

## Estabilidade de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*

### Stability of proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*

Aline Trindade Stürmer\*

Eliana Tiemi Ito\*\*

Geni Varéa Pereira\*\*\*

Dalva Tomoe Miyagui\*\*\*\*

\* Discente do curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

\*\* Mestranda em Biotecnologia na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

\*\*\* Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (USP). Docente do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL). e-mail: gpvarea@uel.br

\*\*\*\* Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (USP). Docente do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

#### Resumo

Fungos entomopatogênicos produzem enzimas proteolíticas e são empregados no controle biológico de insetos-pragas. Realizou-se um cultivo de *Beauveria bassiana* (cepaCG432) a 25°C/180rpm/5dias/10<sup>6</sup>conídeos/100mL. Após centrifugação, o sobrenadante foi concentrado por ultrafiltração seqüencial e mantido a 4 e 25°C em pH 7,0 e 9,5. A atividade proteolítica foi relacionada com o teor de peptídeos solúveis resultantes da incubação de 200µL do sobrenadante e 500µL de albumina sérica bovina a 37°C/30min, adição de 500µL de TCA10% e centrifugação a 1100xg/15min. As enzimas proteolíticas foram estáveis a 25°C em pH 7,0 durante 10dias, porém demonstraram redução significativa da atividade em pH 9,5 após 3dias.

**Palavras-chave:** *Beauveria bassiana*. Protease. Controle biológico.

#### Abstract

*Entomopathogenic fungi produce proteolytic enzymes which maybe used in the biological control of the insects plague. Beauveria bassiana (cepaCG432) was cultivated at 25 °C/180 rpm/5 days/10<sup>6</sup> conidio/100 mL. After centrifugation, the supernatant was concentrated by sequential ultrafiltration and kept at 4 ° and 25 °C at pH 7.0 and 9.5. Proteolytic activity was related to the soluble peptides content resulting from incubation of 200 µL of supernatant and 500 µL of bovine serum albumin at 37 °C/30 min, followed by addition of 500 µL of TCA (10 %) and centrifugation at 1100 x g/15 min. The enzymes were stable at 25 °C at pH 7.0 over 10 days, however, they demonstrated significant reduction in activity in pH 9.5 after 3 days.*

**Key words:** *Beauveria bassiana*. Protease. Biological control.

## 1 Introdução

O controle biológico é uma técnica cada vez mais requisitada na agricultura para a diminuição do uso de agrotóxicos nocivos aos animais e ao ambiente. Pelo menos 90 gêneros e mais do que 700 espécies de fungos têm sido identificados como entomopatogênicos (FEPs) (KHACHATOURIANS, 1996). Vilcinskas, Matha e Götz (1997) mencionaram que FEPs produzem metabólitos secundários para danificar o reconhecimento celular e as reações de defesa do hospedeiro. Estudos ultra estruturais e histoquímicos sugerem que os mecanismos de infecção por FEPs ocorrem via combinação de degradação enzimática e pressão mecânica (St-LEGER; CHARNLEY; COOPER, 1986).

O fungo *Beauveria bassiana* é um dos entomopatógenos mais amplamente estudados devido ao seu potencial como agente de controle biológico de insetos-pragas. O interesse corrente em *B. bassiana* surgiu por ser o fungo mais comum isolado de insetos mortos e moribundos na natureza (CHAMPLIN; GRULA, 1979) e por seus esporos serem aplicados no campo (URIBE-SOTO et al., 1997).

A infecção por *B. bassiana* é iniciada pelo contato, adesão, invasão do conídio e crescimento do tubo

germinativo sobre a cutícula com concomitante produção de fatores de virulência representados por enzimas extracelulares, principalmente proteases e quitinases. Estas enzimas degradam a estrutura de polímeros da cutícula formada por fibrilas quitinosas embebidas em matriz composta por mais de 50% de proteínas (CHRZANOWSKA; KOLACZKOWSKA, 1998).

Acredita-se que as proteases extracelulares produzidas por *B. bassiana* exerçam papel chave na hidrólise da cutícula para penetração do fungo através do exoesqueleto (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1990). Uma vez na hemocele, o fungo poderá produzir metabólitos tóxicos capazes de causar paralisias (DRESNER, 1950), atuar nos hemócitos (MAZET; HUANG; BOUCIAS, 1994), destruir o balanço fisiológico normal do sistema hospedeiro (SHARMA; AGARWAL; TAJAK, 1994), interagir ou escapar dos mecanismos de defesa do inseto (KHACHATOURIANS, 1996) e, em consequência, proliferar-se utilizando os nutrientes solúveis da hemolinfa (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1990). Bioensaios realizados nas condições de campo demonstraram que o fungo *B. bassiana* colonizou totalmente insetos de broca do café em 8 dias (HARAPRASAD et al., 2001).

Considerando que estudos sobre as características cinéticas das enzimas extracelulares podem ajudar a esclarecer e propor formas de otimizar a virulência, e que estas moléculas biologicamente ativas podem ser isoladas do meio de cultivo de crescimento de FEPs (St-LEGER, 1995), o presente trabalho teve o objetivo de estudar a atividade e a estabilidade de proteases extracelulares produzidas pela cepa CG447 de *B. bassiana* em diferentes condições de pH a 4 e 25°C.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Microrganismo

Utilizou-se o fungo *Beauveria bassiana* cepaCG432 do Banco de Entomopatógenos do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, cedido pela EMBRAPA/Cenargen e isolado de adultos da família Membracidae (Homoptera) em Natal-Rio Grande do Norte. O fungo foi mantido em meio de cultivo sólido (MSBb) contendo 20g de ágar; 10g de D-glicose anidra; 5g de extrato de levedura; 1,58g de NaNO<sub>3</sub>; 1,05g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1g de KCl; 0,6g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 0,36g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e água deionizada para 1 litro (ALVES, 1998), a 25°C/12h fotofase/10 dias.

### 2.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado pela transferência de conídios do meio de cultivo MSBb, em água destilada com Tween 20 (1gota/300ml). A suspensão de microrganismos foi ajustada a 10<sup>8</sup> conídios/mL, através de contagem em câmara de Neubauer.

### 2.3 Cultivo de *B. bassiana*

O cultivo do fungo foi realizado com 1% de inóculo em meio de cultivo líquido de mesma composição do meio de cultivo sólido, porém sem o ágar (MLBb) em frascos erlenmeyer com capacidade de 250 mL a 25°C/180 rpm/5 dias (ITO, 2003).

### 2.4 Obtenção dos extratos de proteases extracelulares

O cultivo foi filtrado a vácuo, dialisado contra tampão fosfato 5mM, pH 7/4°C/24 horas, denominado extrato bruto de protease e submetido à ultrafiltração seqüencial em membranas com limite de exclusão molecular iguais a 100, 30 e 3 kDa (Millipore) sob pressão de nitrogênio, resultando em extratos protéicos denominados R100, R30 e R3, respectivamente.

### 2.5 Determinação da atividade das proteases

A atividade das proteases foi determinada no extrato bruto e nos extratos da ultrafiltração. A reação foi iniciada pela adição de 200 mL da amostra diluída adequadamente, 100 mL do tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7,0 ou tampão Glicina-NaOH 5 mM pH 9,5 e 250 mL da solução de substrato soro albumina bovina 5mg/mL preparada no mesmo tampão da reação. Após 30 minutos a 37°C, a incubação foi interrompida pela adição de 500 mL de ácido tricloroacético (TCA) gelado a 10%, centrifugação a 1.100xg/15 minutos (Centrífuga

Macro Ev04 – Evlab) e a atividade de proteases, correspondente ao teor de peptídeos solúveis resultantes da ação destas, foi determinada em 300 mL do sobrenadante pelo método espectrofotométrico de Hartree (1972), através da leitura da absorvância a 650 nm (espectrofotômetro UV Vis, Metrolab 1700). A atividade das proteases foi expressa como valores de absorvância resultantes da liberação de peptídeos solúveis por mL, de extrato enzimático nas condições da reação.

### 2.6 Determinação de proteínas

O teor de proteínas dos extratos enzimáticos foi determinado por espectrofotometria através do método de Hartree (1972) e relacionadas com uma curva de calibração a concentrações de 50 a 175 mg, a partir de uma solução de soro albumina bovina 1 mg/mL, através da equação de regressão.

### 2.7 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade das proteases extracelulares

A atividade das proteases foi determinada no extrato bruto obtido no 5º dia de cultivo em soluções tampão 100 mM pH 3,5 a 5,5 (tampão acetato), 6,0 a 8,0 (tampão fosfato) e 8,5 a 11,0 (tampão Glicina NaOH).

A estabilidade das proteases foi avaliada no extrato bruto e nos extratos R30 e R3 mantidos a 4°C e 25°C em pH 7,0 e 9,5. Diariamente e durante 10 dias, uma alíquota dos extratos era avaliada quanto à atividade proteases, conforme descrito no item 2.5.

## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Obtenção dos extratos de proteases extracelulares

A técnica da ultrafiltração separou 82% e 26% de atividade das proteases extracelulares de *B. bassiana* nos extratos R30 e R3, respectivamente (Tabela 1). Tais extratos apresentaram aumento dos valores da atividade específica em relação ao extrato bruto iguais a 7,5 e 3,7 vezes conforme revelado pelos respectivos fatores de purificação.

A Tabela 1 mostra também que o filtrado remanescente da ultrafiltração seqüencial (fração F3), apresentou inexpressivo fator de purificação de proteases, motivo pelo qual não foi selecionada para os estudos das propriedades cinéticas subseqüentes.

Os resultados sugerem que a cepa de *B. bassiana* estudada produziu e secretou para o meio de cultivo proteases com tamanhos moleculares em torno de 30 kDa. Estes resultados coincidem com os relatados pela literatura como serino-proteinases tipo quimiotripsina com peso molecular estimado em 32 kDa (CHRZANOWSKA; BANOS; KOLACZKOWSKA, 2001) e 31,5 kDa (URTZ; RICE, 2000) e uma protease extracelular com ação endopeptidase de 35 kDa (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1987).

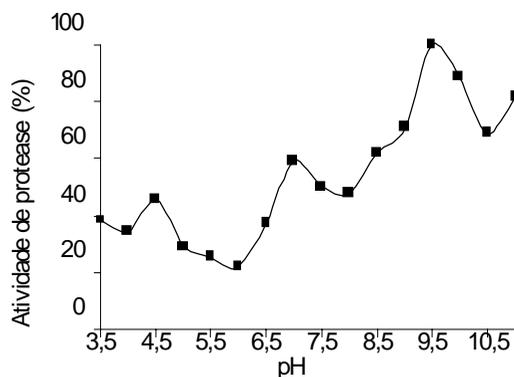
### 3.2 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade das proteases extracelulares

Os resultados mostraram que as proteases do extrato bruto apresentaram elevada atividade nos valores de pH 4,5; 7,0 e 9,5, sugerindo a produção de, pelo

**Tabela 1.** Separação de proteases extracelulares de *B. bassiana*.

Etapa da separação	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (AT)	Atividade específica (AT/prot.)	Rendimento de atividade (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	670	434,83	1367	3,14	100	1
Ultrafiltração						
R100	10	10,5	19	1,81	1,4	0,6
R30	15	47,8	1125	23,54	82	7,5
R3	10	30,75	356	11,58	26	3,7
F3	532	242,06	218	0,90	15,95	0,3

menos, três proteases distintas (Gráfico 1). Urtz e Rice (2000) obtiveram uma protease com atividade ótima em pH 9,5, Kucera e Samsinakova (1968) em pH 6,5 e 9,0, e Bidochka e Khachatourians (1987) em pH 8,5 a partir de diferentes cepas de *B. bassiana*.



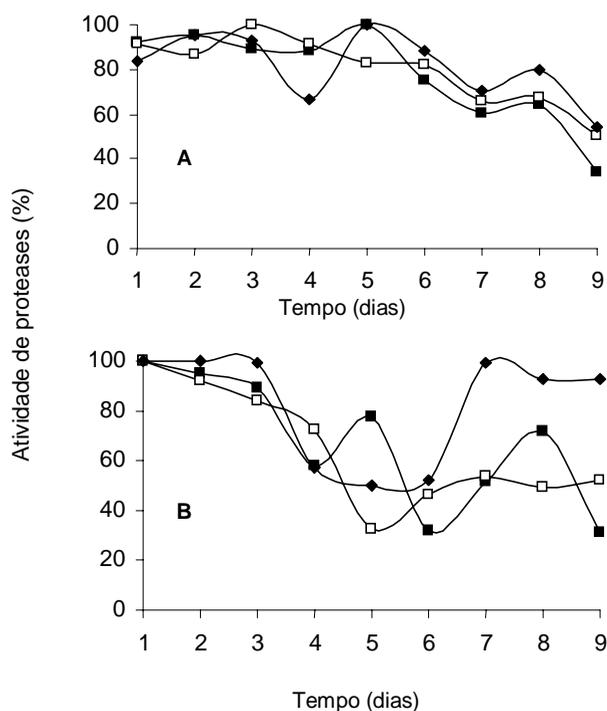
**Gráfico 1.** Efeito do pH sobre a atividade de proteases extracelulares de *B. bassiana* presentes no extrato bruto obtido no 5º dia de cultivo em soluções tampão 100mM pH 3,5 a 5,5 (tampão acetato), 6,0 a 8,0 (tampão fosfato) e 8,5 a 11,0 (tampão Glicina-NaOH).

Comparando-se os resultados apresentados no Gráfico 2, observa-se que os extratos bruto, R30 e R3 mantidos a 25°C apresentaram perfis de estabilidade semelhantes entre si no pH 7,0 (Gráfico 2A), enquanto que no pH 9,5 (Gráfico 2B), ocorreu uma variação com resultados mais elevados a partir do quinto dia, provavelmente resultante da autodegradação das proteases, conforme já referida por Urtz e Rice (2000), que utilizaram o inibidor PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) para prevenir a decomposição de uma amostra de protease de *B. bassiana* durante a realização de métodos de determinação de peso molecular e pH isoelétrico.

Os mesmos extratos mantidos a 4°C não apresentaram alterações da atividade durante todo o período experimental (dados não mostrados).

A análise do Gráfico 2 (A e B) permite ainda observar que as proteases mantiveram 80% da atividade em pH

7,0 até o sexto dia do experimento, e que em pH 9,5, as proteases permaneceram neste percentual de atividade somente até o terceiro dia. As proteases extracelulares de *B. bassiana* isoladas por Urtz e Rice (2000) apresentaram pH ótimo alcalino entre 7,5 a 9,5, por um período de até oito horas de incubação a temperatura de 25°C.



**Gráfico 2.** Estabilidade de proteases produzidas por *B. bassiana* do extrato bruto (n), R30 (o) e R3 (®) mantidos em tampão fosfato 5 mM pH 7 (A) e tampão Glicina-NaOH 5 mM pH 9,5 (B) a 25°C.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a cepa de *B. bassiana*, isolada em território brasileiro, produziu proteases extracelulares com características de atividade semelhantes àquelas já

identificadas em outros países, e poderão contribuir em estudos posteriores de purificação, determinação das características estruturais e propriedades cinéticas, e seleção de linhagens de cepas de *B. bassiana* com maior virulência e rápido desenvolvimento de infecções, tornando-a mais eficaz como um agente bioinseticida de interesse ecológico e econômico.

## Referências

- ALVES, S.B. *Controle microbiano de insetos*. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, 1163p.
- BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Purification and Properties of an Extracellular Protease Produced by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 53, n. 7, p. 1679-1684, Jul. 1987.
- \_\_\_\_\_. Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 56, n. 3, p. 362-370, Nov. 1990.
- CHAMPLIN, F.R.; GRULA, E.A. Noninvolvement of beauvericin in the entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 37, n. 6, p. 1122-1126, June 1979.
- CHRZANOWSKA, J.; KOLACZKOWSKA, M. Production of extracellular proteolytic enzymes by *Beauveria bassiana*. *Acta Mycologica*, Warsaw, v. 33, n. 2, p. 277-285, 1998.
- CHRZANOWSKA, J.; BANAS, J.; KOLACZKOWSKA, M. Purification and Characterization of *Beauveria bassiana* Proteinases. *Acta Biotechnologica*, Berlin, v. 21, n. 1, p. 73-81, 2001.
- DRESNER, E. The toxic effect of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on insects. *Journal of the New York Entomology Society*, Lawrence, Kan, v. 58, n. 4, p. 269-278. 1950.
- HARAPRASAD, N. *et al.* *Beauveria bassiana* – A potential mycopesticide for the efficient control of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in India. *Biocontrol Science and Technology*, Abingdon, v. 11, n. 2, p. 251-260, Apr. 2001.
- HARTREE, E.S. Determination of protein: a modification of Lowry methods that gives a lines photometric response. *Analytical Biochemistry*, San Diego, v. 9, n. 3, p. 422-427, 1972.
- ITO, E. T. *Estabilidade e perfil de produção de proteases pelo fungo entomopatogênico Beauveria bassiana (BALS.) VUILL.* 2003. Monografia (Especialização em Bioquímica Aplicada) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- KHACHATOURIANS, G. G. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In: HOWARD, D. E.; MILLER, J. D. (Ed.). *The Mycota VI. Human and relationships*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1996. p. 331-363.
- KUCERA, M.; SAMSINAKOVA, A. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 12, p. 316-320, 1968.
- MAZET, I.; HUANG, S.Y.; BOUCIAS, D.G. Detection of toxic metabolites in the hemolymph of *Beauveria bassiana* infected *Spodoptera exigua* larvae. *Experientia*, Basel, v. 50, n. 2, p. 142-147, Feb. 1994.
- SHARMA, S.; AGARWAL, G.P.; TAJAK, R.C. Pathophysiological alterations caused in *Heliothis armigera* by toxic metabolites of *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. *Indian Journal of Experimental Biology*, New Delhi, v. 32, n. 3, p. 168-171, 1994.
- St-LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 47, n. 2, p. 167-177, Mar. 1986.
- St-LEGER, R.J. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 73, suppl. 1, p. S1119-S1125, 1995.
- URIBE-SOTO, S. et al. Producción de beauvericina por *Beauveria bassiana* 9401 asilado sobre *Lutzomyia* sp. (Diptera: Psychodidae) vectores de Leishmaniosis. *Revista Colombiana de Entomología*, Bogotá, v. 23, n. 3/4, p. 137-141, Jul./Dic. 1997.
- URTZ, B.E.; RICE, W.C. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*, Cambridge, v. 104, pt. 2, p. 180-186, 2000.
- VILCINSKAS, A.; MATHA, V.; GÖTZ, P. Inhibition of Phagocytic Activity of Plasmotocytes Isolated from *Galleria mellonella* by Entomogenous Fungi and Their Secondary Metabolites. *Journal Insect Physiology*, London, v. 43, n. 5, p. 475-483, May 1997.