



Co-cultivo de Fungos Filamentosos como Abordagem para o Estudo de Hidrolases Envolvidas na Virulência de Microrganismos e com Potencial Biotecnológico

Nathália Gonsales da Rosa Garzon¹, Ana Claudia Rodrigues de Siqueira¹, Luciana Barbosa Coitinho¹ e Hamilton Cabral¹

¹Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
CEP – 14040-903 Ribeirão Preto – SP - E-mail: nathaliagrosa@gmail.com

RESUMO

*Os fungos constituem uma fonte muito importante para a busca por novas enzimas com potencial biotecnológico, pois esses organismos são metabolicamente versáteis. *Fusarium oxysporum*, fungo causador de doenças em plantas e *Trichoderma asperellum*, fungo decompositor, têm ganhado destaque na literatura não só pela capacidade de produção de diversas enzimas como no controle de doenças causadas por *Fusarium* utilizando o *Trichoderma* como agente de controle biológico. Diante disso, o objetivo deste estudo é verificar a produção de hidrolases em cultivos individuais de *F. oxysporum* e *T. asperellum* e no co-cultivo em bioproceto sólido, além de caracterizar as condições de pH e temperatura ótimos das proteases produzidas por estes microrganismos. A produção de hidrolases foi diferenciada nos cultivos analisados, sendo que *F. oxysporum* apresentou a maior produção de lipases e pectinases enquanto que *T. asperellum* apresentou maior produção de proteases. A produção de xilanase foi uniforme em todos os cultivos. Além disso, o pH e temperatura ótimos apresentaram padrão similar. Desta forma, as diferenças nas atividades enzimáticas não foram suficientes para concluir a interferência do co-cultivo na produção de enzimas.*

Palavras-chave: Biotecnologia, hidrolases, fungos filamentosos.

INTRODUÇÃO

A versatilidade metabólica dos fungos filamentosos permite que estes produzam diferentes enzimas. Além disso, possuem a capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular o que permite a adaptação do seu metabolismo aos substratos disponíveis (GÓMES-MENDOZA et al, 2014). Esta característica tem sido explorada na produção de enzimas com aplicação biotecnológica e industrial (ODA et al, 2006).

F. oxysporum é um fungo filamentoso de solo distribuído mundialmente (FANG, BARBETTI, 2014) que causa a murcha vascular em um amplo número de espécies de plantas e que também está emergindo como agente causador de infecções em pacientes imunocomprometidos. Espécies de *Fusarium* são responsáveis por perdas em culturas economicamente importantes (FANG et al, 2015) e o sucesso deste fitopatógeno depende da interação com os hospedeiros e as alterações metabólicas que permitem infectar e causar doença no tecido da planta (CARACUEL et al, 2003). As proteínas secretadas por fitopatógenos são essenciais para os processos de infecção e, mais especificamente, as enzimas que causam degradação estão relacionadas à virulência do fungo e podem ser estudadas como alvos para



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

controle de doenças (GONZALES-FERNANDES, JORRIN-NOVO, 2012). Entretanto, estas enzimas também podem ser exploradas para a aplicação em diferentes setores industriais.

Trichoderma asperellum é um fungo filamentososo que têm como habitat o solo, matéria orgânica e árvores em decomposição e que atuam como agentes de biocontrole, pois têm a capacidade de biorremediação de solos, promoção do crescimento de plantas, produção de proteínas, enzimas, antibióticos e micro-nutrientes. Também são utilizados no biocontrole de doenças vegetais provocadas por outros fungos, como os do gênero *Fusarium*, utilizando mecanismos tais como, produção de metabólitos antifúngicos, micoparasitismo ou ainda competição por nutrientes e/ou espaço (WIJESINGHE et al, 2011).

O objetivo deste estudo é verificar a produção de hidrolases em cultivos individuais de *F. oxysporum* e *T. asperellum* e no co-cultivo em bioprocessos sólidos, além de caracterizar as condições de pH e temperatura ótimas das proteases produzidas por estes microrganismos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os fungos *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma asperellum* foram cultivados em tubos inclinados contendo meio Agar-batata por 7 dias a 30°C. O bioprocessos em substrato sólido foi realizado em meio contendo 5 g farelo de trigo no qual foi adicionado 10 mL de solução salina (0,1% NH_4NO_3 , 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Ao substrato sólido foram adicionados 3 discos de 0,5 cm² de *Fusarium oxysporum* (Fox), 3 discos de 0,5 cm² de *Trichoderma asperellum* (Tas) ou 3 discos de 0,5 cm² de *Fusarium oxysporum* e 3 discos de 0,5 cm² de *Trichoderma asperellum* (Fox x Tas). Após 168 horas de bioprocessos, foram adicionados 50 mL de água a cada cultivo e o material foi macerado, filtrado e centrifugado a 6000 x g, 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a avaliação da atividade enzimática. Para avaliar a atividade proteolítica foi utilizada a caseína 1% (m/v) como substrato em tampão fosfato (50mM, pH 6,5) a 40°C. A reação foi interrompida com ácido tricloroacético 10%, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 10000xg e a leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro contra seus respectivos brancos a 280nm. Para avaliar a atividade de lipase foi utilizado o substrato p-nitrofenil palmitato (0,8 mM) preparado em solução contendo goma arábica 0,05% (m/v) em tampão Tris 100 mM pH 8,0. A reação foi interrompida em banho fervente por 1 minuto seguida de banho de gelo e, por fim, foi adicionado ao volume reacional o mesmo volume de solução saturada de tetraborato de sódio. A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro contra seus respectivos brancos a 410nm. Para avaliar as atividades de xilanase e pectinase foram utilizados os substratos xilana 0,5% (m/v) e pectina cítrica 0,5 % (m/v) que foram preparados em tampão acetato 100 mM, pH 4,5. A reação foi interrompida pela adição de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) em banho fervente por 5 minutos. Por fim, foi adicionada ao volume reacional água e a leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro contra seus respectivos brancos a 540nm. Os ensaios de caracterização dos extratos foram realizados com azo-caseína (Sigma) como substrato. Para determinação do pH ótimo foram avaliados os pH 5, 7 e 9 e para a temperatura ótima foi avaliada a 30, 40 e 50°C. Para esses testes foram utilizados 100µL de extrato enzimático bruto, 100µL de tampões adequados ao pH desejado para reação, e 200µL de azo-caseína 1%. Os ensaios foram incubados por 15 minutos na temperatura adequada a cada ensaio. A reação foi interrompida com 800 µL TCA 10% e os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 10.000 x g em temperatura ambiente. Os sobrenadantes dos tubos testes foram quantificados contra seus respectivos brancos em 440nm, em espectrofotômetro.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

RESULTADO E DISCUSSÃO

A produção de hidrolases foi diferencialmente modulada nos cultivos individuais (Fox e Tas) e conjunto (Fox x Tas). A maior produção de protease foi obtida no cultivo Tas e a menor produção foi observada no cultivo Fox. Por outro lado, as maiores produções de lipase e pectinase foram observadas no cultivo Fox e as menores no cultivo Tas. Já a produção de xilanase apresentou-se de modo uniforme entre todos os cultivos (Figura 1).

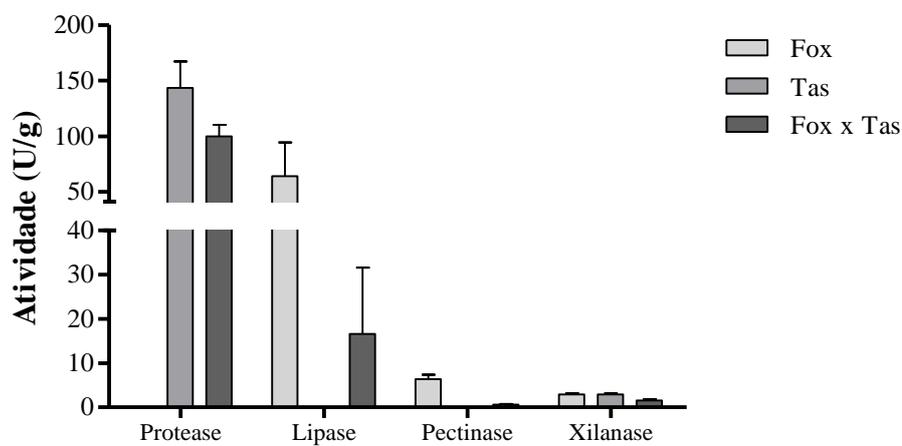


Figura 1. Produção de hidrolases em bioprocesso sólido utilizando *F. oxysporum* e *T. asperellum* em cultivos individuais e combinados.

Protease, lipase, pectinase e xilanase são hidrolases fundamentais no processo de degradação de biomassa e tanto o seu modo de ação quanto os seus produtos finais são relevantes do ponto de vista biotecnológico. As proteases constituem o principal grupo de enzimas comercializadas, com ampla aplicação industrial e biotecnológica e, por esse motivo, foi caracterizada em relação ao seu pH e temperatura ótimos (Figura 2).

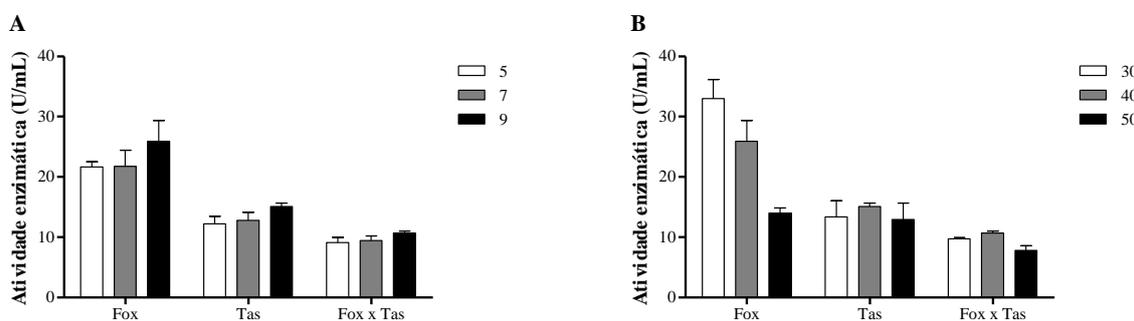


Figura 2. Efeito de pH e temperatura sobre a atividade de proteases obtidas em bioprocesso sólido utilizando *F. oxysporum* e *T. asperellum* em cultivos individuais e combinados. (A) pH, (B) temperatura.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Na Figura 2A é possível observar que o pH ótimo de atividade proteolítica foi 9 para os cultivos Fox e Tas, entretanto não houve diferença estatística entre as três condições de pH no cultivo com Fox x Tas. Na figura 2B é possível observar que nos cultivos Fox, Tas e Fox x Tas as temperaturas ótimas foram 30, 40 e 40°C, respectivamente. As pequenas diferenças observadas pode se dar pelo fato que a produção de enzimas obedece a condições próprias de cada espécie de micro-organismo e também ao meio utilizado para o bioprocessamento, cujos parâmetros físico-químicos constituem fatores determinantes na investigação da produção microbiana (SANDHYA et al, 2005).

CONCLUSÕES

A produção de hidrolases foi modulada diferencialmente entre os cultivos e isso pode ser um reflexo do momento metabólico destes microrganismos. Além disso, o pH e temperatura ótimos apresentaram padrão similar. Sendo assim, é possível que as cepas de *F. oxysporum* e *T. asperellum* utilizadas neste estudo não apresentem comportamentos antagonista ou ainda que a disponibilidade de nutrientes não tenha sido afetada no ambiente compartilhado, entretanto são necessários estudos adicionais para a confirmação desta evidência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Caracuel Z, Roncero MIG, Espeso EA, González-Verdejo CI, García-Maceira FI, Di Pietro A. 2003. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Microb* 48:765–779.
- Fang X, Chen J, Dai L, Ma H, Zhang H, Yang J, Wang F, Yan C. 2015. Proteomic dissection of plant responses to various pathogens. *Proteomics* 15:1525–1543.
- Fang X, Barbetti MJ. 2014. Differential protein accumulations in isolates of the strawberry wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* differing in virulence. *J Proteomics* 108:223-37.
- Gomes-Mendoza DP, Junqueira M, Do Vale LHF, Domont GB, Ferreira-Filho EX, De Souza MV, Ricart, CAO. 2014. Secretomic survey of *Trichoderma harzianum* grown on plant biomass substrates. *J Prot Res* 13:1810-1822, 2014.
- Gonzales-Fernandes R, Jorin-Novo JV. 2012. Contribution of Proteomics to the Study of Plant Pathogenic Fungi. *J Prot Research* 11:3–16.
- Oda K, Kakizono D, Yamada O, Iefuji H, Akita O, Iwashita K. 2006. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl Environ Microb*, v.72, p.3448-3457, 2006.
- Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, Pandey A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem* 40: 2689-2694.
- Wijesinghea CJ, Wilson Wijeratnama RS, Samarasekara JKRR, Wijesunderac RLC. 2011. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). *Crop Prot* 30:300-306.