



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Imobilização de enzimas de interesse biotecnológico produzidas durante o co-cultivo *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma asperellum*

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

¹Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Av do café s/n, Ribeirão Preto – SP. E-mail: anacrsiqueira@gmail.com

RESUMO

O fungo *Fusarium oxysporum* é causador de doenças em plantas, o que gera grandes prejuízos para diversos plantios. Uma alternativa para controlar esse patógeno é utilizar fungos do gênero *Trichoderma sp.* como controle biológico. Esse controle pode estar relacionado às diferenças na produção enzimática desses fungos quando co-cultivados. Além disso, esses fungos são fontes de enzimas com potencial biotecnológico. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi imobilizar as enzimas produzidas no co-cultivo dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma asperellum*. Foram imobilizadas lipase, protease e xilanase em resinas DEAE-agarose, MANAE-agarose, sulfopropil, glioxil-agarose e beads de alginato ativadas por glutaraldeído 2%. O suporte DEAE foi o que gerou maior atividade enzimática porém, as beads foram escolhidas para próximos estudos, devido ao baixo custo e fácil recuperação.

Palavras-chave: hidrolases, *Trichoderma sp.*, *Fusarium sp.*

INTRODUÇÃO

Fusarium oxysporum é um fungo cosmopolita saprófito conhecido por ser patógeno oportunista de plantas gerando grande prejuízo a diversos tipos de plantios (MICHELSE e REP, 2009). Este fungo também tem sido estudado para a produção de diferentes enzimas no intuito de aplicação biotecnológica, tais como, as pectinases (MEHTA & MEHTA, 1985), amilase (KWON et al, 2007), xilanases, celulases (PANAGIOTOU et al, 2003), proteases (BARATA et al, 2002) e lipases (PRAZERES et al, 2006; GOPINATH, et al, 2013).

Os fungos do gênero *Trichoderma spp.* são amplamente distribuídos no meio-ambiente e conhecidos como oportunistas, simbioses de plantas e parasitas de outros fungos, por estas características são utilizados como uma fonte para controle biológico de plantações infectadas por fitopatógenos (HARMAN et al, 2004). Este controle dá-se por diferentes mecanismos, um deles é a partir da secreção de diferentes classes de enzimas. A espécie *T. asperellum* é reconhecida como controle biológico efetivo comprovado em diversos estudos (WATANABE et al, 2006; MARCELLO et al, 2010; MGARBA et al, 2014).

Os bioprocessos sólidos são conhecidos por mimetizar o crescimento dos fungos no meio-ambiente, desta forma é possível a utilização de resíduos agroindustriais. Este produto é obtido a partir de plantas leguminosas e gramíneas gerando um meio rico para o crescimento de fungos e produção enzimática.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

As proteases são hidrolases que catalisam a quebra da ligação peptídica de proteínas e peptídeos (KUMAR & TAGAKI, 1999) e tem papel importante no metabolismo de fungos, bem como as lipases que são catalisadores da hidrólise de triacilgliceróis (JOSEPH et al, 2008) e promovem a esterificação de compostos e as xilanases que degradam a β -1,4 xilana em xilose e xilo-oligosacarídeo (KAMBLE e JADHA, 2012). Estas enzimas têm diversas aplicações biotecnológicas, e podem ser usadas em conjunto na degradação de tecidos vegetais.

Desta forma, no intuito de mimetizar o crescimento dos fungos *F. oxysporum* e *T. asperellum* isolados e em um co-cultivo, utilizamos o feno como suporte e meio de cultura para analisar as diferentes classes de enzimas produzidas, e promovemos um estudo para imobilização concomitante de todas as classes de enzimas analisadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os fungos *F. oxysporum* e *T. asperellum* foram cultivados em tubos inclinados contendo meio Agar-batata por 7 dias a 30°C. O bioprocesso 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 *F. oxysporum* (Fox), 3 discos de 0,5 cm² de *T. asperellum* (Tas) ou 3 discos de 0,5 cm² de *F. oxysporum* e 3 discos de 0,5 cm² de *T. asperellum* (Fox x Tas). Após 168 horas de bioprocesso, 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 foram utilizados o substrato xilana 0,5% (m/v) que foi preparado 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 imobilização deram-se a partir dos seguintes suportes: DEAE-agarose (suporte aniônico comercial) e MANAE-agarose (suporte aniônico ativado a partir de agarose de acordo com Fernandez-LaFuente *et al*, 1993), sulfopropil (suporte catiônico comercial), glioxil-agarose (suporte covalente ativado a partir de MANAE-agarose de acordo com



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Guisan, 1987) e beads de alginato ativadas por glutaraldeído 2% (suporte covalente ativado a partir de *beads* de alginato de acordo com Pal e Khanum, 2011). O extrato enzimático proveniente do bioprocesso sólido com Feno em co-cultivo foi a matéria-prima utilizada, devido a presença de atividade de protease, lipase e xilanase, enzimas alvo para imobilização. A imobilização nos suportes catiônico e aniônicos deram-se pela adição de 5mL de extrato e 5mL de tampão hepes 5mM pH 7,0 a um 1g de suporte. Esta mistura foi mantida em agitador basculante durante duas horas, a suspensão foi filtrada e então o derivado (complexo enzima-suporte) foi recuperado. A ligação entre enzimas e suporte glioxil-agarose ocorreu através da adição de 5mL de extrato enzimático e 5mL de tampão bicarbonato de sódio 100mM pH 10,05 a 1g de suporte. Esta suspensão foi mantida em agitador basculante por duas horas, afim de promover a adsorção das enzimas ao suporte. Com a finalidade de promover uma ligação covalente entre a enzima e o suporte, foi então adicionado 8,9mg de borohidreto de sódio. Essa mistura foi mantida sob agitação a frio e destampada para liberação de hidrogênio durante 10 a 15 minutos. O derivado foi então lavado e recuperado. A imobilização nas *beads* de alginato-glutaraldeído deu-se pela adição de 5mL de extrato enzimático a 5g de *beads*, que foram mantidas sob agitação orbital (200rpm) a temperatura ambiente durante 3 horas. A imobilização foi comprovada pela ausência de atividade enzimática nas diversas lavagens com água deionizada as quais as *beads* foram submetidas após o tempo de imobilização.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

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 Fox x Tas e a menor produção foi observada no cultivo com Tas. Da mesma forma, a maior produção de lipase foi observada no cultivo Fox x Tas bem como no cultivo com somente Fox e Tas não demonstrou nenhuma produção desta enzima. Já a produção de xilanase foi baixa, porém apresentou-se de modo uniforme entre todos os cultivos (Figura 1).

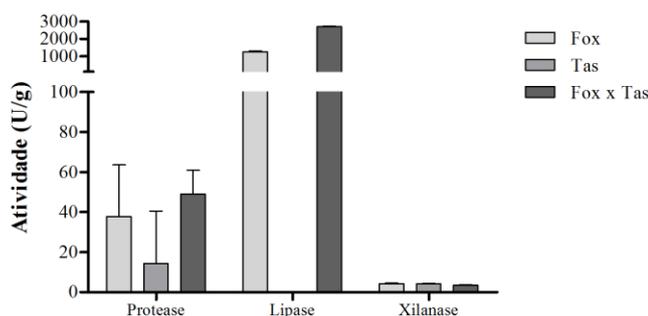


Figura 1. Produção de hidrolases em bioprocesso sólido utilizando *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma asperellum* em cultivos individuais e combinados.

Dentre os suportes iônicos, o DEAE-agarose demonstrou maior rendimento frente aos diferentes suportes e enzimas, uma vez que apresentou atividade lipolítica maior que a atividade original do extrato enzimático, bem como promoveu o aumento da atividade proteolítica e manteve a atividade de xilanase (Figura 2). As *beads* de alginato-glutaraldeído foram o suporte covalente que mantiveram as atividades de forma geral (Figura 2), a



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

vantagem de uma imobilização covalente é a ligação estável e duradoura ao suporte, possibilitando a reutilização destas enzimas por mais tempo. Em contrapartida no suporte iônico a enzima pode se desligar e contaminar o produto.

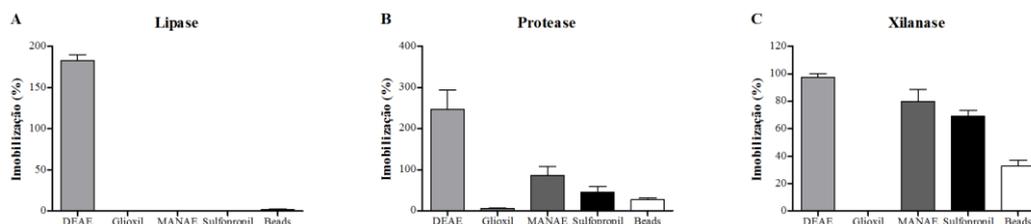


Figura 2. Imobilização do extrato enzimático contendo lipase(A), protease (B) e xilanase (C) proveniente da produção em bioprocesso sólido utilizando *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma asperellum* em co-cultivo.

CONCLUSÕES

A análise da produção de hidrolases nos mostrou que o co-cultivo de *F. oxysporum* e *T. asperellum* apresentou melhor desempenho global na produção de protease, lipase e xilanase, sendo por esse motivo selecionado para os processos de imobilização. Na imobilização, embora o suporte DEAE- agarose tenha sido capaz de imobilizar demonstrando maior atividade, as *beads* são a escolha para próximos estudos, uma vez que é um suporte de menor custo e podem ser recuperadas com maior facilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mehta, A, Mehta, P. 1985. Production of pectolytic and cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium moniliforme* under different cultivation conditions. *Folia Microbiology*, v. 30, p. 42-50.
- Panagiotou, G, Kekos, D, Macris, BJ, Christakopoulos, P. 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*, v. 18, p. 37-45.
- Kwon, HW, Yoon, H, Kim, SH, Hong, SB, Cheon, Y, Ko, SJ. 2007. Detection of extracellular enzyme activities in various *Fusarium* spp. *Microbiology*, v. 35, n. 3, p. 162-165.
- Joseph, B, Ramteke, PW, Thomas, G. 2008. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*, v. 26, p. 457-470.
- Gopinath, SB, Periasamy, A, LakshmiPriya, T, Hilda, A. 2013. Strategies to Characterize Fungal Lipases for Applications in Medicine and Dairy Industry. *BioMed Research International*, v. 20.
- Barata, RA, Andrade, MHG, Rodrigues, RD, Castro, IM. 2002. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. *lini*. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 94, p. 304-308.
- Prazeres, JN, Cruz, JAB, Pastore, GM. 2006. Characterization of Alkaline Lipase From *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 505 – 509.
- Kumar, CG, Takagi, H. 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, v. 17, p. 561-594.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species—Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:43-56.
- Mbarga, JB, Begoude, BA, Ambang, Z, Meboma, M, Kuate, J, Schiffers, B, Ewbank, W, Hoopen, GMT. 2014. A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. *Biological Control*, 77, pp. 15-22.