

Caracterização morfológica e proteolítica de *Aspergillus niger* isolado da biblioteca do IFPE - *campus* Recife**Morphological and proteolytical characterization of *Aspergillus niger* isolated from the IFPE - *campus* Recife library**

DOI:10.34117/bjdv6n8-721

Recebimento dos originais:08/07/2020

Aceitação para publicação:31/08/2020

Francisco Braga da Paz Junior

Doutor em Biologia de Fungos

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE) – *Campus* Recife

Endereço: Av. Prof. Luiz Freire 600, Recife-PE, Brasil, 50740-540.

E-mail: franciscobraga@recife.ifpe.edu.br

Jonas Oliveira Varela da CostaBolsista PIBIC Técnico do Curso de Química do IFPE – *campus* RecifeInstituição: IFPE – *Campus* Recife

Endereço: Av. Prof. Luiz Freire 600, Recife, PE, Brasil, 50740-540.

E-mail: jovc@discente.ifpe.edu.br

Lindeberg Rocha Freitas

Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Instituição: IFPE – *Campus* Pesqueira

Endereço: BR 232 – Km 214 – Loteamento Redenção - Prado, Pesqueira - PE, Brasil.

E-mail: lindeberg@pesqueira.ifpe.edu.br

Eliana Santos Lyra Da Paz

Doutora em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade de Pernambuco

Endereço: Av. Gov. Agamenon Magalhães, Santo Amaro, Recife-PE, Brasil, 50100-010.

E-mail: eliana.lyra@upe.br

Leonardo Ricardo de Andrade Filho

Graduando em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, 52171-900

E-mail: souleoricardo@icloud.com

Carlos Fernando Rodrigues Guaraná

Doutor em Ciências Biológicas

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, 52171-900

E-mail: carlos.guarana@ufrpe.br

Ana Cristina Barreto Silveira

Doutora em Biologia de Fungos

Instituição: Universidade de Pernambuco

Endereço: Av. Gov. Agamenon Magalhães, Santo Amaro, Recife-PE, Brasil, 50100-010

E-mail: anacristina.silveira@upe.br

Hidemburgo Gonçalves Rocha

Doutor em Farmacologia

Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Santa Isabel, 2111, Pirajá, Juazeiro do Norte-CE, Brasil.

E-mail: hidemburgo.rocha@hotmail.com

RESUMO

Os fungos anemófilos tem se destacado como um dos principais agentes causadores de infecções respiratórias em ambientes climatizados artificialmente, devido a sua potencialidade como produtor de enzimas extracelulares, principalmente as proteases. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar morfológicamente o isolado fúngico C4(27) e avaliar a sua capacidade em produzir protease. A identificação do isolado fúngico foi realizada através do estudo de características macro e microscópicas. Para determinação da atividade proteolítica, discos de micélio provenientes de colônias jovens foram inoculados centralmente em placas de Petri contendo o meio ágar-leite. Avaliou-se a atividade enzimática pela formação de halos de degradação do fungo crescido no meio específico e determinação do Índice de Relação Enzimática. O isolado fúngico testado mostrou reação positiva para produção enzimática, apresentando índice de relação enzimática superior a 2,0. Este dado sugere que o fungo em estudo é um microrganismo promissor na produção de protease.

Palavras-chave: Fungo anemófilo, morfologia, *Aspergillus*, protease.

ABSTRACT

Anemophilic fungi have stood out as one of the main agents that cause respiratory infections in artificially conditioned environments, due to their potential as a producer of extracellular enzymes, especially proteases. The present study aimed to characterize the fungal isolate C4 (27) morphologically and to evaluate its ability to produce protease. The identification of the fungal isolate was carried out through the study of macro and microscopic characteristics. To determine the proteolytic activity, mycelium discs from young colonies were inoculated centrally in Petri dishes containing the agar-milk medium. The enzymatic activity was evaluated by the formation of degradation halos of the fungus grown in the specific medium and determination of the Enzyme Relationship Index. The tested fungal isolate showed a positive reaction for enzyme production, with an enzyme ratio greater than 2.0. This data suggests that the fungus under study is a promising microorganism in the production of protease.

Keywords: Anemophilic fungus, morphology, *Aspergillus*, protease.

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores orgânicos, acelerando reações químicas, apresentando grande interesse industrial, como exemplo têm-se as proteases. Devido à demanda cada vez maior da biotecnologia pelos catalisadores de proteínas, uma ampla faixa de microrganismos (p.ex. fungos e bactérias) está sendo usada para obter enzimas. No setor industrial,

as enzimas fúngicas equivalem a 60% da demanda do mercado (SOARES et al.,2010). Dentre os tipos de fungos utilizados para sintetizar enzimas, os fungos filamentosos possuem a capacidade de produzir uma ampla quantidade de biocatalisadores. Além da utilização dessas enzimas sintetizadas por fungos na área industrial, também há a importância delas na área médica, em virtude da virulência dos fungos serem associadas à produção de protease (TOMEI et al., 1997).

Os fungos são organismos eucariontes, uni ou multicelulares, heterótrofos por absorção, com parede celular composta de quitina e α -glucano, de reprodução sexuada ou assexuada que produzem esporos. Aqueles cujos esporos se dispersam pelo ar são chamados de fungos anemófilos (ALEXOPOULOS et al.,1996). Dentre os diversos gêneros de fungos presentes no grupo dos anemófilos, o gênero *Aspergillus* destaca-se por possuir grande distribuição no ambiente e apresentar extensa utilização na biotecnologia devido a sua capacidade de produzir diversos tipos de substâncias, como exemplo as enzimas proteases (QUEIROZ; SOUZA, 2020; SANTOS et al., 2020; que possuem ampla utilização nas indústrias alimentícias, de bebidas, farmacêuticas, têxteis, entre outras.

Com o avanço no conhecimento das enzimas, os fungos vêm adquirindo um status de destaque para vários tipos de indústrias uma vez que existe a possibilidade de utilizá-las para melhorar vários aspectos do produto final. (SOARES, et al., 2010, p.701).

Além da importância industrial e comercial as enzimas proteolíticas, possuem importante atuação na virulência dos fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente o *Aspergillus fumigatus*. A protease faz com que as células pulmonares descamem, diminuindo a barreira física e facilitando a fixação e invasão do fungo (TOMEI et al., 1997). Alguns gêneros de *Aspergillus* têm grande importância na área médica por serem responsáveis por doenças graves em pacientes imunodeprimidos (KOSMIDIS; DENNING, 2015) atuando como oportunistas, se aproveitando do estado imunodeprimido do hospedeiro e se fixando em locais do corpo, principalmente as vias aéreas superiores. Conforme observado por Lima et al. (2017), fungos do gênero *Aspergillus* de águas de consumo da população apresentaram capacidade de produzir enzimas proteases.

Devido à importância médica e biotecnológica das enzimas fúngicas, este trabalho teve como objetivo caracterizar morfológicamente o isolado fúngico C4(27) coletado na biblioteca do IFPE – campus Recife e avaliar a sua capacidade em produzir protease.

2 METODOLOGIA

• Local da pesquisa

Os procedimentos experimentais foram realizados no laboratório de Biologia do IFPE – Campus Recife.

• Amostra fúngica

Utilizou-se nessa pesquisa a amostra C4(27) isolada e identificada como *Aspergillus* no Plano de Atividades intitulado “Prevalência de fungos anemófilos na Sala de Memorial da Biblioteca do IFPE – Campus Recife” (PIBIC 2017-2018) pertencente ao Projeto de Pesquisa “Fungos anemófilos isolados de setores do IFPE – Campus Recife: Prevalência e atividade enzimática”.

• Identificação do fungo

A confirmação do gênero e a identificação do isolado fúngico ao nível de espécie foi realizado através do estudo de características macroscópicas (diâmetro, cor e textura da colônia, presença ou ausência de rebordo, zonação e rugosidade) e microscópicas (hifas, conídios e esporos) e comparação com literaturas especializadas, tais como Singh et al (1991), Samson et al. (1996). Para melhor visualização das microestruturas, utilizou-se a técnica de microcultivo segundo metodologia de Riddell (1950). Após identificação, o isolado foi cultivado em placas de Petri contendo meio Sabourand-Dextrose-Ágar e armazenados a 4°C para posterior análise enzimática

• Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica da amostra foi testada mediante a hidrólise de caseína em meio ágar-leite, conforme metodologia descrita por Sarath et al. (1989). Cada placa contendo o citado meio foi inoculada centralmente com um disco de micélio (5 mm de diâmetro) de colônia jovem para crescimento em regime de alternância luminosa por 05 dias, em sala climatizada ($28 \pm 2^\circ\text{C}$). A leitura das placas foi feita a cada 24 horas, anotando-se as medidas do diâmetro do crescimento das colônias e do halo de degradação do meio em dois sentidos diametralmente opostos com o auxílio de uma régua milimetrada.

A atividade proteolítica foi determinada pelo Índice de Relação Enzimática ($\text{IRE} = \text{D/d}$), em que **D** corresponde à soma do diâmetro total da colônia com o diâmetro do halo de degradação e **d** equivale ao diâmetro da colônia sem o halo.

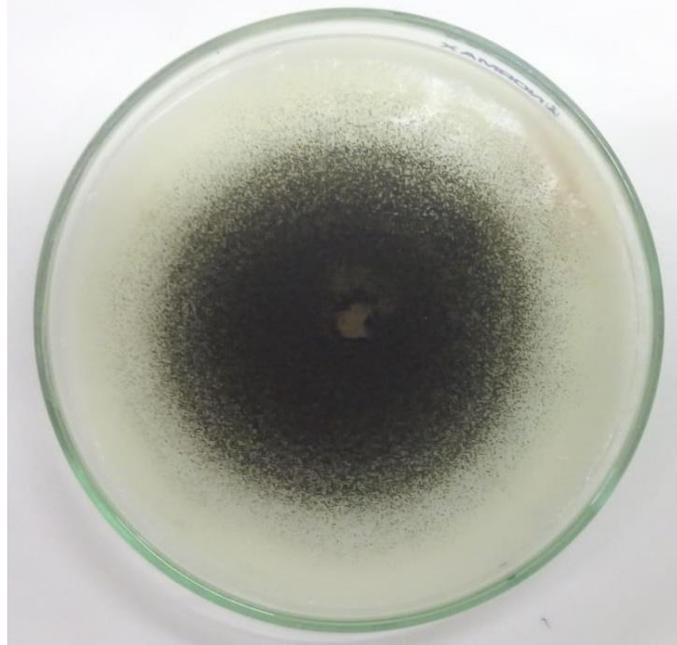
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das características da macro e micromorfologia do isolado fúngico e comparação com as chaves para identificação de espécies do gênero *Aspergillus* foi sugestiva de que a espécie identificada é *Aspergillus niger*. Quanto aos aspectos macroscópicos, as colônias apresentaram crescimento rápido, pulverulento, inicialmente com coloração branca, e posteriormente ficando com coloração negra. (Figura 1). De acordo com Silva et al. (2011) a coloração marrom-escuro é uma característica marcante nas linhagens pertencentes ao gênero *Aspergillus* Section *Nigri*. Eles

afirmam ainda que a espécie *A. niger* é amplamente utilizada em processos biotecnológicos e é a única que tem o "status GRAS" (Geralmente Considerado Seguro) pela "Food and Drug Administration", embora algumas variedades sejam produtoras de micotoxinas.

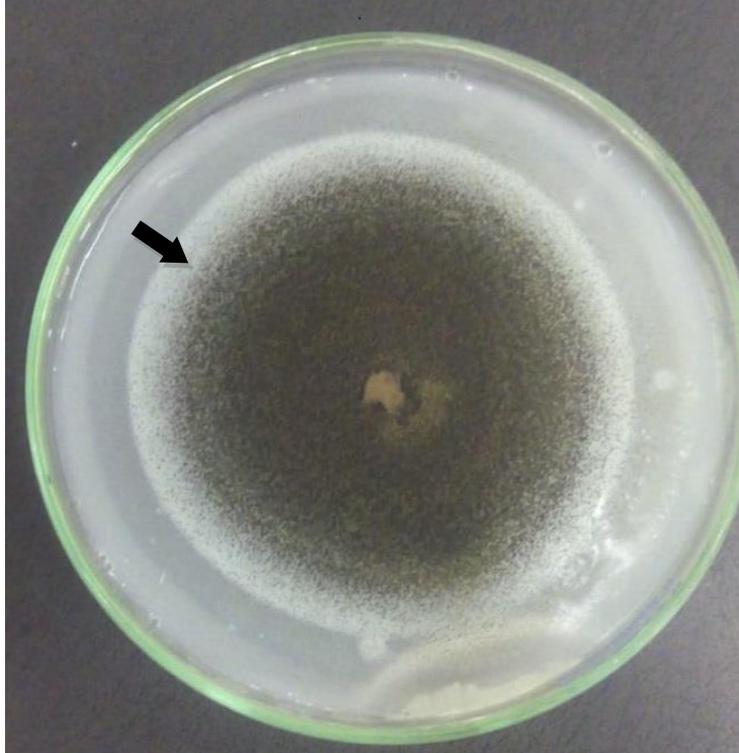
A análise microscópica do isolado fúngico revelou a presença de conídios globosos, rugosos e negros; conidióforos com estipe de parede lisa, longo e hialino; vesículas esféricas e hifas hialinas ou levemente pigmentadas próximo ao ápice. Fiálides apoiadas em métulas marrons.

Figura 1. Aspectos macroscópicos da colônia de *Aspergillus niger* em meio Sabourand-Dextrose-Ágar .



Quanto à capacidade em degradar o meio específico, o isolado apresentou reação positiva para produção de protease, evidenciado pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia (figura 2).

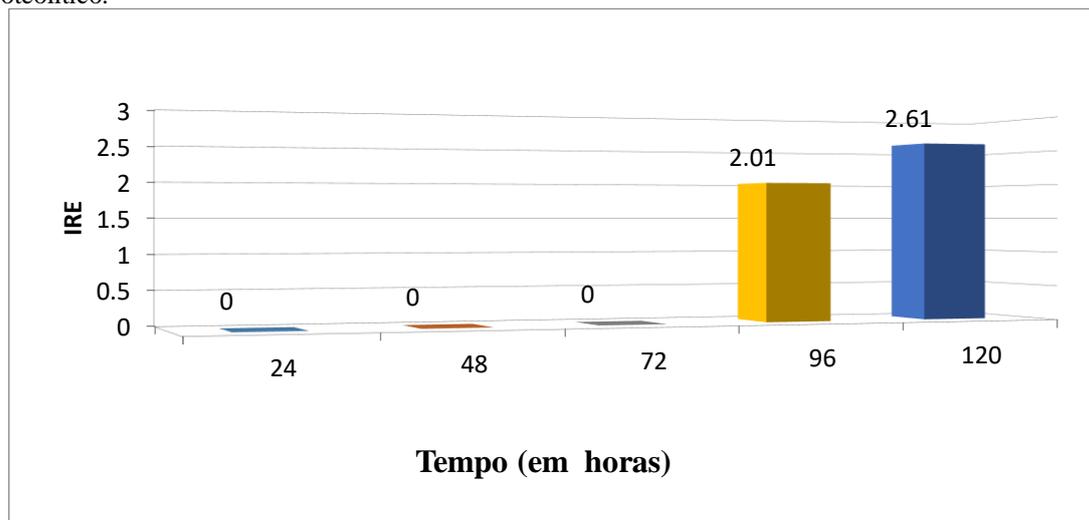
Figura 2. Crescimento de *Aspergillus niger* em placa contendo meio ágar-leite (seta indicando o halo de degradação).



A análise da atividade proteolítica foi expressa pelo Índice Enzimático (I.E), figura 3, durante o período de cinco dias. Pela análise do gráfico pode-se constatar que no quarto (96 h) e quinto dia (120 h), o isolado fungico apresentou I.E maior que 2. Segundo Lealem e Gashe (1994), microrganismos com índice enzimático igual ou maior a dois podem ser considerados potenciais produtores de enzimas. Maffessoni et al. (2017) também evidenciaram uma boa produção de protease em seus estudos com *Aspergillus niger* nas 120 horas iniciais de incubação no meio caseína leite. Segundo Santos et al. (2020), a fermentação em estado sólido é excelente substrato para avaliação enzimática, visto que este tipo substrato demanda pouca umidade e assemelha-se ao ambiente natural do micro-organismo.

Conforme pesquisado por Malathi (1990), nos seus trabalhos com o *A. flavus*, o fungo apresentou capacidade de produzir enzimas proteolíticas. Charles et al. (2008) em sua pesquisa, mostra que o fungo *A. nidulans* foi capaz de produzir enzimas proteolíticas que podem ser utilizadas na biotecnologia. Esses dados corroboram com a capacidade de síntese enzimática de proteases pelo gênero *Aspergillus*.

Figura 3. Gráfico dos valores médios de IRE ao longo do tempo de crescimento da colônia de *Aspergillus niger* em meio proteolítico.



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise das características macroscópicas e microscópicas do isolado fúngico anemófilo coletado na Biblioteca do IFPE – campus Recife, o caracteriza como pertencente à espécie *Aspergillus niger*. A análise enzimática mostrou que o fungo foi capaz de degradar a proteína e o Índice Enzimático superior a 2 o qualificam para ter uma boa performance em processo industriais, contudo faz-se necessários estudos adicionais para verificar a influencia de outros parâmetros e determinar a condição ótima de produção da enzima.

AGRADECIMENTOS

Ao IFPE - *campus* Recife pela da concessão de bolsa do PIBIC- técnico e pela infraestrutura fornecida para realização do presente trabalho.

REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. p.865.

ALMEIDA, T. L. et al. PREVALÊNCIA DE FUNGOS ANEMÓFILOS COLETADOS NA SALA DE ACERVOS DA BIBLIOTECA DO IFPE – CAMPUS RECIFE. *In*: GONÇALVES, F. A. M. F (Org). **Ensino de Ciências e Educação Matemática 2**. Minas Gerais: Atena Editora, 2019, p.177-182.

SOUZA, D. N. M. et al. ISOLAMENTO DA MICOTA ANEMÓFILA PRESENTE NA SALA DE MEMORIAL DA BIBLIOTECA JOSEPH MESEL DO IFPE – CAMPUS RECIFE. *In*: GONÇALVES, F. A. M. F (Org). **Ensino de Ciências e Educação Matemática 2**. Minas Gerais: Atena Editora, 2019, p.149-154.

CHARLES, P. et al. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline

protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v.48, p.347-352, 2008.

LIMA, A. K. S. et al. Fungos isolados da água de consumo de uma comunidade ribeirinha do médio Rio Solimões, Amazonas-Brasil: Potencial patogênico. **Revista Ambiente e Agua**, 2017.

KOSMIDIS, C.; DENNING, D. W. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 91, n. 1077, p.403-410, 2015.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 348-352, 1994.

MAFFESSIONI, C.; SCHUSTER, F.P.W, SCHITTLER, L.; KEMPKA, A.P. Atividade proteolítica de *Aspergillus niger* em meio suplementado com hemácia suína. **27º Seminário de Iniciação Científica**, 2017, p.1-2.

MALATHI, S.; CHAKRABORTY, R. Production of Alkaline Protease by a New *Aspergillus flavus* Isolate under Solid-Substrate Fermentation Conditions for Use as a Depilation Agent. **Applied and Environmental Microbiology**, Madra, v.57, n.3, p.712-716, 1991.

QUEIROZ, C; SOUSA, A. C. B. Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 7 , p.51849-51860, jul. 2020.

SAMSON, R. A. et al. *Introduction to food-borne fungi. Inglaterra: Centraalbureau voor Schimmelculture*, 1996.

SANTOS, A. F. A.; ANDRADE, V. D., CARDOSO, B. A.; SILVA, O. S., OLIVEIRA, R. L., PORTO, A. L. F., PORTO, T. S., PORTO, C. S. Bioprospecção de enzimas produzidas por *Aspergillus tamarii* URM 4634, isolado do solo da Caatinga, por fermentação em estado sólido. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n.5, p.25663-25676 , 2020.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, R. S.;WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: Beynon. R. J and Bond. J.S. (Eds.).Proteolite Enzymes.A Practical Approach. **Oxford University**.1989 Oxford. p. 22-55.

SILVA D.M.; BATISTA, L.R.; REZENDE, E.F.; FUNGARO, M.H.; SARTORI, D.; ALVES, E. Identificação de fungos do gênero *Aspergillus* seção *nigri* utilizando taxonomia polifásica. **Braz J Microbiol.** 42 (2) :761-773, 2011. doi:10.1590/S1517-838220110002000044

SOARES, I. A. et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo Filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700–705, 2010.

TOMEI, J. F. C. et al. Proteases from *Aspergillus fumigatus* Induce Release of Proinflammatory Cytokines and Cell Detachment in Airway Epithelial Cell Lines. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.176, n.1, p.300-303, 1997.