



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**BIOSSÍNTESE DE β -1,3-GLUCANASES POR *Trichoderma harzianum*
Rifai UTILIZANDO CÉLULAS LIVRES E IMOBILIZADAS**

HÂMARA MILANEZE DE SOUZA ZANIBONI

Maringá

2021

HÂMARA MILANEZE DE SOUZA ZANIBONI

**BIOSSÍNTESE DE β -1,3-GLUCANASES POR *Trichoderma harzianum*
Rifai UTILIZANDO CÉLULAS LIVRES E IMOBILIZADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Maringá

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

Z31b Zaniboni, Hâmara Milaneze de Souza
Biossíntese de β -1,3-glucanases por *Trichoderma Harzianum* Rifai utilizando células livres e imobilizadas / Hâmara Milaneze de Souza Zaniboni. -- Maringá, 2021.
57 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Graciette Mاتيولي.
Coorientadora: Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa Dekker.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2021.

1. Fungo (*Trichoderma Harzianum*). 2. β -glucanas. 3. Microbiótica intestinal. 4. Enzimas. 5. Prebiótico. I. Mاتيولي, Graciette, orient. II. Dekker, Aneli de Melo Barbosa, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

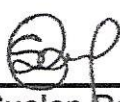
CDD 21.ed. 660.634

Elaine Cristina Soares Lira - CRB-9/1202

HÂMARA MILANEZE DE SOUZA ZANIBONI

**“BENEFÍCIOS DAS B-GLUCANAS PARA A SAÚDE INTESTINAL E
BIOSSÍNTESE DE B-1,3-GLUCANASES FÚNGICAS”**

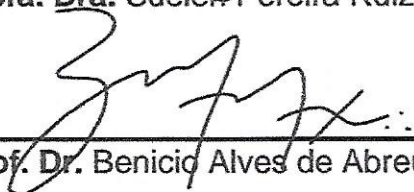
Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.



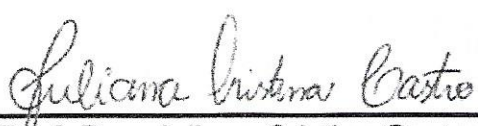
Profa. Dra. Suelen Pereira Ruiz Herrig



Profa. Dra. Magali Soares dos Santos Pozza



Prof. Dr. Benicio Alves de Abreu Filho



Prof. Dra. Juliana Cristina Castro

GRACIETTE
MATIOLI:60668989904

Assinado de forma digital por
GRACIETTE MATIOLI:60668989904
Dados: 2021.12.13 14:08:32 -03'00'

Profa. Dra. Graciette Matioli
Orientadora

Maringá – 2021

Orientadora:

Profa. Dra. Graciette Matioli

Co-orientadora:

Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa Dekker

BIOGRAFIA

Hâmara Milaneze de Souza Zaniboni nasceu no dia 06 de maio de 1989, na cidade de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brasil. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) e Mestrado em Zootecnia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste). Tem experiência nas áreas de medicina veterinária e produção animal atuando principalmente nos seguintes temas: qualidade do leite, microbiologia e biotecnologia enzimática.

Dedico

Aos meus pais Maria de Fátima e Ademar, e ao meu esposo Alex.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente aos meus pais, Maria de Fátima e Ademar, e à minha irmã Hadma, pelo amor, compreensão, conselhos e incentivos, confiança e acima de tudo pelo apoio e esforços empregados para que fosse possível a realização desta etapa da minha vida.

Aos meus tios, Dora e Fernando, e primo Luciano, que me receberam tão calorosamente em sua casa e me estimularam a prosseguir no caminho do conhecimento.

Ao meu marido e amigo, Alex, que desde o princípio me apoiou e incentivou durante todo o projeto e mesmo com as dificuldades promovidas pela distância sempre se manteve presente e companheiro.

À minha orientadora Dr^a Graciette Matioli, agradeço imensamente pela oportunidade, por todo o conhecimento transmitido, apoio, compreensão, paciência, orientação e amizade que possibilitaram o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À minha coorientadora Dr^a Aneli de Melo Barbosa Dekker, pelo tempo dedicado e por todo ensinamento que contribuíram significativamente para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia Enzimática, Juliana, Vanderson, Nathália, Marília, Carolina, Cecília, Thamara, Richard e Tiele, por todo carinho, amizade, auxílio e incentivos. Proporcionando os dias mais leves e agradáveis.

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (FA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Enfim, a todos aqueles que auxiliaram na realização deste trabalho, o meu sincero obrigada!

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está apresentada na forma de um capítulo de livro e um artigo científico, descritos a seguir.

1. Hâmara Milaneze de Souza, Cecilia Valente Rodrigues Truite, Tiele Carina de Oliveira Delani, Graciette Matioli. **β -glucanas e seus benefícios para a saúde intestinal**. Artigo de revisão publicado como capítulo de livro no e-book “Compostos Bioativos e suas aplicações” pela editora Mérida Publishers, 2021, cap. 4, p. 71-93.

2. Hâmara Milaneze de Souza Zaniboni, Richard Marllon Silva, Marília Gimenez Nascimento, Juliana Harumi Miyoshi, Aneli de Melo Barbosa, Graciette Matioli. **Economical alternatives for the production of fungal β -1,3-glucanase using easily obtainable industrial substrates**. Submetido no periódico Acta Scientiarum. Technology. Classificação B2 no Qualis-Capes da área de Ciência de Alimentos. Normas disponíveis no site: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/about/submissions>

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION. β -glucans are sugar polymers composed of several monosaccharide units. Differentiated by the glycosidic bonds that bind them together. In food industries, they are used as thickeners, gelling agents, texturizers, and stabilizers, however, they can have low water solubility and high viscosity, making their application difficult. They can also be used in human and animal health when considering their bioactive properties. However, β -glucans may have low water solubility and high viscosity, making their industrial application difficult. To solve these issues enzymatic hydrolysis can be used to help obtain bioactive oligosaccharides and provide technological and biological applications. Therefore, the β -1,3-glucanases synthesized by filamentous fungi have wide applicability in the food, chemical, and pharmaceutical industries. However, its obtainment can be costly, especially due to substrates used to induce its synthesis. Enzyme production can be carried out with free or immobilized microbial cells. Therefore, the microorganism immobilization technique by passive adhesion to surfaces, such as natural and synthetic sponges, has great potential for industrial application and can be applied in the production of β -glucanases. This process has several advantages over the conventional method with free cells, such as the ability to use the microorganisms in repetitive batches, easy recovery of cells from the fermentation medium, and a reduction in contamination risk.

OBJECTIVES. This work aimed to highlight the benefits of bioactive β -glucans and produce β -1,3-glucanase by *T. harzianum* Rifai, using free and immobilized cells in synthetic and plant sponges, using different inducing substrates that could provide better cost-effectiveness for the industrial production of the enzyme.

MATERIALS AND METHODS. A review study was carried out on β -glucans and their benefits, to characterize them and discuss their potential to act in intestinal health as a bioactive polymer with prebiotic and immunomodulatory action. Together, the β -1,3-glucanase enzyme was synthesized by the fungus *T. harzianum* Rifai. The specific substrates studied were: curdlan, succinoglycan, corn starch, cassava starch, fungal biomass and lactose. The substrates were evaluated in relation to production of β -glucanases in the presence of *T. harzianum* Rifai fungus and the *A. pullulan* 1WA1 yeast, through the observation of hydrolysis halo in a Petri dish (zymogram). After screening the substrates by the qualitative technique of zymogram, enzyme production assays were carried out. The production of β -1,3-glucanases was studied through the cultivation of *T. harzianum* Rifai using free and immobilized cells in synthetic sponges through repetitive batch processes. For microbial immobilization, natural and synthetic matrices were used, respectively, *Luffa cylindrica* bushing and synthetic polyurethane sponge. The matrices were prepared in disks form, each approximately 25 mm in diameter and thickness. Tests were also carried out for the synthesis of β -1,3-glucanases with different concentrations of corn starch and cassava starch (0.15%; 0.5%; 1.0%; 3.0% and 5.0%), using only free cells. The β -1,3-glucanase activity was determined by quantifying the reducing sugars released from the hydrolysis of the laminarin substrate, according to the cuproarsenate method described by Somogyi and Nelson. The unit of β -1,3-glucanases activity was defined as the number of μmol of reducing sugars released per minute per mL of enzyme extract under the test conditions. The results of the synthesis of β -1,3-glucanases were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by the Tukey test, considering a significance level of 5% ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION. The zymogram method, which is a qualitative, low-cost, and fast technique, proved to be efficient for screening substrates inducing β -glucanases against species of filamentous fungi. All substrates evaluated showed positive results for the method. It was possible to immobilize *T. harzianum* Rifai in sponge synthetic and natural. However, after exposing the natural sponge (*L. cylindrica*) to the fungus from the second repetitive batch of β -1,3-glucanases production, started a process of degradation of the natural support, preventing its use. The degradation of the natural support was related to the potential of synthesis of xylanase and cellulase by *T. harzianum*. All tested substrates resulted in the synthesis of β -1,3-glucanase, including succinoglycan, proposed innovatively in this study. Fungal biomass resulted in the best inducing substrate under conditions of free and immobilized cells, with a production of β -1,3-glucanases of 0.73 U and 0.80 U, respectively. The good performance of fungal biomass as an inducing substrate was already expected since it is known in the literature that *Trichoderma* species synthesize a greater amount of extracellular β -glucanases when cultivated in a medium containing fungal cell wall. Corn starch managed to maintain the production of β -1,3-glucanases until the fourth batch was evaluated, showing itself to be an interesting substrate since it is currently the cheapest and most accessible in the market among those evaluated in this research. The synthesis of β -1,3-glucanase using immobilized cells, in the first batch, about free cells, showed an increase in the production of β -1,3-glucanases to observe an increase in the production of β -1,3-glucanases for the inducing media fungal biomass, lactose, and succinoglycan with and without glucose, which reached an enzymatic concentration around 8.74%, 47.80%, 78.10%, and 46.90% higher, respectively. The substrates corn starch and cassava showed promise in the production of β -1,3-glucanase. Corn starch showed the best result in this test and, for the two substrates studied, there was an increase in enzyme production against the increase in the concentration of up to 1.0% of the substrate, obtaining 0.51 U and 0.46 U for starch from corn and cassava starch, respectively. From 3% onwards, there was a decrease in the production of β -1,3-glucanases for the two substrates. No significant difference was observed between corn and cassava starch when using concentrations of 0.5% and 1%. Similarities in production between substrates should be considered a relevant and positive factor, considering the possibility of replacing the raw material by industry in face of price variation, due to the seasonality of agricultural crops.

CONCLUSION. It is possible to use the zymogram technique to screen for substrates inducing β -1,3-glucanases. Fungal biomass resulted in good production of β -1,3-glucanases, however, its acquisition is restricted. Starch sources showed promise for enzyme production by *T. harzianum*, being easy to acquire industrially and at a low cost. Succinoglycan can be used as an inducing substrate in the production of fungal β -1,3-glucanases. The use of free and immobilized cells allowed the microorganism to be reused, allowing its use in repetitive batches. The use of β -1,3-glucanases enables the best industrial use of β -glucans with bioactive potential.

Keywords: β -glucans; *Trichoderma harzianum*; starch; immobilization; zymogram; succinoglycan.

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO. As β -glucanas são polímeros de açúcar constituídos de várias unidades monossacarídicas, diferindo-se pelas ligações glicosídicas que as unem. Nas indústrias alimentícias são utilizadas como espessantes, gelificante, texturizante e estabilizantes, contudo, podem apresentar baixa solubilidade em água e elevada viscosidade, dificultando sua aplicação. Também podem ser utilizadas na saúde humana e animal quando consideradas suas propriedades bioativas. Entretanto as β -glucanas podem apresentar baixa solubilidade em água e elevada viscosidade, dificultando sua aplicação industrial. Para solucionar esses problemas a hidrólise enzimática pode ser utilizada para auxiliar na obtenção de oligossacarídeos bioativos e proporcionar aplicações tecnológicas e biológicas. Desta forma, as β -1,3-glucanases sintetizada por fungos filamentosos possuem amplas aplicabilidades nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica, entretanto, sua obtenção pode ser onerosa, especialmente devido substratos utilizados para induzir sua síntese. A produção enzimática pode ser realizada com células microbianas livres ou imobilizadas. Portanto, a técnica de imobilização de microrganismos por adesão passiva em superfícies, como em esponja naturais e sintéticas, tem grande potencial para aplicação industrial e pode ser usada na produção das β -1,3-glucanases. Este processo apresenta diversas vantagens sobre o método convencional com células livres, como a capacidade de utilizar os microrganismos em lotes repetitivos com fácil recuperação das células do meio de fermentação e redução do risco de contaminação.

OBJETIVOS. O objetivo deste trabalho foi ressaltar os benefícios das β -glucanas bioativas, e produzir β -1,3-glucanase por *T. harzianum* Rifai, utilizando células livres e imobilizadas em esponjas sintética e vegetal, empregando diferentes substratos indutores que pudessem proporcionar melhor custo-benefício para a produção industrial da enzima.

MATERIAL E METODOS. Foi feito um estudo de revisão sobre as β -glucanas e seus benefícios, com o objetivo de caracterizá-las e discutir sobre seu potencial de atuação na saúde intestinal como polímero bioativo de ação prebiótica e imunomoduladora. Juntamente, foi realizado a síntese da enzima β -1,3-glucanase pelo fungo *T. harzianum* Rifai. Os substratos específicos estudados foram: curdlana, succinoglucana, amido de milho, amido de mandioca, biomassa fúngica e lactose. Os substratos foram avaliados quanto à produção de β -glucanases na presença do fungo *T. harzianum* Rifai e da levedura *A. pullulan* 1WA1, por meio da observação de halo de hidrólise em placa de Petri (zimograma). Após triagem dos substratos pela técnica qualitativa de zimograma, foram realizados ensaios de produção enzimática. A produção de β -1,3-glucanases foi estudada por meio do cultivo de *T. harzianum* Rifai utilizando células livres e imobilizadas em esponja sintética por meio de processos em lotes repetitivos. Para a imobilização microbiana foram utilizadas matrizes natural e sintética, respectivamente, bucha de *Luffa cylindrica* esponja sintética de poliuretano. As matrizes foram preparadas em forma de discos, cada um com aproximadamente 25 mm de diâmetro e espessura. Também foram realizados ensaios para síntese de β -1,3-glucanases com diferentes concentrações de amido de milho e amido de mandioca (0,15%; 0,5%; 1,0%; 3,0% e 5,0%), utilizando somente células livres. A atividade da β -1,3-glucanases foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados da hidrólise do substrato laminarina, de acordo com o método do cuproarsenato descrito por

Somogyi e Nelson. A unidade de atividade de β -1,3-glucanases foi definida como o número de μ mol de açúcares redutores liberados por minuto por mL de extrato enzimático nas condições de ensaio. Os resultados da síntese de β -1,3-glucanases foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO. O método de zimograma, o qual é uma técnica qualitativa, de baixo custo e rápida, se mostrou eficiente para triagem de substratos indutores de β -glucanases frente a espécies de fungos filamentosos. Todos os substratos avaliados apresentaram resultado positivo para o método. Foi possível realizar imobilização do *T. harzianum* Rifai em ambas esponjas sintética e natural. Entretanto, após exposição da esponja natural (*L. cylindrica*) ao fungo em lotes repetitivos de produção da β -1,3-glucanases, iniciou um processo de degradação do suporte natural, impedindo sua utilização. A degradação do suporte natural foi relacionada ao potencial de síntese de xilanase e celulase pelo *T. harzianum*. Quanto aos substratos testados, todos resultaram em síntese de β -1,3-glucanase, incluindo a succinoglucana, proposto de forma inovadora neste estudo. A biomassa fúngica resultou no melhor substrato indutor em condições de células livres e imobilizadas, com uma produção de β -1,3-glucanases de 0,73 U e 0,80 U de β -1,3-glucanases. O bom desempenho da biomassa fúngica como substrato indutor já era esperado, uma vez que é conhecido na literatura que as espécies de *Trichoderma* sintetizam uma maior quantidade de β -glucanases extracelulares quando cultivado em um meio que contenha parede celular fúngica. O amido de milho conseguiu manter a produção de β -1,3-glucanases até o quarto lote avaliado, mostrando ser um substrato bastante interessante, visto que atualmente é o mais barato e acessível no mercado dentre os avaliados nesta pesquisa. A síntese de β -1,3-glucanase utilizando células imobilizadas, no primeiro lote, em relação as células livres, apresentou um acréscimo na produção de β -1,3-glucanases para os meios indutores biomassa fúngica, lactose e succinoglucana com e sem glicose, que atingiram uma concentração enzimática cerca de 8,74%, 47,80%, 78,10% e 46,90% superior, respectivamente. Os substratos amido de milho e mandioca mostraram promissores na produção de β -1,3-glucanase. O amido de milho apresentou melhor resultado neste ensaio e, para os dois substratos estudados, ocorreu o aumento da produção enzimática frente o acréscimo da concentração até 1,0% de substrato, sendo obtido 0,51 U e 0,46 U para amido de milho e amido de mandioca, respectivamente. A partir de 3% de substrato ocorreu diminuição da produção de β -1,3-glucanases para os dois substratos. Não foi observado diferença significativa entre o amido de milho e de mandioca quando utilizada as concentrações de 0,5% e 1% de substrato. Semelhanças na produção entre os substratos deve ser considerada um fator relevante e positivo, tendo em vista a possibilidade de substituição da matéria prima pela indústria frente a variação de preços, devido a sazonalidade das culturas agrícolas.

CONCLUSÃO. É possível utilizar a técnica de zimograma para triagem de substratos indutores de β -1,3-glucanases. A biomassa fúngica resultou em boa produção enzimática, contudo, sua aquisição é restrita. As fontes de amido se mostraram promissoras para produção enzimática pelo *T. harzianum*, sendo de fácil aquisição industrial e de baixo custo. A succinoglucana é passível de ser utilizada como substrato indutor na produção de β -1,3-glucanases fúngica. O uso de células livres e imobilizadas permitiram o reaproveitamento do microrganismo, possibilitando o uso em lotes repetitivos. Portanto, o uso das β -1,3-

glucanases possibilita o melhor aproveitamento industrial das β -glucanas com potencial bioativo.

Palavras chaves: β -glucanas; *Trichoderma harzianum*; amido; imobilização; zimograma; succinoglucana;

ARTIGO 1**β-GLUCANAS E SEUS BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE INTESTINAL**

β -glucanas e seus benefícios para a saúde intestinal

Hâmara Milaneze de Souza^{1*}, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá-PR, Brasil. Email: hmilaneze@hotmail.com

Cecilia Valente Rodrigues Truite², Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá-PR, Brasil. Email: ceciliatruite@gmail.com

Tieles Carina de Oliveira Delani³, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá-PR, Brasil. Email: tielesfar@yahoo.com.br

Graciette Matioli⁴, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá-PR, Brasil. Email: gracietteuem@gmail.com

Resumo

As glucanas são polímeros de açúcar que se diferem pelo tipo de ligação glicosídica, comprimento de suas cadeias e grau de ramificação, quando presente. Estrutura e composição influenciam suas funções bioativas. As β -glucanas são amplamente distribuídas na natureza e fazem parte dos constituintes estruturais da parede celular de fungos, algas e cereais. Quando microrganismos produzem e secretam esses polissacarídeos para o meio extracelular dão origem aos exopolissacarídeos. Além de melhorar aspectos sensoriais nas indústrias alimentícias, as β -glucanas possuem uma vasta aplicabilidade para a saúde humana e animal quando consideradas suas propriedades bioativas. Integrando o grupo das fibras alimentares, seus benefícios fisiológicos à saúde são atribuídos, entre outros, ao efeito prebiótico e ação imunomoduladora. O uso de prebióticos proporciona a manutenção da saúde intestinal por meio do desenvolvimento imunológico em níveis local e sistêmico, assim como, a conservação de sua microbiota comensal, que exerce papel fundamental no crescimento e na saúde dos indivíduos. Também é importante na prevenção da colite e constipação, assim como, inibição do câncer, redução do colesterol sérico, diminuição de doenças cardiovasculares, prevenção da obesidade. Desta forma, a presente revisão tem como objetivo caracterizar as β -glucanas e discorrer sobre seu potencial de atuação na saúde intestinal como polímero bioativo de ação prebiótica e imunomoduladora.

Palavras-chave: imunomodulador, microbiota intestinal, polissacarídeos, prebiótico, substância bioativa.

1. Introdução

O trato gastrointestinal (GI) é um tubo longo e complexo com funções sofisticadas e coordenadas, que levam a digestão de alimentos em produtos passivos de absorção, assim como, a eliminação de resíduos metabólicos e defesa do corpo contra agressões do meio externo (BOURLIOUX, et al. 2003; CHENG, et al., 2010). É o maior órgão linfóide do corpo, contendo cerca de 60% das imunoglobulinas totais produzidas e com um número significativamente maior de linfócitos ($>10^6$ linfócitos/g de tecido) quando comparado ao sistema imune circulante (SALMINEN, et al., 1998).

Uma vez que o trato GI se abre para o exterior, permite que uma grande variedade microbiana entre em contato e habitem o seu lúmen. Este conjunto de microrganismos chamados coletivamente de microbiota, é formado principalmente por bactérias, mas também estão presentes fungos, vírus e protozoários (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, et al., 2011).

Esta relação entre hospedeiro e microbiota intestinal tornou-se, um tema de extrema importância para a fisiologia e saúde do indivíduo, assim como, a relação de disbiose frente o desenvolvimento de doenças (RINNINELLA, et al., 2019). Desta forma, fica evidente a importância do trato GI como um ambiente crucial na interação antigênica, uma vez que está em constante contato com microrganismos comensais, patogênicos e inúmeras moléculas derivadas de alimentos ingeridos (GONÇALVES, et al., 2016). A microbiota intestinal pode exercer funções específicas e benéficas para seu hospedeiro, como aproveitamento de carboidratos complexos, produção metabólitos primários ou atuar na modulação de metabólitos secundários. Como exemplo produção de ácidos graxos voláteis, vitaminas, metabólitos neuroativos e aminoácidos, assim como, regulação do sistema imunológico (FAN; PEDERSEN, 2021). Alterações que promovam a interrupção desta homeostase conduz a um quadro de disbiose que, frequentemente, é associada ao desenvolvimento de doenças, como as síndromes metabólicas, obesidade, diabetes, doença inflamatória intestinal e doenças cardiovasculares (IBAY, et al., 2019).

Uma forma de manter e restabelecer o equilíbrio da microbiota intestinal é por meio do uso de prebióticos, que são substratos seletivos. Estes podem influenciar favoravelmente a microbiota comensal, assim como, o sistema imunológico e, conseqüentemente, promover efeitos benéficos na saúde humana e animal (GIBSON, et al., 2017). Os prebióticos se destacam entre os alimentos funcionais com uma ampla aplicabilidade industrial, que conquistando cada vez mais a aceitação dos consumidores, devido suas características benéficas (GLOBE NEWSWIRE, 2021). É reconhecido pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) pelos seus efeitos benéficos a saúde por meio de ações multidimensionais (PINHEIRO, et al., 2008). Entre as novas fontes prebiótica estudadas as β -glucanas têm se destacado (LAM; CHEUNG, 2013).

As β -glucanas fazem parte dos constituintes estruturais da parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais (CAMILLI; TABOURET; QUINTIN, 2018; SILVA, et al., 2006). Estes polissacarídeos também podem ser secretados para o meio extracelular, sendo então denominadas exopolissacarídeos (EPS) (GIESE, et al., 2008). Integrando o grupo das fibras alimentares, seus benefícios fisiológicos à saúde são atribuídos, entre outros, ao efeito prebiótico e ação imunomoduladora. Proporcionando a manutenção da saúde intestinal por meio da conservação de sua microbiota, assim como, no desenvolvimento imunológico em níveis local e sistêmico (LAM; CHEUNG, 2013). Considerando, que a dieta enriquecida com β -glucanas exerce efeito direto na manutenção da saúde intestinal, esta revisão visa destacar os principais aspectos e característica das β -glucanas e apontar seu potencial bioativo, discutindo seus benefícios prebiótico frente a microbiota e o sistema imunológico da mucosa intestinal.

2. Microbiota intestinal

O trato GI pode variar em sua composição conforme a espécie animal, nos seres humanos inclui a boca, o esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo) e intestino grosso (ceco, cólon, reto e ânus), bem como, órgãos glandulares acessórios, que compreende as glândulas salivares, o fígado, a vesícula biliar e o pâncreas. As funções primárias do trato GI são digestão, absorção, excreção, motilidade e defesa (CHENG, et al., 2010; SILVERTHORN, 2017). A constante interação do trato GI com o meio externo exige que este tenha um sistema imunológico complexo, capaz de identificar e tolerar antígenos

dietéticos e a presença da microbiota comensal benéfica. Ao mesmo tempo deve ser apto a reconhecer e combater antígenos e microrganismos prejudiciais (MANLEY; LEE; ZHANG, 2020).

Existe um importante ecossistema microbiano no trato GI humano, ocorrendo uma relação simbiótica entre os microrganismos e o hospedeiro (SNELSON, et al., 2021). Estima-se que a microbiota humana contenha trilhões de células bacterianas, dez vezes mais do que o número de células que constituem o corpo, sendo encontrados no trato GI mais de 100 trilhões com aproximadamente 1000 espécies distintas (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, et al., 2011; NIE; LUO; LIN, 2018). Os filos Firmicutes e Bacteroidetes representam aproximadamente 90% deste consorcio bacteriano, seguido do Actinobacteria (SNELSON, et al., 2021).

Em um estudo realizado por Qin et al. (2010), sobre sequenciamento metagenômico da microbiota intestinal, foi apontado que os humanos compartilham de uma microbiota comum que foi denominada como “central”, correspondendo aproximadamente a um terço das espécies bacterianas intestinais. Os outros dois terços estão relacionados a uma individualização da microbiota, podendo variar entre os indivíduos. Essa individualidade é influenciada por uma série de fatores, incluindo fatores intrínsecos, como a motilidade intestinal, pH, proteínas antibacterianas e o muco intestinal, assim como, fatores extrínsecos, como medicamentos, atividade física e dieta (QIN et al., 2010).

A dieta é um dos principais aspectos que influenciam a microbiota intestinal, uma vez que esses microrganismos obtêm sua energia dos alimentos, particularmente dos polissacarídeos complexos não digeríveis (FAN; PEDERSEN, 2021). Os prebióticos são um exemplo de carboidratos que serão utilizados pela microbiota, que durante o processo de fermentação podem gerar os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente butirato, acetato e propionato. O butirato é uma fonte de energia primária para os colonócitos e mantém a homeostase intestinal por meio de ações anti-inflamatórias (SNELSON, et al., 2021). Outras funções centrais de uma microbiota intestinal saudável incluem a codificação e degradação de glicosaminoglicanos, a síntese de lipopolissacarídeos específicos (LPS) e a biossíntese de alguns aminoácidos essenciais e vitaminas, assim como, a modulação do sistema imunológico (IBAY, et al., 2019; FAN; PEDERSEN, 2021).

Com relação a imunidade do hospedeiro, a microbiota intestinal desempenha um papel importante, tanto no desenvolvimento do sistema

imunológico como na sua manutenção. A presença de microrganismos comensais pode ajudar a proteger o hospedeiro de infecções patogênicas por meio de vários mecanismos, entre eles, competição direta entre espécies, mantendo a barreira epitelial saldável e modulando as respostas imunes adaptativas (MANLEY; LEE; ZHANG, 2020). Quando esta microbiota se encontra equilibrada pode promover benefícios a saúde, entretanto, seu desequilíbrio pode resultar efeitos adversos, por meio de seus resultados metabólicos ou potencial para patogenicidade de alguns agentes (Figura 1).

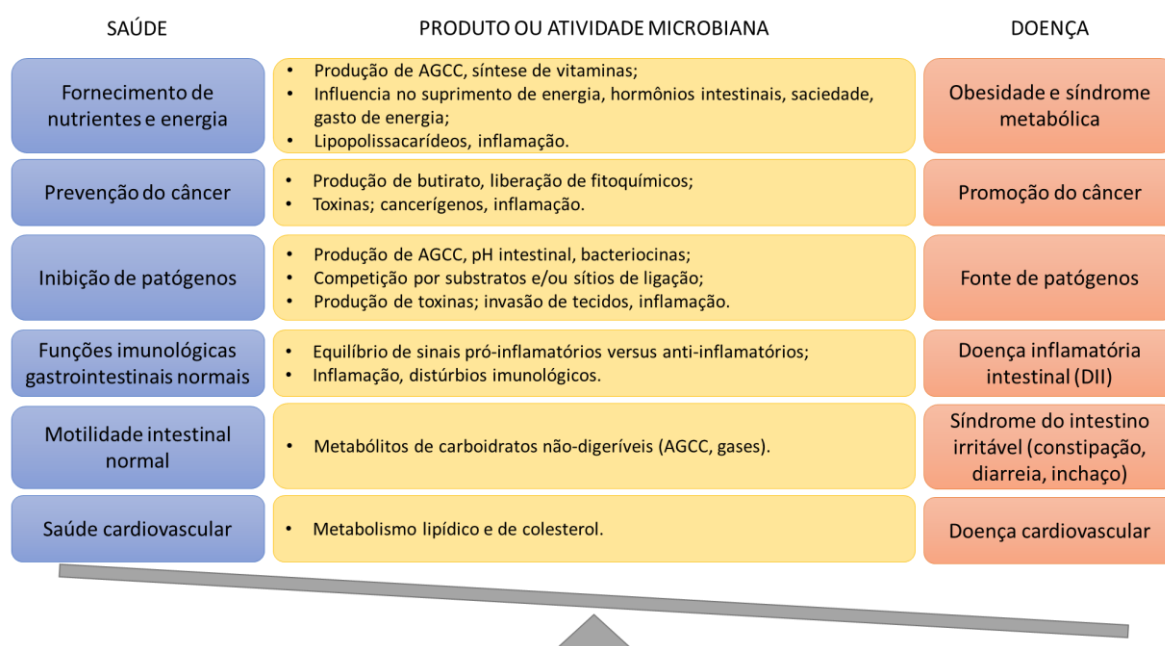


Figura 1: Influência da microbiota intestinal na saúde. A coluna central indica as principais funções da microbiota intestinal comensal. O equilíbrio da comunidade e sua produção determina a contribuição para a saúde ou doença (Modificado de FLINT, et al., 2012). (AGCC = ácido graxo de cadeia curta).

A doença inflamatória intestinal é um problema de saúde global, e consiste em uma doença crônica do trato GI, que inclui duas formas principais: doença de Crohn e colite ulcerativa (SCHIRMER, et al., 2019). A inflamação da mucosa intestinal é caracterizada por episódios de dor abdominal, diarreia, fezes com sangue, perda de peso e o influxo de neutrófilos e macrófagos que produzem citocinas, enzimas proteolíticas e radicais livres, que resultam em inflamação e ulceração. Embora a etiologia permaneça amplamente desconhecida, pesquisas recentes indicaram que a suscetibilidade genética do indivíduo, ambiente,

microbiota intestinal e respostas imunes estão envolvidos e integrados na patogênese da DII (GUAN, 2019).

Desta forma, entende-se que alguns agentes da microbiota intestinal são capazes de exacerbar a inflamação, como a *Escherichia coli*. Entretanto, os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Faecalibacterium* podem atuar na proteção da mucosa intestinal frente a respostas inflamatórias inadequadas que prejudicariam o hospedeiro. Algumas cepas como a *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Faecalibacterium prausnitzii*, agem inibindo a expressão das principais citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, neutralizando os efeitos da *E. coli* (MANICHANH, et al., 2012)

Outro papel importante, exercido pela microbiota intestinal, é a prevenção câncer cólon e reto por meio da produção de ácido graxo de cadeia curta (AGCC), em especial o butirato, e na transformação de fenólicos dietéticos. Por outro lado, compostos promotores do câncer também podem ser sintetizados pela atividade microbiana, e o equilíbrio das ações procarcinogênicas e anticarcinogênicas é altamente dependente da dieta e da ingestão de xenobióticos (FLINT, et al., 2012).

3. β -glucanas

As glucanas são polímeros de glicose, de ocorrência natural, que podem ser constituídas de centenas ou milhares de unidades monossacarídicas, diferindo-se pelas ligações glicosídicas (α , β) que as unem, pelo comprimento das cadeias polissacarídicas e pelo grau de ramificação, quando presente. As β -glucanas são amplamente encontradas, fazendo parte dos constituintes estruturais da parede celular de leveduras, fungos filamentosos e comestíveis (cogumelos) e alguns cereais (SILVA, et al., 2006; CAMILLI; TABOURET; QUINTIN, 2018). Estas também podem ser sintetizadas por microrganismos e secretadas para o meio extracelular, sendo, então, denominadas exopolissacarídeos (EPS) (GIESE, et al., 2008). Na Figura 2 estão representados exemplos de fórmulas estruturais de β -glucanas de origens distintas.

A fonte de obtenção das β -glucanas influencia diretamente suas características morfológicas, como ligações glicosídicas, grau de ramificação, peso molecular e solubilidade (KAUR, et al., 2020). As β -glucanas presentes em plantas e cereais encontram-se principalmente nas paredes celulares do endoplasma dos grãos, e compartilham uma estrutura comum formada por uma cadeia de glicosídica

com ligações $\beta(1,3)$ e $\beta(1,4)$. As β -glucanas presente em leveduras e fungos são compostas, principalmente, de ligações $\beta(1,3)$ e $(1,6)$ (DU, et al., 2019; KAUR, et al., 2020). Já, as β -glucanas bacterianas são compostas por moléculas de glicopiranoose unidas por ligações $\beta(1,3)$, não ramificadas (LAROCHE; MICHAUD, 2007). Os EPS possuem composição semelhante a produtos vegetais ou microbianos, entretanto, apresentam uma maior variedade de combinações estruturais devido à grande diversidade de microrganismos que são produtores destes polissacarídeos (MOSCOVICI, 2015).

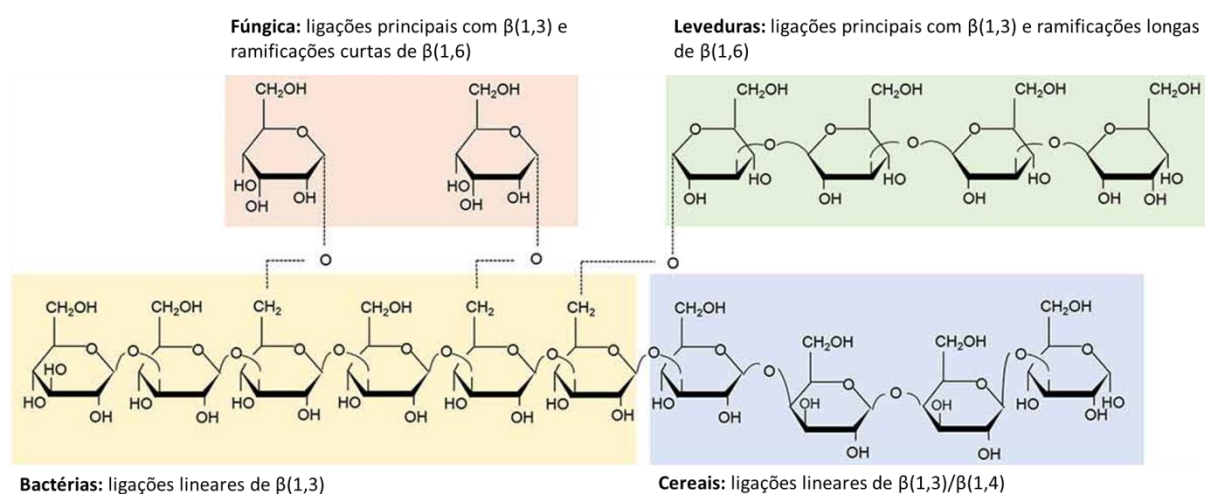


Figura 2. β -glucanas e suas estruturas químicas. Exemplos e configurações de β -glucanas derivadas de bactérias, fungos, leveduras e cereais (Modificado de, DE GRAAFF et al., 2018).

Entre os EPS, é possível citar a succinoglucana, um heteropolissacarídeo ácido sintetizado por bactérias e compostos por unidades repetidas de octosacarídeos com ligações tipo β . O fragmento de polissacarídeo consiste em monómeros de glicose ligados a $\beta(1,3)$, $\beta(1,4)$ e $\beta(1,6)$, juntamente com uma pequena proporção de galactose ligada a $\beta(1,3)$, em uma proporção molar de 1:7 (ZEVENHUIZEN, 1997; SIMSEK, et al., 2009). Ruiz et al. (2015), obtiveram resultados promissores ao imobilizarem as células de *Agrobacterium radiobacter* em esponja vegetal e utilizando como substratos indutores o melaço de cana-de-açúcar e a lactose a 7,5%, obtendo uma produção de 14 g/L e 12 g/L de succinoglucana, respectivamente. A botrisferana, produzida pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* (GIESE, et al., 2005), é outro EPS microbiano composto de

ligações $\beta(1,3)$ e $\beta(1,6)$ com aproximadamente 22% de ramificações, as quais são constituídas por resíduos de glucose e gentiobiose.

Entretanto, mesmo quando obtida da mesma origem, as β -glucanas podem diferir significativamente, isso pode ocorrer devido as condições de extração que geralmente afetam a qualidade, quantidade, peso molecular, viscosidades e outras propriedades físico-químicas, tornando fundamental a escolha de uma técnica de extração apropriada (KAUR, et al., 2020). Como exemplo, acurdlna é um EPS linear neutro e composto de unidades de glicose repetidas unidas por ligações $\beta(1,3)$. Esta glucana é insolúvel em água, o que dificulta sua homogeneização ou dispersão em produtos alimentícios (MANGOLIM et al., 2017). No entanto, sua estrutura conformacional pode ser alterada frente a técnica de recuperação utilizada, como observada por Mangolim et al. (2017) ao estudarem a formação de gel de curdlana produzido por *Agrobacterium* sp. em comparação com a curdlana comercial. Ambas as fontes estudadas se dispersaram facilmente em água quando mantidos na forma de pré-gelificação, aumentando significativamente a facilidade de aplicação da curdlana em matrizes alimentares, quando comparada com a forma seca da curdlana comercial.

3.1 Aplicação das β -glucanas

As glucanas podem ser utilizadas em diversos setores comerciais, como na indústria alimentícia, farmacêuticas, químicas e na medicina veterinária (ZHU; DU; XU, 2016). No processamento de alimentos proporcionam, principalmente, melhoria nas características funcionais, como reologia e textura, resultando em um excelente espessante e estabilizador de emulsões, melhorando as características sensoriais dos produtos. As β -glucanas também desempenha um papel importante na substituição de óleos e gorduras em produtos *light* ou para redução do conteúdo calórico (MANGOLIM et al., 2017). Lee e Inglett (2006) substituíram com sucesso diferentes quantidades de gordura (10%, 20% e 30%) em biscoitos com β -glucana de farelo de aveia (20%) cozido. Em produtos cárneos e lácteos a substituição da gordura por β -glucana também tem se mostrado eficaz e pode ajudar a controlar a ingestão de calorias e os consequentes riscos à saúde causados pelo consumo excessivo de gordura (VERMA, et al., 2020).

Mesmo com todo seu potencial industrial, algumas β -glucanas podem apresentar baixa solubilidade em água e elevada viscosidade, dificultando o

desenvolvimento de testes biológicos. Para melhorar estes aspectos, um dos métodos mais utilizados na despolimerização das β -glucanas é a hidrólise ácida que consiste em uma via de obtenção de oligossacarídeos, contudo, proporciona a produção de maior quantidade de mono-, di- e trissacarídeos, além de produtos colaterais como furfurais (BAUERMEISTER, et al., 2010).

Já é reconhecido que oligômeros de maior massa molecular ($GP \geq 4$) possuem mais chances de apresentarem propriedade biológicas (SUTHERLAND, 1998). Kaur, et al. (2020), em um trabalho de revisão descreveu como várias técnicas de modificação afetam a estrutura, propriedades e aplicações de β -glucanas na indústria de alimentos. Alterações da estrutura e conformação possibilita melhorar suas propriedades biofuncionais, no entanto, cuidados devem ser considerados, uma vez que, essas estratégias podem alterar as propriedades funcionais tanto positivamente quanto negativamente.

As técnicas enzimáticas desempenham um papel relevante na modificação das características funcionais dos polissacarídeos, objetivando principalmente a redução da massa molecular, aumentando a solubilidade em água, e proporcionar maior bioatividade das β -glucanas. Esta metodologia emprega o uso de enzimas específicas com o propósito de promover a despolimerização, a desramificação ou desesterificação (KAUR, et al., 2020). Os oligossacarídeos obtidos por hidrólise enzimática têm originado novas pesquisas para viabilizar sua obtenção e elucidar suas propriedades biológicas e funcionais (REMAUD-SIMEON, et al. 2000). Bae et al. (2009) produziu hidrolisados de β -glucano de aveia com diferentes pesos moleculares usando hidrólise enzimática com a ajuda de enzimas celulase e examinou suas propriedades físico-químicas, bem como de redução de peso e colesterol *in vivo*. O tratamento com celulase causou redução no peso molecular do β -glucano de aveia de 1450 para 370 kDa. Em um estudo com ratos, eles suplementaram três hidrolisados (1450, 730 e 370 kDa) às dietas com elevado teor de gordura e relataram que os animais que receberam dietas com β -glucanas apresentaram redução significativa do peso corporal.

4. Bioatividade das β -glucanas

Existem diversos estudos que relatam as propriedades bioativas das β -glucanas. Nos tópicos a seguir serão discutidas características das β -glucanas como prebióticos e imunomoduladores.

4.1 Ação prebiótica das β -glucanas

O mercado global de prebióticos está crescendo rapidamente. Em relatório realizado pela empresa *Quince Market Insights*, o mercado de prebióticos foi avaliado em US\$ 8,95 bilhões no ano de 2020 e projetado para alcançar uma taxa de crescimento anual composta de 7% até 2030 (GLOBE NEWSWIRE, 2021). Esta constante expansão é explicada pelo aumento na diversidade de produtos alimentícios aos quais os prebióticos foram adicionados (PINEIRO, et al., 2008). Assim como, pela crescente busca dos consumidores pelos seus aspectos bioativos (GLOBE NEWSWIRE, 2021).

Originalmente, o termo prebiótico foi definido como “ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon e, assim, melhora a saúde do hospedeiro” (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Diversas atualizações foram propostas frente a constante compreensão da importância da microbiota na saúde do hospedeiro. Em 2016, um painel de especialistas em microbiologia, nutrição e pesquisa clínica foi convocado pela Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (do inglês *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* - ISAPP) para revisar a definição e o escopo dos prebióticos. Sugerindo uma abordagem mais abrangente o consenso atualizou a definição de prebiótico com “um substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros, conferindo um benefício à saúde”. Esta nova definição amplia o conceito de prebióticos para possivelmente incluir substâncias além de carboidratos não digeríveis, aplicações em locais do corpo que não sejam o trato gastrointestinal e categorias além de alimentos. Mas, mantendo a necessidade de mecanismos seletivos mediados pela microbiota (GIBSON, et al., 2017). A Figura 3 demonstra algumas das alterações no conceito de prebiótico durante os anos.

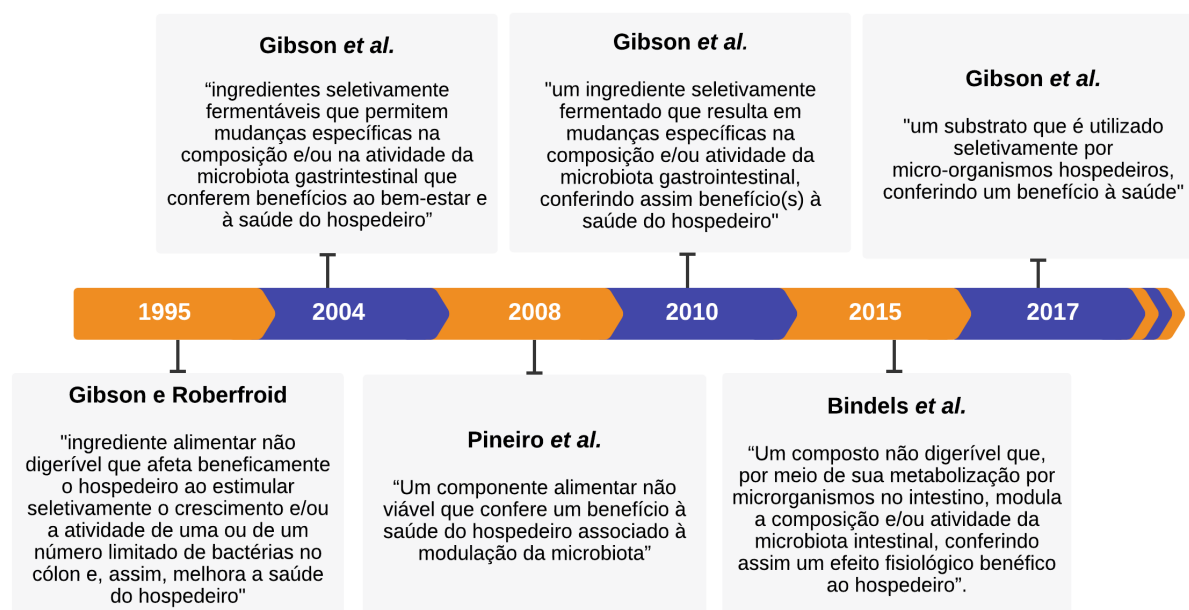


Figura 3. Evolução do conceito de prebiótico.

Para um substrato ser considerado prebiótico é essencial que este estimule seletivamente a microbiota do hospedeiro alvo. Se uma substância possui a capacidade de influenciar a composição microbiana por meio de outros mecanismos que não a utilização seletiva, este não atende aos critérios prebióticos. Antibióticos, vitaminas, proteínas, gorduras e probióticos são alguns exemplos dessas substâncias não prebióticas (GIBSON, et al., 2017). Portanto, inúmeras substâncias que podem afetar a microbiota intestinal e estas podem ser diferenciadas em prebióticos e não prebióticos, como demonstrado na Figura 4.

Diversos carboidratos fermentáveis são reconhecidos com ação prebiótica, sendo que os mais documentados como tendo benefícios à saúde são os oligossacarídeos não digeríveis, frutanos (FOS) e galactanos (GOS) (GIBSON, et al., 2017). Já as β -glucanas têm demonstrado um grande potencial como nova fonte prebiótica (JAYACHANDRAN, et al., 2018; LAM, et al., 2020). Os cereais enquadrados como fibras dietéticas são uma fonte de β -glucanas com potencial prebiótico que apresentam uma série de propriedades funcionais, como maior solubilidade, viscosidade e tendência a serem completamente fermentados pela microbiota intestinal. Desta forma, possibilitam efeitos positivos na saúde humana, como prevenção do câncer, atividade anti-inflamatória, proteção da pele, antioxidante, modulação imunológica e redução da glicemia e do colesterol sérico (SHOUKAT; SORRENTINO, 2021)

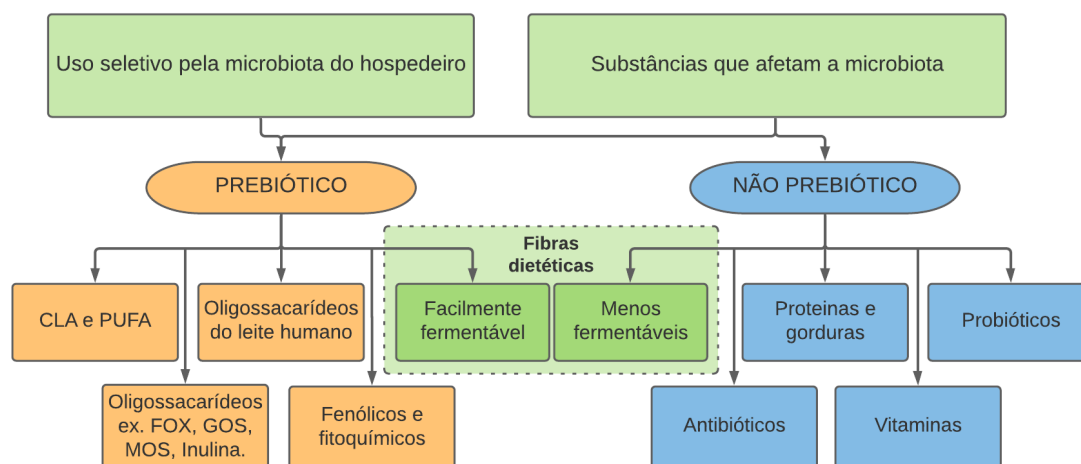


Figura 4. Distinção entre substâncias consideradas prebióticas das não prebióticas. O esquema representa tanto os prebióticos já aceitos, mas principalmente auxilia no enquadramento de novos substratos propostos como ação prebiótica. CLA, ácido linoléico conjugado; PUFA, ácido graxo poliinsaturado; FOS, fruto-oligossacarídeos; GOS, galacto-oligossacarídeos; MOS, mananoligossacarídeos (Modificado de GIBSON, et al., 2017).

Diversos estudos relatam os efeitos das glucanas de cereais, em especial aveia e cevada, na modulação da microbiota intestinal, atuando seletivamente no crescimento de *Lactobacilli* e *Bifidobacterium* (LAROCHE; MICHAUD, 2007; SHOUKAT; SORRENTINO, 2021). Em um estudo *in vivo* realizado por Mitsou e colaboradores (2010) contou com a participação de 52 voluntários saudáveis com idades entre 39-70 anos, que foram aleatoriamente designados para consumir diariamente um bolo contendo 0,75 g de β -glucano de cevada ou um placebo por 30 dias. Foi observado o aumento significativo na contagem de *Bifidobacterium* spp., em especial em indivíduos mais velhos (≥ 50 anos de idade). Os autores concluíram que a ingestão diária de um bolo contendo β -glucana de cevada é bem tolerada e demonstrou propriedades bifidogênicas significativas em voluntários saudáveis mais velhos que consumiram suas dietas habituais.

Cogumelos comestíveis como *Pleurotus* sp., *Lentinus edodes*, *Tremella fuciformis* e *Agaricus bisporus* têm demonstrado atividade prebiótica (LAM; CHEUNG, 2013). Seu componente ativo foi correlacionado as β -glucanas de cadeia longa, incluído homo e hetero-glucanos com $\beta(1,3)$, $\beta(1,4)$ e $\beta(1,6)$ ligações glucosídicas (MANZI; PIZZOFERRATO, 2000). Synytsya et al. (2009) estudaram o

efeito prebiótico das β -glucanas obtidos de duas espécies de *Pleurotus* (*P. ostreatus* e *P. eryngii*) frente a diferentes cepas probióticas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e relataram que a β -glucanas extraído de ambas as espécies de *Pleurotus* exibiram efeito prebiótico em relação as cepas de *Lactobacillus*. As cepas de *Bifidobacterium* apresentaram melhor seletividade frente ao extrato de *P. eryngii*.

Alguns efeitos farmacológicos também são observados de β -glucanas extraídas de cogumelos, incluindo atividades antimicrobianas, antivirais, antitumorais, antialérgicas, imunomoduladoras, anti-inflamatórias, antiaterogênicas, hipoglicêmicas e hepatoprotetora (LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JULICH, 2005). O potencial anticancerígeno é atribuído, principalmente, as β -glucanas de cogumelo, apresentando maior potencial quando comparada as de cereais. No câncer de cólon o efeito profilático está correlacionado a produção de butirato, que promove a regeneração das células epiteliais do intestino (ZHANG, et al., 2010).

4.2 Atividade imunomoduladora das β -glucanas

As β -glucanas não se limitam a exercer interação com a microbiota como prebiótico, mas podem atuar diretamente com as células do hospedeiro e influenciar a função imune por meio de mecanismos alternativos (LOMAX; CALDER, 2008; PENG, et al. 2020). Uma substância é considerada imunomoduladora quando é capaz de interagir com o sistema imunológico, resultando em uma regulação positiva ou negativa de partes específicas da resposta imunológica. Estas moléculas podem ser de cunho natural, sintéticas ou recombinantes (VETVICKA, et al., 2019).

A ativação do sistema imunológico por meio das β -glucanas é bastante complexa e depende de muitos fatores que ainda não foram totalmente revelados. Estas exercem efeitos em vários pontos do sistema imunológico, incluído sistema inato e adquirido (HAN, et al, 2020). Os componentes individuais que são afetados pela β -glucanas estão resumidos na Figura 5. As células do sistema imune inato, como macrófagos, monócitos, células dendríticas e células *natural killer*, possuem receptores em sua membrana celular que podem reconhecer as glucanas. Os principais receptores são a Dectina-1 e receptor complemento CR3 (CD11b/CD18).

As β -glucanas também possuem ação sobre receptores adicionais como Toll 2, manose e necrófagos (VETVICKA, et al., 2019).

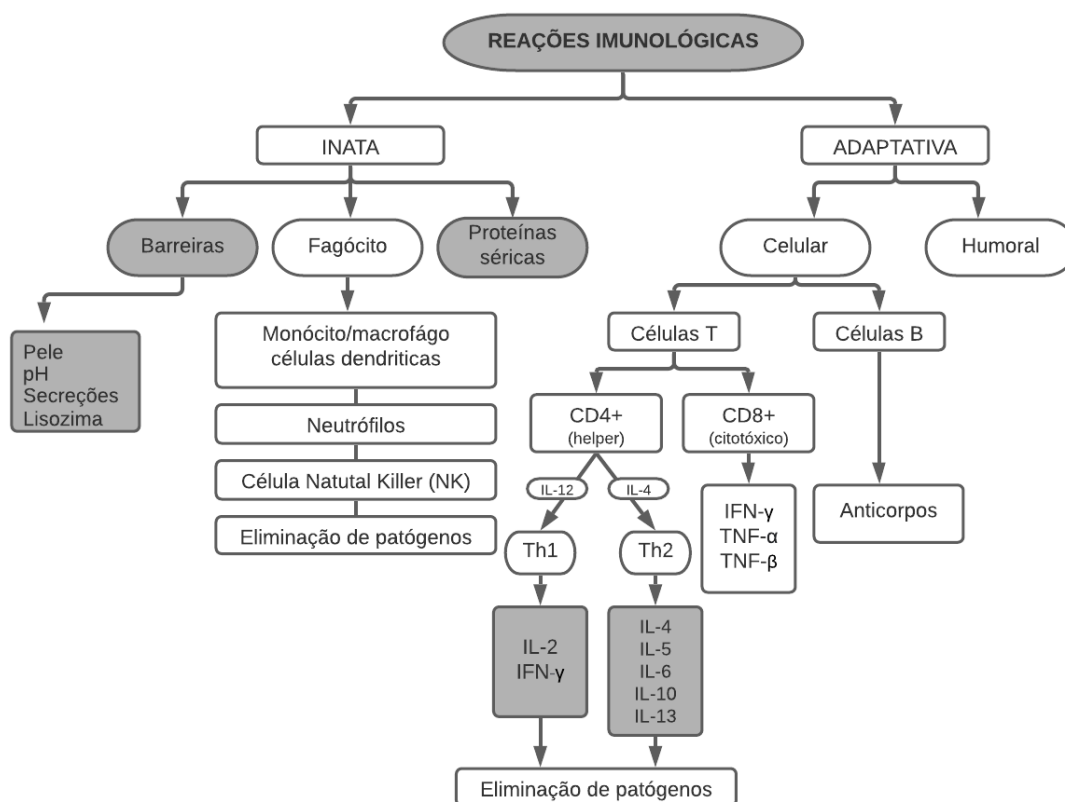


Figura 5. Efeito das glucanas em diferentes pontos do sistema imunológico. As reações conhecidas por serem influenciadas pelas glucanas estão representados na cor branca. Reações em que as glucanas não possuem efeitos confirmados estão representadas na cor cinza (Modificado de VETVICKA, et al., 2019).

Após a interação das β -glucanas com o sistema imune adaptativo, vários processos ocorrem, incluindo a ativação direta do receptor e/ou ativação da via celular. Consequentemente, inicia a resposta do sistema imune adaptativo como os linfócitos B e T, secretando diversas citocinas, como interleucinas e fator de necrose tumoral (LEE; KIM, 2014). As células B ativadas por glucanas secretam algumas linfocinas pró-inflamatórias como a IL-8 (VETVICKA, et al., 2019). A resposta intensificada a infecções secundárias, promovida pela resposta imune inata, pode ser efetuada, tanto contra microrganismos homólogos quanto heterólogos (HAN, et al., 2020). Foi demonstrado que a pré-administração de β -

glucanas proporciona memória imunológica inata, protegendo camundongos contra a reinfecção por *Escherichia coli* potencialmente letais (QUINTIN, 2018).

A dose diária sugerida de β -glucanas, para humanos encontra-se na faixa de 100 a 500 mg para estimulação do sistema imunológico, enquanto para uma redução nos níveis de colesterol sérico, a dose diária recomendada é de 3 g (VETVICKA, et al., 2019). A fermentação de β -glucanas no cólon pela microbiota intestinal resulta na formação de AGCC, que possuem diversos efeitos benéficos ao hospedeiro, como ação imunomoduladora, mediação da apoptose de células cancerosas no cólon e prevenção da obesidade (NAKASHIMA, et al. 2018). O butirato, um AGCC, possui efeito anti-inflamatório por afetar a migração e adesão de células do sistema imunológico e a expressão de citocinas, bem como por inibir processos celulares como proliferação e apoptose. No tratamento do câncer o mecanismo de ação das β -glucanas estão relacionados ao efeito citotóxicos e/ou imunomoduladores (CHAN; CHAN; SZE, 2009).

5. Conclusão

As β -glucanas são polissacarídeos de ocorrência natural que ocupam uma posição de destaque entre as substâncias bioativas. Além do benefício no tratamento e prevenção de várias doenças, são comprovados imunomoduladores naturais que podem influir direta e indiretamente nas diferentes respostas imunológicas, dependendo de sua estrutura molecular, sua origem, e forma de obtenção. Sua ação bioativa é ampla e inclui a capacidade de modulação da microbiota intestinal como um potencial prebiótico. Na modulação da resposta imunológica, exerce efeitos benéficos em quadros como de infecções, artrite, diabetes, baixa imunidade e câncer. Apresentando fontes relativamente baratas para sua obtenção estes biopolímeros não exibem efeitos colaterais negativos consideráveis. No entanto, é comum encontrar resultados controversos sobre suas propriedades, e isso geralmente está relacionado as características das β -glucanas utilizadas durante os estudos, tornando essencial a realização de mais pesquisas sobre os mecanismos de ação das diferentes fontes e estruturas de β -glucanas no organismo humano e animal. Essas investigações poderão proporcionar inovação no setor de alimentos e fármacos, com novas possibilidades de aplicações nutricionais e salutaras das β -glucanas.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e da Fundação Araucária.

Referências

BAE, In Young et al. Effect of partially hydrolyzed oat β -glucan on the weight gain and lipid profile of mice. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 2016-2021, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.03.016>.

BAUERMEISTER, Anelize et al. β -1, 3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 31, n. 2, p. 75-86, 2010. <https://doi.org/10.5433/1679-0375.2010v31n2p75>.

BINDELS, Laure B. et al. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 5, p. 303-310, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.47>

BOURLIOUX, Pierre et al. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002. **The American journal of clinical nutrition**, v. 78, n. 4, p. 675-683, 2003. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.4.675>.

CAMILLI, Giorgio; TABOURET, Guillaume; QUINTIN, Jessica. The complexity of fungal β -glucan in health and disease: effects on the mononuclear phagocyte system. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 673, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00673>.

CHAN, Godfrey Chi-Fung; CHAN, Wing Keung; SZE, Daniel Man-Yuen. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. **Journal of hematology & oncology**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2009. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-2-25>.

CHENG, Leo K. et al. Gastrointestinal system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 65-79, 2010.

<https://doi.org/10.1002/wsbm.19>.

DE GRAAFF, Priscilla et al. Consumption of β -glucans to spice up T cell treatment of tumors: A review. **Expert opinion on biological therapy**, v. 18, n. 10, p. 1023-1040, 2018. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1523392>.

DU, Bin et al. A concise review on the molecular structure and function relationship of β -glucan. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 16, p. 4032, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20164032>.

FAN, Yong; PEDERSEN, Oluf. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 55-71, 2021.

<https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>

FLINT, Harry J. et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 9, n. 10, p. 577-589, 2012.

<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.156>

GIBSON, Glenn R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition research reviews**, v. 17, n. 2, p. 259-275, 2004.

<https://doi.org/10.1079/NRR200479>

GIBSON, Glenn R. et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Sci Technol Bull Funct Foods**, v. 7, n. 1, p. 1-19, 2010.

<https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>

GIBSON, Glenn R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.

<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

GIBSON, Glenn R.; ROBERFROID, Marcel B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>

GIESE, Ellen 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, n. 12, p. 3783-3788, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.04.004>

GIESE, Ellen C. et al. Triple helix conformation of botryosphaeran, a (1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 4, p. 953-956, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.038>

GLOBE NEWSWIRE. <https://www.globenewswire.com/news-release/2021/05/24/2234520/0/en/Global-Prebiotics-Market-is-Anticipated-to-Grow-at-a-CAGR-of-7-from-2021-to-2030.html> (acessado 17 de junho 2021).

GONÇALVES, Juliana Lauar et al. Bases do sistema imunológico associado à mucosa intestinal. In: ORIÁ, Reinaldo Barreto; BRITO, Gerly Anne de Castro. **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Blucher, 2016. p. 369-388. <https://doi.org/10.5151/9788580391893>

GUAN, Qingdong. A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7247238>

HAN, Biao et al. Structure-functional activity relationship of β -glucans from the perspective of immunomodulation: a mini-review. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 658, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00658>

IBAY, Iara Cassandra V. et al. Diet-microbiome interactions and the regulation of the epigenome. In: **Nutritional Epigenomics**. Academic Press, 2019. p. 401-407. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816843-1.00024-2>

JAYACHANDRAN, Muthukumaran et al. A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 61, p. 101-110, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.06.010>

KAUR, Ramandeep et al. Structural features, modification, and functionalities of beta-glucan. **Fibers**, v. 8, n. 1, p. 1, 2020. <https://doi.org/10.3390/fib8010001>

LAM, Ka-Lung et al. Use of random forest analysis to quantify the importance of the structural characteristics of beta-glucans for prebiotic development. **Food Hydrocolloids**, v. 108, p. 106001, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106001>

LAM, Ka-Lung; CHEUNG, Peter Chi-Keung. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. **Bioactive carbohydrates and dietary fibre**, v. 2, n. 1, p. 45-64, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.09.001>

LEE, Dong Hee; KIM, Ha Won. Innate immunity induced by fungal β -glucans via dectin-1 signaling pathway. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 16, n. 1, 2014. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v16.i1.10>

LINDEQUIST, Ulrike; NIEDERMEYER, Timo HJ; JÜLICH, Wolf-Dieter. The pharmacological potential of mushrooms. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2, n. 3, p. 285-299, 2005.

<https://doi.org/10.1093/ecam/neh107>

LOMAX, Amy R.; CALDER, Philip C. Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. **British Journal of nutrition**, v. 101, n. 5, p. 633-658, 2008. <https://doi.org/10.1017/S0007114508055608>

MANGOLIM, Camila S. et al. Use of FT-IR, FT-Raman and thermal analysis to evaluate the gel formation of curdlan produced by *Agrobacterium* sp. IFO 13140 and determination of its rheological properties with food applicability. **Food**

chemistry, v. 232, p. 369-378, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.031>

MANICHANH, Chaysavanh et al. The gut microbiota in IBD. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 9, n. 10, p. 599-608, 2012.

<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.152>

MANLEY, Grace CA; LEE, Yuan-Kun; ZHANG, Yongliang. Gut microbiota and immunology of the gastrointestinal tract. In: **Clinical and Basic Neurogastroenterology and Motility**. Academic Press, 2020. p. 63-78.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813037-7.00004-2>

MANZI, Pamela; PIZZOFERRATO, Laura. Beta-glucans in edible mushrooms. **Food chemistry**, v. 68, n. 3, p. 315-318, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00197-1)

MITSOU, Evdokia K. et al. Prebiotic potential of barley derived β -glucan at low intake levels: A randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical study. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1086-1092, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.01.020>

MOSCOVICI, Misu. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1012, 2015.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01012>

NIE, Ying; LUO, Feijun; LIN, Qinlu. Dietary nutrition and gut microflora: A promising target for treating diseases. **Trends in Food Science & Technology**, v. 75, p. 72-80, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.002>.

PENG, Mengfei et al. Effectiveness of probiotics, prebiotics, and prebiotic-like components in common functional foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 1908-1933, 2020.

<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12565>

PINEIRO, Maya et al. FAO Technical meeting on prebiotics. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 42, p. S156-S159, 2008.

<https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31817f184e>

PINEIRO, Maya et al. FAO Technical meeting on prebiotics. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 42, p. S156-S159, 2008.

<https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31817f184e>

QIN, Junjie et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **nature**, v. 464, n. 7285, p. 59-65, 2010.

<https://doi.org/10.1038/nature08821>

QUINTIN, Jessica. Fungal mediated innate immune memory, what have we learned? *In: Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, 2019. p. 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.05.023>

REMAUD-SIMEON, Magali et al. Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 1-3, p. 117-128, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00119-3](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00119-3)

RINNINELLA, Emanuele et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, p. 14, 2019.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>

RUIZ, Suelen Pereira et al. Biosynthesis of succinoglycan by *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological characterization of biopolymer. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 15-28, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.08.016>

SALMINEN, S. et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **British journal of nutrition**, v. 80, n. S1, p. S147-S171, 1998.

<https://doi.org/10.1079/BJN19980108>

SCHIRMER, Melanie et al. Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 8, p. 497-511, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0213-6>

SHOUKAT, Mahtab; SORRENTINO, Angela. Cereal β -glucan: a promising prebiotic polysaccharide and its impact on the gut health. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 56, n. 5, p. 2088-2097, 2021.

<https://doi.org/10.1111/ijfs.14971>

SILVA, Maria de Lourdes Corradi da et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100017>

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SIMSEK, Senay et al. Chemical and rheological properties of bacterial succinoglycan with distinct structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 320-324, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.10.033>

SNELSON, Matthew et al. Gut microbiome, prebiotics, intestinal permeability and diabetes complications. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, p. 101507, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2021.101507>

SUTHERLAND, Ian W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 41-46, 1998.

[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01139-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01139-6)

SYNYTSYA, Andriy et al. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. **Carbohydrate polymers**, v. 76, n. 4, p. 548-556, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.021>

TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, Helena et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. **Cellular & molecular immunology**, v. 8, n. 2, p. 110-120, 2011. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.67>

VERMA, Deepak Kumar et al. Chemistry and microbial sources of curdlan with potential application and safety regulations as prebiotic in food and health. **Food Research International**, v. 133, p. 109136, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109136>

VETVICKA, Vaclav et al. Beta glucan: supplement or drug? From laboratory to clinical trials. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1251, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24071251>

ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. Succinoglycan and galactoglucan. **carbohydrate Polymers**, v. 33, n. 2-3, p. 139-144, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00054-4)

ZHANG, Yu, et al. Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells. **Chemico-biological interactions**, v. 185, n. 3, p. 174-181, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.03.035>

ZHU, Fengmei; DU, Bin; XU, Baojun. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 275-288, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.003>

ARTIGO 2**ECONOMICAL ALTERNATIVES FOR THE PRODUCTION OF FUNGAL β -1,3-
GLUCANASE USING EASILY OBTAINABLE INDUSTRIAL SUBSTRATES**

Economical alternatives for the production of fungal β -1,3-glucanase using easily obtainable industrial substrates

Alternativas econômicas para produção de β -1,3-glucanase fúngica utilizando substratos de fácil obtenção industrial

Hâmara Milaneze de Souza Zaniboni

<https://orcid.org/0000-0002-1025-8414>

Universidade Estadual de Maringá/UEM, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Maringá, PR, BR.

Richard Marllon Silva

<https://orcid.org/0000-0002-6546-5963>

Universidade Estadual de Maringá/UEM, Departamento de Engenharia de Alimentos, Maringá, PR, BR.

Marília Gimenez Nascimento

<https://orcid.org/0000-0002-9708-0136>

¹Universidade Estadual de Maringá/UEM, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Maringá, PR, BR.

Juliana Harumi Miyoshi

<https://orcid.org/0000-0003-1234-9608>

Universidade Estadual de Maringá/UEM, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Maringá, PR, BR.

Aneli de Melo Barbosa

<https://orcid.org/0000-0002-2339-8985>

Universidade Estadual de Londrina/UEL, Departamento de Química, Londrina, PR, BR.

Graciette Matioli*

<https://orcid.org/0000-0002-2531-2567>

Universidade Estadual de Maringá/UEM, Departamento de Farmácia, Maringá, PR, BR.

*Corresponding author: gmatioli@uem.br

ABSTRACT

The β -1,3-glucanases synthesized by filamentous fungi have wide applicability in the food, chemical, and pharmaceutical industries. However, its obtainment can be costly, especially due to substrates used to induce its synthesis. Therefore, the objective of this work was to produce β -1,3-glucanase by *T. harzianum* Rifai using free and immobilized cells in synthetic and plant sponges, using different inducing substrates that could provide better cost-effectiveness for the industrial production of the enzyme. The Petri dish zymogram technique proved to be efficient for screening substrates inducing β -1,3-glucanases against species of filamentous fungi. It was possible to perform the immobilization of *T. harzianum* in a synthetic sponge allowing the realization of repetitive batches for enzymatic production. All tested substrates resulted in the synthesis of β -1,3-glucanase, including succinoglycan, proposed innovatively in this study. Fungal biomass resulted in the best inducing substrate under conditions of free and immobilized cells, with a production of β -1,3-glucanases of 0.73 U and 0.80 U of β -1,3-glucanases. The substrates corn starch and cassava showed promise in the production of β -1,3-glucanase and maintained production until the fourth batch was evaluated, with values of 0.51 U and 0.46 U of β -1,3-glucanases, respectively. The results obtained in this study showed that the zymogram is a practical method for screening substrates induced by the fungus *T. harzianum*. Corn starch and cassava are accessible and low-cost sources for β -1,3-glucanase synthesis in repetitive batches, including the use of immobilized and free cells.

Keywords: *Trichoderma harzianum*; starch; immobilization; zymogram; succinoglycan.

RESUMO

As β -1,3-glucanases sintetizada por fungos filamentosos possuem amplas aplicabilidades nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica. Entretanto, sua obtenção pode ser onerosa, especialmente devido substratos utilizados para induzir sua síntese. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi produzir β -1,3-glucanase por *T. harzianum* Rifai utilizando células livres e imobilizadas em esponjas sintética e vegetal, empregando diferentes substratos indutores que pudessem proporcionar melhor custo-benefício para a produção industrial da enzima. A técnica de zimograma em placa de Petri se mostrou eficiente para triagem de substratos indutores de β -1,3-glucanases frente espécies de fungos filamentosos. Foi possível realizar a imobilização do *T. harzianum* em esponja sintética permitindo a realização de lotes repetitivos para produção enzimática. Todos os substratos testados

resultaram em síntese de β -1,3-glucanase, incluindo a succinoglucana, proposto de forma inovadora neste estudo. A biomassa fúngica resultou no melhor substrato indutor em condições de células livres e imobilizadas, com uma produção de β -1,3-glucanases de 0,73 U e 0,80 U de β -1,3-glucanases. Os substratos amido de milho e mandioca mostraram promissores na produção de β -1,3-glucanase e mantiveram a produção até o quarto lote avaliado, com valores de 0,51 U e 0,46 U de β -1,3-glucanases, respectivamente. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o zimograma é um método prático para triagem de substratos indutores pelo fungo *T. harzianum*. O amido de milho e mandioca são fontes acessíveis e de baixo custo para síntese de β -1,3-glucanase em lotes repetitivos, inclusive com uso de células imobilizadas e livres.

Palavras-chaves: *Trichoderma harzianum*; amido; imobilização; zimograma; succinoglucana.

INTRODUCTION

The β -1,3-glucanases are enzymes that hydrolyze the glycosidic bonds between oligosaccharide and/or polysaccharide-forming monosaccharides (Usoltseva et al., 2020). Widely distributed in nature, β -1,3-glucanases can act in several functions, including the degradation of polysaccharides that will be used as an energy source for fungi and bacteria. The β -1,3-glucanases can be of the exo and endo type, synergistic action being common, in which at least two enzymes with different modes of action are used to degrade β -glucans (Pitson, Seviour, & McDougall, 1993).

Several microorganisms can synthesize β -1,3-glucanases for the extracellular medium, especially yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae* (Lopes et al., 2015), *Pichia membranifaciens* (Masih & Paul, 2002), and *Aureobasidium pullulans* (Bauermeister et al., 2015), and filamentous fungi of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Trichoderma* genders (Musoni et al., 2015). Some *Trichoderma* species, including *T. harzianum* (El-Katatny et al., 2000), are efficient biocontrol agents for phytopathogenic fungi of economic importance, such as *Botrytis*, *Fusarium*, *Pythium*, and *Rhizoctonia* (Howell, 2003; Sharma, Mishra, & Misra, 2009; Menezes et al., 2010), as they are capable of degrading the fungal cell wall, especially through the action of β -glucanases (Gerhardson, 2002).

The microorganism immobilization technique by passive adhesion to surfaces, such as natural and synthetic sponges, has great potential for industrial application and can be

applied in the production of β -glucanases (Haapala et al., 1994). This process has several advantages over the conventional method with free cells, such as the ability to use the microorganisms in repetitive batches, easy recovery of cells from the fermentation medium, and a reduction in contamination risk. The ideal immobilization matrix must be strong, resistant, and porous. Natural and synthetic sponges have been used successfully to immobilize fungi (Hideno et al., 2007; Pazzetto et al., 2011; Santos & Cruz, 2016).

In addition to their use in agriculture, fungal β -1,3-glucanases have several applications such as in the production process of wines and beers for intensifying sensory characteristics, improving the digestibility of animal feed, in bioactive oligosaccharides production, including prebiotics and immunomodulators, becoming an important tool for the food, chemical and pharmaceutical industry (Bauermeister et al., 2010; González-Pombo et al., 2011).

The production of β -1,3-glucanases can be affected by some fermentation parameters, such as agitation, pH, temperature, incubation time, fermentation process, as well as culture medium components, such as the type and carbon source concentration (Vázquez-Garcidueñas, Leal-Morales, & Herrera-Estrella, 1998). Therefore, it is essential to choose the substrate used to induce its synthesis. Laminarin, isolated from *Laminaria digitata* alga, is one of the main substrates used for the synthesis and determination of β -1,3-glucanases, however, it has a high economic value which makes its industrial application difficult (Stubbs et al., 1999; Barsanti et al., 2001). Also, branched-chain fungal exopolysaccharides have stood out as inducers of β -glucanases, among them curdlan and botryosphere. In the case of botryosphere production, a lot of fungal biomass is generated and used as an industrial by-product (Giese et al., 2011), even so, when commercially available, these have high values due to their low productivity or commercial scarcity.

Another substrate for the β -1,3-glucanases synthesis was proposed in an innovative way in this research, as succinoglucyn being used for this function are not known in the literature. Succinoglycan are β -glucans synthesized by bacteria, such as *Agrobacterium* and *Sinorhizobium*, and constituted by monomers of galactose and glucose present in the proportion of 1-7, which are connected by β -glycosidic bonds (Ruiz et al., 2015). Succinoglycan have properties such as thickening, stabilizing, emulsifying and texturizing agents, which allows them to be used in different industrial sectors (Bakhtiyari, Moosavi-Nasab, & Askari, 2015).

Starch, which is already used in several enzymatic syntheses, becomes an alternative for the industrial production of β -1,3-glucanase as an inductor and carbon source (Marcello

et al., 2010; Rao, Raju, & Ravisankar, 2016). Considering Brazil the third-largest corn producer in the world, followed by China and the United States, and one of the main producers of cassava root, reaching 18.96 million tons in 2020 (Da Silva & Castañeda-Ayarza, 2021), the use of corn starch and cassava starch can make β -1,3-glucanases a product that is easy to obtain and has a reduced cost when compared to the use of other inducing sources mentioned above.

Thus, considering the potential of β -1,3-glucanases in agriculture and their applications in the food, chemical, and pharmaceutical industry, the objective of this research was to synthesize these enzymes by free and immobilized cells of *T. harzianum* Rifai, using different inducing substrates, mainly starch, easily obtainable, and succinoglycan, as an innovative proposal in this research. Therefore, it is expected with this study to provide better cost-effectiveness in the industrial production of β -1,3-glucanases.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Acurdluna was acquired from Takeda Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan) and succinoglycan (Rheozan[®]) was provided by the Rhodia Solvay Group (São Paulo, Brazil). The fungus biomass of *Botryosphaeria rhodina* MAMB 05 was provided by the Department of Chemistry of State University of Londrina (UEL) (Giese et al., 2005). The substrates cassava starch (Polvilho Doce, Alimentos Zaeli Ltd., Brazil) and corn starch (Maizena, Unilever Company), both food grade, were purchased in the local market. Standard laminarin (*Laminaria digitata*) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, The USA). All other chemicals used in the study were of analytical grade.

Microorganism and maintenance conditions

The filamentous fungus *Trichoderma harzianum* Rifai and yeast *Aureobasidium pullulans* 1WA1 were kindly granted by Dr. Aneli Barbosa de Melo Dekker, Senior Professor of the Department of Chemistry, from State University of Londrina (PR, Brazil). The microorganism maintenance was carried out using the technique of replicating in Petri dishes every 30 days. Potato dextrose agar (BDA) was used for yeast and VXA solid medium for filamentous fungus (1% xylose (p/V); 2% agar (p/V); 2% Vogel solution (V/V) (1956)).

For reactivation and preparation of the inoculum of *T. harzianum* Rifai, it was cultivated in a VXA plate for 7 days. Sequentially, 15 discs of approximately 8 mm were

removed and added to 250 ml Schott flasks containing 200 ml of saline (0.85% (w/V)), vigorously homogenized to release the conidia in the solution.

Screening of inducing substrates by detection of enzymatic activity in solid media - Zymogram

The substrates were evaluated in relation to production of β -glucanases in the presence of *T. harzianum* Rifai fungus and the *A. pullulan* 1WA1 yeast, through the observation of hydrolysis halo in a Petri dish. The zymogram method was performed according to the methodology described by Bauermeister et al. (2015), with modifications, comprising the following steps: punctual inoculation of the microorganism tested with a bacteriological needle in a previously prepared Petri dish, containing 0.5% of specific substrate, solubilized in minimal Vogel medium (2% of 1: 50) containing agar (2%). The plates were incubated at 28 °C for 48 to 120 h. After incubation, the presence of a hydrolysis halo around the microbial growth indicated enzymatic activity. The specific substrates studied were: curdlan, succinoglycan, corn starch, cassava starch, fungal biomass and lactose.

Microbial Immobilization Procedure

For microbial immobilization, natural and synthetic matrices were used, respectively, *Luffa cylindrica* bushing and synthetic polyurethane sponge for aquarium filters 25 ppi (pores per linear inch) (Elite HUSH, Hagen). *L. cylindrical* sponges were treated as described by Pazzetto et al. (2011). The matrices were prepared in disks form, each approximately 25 mm in diameter and thickness. After preparing the matrices, they were individually placed in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of VX medium (1% xylose (w/V); 2% Vogel solution (1:50)) and sterilized in an autoclave at 121°C for 20 min. Sequentially, 1 ml of *T. harzianum* Rifai inoculum was added, which were kept in an incubator with shaking for 72 h at 28 °C and 180 rpm, for immobilization by adsorption. After this procedure, the matrices with immobilized cells were transferred to the production medium to obtain β -1,3-glucanases.

Production and recovery of β -1,3-glucanases

The production of β -1,3-glucanases was studied through the cultivation of *T. harzianum* Rifai using free and immobilized cells in synthetic sponges through repetitive batch processes. The following substrates were used as a carbon source (0.15%), solubilized

in 2% minimum Vogel medium (1:50): curdlan, succinoglycan, corn starch, fungal biomass, and lactose. As well as succinoglycan (0.15%) plus glucose (0.1%). All enzymatic synthesis processes were performed in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of specific substrate plus minimal Vogel medium (2% of 1:50).

Inoculation was done with 1 mL of the inoculum solution as described above. The condition for the synthesis of β -1,3-glucanases, after preparation of medium and inclusion of the microorganism, consisted of incubation in a rotary shaker at 28 °C at 180 rpm for five days, initial pH of 5.5 with adjustments every 24 hours. After production, extracellular content was recovered by centrifugation, 7000 g for 10 min at 4 °C (Bauermeister et al., 2015).

Tests were also carried out for the synthesis of β -1,3-glucanases with different concentrations of corn starch and cassava starch (0.15%; 0.5%; 1.0%; 3.0% and 5.0%), using only free cells.

In processes with repetitive batch at the end of each cycle was taken fungal recovery as follows: for free cells after the first inoculum (1^o batch), the cells were recovered from the reaction medium by centrifuging 25 mL per 5 min at 2,940 xg and 25 °C, the sediment was washed with sterile saline solution and transferred to a new reaction medium. To recover the immobilized sponge discs, they were seized with tweezers, washed with saline solution, and transferred to a new reaction medium, the entire process is carried out in a sterile manner. In this way, successive operational cycles of β -1,3-glucanases production were carried out. All experiments were performed in triplicate.

Determination of enzymatic activity

The β -1,3-glucanase activity was determined by quantifying the reducing sugars released from the hydrolysis of the laminarin substrate of *L. digitata* (Sigma-Aldrich) according to the methodology of Bauermeister et al. (2015). Enzyme activity was determined in a final volume of 0.5 mL, 0.4% laminarin substrate, sodium acetate buffer, pH 5.0. Each reaction mixture was incubated at 37 °C for 60 min and stopped by adding 50 μ L of 1.0 mol/L NaOH. The reducing sugars were determined according to the cuproarsenate method described by Somogyi and Nelson (1944). The unit of β -1,3-glucanases activity was defined as the number of μ mol of reducing sugars released per minute per mL of enzyme extract under the test conditions.

Statistical analysis

The results of the synthesis of β -1,3-glucanases were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by the Tukey test, considering a significance level of 5% ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Screening of inducing substrates by detection of enzymatic activity in solid media - Zymogram

The zymogram method is a qualitative, low-cost, and considerably fast technique, which allows the evaluation of substrates for the production of glycolytic complexes, as well as the possible microorganisms producing these complexes (Syed et al., 2013; Bauermeister et al., 2015). Therefore, it allows for a screening of substrates that stimulate the enzymatic synthesis of microorganisms already recognized as glucanase producers.

The activity of the complex of β -glucanases is considered positive when there is the formation of a halo transparent around the microbial growth.

The yeast *A. pullulans* 1WA1 was used as a positive control for screening new substrates with enzymatic induction potential, as it is recognized for its potential to produce β -glucanase (Vero et al., 2009; Zhang et al., 2010; Di Francesco et al., 2015). The yeast showed positivity for the Petri dish zymogram technique for all substrates analyzed in this research (curdian, succinoglycan, corn starch, fungal biomass, and lactose) and the Figure 1 exemplifies the action of yeast on the succinoglycan substrate.

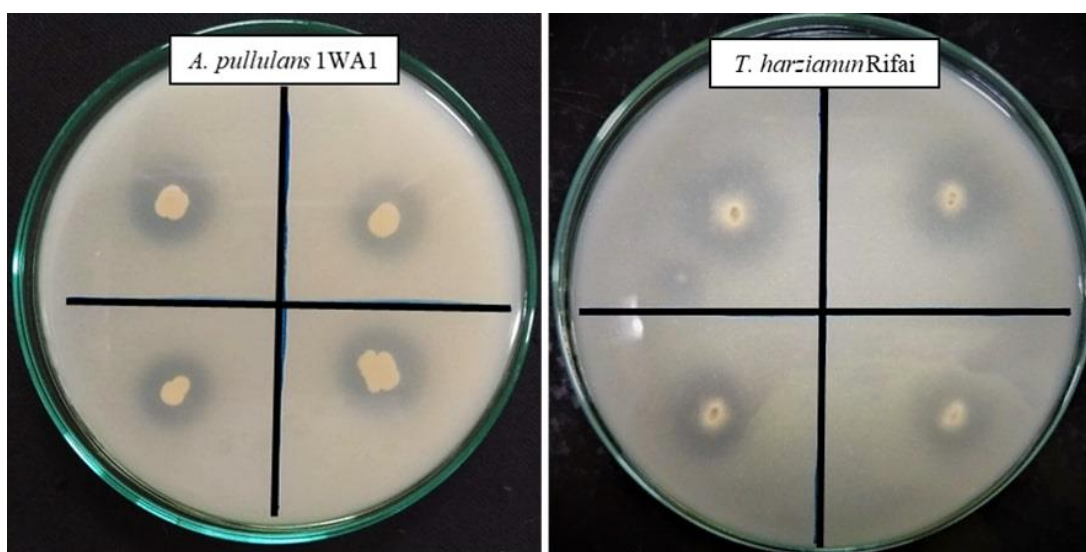


Figure 1. Petri dish containing 0.5% succinoglycan as the only carbon source. A clear halo around the growth of *A. pullulans* 1WA1 (standard) is observed, as well as the presence of a halo around the filamentous fungus *T. harzianum* Rifai (test).

When the technique was used against the filamentous fungus *T. harzianum* Rifai, all the tested substrates showed positive for the production of β -glucanases. Figure 1 exemplifies the action of the fungus when the substrate succinoglycan was used. It was also observed that the diameters of the halos were larger than the diameters of microbial growth, indicating exocellular secretion of β -glucanases, which diffused through the agar medium and performed the substrate hydrolysis, as previously described by Bauermeister et al. (2015).

Immobilization of filamentous fungus in synthetic and natural sponge

It was possible to immobilize *T. harzianum* Rifai in both synthetic and natural sponges (Figure 2). However, after exposing the natural sponge (*L. cylindrica*) to the fungus from the second repetitive batch of β -1,3-glucanases production, started a process of degradation of the natural support, preventing its use. The strain of *T. harzianum* Rifai studied was isolated from *Aspidosperma* sp. (Peroba) in decomposition and selected among 85 microorganisms as the best xylanase producer in submerged cultivation in sugarcane bagasse -of sugar. Resende et al. (2002), using the same strain, demonstrated the production of xylanase and cellulase in sugarcane bagasse fermentation under solid-state conditions, with the average yield of xylanase being higher than that of cellulose. This feature is shared by other *Trichoderma* species (De Souza, et al., 2019). Thus, considering that *L. cylindrica* bushing is chemically composed of cellulose (65.2%), hemicellulose (17.5%), and lignin (15.2%) (Siqueira, Bras, & Dufresne, 2010), it is possible to suggest that the biodegradability of the plant support occurred through the action of the xylanase produced by the fungus. Consequently, the synthetic support was the only one selected for the subsequent tests of enzymatic synthesis in repetitive batches with immobilized cells.

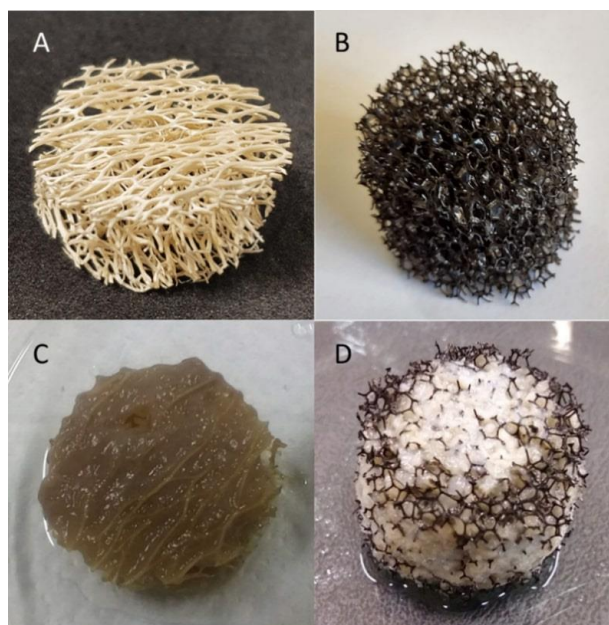


Figure 2. Three-day immobilization of *T. harzianum* Rifai fungus in natural and synthetic sponge. (A) natural sponge before immobilization; (B) synthetic sponge before immobilization; (C) natural sponge after immobilization and (D) synthetic sponge after fungal immobilization.

Synthesis of β -1,3-glucanase and determination of enzymatic activity

Different carbohydrates were evaluated for their ability to produce β -1,3-glucanases by *T. harzianum* Rifai when cultivated under the same conditions over 5 days in repetitive batches using free cells. The different substrates used and the results obtained are shown in Table 1.

Table 1. β -1,3-glucanases production (U mL/min) by *T. harzianum* Rifai in repetitive batches using free cells in a reaction medium containing 0.15% of different inducing carbon sources in Vogel's minimal medium (28°C, 180 rpm, 5 days, pH 5.5).

Inducing sources	Repetitive batches (β -1,3-glucanases U mL/min)			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
Curdlan	0.670 $\pm$ 0.174 ^{Aab}	0.036 $\pm$ 0.010 ^{Bd}	0.002 $\pm$ 0.000 ^{Bd}	0.005 $\pm$ 0.000 ^{Bb}
Succinoglycan	0.105 $\pm$ 0.013 ^{Ad}	0.073 $\pm$ 0.001 ^{Bd}	0.052 $\pm$ 0.007 ^{Cc}	0.004 $\pm$ 0.001 ^{Db}
Sucinoglycan and glucose	0.113 $\pm$ 0.027 ^{Ad}	0.111 $\pm$ 0.010 ^{Bc}	0.052 $\pm$ 0.131 ^{Cc}	0.005 $\pm$ 0.002 ^{Db}
Corn starch	0.382 $\pm$ 0.027 ^{Abc}	0.298 $\pm$ 0.001 ^{Ba}	0.288 $\pm$ 0.027 ^{Bb}	0.166 $\pm$ 0.045 ^{Ca}
Fungal biomass	0.732 $\pm$ 0.023 ^{Aa}	0.313 $\pm$ 0.024 ^{Bb}	0.300 $\pm$ 0.070 ^{Ca}	0.004 $\pm$ 0.001 ^{Db}

Lactose	0.272±0.039 ^{Ac}	0.260±0.080 ^{Ab}	0,258±0.067 ^{Ab}	0.020±0.006 ^{Bb}
---------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------

*Values represent mean ± standard deviation. U ml/min. Equal letters, uppercase in the row or lowercase in the column, do not present a statistically significant difference. Tukey Test 5%. P-value <0.0001.

The inducing substrate that showed the best production in the first production batch of β -1,3-glucanases was fungal biomass, followed by curdlan and corn starch. However, fungal biomass had a sharp drop in production in the second batch, being negative in the fourth batch. The good performance of fungal biomass as an inducing substrate was already expected since it is known in the literature that *Trichoderma* species synthesize a greater amount of extracellular β -glucanases when cultivated in a medium containing fungal cell wall (Ramada et al., 2016).

Succinoglycan is an acidic heteropolysaccharide synthesized by bacteria and consisting of β (1,3), β (1,4), and β (1,6) glucan bonds (Ruiz et al., 2015). Considering that its use in the synthesis of β -1,3-glucanases is unknown in the literature, the present research used succinoglycan as a hypothesis of an inducing carbon source, as it has a complex structure with a possible capacity to stimulate the synthesis of β -1,3-glucanases. However, succinoglycan was the substrate that showed the lowest induction in the fungal synthesis of β -1,3-glucanases. It is given its complex structure and numerous ramifications, another proposal of this research was the addition of glucose together with succinoglycan in one of the formulations, to stimulate greater initial fungal multiplication, seeking to boost a subsequent production of β -1,3-glucanase. However, there was no significant difference between treatments with or without glucose.

Corn starch managed to maintain the production of β -1,3-glucanases until the fourth batch was evaluated, showing itself to be an interesting substrate since it is currently the cheapest and most accessible in the market among those evaluated in this research. Other authors have already reported on the induction of β -1,3-glucanases using starch as the main carbon source (Marcello et al., 2010). Rao, Raju and Ravisankar (2016) when evaluating the enzymatic production of *Trichoderma* spp. isolated from the rhizosphere of tobacco, obtained a β -1,3-glucanases production of 0.112 U when subjected to 0.2% starch as the only carbon source. Lactose also showed good results, maintaining production until the third repetitive batch. Curdlan, on the other hand, showed a significant decrease from the second batch.

The enzyme production, in repetitive batches, using *T. harzianum* Rifai cells immobilized in a synthetic sponge is shown in Table 2. In the first batch, about free cells, it was possible to observe an increase in the production of β -1,3-glucanases for the inducing media fungal biomass, lactose, and succinoglycan with and without glucose, which reached an enzymatic concentration around 8.74%, 47.80%, 78.10%, and 46.90% higher, respectively.

Table 2. Production of β -1,3-glucanases (U mL/min) by *T. harzianum* Rifai in repetitive batches, using cells immobilized in synthetic sponge containing 0.15% of different inducing carbon sources in Vogel's minimal medium (28 °C, 180 rpm, 5 days, pH 5.5).

Inducing sources	Repetitive batches (β -1,3-glucanases U mL/min)			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
Curdlan	0.563±0.132 ^{Ab}	0.007±0.002 ^{Bd}	0.002±0.000 ^{Bd}	0.002±0.000 ^{Bd}
Succinoglycan	0.187±0.017 ^{Ac}	0.129±0.005 ^{Bc}	0.004±0.001 ^{Cd}	0.004±0.001 ^{Cd}
Sucinoglycan and glucose	0.166±0.002 ^{Ac}	0.124±0.011 ^{Bc}	0.006±0.001 ^{Cd}	0.005±0.001 ^{Cd}
Corn starch	0.302±0.009 ^{Ac}	0.204±0.009 ^{Bbc}	0.103±0.009 ^{Cb}	0.039±0.002 ^{Cc}
Fungal biomass	0.796±0.146 ^{Aa}	0.267±0.033 ^{Ba}	0.059±0.013 ^{Cb}	0.039±0.014 ^{Cc}
Lactose	0.402±0.010 ^{Ac}	0.233±0.075 ^{Bab}	0.185±0.007 ^{Ba}	0.091±0.005 ^{Ca}

*Values represent mean $\pm$ standard deviation. U ml/min. Equal letters, uppercase in the row or lowercase in the column, do not present a statistically significant difference. Tukey Test 5%. P-value <0.0001.

In repetitive batches, the result of β -1,3-glucanases production using the microbial immobilization process was very similar to those obtained by free cells. Fungal biomass was also the best-inducing substrate in the first batch, but it was only relevant until the second batch. For substrates such as corn starch, fungal biomass, and lactose, immobilization was interesting, as it achieved production results in at least three repetitive batches, while the other inducing sources, only the first batch showed results. Considering that, during enzyme production, cell transfer is more practical with the microorganism immobilized in a sponge, not requiring centrifugation for cell rescue, this method requires prior preparation of the support with fungal immobilized, adding steps to the process. Therefore, an economic feasibility study is necessary for the use of the immobilization proposed in this research.

The decrease in enzyme synthesis during repetitive batches in the present research may be related to the viability, cell death, and interaction of the microorganism with the

reaction medium. Yu et al. (2018) emphasize the importance of the balance between the interaction of the microorganism with the support, especially with the hydrophobic strength and pore size of the support. Therefore, a relatively loosely diffused fungal growth on the substrate is important so as not to block pores and allow the passage of nutrients.

Considering the good enzymatic production obtained using corn starch, and always aiming at the possibility of using a more cost-effective substrate, tests were carried out with free cells, comparing cassava starch and corn starch as a carbon source. A previous screening was performed with cassava starch, using the zymogram method, which was positive.

Results of β -1,3-glucanases production by free cells of *T. harzianum* Rifai using different starch sources (corn and cassava) and different concentrations, 0.15%; 0.5%; 1.0%; 3.0% and 5.0% are shown in Figure 3.

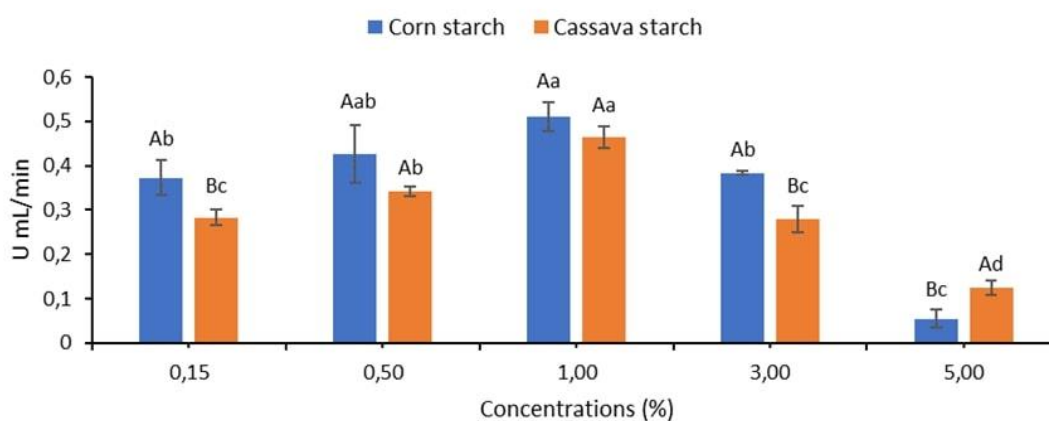


Figure 3. Synthesis of β -1,3-glucanases (free cells) by *T. harzianum* Rifai in corn starch and cassava starch at different concentrations (0.15% 1% 2% 3%) plus minimal Vogel medium (28°C/ 180 rpm/ 5 days/ pH 5.5). Equal letters do not present a statistically significant difference, with capital letters representing analysis between the two types of starch and lowercase letters representing analyzes between concentrations of the same substrate.

Corn starch showed the best result in this test and, for the two substrates studied, there was an increase in enzyme production against the increase in the concentration of up to 1.0% of the substrate, obtaining 0.51 U and 0.46 U for starch from corn and cassava starch, respectively. From 3% onwards, there was a decrease in the production of β -1,3-glucanases for the two substrates.

It is important to emphasize that even with lower production, the concentrations of 0.15% and 0.5% presented excellent benefits, compared to the production with 1% of the

substrate, since with the amount of 1% it is possible to carry out six batches of concentration of 0.15% and two batches with 0.5% of the substrate, which would result in an enzyme production much higher than that obtained with a single production with 1% of the substrate. As an example, for the use of 0.15% corn starch, the increase would be about 338% higher and for cassava starch, 265% higher.

No significant difference was observed between corn and cassava starch when using concentrations of 0.5% and 1%. Similarities in production between substrates should be considered a relevant and positive factor, considering the possibility of replacing the raw material by industry in face of price variation, due to the seasonality of agricultural crops. This becomes even more relevant when it is observed that corn starch and cassava starch have similar properties and compete as a commodity in the international market (Vilpoux, 2011).

CONCLUSION

The zymogram technique proved to be efficient for screening inducing substrates. Fungal biomass resulted in good production of β -1,3-glucanases, however, its acquisition is restricted. Starch sources showed promise for enzyme production by *T. harzianum*, being easy to acquire industrially and at a low cost. Succinoglycan can be used as an inducing substrate in the production of fungal β -1,3-glucanases. The use of free and immobilized cells allowed the microorganism to be reused, allowing its use in repetitive batches.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful for the financial support of CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), CNPq (National Council for Science and Technological Development) and the Araucária Foundation.

REFERENCES

Bakhtiyari, M., Moosavi-Nasab, M, & Askari, H (2015). Optimization of succinoglycan hydrocolloid production by *Agrobacterium radiobacter* grown in sugar beet molasses and investigation of its physicochemical characteristics. **Food Hydrocolloids**, 45, 18-29.

Barsanti, L, Vismara, R, Passarelli, V, & Gualtieri, P (2001). Paramylon (β -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. **Journal of applied phycology**, 13 (1), 59-65.

Bauermeister, A, Amador, IR, Pretti, CP, Giese, EC, & Oliveira, ALM (2015). β -(1 $\rightarrow$ 3) Glucanolytic yeasts from Brazilian grape microbiota: production and characterization of β -Glucanolytic enzymes by *Aureobasidium pullulans* 1WA1 cultivated on fungal mycelium. **Journal of agricultural and food chemistry**, 63 (1), 269-278.

Bauermeister, A, Rezende, MI, Giese, EC, Dekker, RFH, & Barbosa, AM (2010). β -1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, 31(2), 75-86.

Da Silva, AL, & Castañeda-Ayarza, JA (2021). Macro-environment analysis of the corn ethanol fuel development in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 135, 110387.

De Souza, MP, Hoeltz, M, Muller, MVG, Gressler, PD, Bjerk, TR, de Souza Schneider, RDC, & Corbellini, VA (2019). Screening of fungal strains with potentiality to hydrolyze microalgal biomass by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). **Acta Scientiarum. Technology**, 41, e39693-e39693.

Di-Francesco, A, Ugolini, L, Lazzeri, L, & Maria, M (2015). Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. **Biological Control**, 81, 8-14.

EL-Katatny, MH, Somitsch, W, Robra, K-H, El-Katatny, MS, & Gübitz, GM (2000). Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the

phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. **Food Technology and Biotechnology**, 38 (3), 173-180.

Gerhardson, B (2002). Biological substitutes for pesticides. **Trends in biotechnology**, 20 (8), 338-343.

Giese, EC, Covizzi, LG, Borsato, D, Dekker, RFH, Da Silva, MD, & Barbosa, AM (2005). Botryosphaeran, a new substrate for the production of β -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. **Process biochemistry**, 40 (12), 3783-3788.

Giese, EC, Dekker, RFH, Scarminio, IS, Barbosa, AM, & Da Silva, R (2011). Comparison of β -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical mixture-design. **Biochemical Engineering Journal**, 53 (2), 239-243.

González-Pombo, P, Fariña, L, Carrau, F, & Batista-Viera, F (2011). A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. **Process Biochemistry**, 46 (1), 385-389.

Haapala, R, Linko, S, Parkkinen, E, & Suominen, P (1994). Production of endo-1,4- β -glucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane foam. **Biotechnology techniques**, 8 (6), 401-406.

Hideno, A, Ogbonna, JC, Aoyagi, H, & Tanaka, H (2007). Acetylation of loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as immobilization carrier for bioprocesses involving cellulase. **Journal of bioscience and bioengineering**, 103 (4), 311-317.

Howell, CR (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant disease**, 87 (1), 4-10.

Lopes, MR, Klein, MN, Ferraz, LP, Silva, AC, & Kupper, KC (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: a novel and efficient biological control agent for *Colletotrichum acutatum* during pre-harvest. **Microbiological research**, 175, 93-99.

Marcello, CM, Steindorff, AS, Silva, SP, Silva, RN, Bataus, L, & Ulhoa, CJ (2010). Expression analysis of the exo- β -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. **Microbiological Research**, 165 (1), 75-81.

Masih, EI, & Paul, B, (2002). Secretion of β -1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* Causing grey mold disease of the grapevine. **Current microbiology**, 44 (6), 391-395.

Menezes, JP, Lupatini, M, Antonioli, ZI, Blume, E, Junges, E, & Manzoni, CG (2010). Variabilidade genética na região its do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, 132-139.

Musoni, M, Destain, J, Thonart, P, Bahama, J-B, & Delvigne F (2015). Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ**, 19 (4), 430-442.

Nelson, N (1994). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of biological chemistry**, 153 (2), 375-380.

Pazzetto, R, Delina, TCO, Fenelon, VC, & Matioli, G (2011). Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 cells immobilized on loofa sponge. **Process biochemistry**, 46 (1), 46-51.

Pitson, SM, Seviour, RJ, & Mcdougall, BM (1993). Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. **Enzyme and microbial technology**, 15 (3), 178-192.

Ramada, MHS, Steindorff, AS, Jr Bloch, C, & Ulhoa, CJ (2016). Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. **Proteomics**, 16 (3), 477-490.

Rao, KLN, Raju, KS, & Ravisankar, H (2016). Cultural conditions on the production of extracellular enzymes by *Trichoderma* isolates from tobacco rhizosphere. **Brazilian journal of microbiology**, 47, 25-32.

Rezende, MI, Barbosa, AM, Vasconcelos, AFD, & Endo, AS (2002). Xylanase production by *Trichoderma harzianum* Rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Microbiology**, 33, 67-72.

Ruiz, SP, Martinez, CO, Noce, AS, Sampaio, AR, Baesso, ML, & Matioli, G (2015). Biosynthesis of succinoglycan by *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological characterization of biopolymer. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 122, 15-28.

Santos, VAQ, & Cruz, CHG. (2016). Ethanol and Levan production by sequential bath using *Zymomonas mobilis* immobilized on alginate and chitosan beads. **Acta Scientiarum. Technology**, 38(3), 263-271.

Sharma, K, Mishra, AK, & Misra, RS (2009). Morphological, biochemical and molecular characterization of *Trichoderma harzianum* isolates for their efficacy as biocontrol agents. **Journal of Phytopathology**, 157 (1), 51-56.

Siqueira, G, Bras, J, & Dufresne, A (2010). *Luffa cylindrica* as a lignocellulosic source of fiber, microfibrillated cellulose and cellulose nanocrystals. **BioResources**, 5 (2), 727-740.

Stubbs, HJ, Brasch, DJ, Emerson, GW, & Sullivan, PA (1999). Hydrolase and transferase activities of the β -1,3-exoglucanase of *Candida albicans*. **European journal of biochemistry**, 263 (3), 889-895.

Syed, S, Riyaz-Ul-Hassan, S, & Johri, S (2013). A novel cellulase from an endophyte, *Penicillium* sp. NFCCI 2862. **American Journal of Microbiological Research**, 1 (4), 84-91.

Usoltseva, RV, Belik, AA, Kusaykin, M, Malyarenko, OS, Zvyagintseva, TN, & Ermakova, S, (2020). Laminarans and 1, 3- β -D-glucanases. **International Journal of Biological Macromolecules**, 163, 1010-1025.

Vázquez-Garcidueñas, S, Leal-Morales, CA, & Herrera-Estrella, A (1998). Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and environmental microbiology**, 64 (4), 1442-1446.

Vero, S, Garmendia, G, González, MB, Garat MF, & Wisniewski, M (2009). *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. **Biocontrol Science and Technology**, 19 (10), 1033-1049.

Vilpoux, O (2011). Desempenho dos arranjos institucionais e minimização dos custos de transação: transações entre produtores e feculárias de mandioca. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, 49, 271-294.

Vogel, HJ (1956). A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial genetics bulletin**. 13, 42-43.

Yu, B, Zhang, X, Sun, W, Xi, X, Zhao, N, Huang, Z, Ying, Z, Liu, L, Liu, D, Niu, H, Wu, J, Zhuang, W, Zhu, C, Chen, Y, & Ying, H (2018). Continuous citric acid production in repeated-fed batch fermentation by *Aspergillus niger* immobilized on a new porous foam. **Journal of biotechnology**, 276, 1-9.

Zhang, D, Spadaro, D, Garibaldi, A, & Gullino, ML (2010). Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. **Biological Control**, 54 (3), 172-180.