



Quitosanases de *Trichoderma virens*: Produção, caracterização e aplicação na obtenção de quito-oligossacarídeos

Esdras G. R. Sales¹(G)*, Lilian C. Zin¹(PG), Luiz G. L. Guimarães¹(PQ), Maíra N. de Almeida¹(PQ)

¹Departamento de Ciências Naturais-DCNAT, UFSJ, Praça Dom Helvécio, 74, Bairro Dom Bosco, São João del Rei, CEP 36301-160
esdrassalesmg@gmail.com

RESUMO

O uso de enzimas quitosanases para produção de quito-oligossacarídeos a partir da quitosana, reduz o desgaste ambiental causado pelas hidrólises ácida e alcalina deste biopolímero, além de proporcionar maior especificidade do material produzido. Os quito-oligossacarídeos, derivados da hidrólise da quitina e quitosana, podem possuir propriedades antioxidantes e antibacterianas, o que os torna materiais de grande interesse e com uma variada gama de aplicações. O presente estudo visou a produção de quito-oligossacarídeos utilizando as enzimas quitosanases secretadas pelo fungo *Trichoderma virens* e devidamente caracterizadas quanto às suas condições ótimas de aplicação. O tempo de melhor produção enzimática foi o de 144 horas com atividade de 0,043 U/mL. O pH ótimo encontrado da quitosanase foi pH 3, enquanto a temperatura ótima foi de 60 °C. A enzima apresentou boa estabilidade térmica, alcançando 63,1 horas como tempo de meia vida, quando pré-incubada a 40 °C. Para a hidrólise enzimática de quitosana, o tempo de maior produção de açúcares redutores foi de 24 horas, com 482,63 micromols de açúcar produzidos. Por fim, a análise de viscosidade apresentou uma redução de massa molar viscosimétrica de 121,7 Kd da quitosana comercial para 6,1 Kd após sua hidrólise enzimática.

Palavras-chave: Quitosana, Hidrólise enzimática, quito-oligossacarídeos

Introdução

A quitina é o segundo polímero natural mais abundante e é formado por unidades de N-acetil-D-glicosamina. Sua desacetilação gera a quitosana, um polímero formado de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina. Estes polímeros são encontrados em exoesqueletos de crustáceos e insetos, parede celular de fungos, entre outros (1). O grau de desacetilação da quitosana influencia diretamente nas suas propriedades e pode ser determinado pelo número de D-glicosaminas presentes na cadeia polimérica (2). Por ser biocompatível e apresentar potencial antioxidante e antibacteriano, diversos estudos vêm sendo realizados para aplicá-la na indústria alimentícia, farmacêutica e biomédica (3,4). Fungos como o *Fusarium oxysporum*, têm sido relatados na literatura como produtores de quitosanases, enquanto o *Trichoderma virens* foi identificado como produtor de quitinases (5,6).

Experimental

Produção enzimática

A produção foi realizada por fermentação submersa. Para preparo do meio mineral foram pesados 7 g de KH_2PO_4 , 2,0 g de K_2HPO_4 , 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e dissolvidos em 1 L de água destilada. 50 ml dessa solução foi adicionada a

Erlenmeyers contendo 0,5 g de fonte de carbono, sendo sacarose para crescimento do micélio e 0,25 g de quitina coloidal e 0,25 g de farelo de trigo para produção enzimática. O micélio foi crescido utilizando os esporos do fungo *Trichoderma virens* e os sobrenadantes foram recolhidos nos tempos de 2 a 15 dias e testado para atividade de quitosanase.

Atividade de quitosanase

A atividade enzimática de quitosanase foi avaliada incubando 200 μL de extrato enzimático, 50 μL de tampão acetato de sódio (300 mmol/L, pH 5,0) e 250 μL de quitosana 0,5 % (p/v) com grau de desacetilação >90, por 60 min em banho maria a 40 °C. Após este intervalo foi adicionado 0,5 mL do reagente ácido dinitrossalicílico (DNS) para quantificação dos açúcares redutores, incubando a reação em banho fervente por 5 min. A absorbância foi medida em 540 nm e convertida em unidades de enzima utilizando curva padrão. Uma unidade de enzima (U) foi considerada a quantidade de micromoles de açúcar redutor liberado por minuto de reação.

Caracterização enzimática

Para determinação dos parâmetros ótimos de uso da enzima, a atividade foi testada na faixa de pH de 2 a 8 para determinação do pH ótimo. Já para a temperatura ótima, a atividade



enzimática foi testada na faixa de temperatura de 20 a 90 °C, no pH ótimo determinado.

Para a determinação da termoestabilidade e tempo de meia vida da enzima, o extrato foi pré-incubado a 40 °C e a atividade enzimática foi testada até que seu percentual fosse inferior a 50%

Hidrólise da quitosana

Para a hidrólise enzimática, foram adicionados em um erlenmeyer, 5 U de enzima por grama de quitosana em meio tamponado com tampão McIlvaine pH 3. As triplicatas foram incubadas em shaker a 40 °C e 150 rpm, e alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 4, 12, 24, 48 e 72 h, para quantificação de açúcares redutores. Foi determinado o grau de desacetilação da quitosana por titulação potenciométrica e a viscosidade foi medida com auxílio de um viscosímetro.

Resultados e Discussão

Produção enzimática

A produção enzimática de quitosanase utilizando esporos do *T. virens* apresentou baixa atividade (0,017 U/mL) em seu ponto máximo e longo período de produção (216 hrs). Já a produção enzimática com micélio, se mostrou mais eficiente, alcançando atividade 2,5 vezes maior (0,043 U/mL) em um tempo menor (144 hrs), como mostra a figura 1.

Figura 1. Produção enzimática de quitosanase

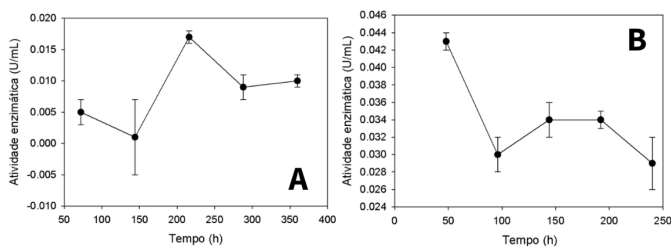


Figura 2. A- Produção enzimática com esporos; B-Produção enzimática de quitosanase com micélio.

Caracterização enzimática e hidrólise da quitosana

A enzima apresentou alta atividade em pHs ácidos, possuindo maior atividade em pH 3. Sua temperatura ótima no pH de maior atividade foi de 60 °C, como mostrado na figura 3.

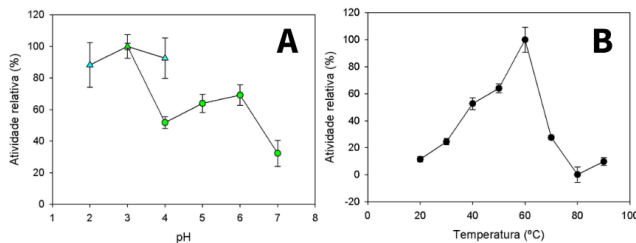


Figura 3. A- pH ótimo para atividade de quitosanase (▲ Britton Robinson, ■ McIlvaine); B- Temperatura ótima para atividade de quitosanase

A quitosanase apresentou tempo de meia vida de 63,1 horas (figura 4) e foi possível determinar o tempo de hidrólise com maior produção de açúcar redutor, sendo o tempo de 24 horas (figura 5)

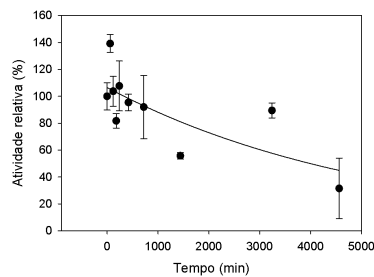


Figura 4. Termoestabilidade da quitosanase incubada a 40°C

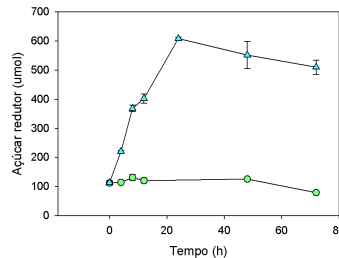


Figura 5. Hidrólise enzimática da quitosana a 40°C e 150 rpm

A tabela a seguir apresenta o grau de desacetilação obtido para a quitosana antes e depois da hidrólise, o que indica a ausência de uma quitosana desacetilase.

Tabela 1. Grau de desacetilação da quitosana comercial

Pré-hidrólise enzimática	88,28 %
Pós hidrólise enzimática	88,28 %

A massa molar viscosimétrica encontrada foi de 121,7 Kd para a quitosana comercial e 6,1 Kd após a hidrólise enzimática.

Conclusões

Neste estudo, foi possível encontrar e caracterizar bioquimicamente, quitosanases do fungo *Trichoderma virens* e determinar seus parâmetros ótimos de utilização. Também foi realizada hidrólise enzimática da quitosana, com redução expressiva de sua massa molar viscosimétrica.

Referências

- DUTTA, Joydeep et al. A facile approach for the determination of degree of deacetylation of chitosan using acid-base titration. *Heliyon*, v. 8, n. 7, 2022.
- Rani, K., Malik, A. K., Setia, A., Randhave, N. V., Verma, N., Kumar, V., ... & Muthu, M. S. (2025). Chitosan and its derivatives as nanotheranostics in multiple diseases management: a clinical perspective. *Carbohydrate Polymers*, 123852.
- El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Alkafaas, S. S., Dladla, M., Ghosh, S., Elkafas, S. S., ... & El-Tarabily, K. A. (2025). Chitosan, derivatives, and its nanoparticles: Preparation, physicochemical properties, biological activities, and biomedical applications—A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 142832.
- Mawale, K. S., Giridhar, P., & Johnson, T. S. (2025). Chitosan: A versatile polymer for enhancing plant bioactive accumulation, managing plant diseases, and advancing food preservation technologies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 142081.
- BUBWINKEL, Franziska et al. Endochitinase 1 (Tv-ECH1) from *Trichoderma virens* has high subsite specificities for acetylated units when acting on chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 114, p. 453-461, 2018.
- ABEDIN, Rania MA; ABD ELWALY, Doha RM; ABD EL-SALAM, Ayat E. Production, statistical evaluation and characterization of chitinase from *Fusarium oxysporum* D18. *Annals of Microbiology*, v. 73, n. 1, p. 27, 2023.

