

Eixo Temático ET-09-005 - Biologia Aplicada

FUNGOS FILAMENTOSOS ENTOMOPATOGÊNICOS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS EXTRACELULARES

Caroline Targino Alves da Silva, Cibele Queiroz, Bianca Teixeira Morais de Oliveira,
Hércules Gonçalves de Almeida Medeiros, Geisi Maria Henrique da Silva,
Adna Cristina Barbosa de Sousa

Universidade Federal da Paraíba. Centro de Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. João Pessoa. Paraíba. Brasil.

RESUMO

Os fungos entomopatogênicos produzem enzimas que estão envolvidas no processo de patogenicidade. Sabe-se que a capacidade de virulência está pautada na produção de enzimas extracelulares (proteases), e pouco é observado na literatura sobre a sua utilização para produção de enzimas de interesse industrial. Essas enzimas são amplamente empregadas na indústria em diversos processos biotecnológicos. No presente estudo propomos utilizar um meio de cultura pobre em nutrientes com uma única fonte de nitrogênio, como fonte de energia para crescimento de fungos filamentosos entomopatogênicos, a fim de caracterizar a atividade proteolítica. Levando em consideração a importância biotecnológica das enzimas proteolíticas, o objetivo desse estudo foi verificar o potencial de produção de proteases, obtida por fungos filamentosos em meio de cultura sólido específico. Para determinação da atividade enzimática proteolítica (IE) e do índice enzimático (Pz) foi utilizado o meio de cultura ágar-leite. O crescimento e formação do halo de degradação foi avaliado durante 12 dias. Os isolados *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. formaram um halo de 0,1, 0,4, 0,4, 0,4 e 0,1 centímetros, respectivamente, e um Pz positivo (classe 2), mostrando que esses isolados secretam a enzima avaliada. *Paecilomyces* sp. não formou halo e apresentou um Pz negativo. O meio ágar-leite mostrou-se ser um substrato potencial para a produção de enzimas proteolíticas com vasta aplicação em diversos processos biotecnológicos.

Palavras chave: Proteases; Enzimas hidrolíticas; Fungos Entomopatogênicos.

INTRODUÇÃO

Os fungos, amplamente distribuídos em todos os *habitats* e ecossistemas, são micro-organismos que participam da decomposição primária em todos os ecossistemas terrestres e desempenham um importante papel ecológico no ciclo do carbono e reciclam nutrientes; São essenciais para sobrevivência de muitos grupos de organismos com os quais estão associados (mutualismo); Muitos são patógenos de plantas, humanos e animais; São potencialmente importantes para a agropecuária (controle biológico) e demonstram potencial para produção biológica e biotecnológica. Diferentes linhagens fúngicas têm sido utilizadas como uma importante fonte de genes e vias metabólicas para a síntese de compostos economicamente significantes, incluindo peptídeos, vitaminas, enzimas, ácidos orgânicos (cítrico, itacônico, láctico e succínico), antibióticos (penicilina), entre outros. Esses compostos, incluindo as enzimas, são amplamente utilizados em processos biotecnológicos nas indústrias têxteis, papel e celulose, couro, detergentes, bebidas destiladas, cervejas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido (produção de xaropes), ração animal, indústria química e farmacêutica (ABREU et al., 2015).

As enzimas são um grupo de proteínas que desempenham funções essenciais no metabolismo atuando como catalisadoras de processos bioquímicos. Dentre várias funções, são capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores. Elas detêm um importante papel principalmente na degradação da matéria orgânica originando novos produtos, na deterioração de alimentos e infecção de hospedeiros (ABREU et al., 2015).

As proteases são exemplos de enzimas produzidas por fungos filamentosos, também conhecidas como peptídeo hidrolases. Essas enzimas catalisam as reações de hidrólise das ligações peptídicas existentes nas moléculas das proteínas, originando peptídeos menores e aminoácidos livres. Algumas pesquisas sugerem que as proteases conduzem modificações específicas e seletivas nas proteínas. Quanto maiores as forças que mantêm sua estrutura tridimensional, maiores são as dificuldades que devem ser ultrapassadas para que as proteases possam desempenhar sua função. Dessa forma, a clivagem de peptídeos proteolíticos tornou-se importante e tem despertado o interesse de pesquisadores (CRUZZI et al., 2011).

As proteases também estão relacionadas com a atividade entomopatogênica desempenhada por algumas espécies de fungos. Para que o fungo possa penetrar o hospedeiro e desempenhar sua atividade entomopatogênica, a ação de enzimas extracelulares como as proteases facilita a sua penetração. A infecção geralmente inicia-se pela adesão e germinação de conídios do fungo sobre a superfície do hospedeiro, seguido da penetração da hifa através da cutícula. Na penetração estão envolvidos os fatores físicos (pressão da hifa que rompe áreas membranosas ou esclerosadas) e químicos, resultante da ação de enzimas extracelulares (esterases, proteases, lipases e quitinases) que facilitam a penetração mecânica. Estas enzimas degradam a estrutura de polímeros da cutícula formada por fibrilas quitinosas embebidas em matriz composta de proteínas (HU; ST LEGER et al., 2002).

Os fungos são capazes de controlar a produção de enzimas de acordo com suas necessidades e com a disponibilidade de substratos. São descritos quatro tipos de mecanismos para regular a síntese e secreção de proteases extracelulares: (1) a presença de substratos específicos; os níveis dos produtos finais (como aminoácidos, NH_4^+ e fontes de carbono) podem diminuir a produção quando em altas concentrações (2); níveis de carbono, de nitrogênio ou de enxofre insuficientes podem aumentar a produção (3); e as enzimas podem ser produzidas em níveis baixos, independentemente da disponibilidade do substrato (4). Além disso, a produção de proteases por fungos filamentosos é influenciada pela qualidade da fonte de nitrogênio. Nesse estudo, o meio ágar-leite foi utilizado na seleção de micro-organismos produtores de proteases, sendo o leite em pó a única fonte de nitrogênio adicionada ao meio (GEISSELER; HORWATH, 2008).

As proteases estão disponíveis comercialmente. Processos industriais geralmente exigem enzimas robustas, capazes de atuar em diferentes condições de pH, temperatura, pressão, entre outros. Além disso, é esperado que as enzimas sejam produzidas com alto rendimento, por processos de fermentação simples e de baixo custo, proporcionando a geração de um produto com alto valor agregado.

Nos últimos anos, a perspectiva da utilização de processos fermentativos em estado sólido tem aumentado para produção de enzimas de interesse industrial. O alto custo das enzimas proteolíticas é um dos fatores limitantes no processo de hidrólise enzimática para a sua produção. Entretanto, o impacto do custo dessas enzimas pode ser reduzido a partir da seleção de micro-organismos produtores de proteases, pela utilização de matéria-prima mais barata e estratégias de fermentação a um custo efetivo, como fermentação em estado sólido (FES) e tecnologias mais eficientes para as etapas de sacarificação e fermentação. Tal processo é caracterizado pelo crescimento de micro-organismos em substratos sólidos e porosos, na ausência de água livre entre as partículas da matriz sólida. A FES usando substratos alternativos e de baixo custo vem sendo empregada, predominantemente, em países orientais, para a obtenção de produtos de importância comercial. Levando em consideração a importância biotecnológica das enzimas proteolíticas, o objetivo desse estudo foi verificar o potencial de produção de proteases em diferentes fungos filamentosos, em meio de cultura sólido específico.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal do Centro de Biotecnologia – CBIOTEC – UFPB (Universidade Federal da Paraíba). Foram utilizados seis isolados fúngicos descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Origem das seis espécies de fungos filamentosos.

Espécie Fúngica	Substrato de Isolamento/Origem
* <i>Beauveria bassiana</i>	<i>Nezara viridula</i> /CENARGEM/PR - 1987
* <i>Beauveria brongniartii</i>	Solo de sistema agroflorestal/ Abreu e Lima/PE - 2011
* <i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Mahanarva posticata</i> /Usina Serra Grande/Maceió-AL - 2005
<i>Paecilomyces</i> sp. TP08	Óleo diesel/Posto de gasolina, João Pessoa, Paraíba - 2014
<i>Aspergillus</i> sp.	Formiga cortadeira/Reserva florestal da Universidade Federal da Paraíba, <i>Campus I</i> , João Pessoa/PB - 2017
<i>Penicillium</i> sp.	Peças anatômicas/Complexo Laboratorial do Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba, <i>Campus I</i> , João Pessoa/PB - 2016

*Linhagem utilizada no controle biológico da cigarrinha da cana-de-açúcar no Norte, Nordeste e Sudeste.

Meio de cultura e manutenção da cultura fúngica: foi utilizado o meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose contendo 10 g de peptona de carne, 40 g dextrose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada, e o pH mantido em torno de 5,6. As amostras foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio ágar-Sabouraud, onde a cultura foi mantida à temperatura ambiente durante 15 dias e em seguida, sob refrigeração à 4 °C.

Crescimento radial: fragmentos da cultura fúngica foram colocados no centro da placa de Petri contendo o meio de cultura específico. Em seguida, as placas foram mantidas em temperatura ambiente. As observações foram feitas nos intervalos de 0-2, 2-4, 6-8, 8-10, 10-12 dias. Mensurações com régua milimetrada foram feitas e empregadas para a construção de um gráfico para a observação do crescimento radial.

Meio de cultura para a produção das enzimas proteolíticas: foi utilizado o meio-ágar-leite preparado com 50g de leite molico desnatado Nestlé, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada e pH mantido em 6,8. O meio foi autoclavado por 15 min. a 120 °C.

Atividade proteolítica: o inóculo do fungo foi colocado no centro da placa de Petri sobre o meio de cultura ágar-leite. Foi avaliada no período de 12 dias, a capacidade de degradação da caseína do leite em pó, única fonte de nitrogênio adicionada ao meio, para medir a atividade proteolítica de todos os isolados fúngicos. A degradação foi avaliada macroscopicamente pela formação do halo transparente ao redor da colônia.

Determinação da atividade enzimática e do índice enzimático: para a determinação do índice enzimático (IE), foi utilizada a metodologia descrita por Hankin e Anagnostakis (16), em que a atividade da espécie avaliada decorre da razão entre o diâmetro da colônia ($\varnothing c$) e o diâmetro da colônia, acrescido da zona de precipitação do halo ($\varnothing h$).

$$IE = \frac{\text{Diâmetro da colônia } (\varnothing c)}{\text{Diâmetro da colônia} + \text{Zona de precipitação do halo } (\varnothing h)}$$

A partir do (IE) a atividade enzimática (Pz) pode ser classificada como:

- A) negativa (IE = 1, Pz = classe 1);
- B) positiva (0,64 = IE < 1, Pz = classe 2);
- C) fortemente positiva (IE < 0,64, Pz = classe 3).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir da avaliação da capacidade de produção de enzimas proteolíticas extracelulares das 06 espécies de fungos filamentosos estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Índices enzimáticos (IE) e atividade enzimática (Pz) de 06 isolados de fungos filamentosos entomopatogênicos.

Espécie fúngica	IE	Pz
<i>Beauveria bassiana</i>	0,92	positiva
<i>Beauveria brongniartii</i>	0,90	positiva
<i>Metarhizium anisopliae</i>	0,98	positiva
<i>Paecilomyces</i> sp. TP08	0	negativa
<i>Aspergillus</i> sp.	0,94	positiva
<i>Penicillium</i> sp.	0,97	positiva

Fonte: Autor

Os fungos foram cultivados em meio contendo uma única fonte de nitrogênio, a caseína do leite. A caseína do leite Molico em pó é uma macromolécula composta por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas, incapaz de penetrar na membrana celular dos microorganismos. Para que a caseína seja utilizada pelos fungos, precisa ser degradada em peptonas, polipeptídeos, dipeptídeos e aminoácidos. Este processo é possível porque os fungos produzem enzimas proteolíticas (proteases) que catalizam a hidrólise da caseína em aminoácidos, os quais são depois assimilados e catabolizados pelas células (GEISSELER; HORWATH, 2008).

Os isolados fúngicos (*Aspergillus* sp., *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *B. brongniartii* e *Penicillium* sp.) com exceção do *Paecilomyces* sp., demonstraram potenciais produtores de enzimas proteolíticas no meio de cultura ágar-leite, porque apresentaram um IE alto e um Pz positivo (classe 2), mostrando que esses isolados secretam a enzima avaliada.

Dentre os fungos filamentosos analisados, *M. anisopliae* apresentou IE de 0,98 e à Pz positiva. Foi observado um crescimento radial lento no meio de cultura ágar-leite quando comparado com seu crescimento em meio de cultivo para manutenção (Ágar-Sabouraud). Foi observado um halo de 0,1 centímetros (Figura 1). O resultado positivo para atividade proteolítica já era esperado, pois vários estudos têm apontado o *M. anisopliae* como potencial agente no controle biológico de alguns insetos-pragas: besouro do grão do trigo (*Anisoplia austríaca*) e do curcúleo da beterraba (*Cleonus punctiventris*) (DIMBI et al., 2004).

No Brasil, o *M. anisopliae* já é utilizado no controle biológico de percevejos das pastagens, gênero *Deois*, da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, da cigarrinha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* e carrapatos que causa impacto na pecuária (PEREIRA et al., 2008). A facilidade de adentrar no hospedeiro devido a alta produção de proteases e outras enzimas faz do *M. anisopliae* um fungo filamentoso com ótima atividade entomopatogênica.

B. bassiana teve seu crescimento relativamente rápido nos dois meios de cultura utilizados. Apresentou uma coloração branca e textura felpuda característica da espécie e uma boa capacidade de esporulação, macroscopicamente. Formou um halo de 0,4 centímetros no meio de cultura ágar-leite (Figura 1). Apresentou a Pz positiva e IE de 0,92. Essa espécie é bastante explorada no controle biológico de vários insetos-praga na agropecuária e não há relatos na literatura sobre a exploração dessa espécie para fins industriais (produção de enzimas).

B. brongniartii apresentou também uma atividade proteolítica alta, formando um halo de degradação de 0,4 centímetros (Figura 1). Apresentou a Pz positiva e IE de 0,90. Apresentou um crescimento rápido e boa capacidade de esporulação, macroscopicamente. Essa espécie é

utilizada no controle biológico parasitando vários insetos-pragas e também não há relatos na literatura sobre a sua utilização para produção enzimática.

Aproximadamente 80 % das doenças acometidas a insetos são causadas por fungos entomopatogênicos, incluindo mais de 700 espécies, tornando estes micro-organismos objetos de uma importância grande em estudos na área de biotecnologia (como produção enzimática) e controle biológico contra insetos que causam prejuízos na agricultura ou pragas urbanas (ALVES, 1998).

Aspergillus sp. secretam grandes quantidades de enzimas. Esse gênero é capaz de obter níveis de atividades enzimáticas superiores aos fungos que são geralmente classificados como os melhores produtores de proteases. Devido a isso, é um gênero bastante explorado na indústria para diversas finalidades. Dentre as enzimas secretadas pelas espécies, destacam-se as proteases (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2006).

O isolado de *Aspergillus* sp. testado neste estudo, formou um halo de degradação de 0,4 centímetros. Apresentou Pz positiva e IE de 0,94. Nossos resultados coincidem com os de Cuzzi (2011). O autor avaliou o isolado D2-NC (*Aspergillus* sp.), quanto a atividade proteolítica (0,85) e a Pz classificada como positiva (classe 2).

As espécies de *Penicillium* possuem um grande potencial de produção de proteases e outras enzimas biotecnológicas, característica muito visada no ramo da biotecnologia e da indústria, atualmente. No nosso estudo utilizamos um isolado de *Penicillium* sp. A colônia formou um halo de degradação de 0,1 centímetros. Apresentou um IE de 0,97 e a Pz positiva. Nossos resultados obtidos para as espécies *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. corroboram com os de Pinto (1997), que destacam a capacidade desses dois gêneros fúngicos em produzir enzimas extracelulares, sobre diversos substratos. Dentre as enzimas produzidas por ambos os gêneros, destacam-se as proteases. Esses resultados também coincidem com os de Lima (2003), que relatam muitas espécies do gênero *Penicillium* como notáveis produtoras de proteases e amilases, com grande potencial de aplicação em distintas áreas.

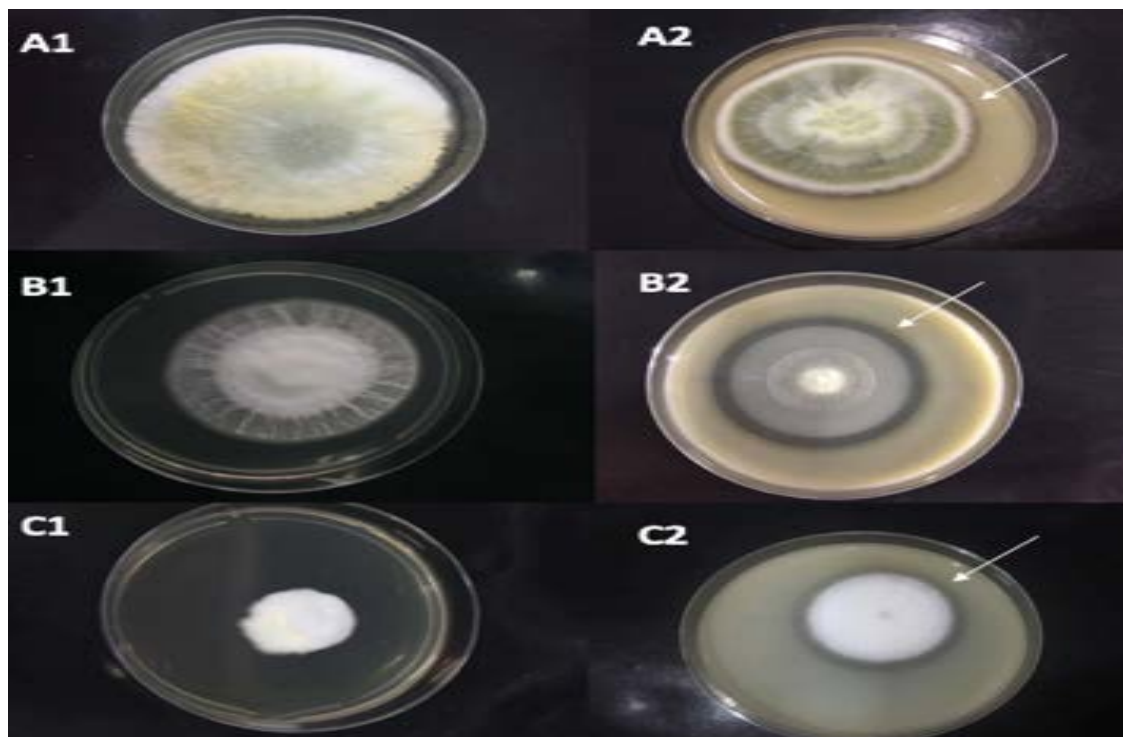


Figura 1. Aspecto das colônias dos diferentes isolados fúngicos em meio de cultura ágar-Sabourad-dextrose (A1, B1 e C1) e formação do halo de degradação em meio de cultura ágar-leite (A2, B2, e C2). (A) *Metarhizium anisopliae*; (B) *Beauveria bassiana*; (C) *Beauveria brongniartii*.

O isolado *Paecilomyces* sp. apresentou crescimento radial muito lento, tanto no meio de manutenção (ágar-Sabourand-dextrose) quanto no meio ágar-leite. Não formou um halo de degradação evidenciando Pz negativa. A colônia apresentou as características típicas da espécie, um aspecto cotonoso de cor marrom-acinzentada. Dessa forma, há necessidade de mais pesquisas com outros substratos mais adaptáveis ao metabolismo do fungo, os quais permitam medir a atividade enzimática do *Paecilomyces* sp.

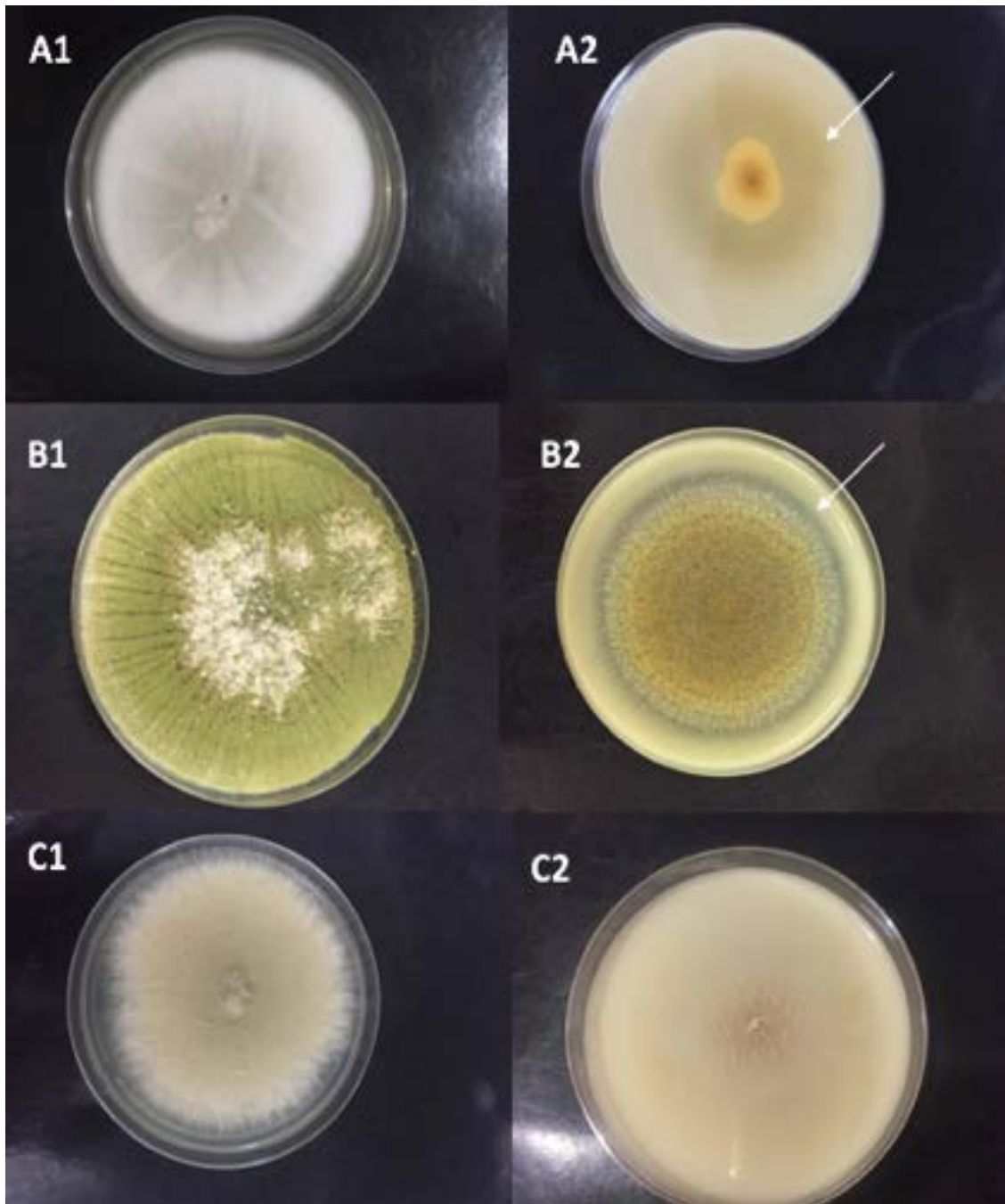


Figura 2. Aspecto das colônias dos diferentes isolados fúngicos em meio de cultura ágar-Sabourad-dextrose (A1, B1 e C1) e formação do halo de degradação em meio de cultura ágar-leite (A2, B2 e C2). (A) *Penicillium* sp.; (B) *Aspergillus* sp.; (C) *Paecilomyces* sp.

O gênero *Paecilomyces* é atualmente explorado no controle biológico, devido a sua atividade parasitária. Foi encontrado em ovos de nemátodes em 1966 e mais tarde descoberto parasitando ovos de *Meloidogyne incognita* (Nematóide-das-galhas) no Peru (FIEDLER; SOSNOWSKA, 2007).

A utilização de enzimas de origem microbiana, na indústria biotecnológica, tem sido muito explorada por apresentar uma série de vantagens, tais como: custos de produção relativamente baixos; facilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais; espectro amplo de características físico-químicas de diferentes enzimas, geralmente relacionadas ao *habitat* e fisiologia do micro-organismo produtor; susceptibilidade de manipulação genética e por representarem um recurso renovável. A utilização ampla destas enzimas é reflexo da elevada especificidade de sua ação como biocatalisadoras. Porém, enzimas com o mesmo perfil de atuação sob o substrato, podem apresentar funcionamento ótimo em pH, temperatura e concentração iônica diferentes, o que requer a seleção de enzimas adequadas às condições nas quais serão utilizadas. Atualmente, enzimas microbianas são amplamente utilizadas no processamento de alimentos, produção de detergentes, indústrias têxtil e farmacêutica, na química biológica, na biologia molecular e medicina.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o meio ágar-leite mostrou-se ser um substrato potencial para a produção de enzimas proteolíticas; *Paecilomyces* sp. apresentou IE negativo. Os isolados de *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *Panicillium* sp. e *Aspergillus* sp. exibiram uma atividade proteolítica positiva, apontando um potencial para serem explorada na indústria como produtoras de enzimas extracelulares.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S.; RODOVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista Uningá Review**, v. 2, p. 55-59, 2015.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Eds.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.
- CUZZI, C.; LINK, S.; VILANI, A.; ONOFRE, S. B. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **GI Sci Technol.**, v. 4, p. 47-57, 2011.
- DIMBI, S.; MANIANIA, N. K.; LUX, A. S.; MUEKE, J. M. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. **Biocontrol.**, v. 49, p. 83-94, 2004.
- FIEDLER, Z.; SOSNOWSKA, D. Nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. **Biocontrol.**, v. 52, p. 547-558, 2007.
- GEISSELER, D.; HORWATH, W. R. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. **Soil Biol Biochem.**, v. 40, p. 3040-3048, 2008.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. et al. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2001-2006, 2011.

HU, G.; ST LEGER, R. J. Field studies using a recombinant Mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 134-135, 2002.

PEREIRA, M. F. A.; BENEDETTI, R. A. L.; ALMEIDA, J. E. M. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin no controle de *Deois flavopicta* (Stal. 1854), em pastagem de capim (*Brachiaria decumbens*). Arquivos do Instituto Biológico. 2008; 75: 465-469.