extrato bruto de *T.asperellum* foi aplicado numa coluna de troca iônica(Q – Sepharose) equilibrada com tampão acetato de sódio ( 50mM.L<sup>-1</sup>, pH 5,0),utilizando um fluxo de 60mL.h<sup>-1</sup> e as proteínas foram eluídas com um gradiente crescente de 0 a 0,5 M de NaCl. Frações de 5,0 mL foram coletadas e utilizadas para a determinação de proteínas a 280 nm e atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

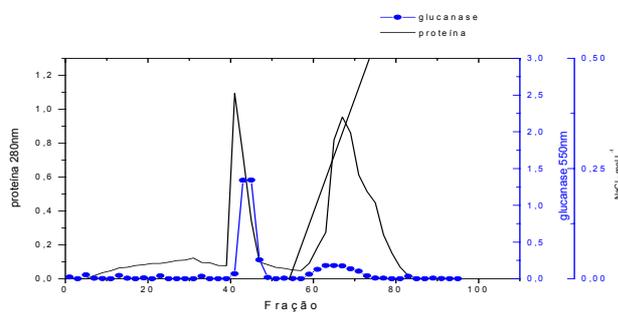
Esporos de *T. asperellum* (10<sup>7</sup> mL<sup>-1</sup>) foram transferidos para meio de cultura contendo em quitina, amido, celulose, quitosana, parede celular de *R. solani* (PCRS) e glicose como fonte de carbono. O sobrenadante de cultura foi coletado após 24 horas e usado para determinar a atividade de  $\beta$  1,3-glucanase. Observamos que o fungo apresentou atividade de  $\beta$  1,3-glucanase no sobrenadante de cultura em todas as fontes de carbono usadas (Tabela 2). Entretanto, maiores atividades foram detectadas nas fontes de carbono quitina (0.137 U. ml<sup>-1</sup>) e PCRS (0.269 U. ml<sup>-1</sup>).

A figura 1 mostra um gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes para análise de isoformas de  $\beta$ -1,3-glucanase produzidas por *T. asperellum*. Duas bandas de atividade foram detectadas em presença de PCRS, uma banda de alta massa molecular em quitina, quitosana, celulose e amido (Figura 1). Entretanto, nenhuma banda de atividade foi detectada nas duas concentrações de glicose utilizada (Figura 1). Para os experimentos de purificação de uma  $\beta$ -1,3-glucanase, o sobrenadante do meio de cultura do isolado de *T.asperellum* foi coletado após 24 horas de crescimento na presença de parede celular de *R. solani*.

As amostras foram dialisadas em água destilada por 15 horas e, posteriormente, dialisadas em tampão acetato de sódio 50 mM. L<sup>-1</sup> pH 5,0 por 12 horas. Um volume de 150 mL do extrato bruto foi aplicado em uma coluna de troca iônica, Q-Sepharose, (figura 2). Dois picos com atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foram observados: pico I (frações 42 a 47) eluídos antes do gradiente, e pico II (frações 59 a 75) eluídas durante a aplicação do gradiente. Esta cromatografia possibilitou a separação das duas  $\beta$ -1,3-glucanases produzidas por *T. asperellum*.



**Figura 1.** Gel de atividade das proteínas secretadas por *T. asperellum*. (1) glicose 2%, (2) glicose 1%, (3) amido 0.5%, (4) celulose 0,5%, (5) quitosana 0.5%, (6) quitina 0.5% e (7) parede celular de *R. solani* 0,5%.



**Figura 2.** Perfil cromatográfico do sobrenadante da cultura de *T. asperellum*, aplicado em coluna de troca iônica, Q-Sepharose. Fluxo: 60 mL.h<sup>-1</sup>. Atividade de β-1,3-glucanase ●; Proteína (Abs.280nm) —; gradiente de NaCl (o - 0,5 mol.L<sup>-1</sup>)

#### 4. CONCLUSÃO

A produção da enzima é dependente da fonte de carbono utilizada. Notamos que a parede celular de *R. solani* é um bom indutor para a produção desta enzima. A purificação de duas β-1,3-glucanase foi permitida através do uso de cromatografia de coluna, utilizando-se uma coluna de troca iônica. Assim, será possível partir para o estudo de regulação destas enzimas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARA, M.T., LIMA, A. & ULHOA, C.J. (2003). Purification and characterization of the exo-β-1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. FEMS Microbiology Letters 219: 81 – 85.
- HERRERA-ESTRELLA, A. & CHET, I (1998). Biocontrol of bacteria and phitopathogenic fungi. In Agriculture Biotechnology. Ed. Arien Altman. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp. 263-282.
- NORONHA, E.F. & ULHOA, C.J. (1996). Purification and characterization of an endo-β-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. Canadian journal of Microbiology 42: 1039-1044.

#### FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBI

<sup>1</sup> Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas-Laboratório de Enzimologia / UFG, [refarma10@yahoo.com.br](mailto:refarma10@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Orientador/Instituto de Ciências Biológicas /UFG