

Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na produção de EPS pelo fungo *Diaporthe phaseolorum var. caulivora*

The influence of different nitrogen sources in the growth and production of Diaporthe phaseolorum var. caulivora fungi's eps

Autores | Authors

✉ **Lorena Bittencourt GUIMARÃES**

Universidade Estadual Paulista "Júlio DE
Mesquita Filho" (UNESP)
Rua Julia Marta Guimarães, 360,
Veredas da cidade
CEP: 38183-970
Araxá/MG - Brasil
e-mail: lo_bitt@hotmail.com

Victor Zanardi Rodrigues SANTOS
Luiz Gustavo COVIZZI
Crispin Humberto GARCIA-CRUZ

Universidade Estadual Paulista "Júlio DE
Mesquita Filho" (UNESP)
e-mail: vzrs_mogirp@yahoo.com.br
lgcovizzi@gmail.com
crispin@ibilce.unesp.br

Resumo

Polissacarídeos são moléculas versáteis, sendo amplamente empregadas nas áreas alimentícia, farmacêutica e química, entre outras. Durante a produção de polissacarídeos estas moléculas podem ser secretadas para o meio de cultivo, sendo chamadas de exopolissacarídeos (EPS). Dentre os produtores microbianos de polissacarídeos destacam-se os fungos por apresentarem uma ampla faixa de crescimento em diversos pHs, fontes de carbono e nitrogênio. O fungo *D. phaseolorum var. caulivora* (*Dpc*) é responsável pelo cancro na haste da soja causando perdas comerciais em cultivares de soja. Aparentemente a fitopatogenicidade deste fungo está envolvida com a produção de EPS, e embora já tenha sido objeto de intensas pesquisas ainda se sabe pouco sobre os parâmetros de produção destes. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de EPS pelo fungo *Dpc* em diferentes fontes de nitrogênio (caldo de batata, caldo nutriente, extrato de levedura, peptona, aveia, Meio mínimo de sais de Vogel e de Sabouraud). Para isto, o *Dpc* foi crescido em meio de BDA e no pré-inóculo a fonte de carbono utilizada foi glicose juntamente com as referidas fontes de nitrogênio. A fermentação se processou por 144 h, após este período realizaram-se determinações de pH, biomassa e produção de EPS. O fungo *Dpc* foi capaz de crescer em todas as fontes de nitrogênio avaliadas, sendo o maior nível de biomassa para o meio mínimo de sais de Vogel (6,0 g.L⁻¹). Para a produção de EPS, os maiores títulos foram de 2,2 e 1,5 g.L⁻¹, quando o microrganismo foi crescido em meio de Vogel e Extrato de levedura, respectivamente. Os resultados mostraram que o meio de Vogel foi tão eficiente para o crescimento da biomassa deste fungo quanto para sua produção de EPS.

Palavras-chave: Fungo; *Diaporthe*; Cancro da haste da soja; Exopolissacarídeos (EPS); Biomassa.

■ Summary

Polysaccharides are versatile molecules, being largely employed in the food, pharmaceutical and chemical areas, among others. During the polysaccharides production by microorganisms, these molecules can be secreted to the culture medium, being called exo-polysaccharides (EPS). Among the microorganisms producers of polysaccharides, the fungi are highlighted for presenting a wide growth range in diverse pHs, carbon and nitrogen sources. The fungus *D. phaseolorum var. caulivora* (*Dpc*) is responsible for the soybean stem canker causing commercial losses in soybean cultivars. Apparently his phytopatogenicity is related to the production of EPS, and though it has already been the object of intense research, little is still known of the parameters of its EPS production. The aim of this work was to study the EPS production by the fungus *Dpc* in different nitrogen sources (potato broth, nutrient broth, yeast extract, peptone, oats, Vogel medium and Sabouraud medium). For this, *Dpc* was grown in BDA medium and, in the seed culture medium, the utilized carbon source was glucose together with the mentioned nitrogen sources. The fermentation was carried out for 144 h. pH, biomass, and EPS measurements were performed after this period. The *Dpc* fungus was able to grow in all tested nitrogen sources, and presented the greatest level of biomass in the Vogel source (6.0 g.L⁻¹). For the EPS production, the maximum levels were 2.2 and 1.5 g.L⁻¹, when the microorganism was grown in Vogel medium and yeast extract, respectively. These results shown that Vogel was as efficient to the growth of this fungus biomass as to EPS production.

Key words: *Fungus; Diaporthe; Soybean stem canker; Exopolysaccharides (EPS); Biomass.*

Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na produção de EPS pelo fungo *Diaporthe phaseolorum var. caulivora*

GUIMARÃES, L. B. et al.

1 Introdução

Polissacarídeos, estruturas naturais compostas por unidades monossacarídicas, são encontrados em todos os organismos vivos. Diferem-se quanto ao monômero constituinte, tamanho da cadeia, ligações glicosídicas (α , β), grau de ramificação, conformação estereoquímica, presença de grupamentos carboxílicos, entre outras funções orgânicas. Embora estejam presentes em todos os seres vivos, a maior diversidade encontra-se no reino microbiano. Os polissacarídeos microbianos podem apresentar propriedades similares ou superiores aos produtores tradicionais, que são obtidos de vegetais e algas marinhas. As variedades nas estruturas e nas configurações existentes conferem aos biopolímeros microbianos características químicas e físicas valiosas em produtos alimentícios, farmacêuticos, médicos, clínicos, ambientais, entre outros. A classificação destas "biomoléculas" pode ser subdividida em polissacarídeos intracelulares, ligados à parede e extracelulares.

Os polissacarídeos Intracelulares estão associados à reserva energética no interior das células, servindo como forma de armazenamento de monossacarídeos empregados como combustível pelas células do organismo. O amido e o glicogênio são polissacarídeos deste tipo. Os carboidratos ligados à parede possuem caráter fibroso, alta resistência e baixa solubilidade em água, que são características associadas a funções como: estrutura celular, principalmente, estabilização de proteínas ligadas às células e proteção devido à dificuldade de degradação. A celulose e a quitina são exemplos desta classe de polissacarídeos. Além de sua função estrutural, estes polímeros favorecem a adesão e coesão entre as células e entre uma superfície sólida, na criação de biofilmes, como no caso da cárie.

Os carboidratos secretados para o meio extracelular recebem o nome de exopolissacarídeo (EPS). Uma rede destes forma um material gelificado que mantém unidas as células de um tecido e fornece uma via porosa para difusão dos nutrientes e oxigênio para as células individuais. Os EPS possuem uma alta densidade de cargas elétricas negativas e para minimizar as forças repulsivas, assumem uma conformação estendida quando em solução. Isto lhes dá a característica de alta viscosidade. (LEHNINGER et al., 1995). Portanto podem atuar como reserva energética externa, formação de biofilmes, proteção contra variações bruscas de pH e retenção de água (KANG e COTTRELL, 1979). O fato de serem secretados para o meio extracelular confere aos EPS grandes vantagens sob os demais polissacarídeos microbianos, uma vez que estes não necessitam de processos complexos para extração e ao mesmo tempo são livres de contaminantes celulares.

Atualmente no ramo industrial, os maiores produtores de EPS são as bactérias, como no caso das

bactérias *Xanthomonas campestris*, *Sphingomonas elodea* e *Agrobacterium radiobacter var. myxogenes* produtoras das gomas: xantana, gelana e curdlana, respectivamente (CUNHA et al., 2003). Porém, os fungos têm ganhado espaço no mercado de EPS por apresentarem propriedades reológicas valiosas para emprego industrial. Entre os polissacarídeos fúngicos com aplicação comercial podem ser citados a escleroglucana produzido pelo fungo *Sclerotium glucanicum* e a pululana pelo fungo *Aureobasidium pullulans*. Seu emprego industrial está no revestimento de alimentos retendo sabor e aparência, preparação de filmes e fibras, coberturas sem odor e sabor (GLAZER e NIKAIDO, 1995; BARBOSA et al., 2004). Além das características físicas e reológicas, são atribuídas a estes EPS propriedades antitumorais e imunomoduladoras relacionadas à organização da estrutura em tripla hélice e também com a complexidade da ramificação lateral e seu peso molecular (SCHMID e STONE, 2006). Além das características únicas dos EPS fúngicos, esta classe microbiana também se destaca por apresentar maior resistência a mutações, baixos requisitos nutricionais e crescimento em maior diversidade de fontes de nitrogênio, carbono e pH. (MAZIERO et al., 1999; HWANG et al., 2003)

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, multi ou unicelulares e podem ser classificados como leveduras, filamentosos ou dimórficos. A obtenção de alimento pelos fungos filamentosos efetua-se por absorção através das paredes ao longo das hifas. As hifas são células composta predominantemente por carboidratos que auxiliam na captação e acúmulo de nutrientes. Fungos patogênicos geralmente têm hifas especializadas (haustório), utilizadas na extração de fontes de carbono do organismo infectado (DOMINGUES, 2007). A espécie e a quantidade de carbono extraído pelas hifas influenciam diretamente na quantidade de EPS produzido, assim como o maquinário enzimático que o fungo utilizará no processo de toxicidade (KANG e COTTRELL, 1979). Cabe, portanto, ressaltar que o processo de patogenicidade pode estar intimamente ligado à capacidade do fungo de produzir polissacarídeos.

O fungo *Diaporthe phaseolorum f. sp. caulivora* (*Dpc*) é associado à formação do cancro da haste na soja, provocando a necrose nas folhas e o avermelhamento nas hastes da planta. Sua proliferação ocorre principalmente na fase de semente do vegetal. Este tipo de infecção causa a morte da planta entre a floração e o enchimento das vagens. No Brasil, esta é uma praga que está presente em todas as regiões produtoras de soja e chega a causar perdas de 80 a 100% da lavoura contaminada (AGUSTA et al., 2006). Aparentemente existe uma correlação entre o processo de toxicidade e o EPS produzido pelo *D. phaseolorum*. Porém ainda pouco se sabe sobre o polissacarídeo produzido por este fungo.

Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na produção de EPS pelo fungo *Diaporthe phaseolorum var. caulivora*

GUIMARÃES, L. B. et al.

A produção de metabólitos fúngicos exige um conhecimento detalhado da fisiologia microbiana e do comportamento celular durante a fase fermentativa. Parâmetros como temperatura, agitação, pH, O₂ dissolvido, vitaminas, fontes de carbono e de nitrogênio podem ser determinantes no controle do processo. A fermentação para a produção de polímeros microbianos pode ser potencializada pelo controle de fontes de carbono e nitrogênio, viabilizando o processo de produção industrial (HE et al., 2004).

Vista a importância dos EPS microbianos no desenvolvimento de novas tecnologias, assim como a melhoria e o barateamento de produtos e processos já existentes, propõe-se a avaliação de diferentes fontes de nitrogênio (caldo de batata, caldo nutriente, extrato de levedura, peptona, aveia, meio mínimo de sais de Vogel e de Sabouraud) no crescimento e na sua produção de EPS pelo fungo *Dpc*.

2 Material e métodos

2.1 Microrganismos

O microrganismo utilizado no presente projeto foi o fungo Ascomiceto *Dpc*, isolado de caule (ou folha) da soja, cedido pela Empresa Brasileira Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA-Londrina). O fungo foi mantido em meio sólido de BDA (Batada-glucose-agar) a 4 °C.

2.2 Fontes de nitrogênio

A fonte de carbono foi fixada em 1% de glicose e foram avaliadas as diferentes fontes de nitrogênio (Caldo de batata, caldo nutriente, extrato de levedura, peptona, caldo de aveia, meio mínimo de sais Vogel e meio mínimo de sais de Sabouraud) nas concentrações que seguem na Tabela 1.

2.3 Pré-Inóculo

O *Dpc* foi mantido por 8 dias a 28 ± 2 °C em placas de Petri contendo BDA. Após este tempo de desenvolvimento, foram transferidas pequenas porções das hifas do fungo da superfície das placas para frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo glicose 1% (p/v) e as diferentes fontes de nitrogênio. A fermentação foi

Tabela 1. Fontes de nitrogênio avaliadas e suas respectivas quantidades.

Caldo de batata	3 (g.L ⁻¹)
Caldo nutriente	1 (g.L ⁻¹)
Extrato de levedura	1 (g.L ⁻¹)
Peptona	1 (g.L ⁻¹)
Caldo de aveia	3 (g.L ⁻¹)
Meio de Vogel	2% (v/v)
Meio de Sabouraud	2% (v/v)

mantida sob agitação constante durante 144 h a 28 ± 2 °C e 150 rpm em Shaker rotatório orbital (Marconi).

2.4 Preparo dos meios de cultivo

Nos frascos de cultivo foram colocadas as fontes de nitrogênio nas concentrações descritas e completadas para 45 mL de solução. Separadamente preparou-se uma solução de glicose 10% para depois de autoclavada (Autoclave Vertical Phoenix) serem acrescentados 5 mL em cada frasco já contendo as fontes de nitrogênio. Os cultivos foram desenvolvidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, guardando a proporção ar:meio (5:1), e mantidos sob agitação constante de 150 rpm, durante 144 h a 28 ± 2 °C.

2.5 Interrupção dos cultivos

Os cultivos foram interrompidos por centrifugação (Centrífuga Jouan GR2022) refrigerada a 4 °C por 15 min a 8000 rpm. Os sobrenadantes foram filtrados e coletados para as determinações analíticas.

2.6 Determinação da biomassa microbiana

A biomassa foi determinada por gravimetria após secagem em estufa a 70 °C até peso constante.

2.7 Determinação do exopolissacarídeo

Os sobrenadantes dos cultivos foram tratados com três volumes de etanol anidro gelado (4 °C) e deixados por 24 h nessa temperatura. O exopolissacarídeo precipitado foi filtrado a vácuo em funil de Büchner e papel de filtro previamente seco em estufa e pré-tarado e foi determinado por gravimetria após secagem em estufa a 70 °C até peso constante.

3 Resultados e discussão

Depois da interrupção dos cultivos, a centrifugação foi realizada e a biomassa separada do sobrenadante. O sobrenadante foi utilizado para determinação de EPS e medição de pH.

3.1 Determinação da biomassa microbiana

Observou-se que o fungo *Dpc* foi capaz de crescer em todas as fontes de nitrogênio avaliadas. A Tabela 2 mostra os valores encontrados para a biomassa com todas as fontes de nitrogênio testadas.

Através da quantidade de biomassa medida, percebe-se um bom desenvolvimento do fungo *Dpc* nos meios de Aveia, Vogel e Sabouraud e um médio crescimento nas outras fontes de nitrogênio.

O meio de aveia é um meio altamente nutritivo, com alto valor proteico e alta porcentagem de lipídeos.

Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na produção de EPS pelo fungo *Diaporthe phaseolorum var. caulivora*

GUIMARÃES, L. B. et al.

Tabela 2. Avaliação da biomassa.

Fonte de nitrogênio	Biomassa (g.L ⁻¹)
Caldo de batata	3,70
Caldo nutriente	3,50
Extrato de levedura	2,80
Peptona	3,45
Aveia	5,25
Vogel	6,00
Sabouraud	4,43

Entre os carboidratos constituintes, o amido é o mais abundante na aveia. Porém, se comparado a outros cereais como centeio, cevada e trigo, o amido da aveia pode ser considerado baixo, devido à elevada concentração de proteínas, lipídios e fibras. A fibra alimentar solúvel da aveia é composta por pectinas, beta-glicanas, mucilagens, algumas hemiceluloses e amido resistente. (SÁ et al., 2000)

O meio de Sabouraud é composto por peptona e glucose. Já o meio de Vogel é constituído por vários sais, sendo o NH₄NO₃ a fonte de nitrogênio deste meio.

Com isso, pode-se concluir que o fungo *Dpc* tem melhor crescimento quando absorve fontes de nitrogênio simples, como no meio de Vogel. O bom desenvolvimento da biomassa nos meios de Aveia e Sabouraud são devido ao maior teor de glucose e de outras fontes nutritivas que estes meios proporcionam ao microrganismo e não as suas fontes de nitrogênio.

3.2 Determinação do exopolissacarídeo

Para a determinação de EPS, o volume do frasco foi medido antes de precipitá-lo. Depois foi feita a conversão para g.L⁻¹. Foram observados os valores de EPS descritos na Tabela 3.

Analisando-se a Tabela 3, nota-se uma boa produção de EPS nos meios contendo extrato de levedura e Vogel. Nos outros meios, a produção não foi tão significativa.

Além de apresentar elevado teor em proteína (30 a 70%), os produtos de levedura são ricos em vitaminas do complexo B (B₁, B₂, B₆, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina), em minerais, em macro e microelementos, particularmente selênio e fibra dietética, representados por carboidratos da parede celular, principalmente mananas e glucanas (HALASZ e LÁSZTITY, 1991). Esta composição, essencialmente os carboidratos, auxiliou na produção de EPS, já que estes são uma cadeia polimérica de monossacarídeos. Porém, isto não contribuiu para o crescimento da biomassa fúngica.

Contudo, o fungo *Dpc* teve ótimo crescimento e produção de EPS quando crescido em meio de Vogel. Isto se deve à boa absorção de fontes nutritivas simples

Tabela 3. Avaliação do EPS.

Fonte de nitrogênio	Quantidade de EPS (g.L ⁻¹)
Caldo de batata	0,851
Caldo nutriente	0,759
Extrato de levedura	1,503
Peptona	0,765
Aveia	0,953
Vogel	2,213
Sabouraud	0,986

Tabela 4. Valores de pH.

Fonte de nitrogênio	pH inicial	pH final
Caldo de batata	5,5	4,3 ± 0,5
Caldo nutriente	6,8	5,2 ± 0,1
Extrato de levedura	6,5	5,5 ± 0,4
Peptona	6,5	6,0 ± 0,5
Aveia	4,5	4,02 ± 0,3
Vogel	5,8	4,8 ± 0,6
Sabouraud	6,5	4,6 ± 0,4

por este fungo e sua grande capacidade de polimerizá-las.

3.3 Determinação do pH

Os valores de pH encontrados são mostrados na Tabela 4.

Pode-se observar um decaimento no pH em todos os meios de cultivo. Isto ocorre devido à produção de algumas moléculas ácidas pelo fungo *Dpc* quando cultivado na presença destes meios, ou até mesmo pela produção de EPS, que podem ser constituídos por vários derivados do ácido urônico, sendo o ácido D-glicurônico o mais comum (LEHNINGER et al., 1995).

4 Conclusões

Os resultados mostraram que o fungo *Dpc* tem bom crescimento nas fontes de Aveia, Vogel e Sabouraud. Porém, a melhor produção de EPS foi obtida nos meios: Extrato de Levedura e Vogel. Contudo, o maior crescimento e a maior produção de EPS foram no meio mínimo de Vogel.

Agradecimentos

Ao professor de inglês Marcelo Batistella pela tradução do manuscrito e à FAPESP pela Bolsa de Iniciação Científica.

Referências

AGUSTA, A.; OHASHI, K.; SHIBUYA, H. Bisanthraquinone metabolites produced by the endophytic fungus *Diaporthe*

Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na produção de EPS pelo fungo *Diaporthe phaseolorum var. caulivora*

GUIMARÃES, L. B. et al.

- sp. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 54, n. 4, p. 579-582, 2006.
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 12, 2004.
- CUNHA, M. A. A. D.; GÓMEZ, R. J. H. C.; AMORIM, E. S. Goma curdlana: um importante hidrocolóide microbiano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 5, 2003.
- DOMINGUES, D. P. **Fungos**. Disponível em: <<http://br.geocities.com/danielpdomingues/introd.htm>>. Acesso em: 20 de Dezembro de 2007.
- GLAZER, A.; NIKAIIDO, H. **Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. New York: W.H. Freeman, 1995. 50 p.
- HALASZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 312 p.
- HE, N.; LI, Y.; CHEN, J. Production of a novel polygalacturonic acid bioflocculant REA-11 by *Corynebacterium glutamicum*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 94, n. 1, p. 99-105, 2004.
- HWANG, H. J.; KIM, S. W.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 33, n. 2-3, p. 309-319, 2003.
- KANG, K. S.; COTTRELL, I. W. **Polysaccharides in microbial technology**. New York: Academic Press, 1979.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON D. L. **Princípios de Bioquímica**. New York: Sarvier, 1995.
- MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 7, 1999.
- SÁ, R. M.; De FRANCISCO, A.; OGLIARI, P. J.; BERTOLDI, F. C. Variação no conteúdo de beta-glucanas em cultivares brasileiros de aveia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 99-102, 2000.
- SCHMID, F.; STONE, B. A. Structure and assembly of epiglucan, the extracellular (1-->3;1-->6)-[beta]-glucan produced by the fungus *Epicoccum nigrum* strain F19. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 3, p. 365-373, 2006.