

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

Daiana Bortoluzzi Baldoni

**PROSPECÇÃO DE FUNGOS PARA PRODUÇÃO DE QUITINASES
POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Santa Maria, RS
2016

Daiana Bortoluzzi Baldoni

**PROSPECÇÃO DE FUNGOS PARA PRODUÇÃO DE QUITINASES POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciência do Solo**.

Orientadora: Prof. Dr. Zaida Inês Antonioli

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bortoluzzi Baldoni, Daiana
Prospecção de fungos para produção de quitinases por
fermentação em estado sólido / Daiana Bortoluzzi Baldoni.-
2016.
82 p.; 30 cm

Orientadora: Zaida Inês Antonioli
Coorientador: Rodrigo Josemar Seminoti Jacques
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência do Solo, RS, 2016

1. Fungos filamentosos 2. Quitina 3. Bioprocesso I.
Antonioli, Zaida Inês II. Seminoti Jacques, Rodrigo
Josemar III. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Daiana Bortoluzzi Baldoni. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: daianabio@hotmail.com

Daiana Bortoluzzi Baldoni

**PROSPECÇÃO DE FUNGOS PARA PRODUÇÃO DE QUITINASES POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Área de concentração Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciência do Solo**.

Aprovado em 22 de julho de 2016:

Zaida Inês Antonioli, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Andressa de Oliveira Silveira, Dra. (UFSM)

Marcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)

Marcelo Aloisio Sulzbacher, Dr. (UFSM)

Caroline Borges Bevilacqua, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS

2016

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais Iracema e Valter, exemplos de honestidade e perseverança.

Ao meu avô José Valentim in memoriam.

A minha querida Rosália Montagner in memoriam.

Eu dedico

Agradecimentos

A Deus por colocar em meu caminho tantas pessoas e oportunidades maravilhosas nesse período de aprendizado;

A minha Orientadora e mãe científica Zaida Inês Antonioli pela orientação, tranquilidade e palavras de otimismo e esperança;

Ao meu co-orientador Rodrigo Josemar Seminoti Jacques pela orientação, incentivo e confiança;

A Professora Andressa de Oliveira Silveira pela orientação, força e amizade;

Aos meus pais pela compreensão e carinho em todos os momentos dessa caminhada; pelo incentivo na realização desse grande sonho; por toda educação que me proporcionaram;

Aos meus irmãos Alexandre, Élbio, Elizandro e cunhadas pelo apoio;

Ao meu namorado e fiel amigo André Carnieletto Dotto pelo amor incondicional e por nunca me deixar desistir nos momentos mais difíceis dessa longa jornada;

Aos meus carinhosos Choquito e Milka, sem dúvida mudaram minha vida;

Aos meus amigos que tornaram meus dias mais leves oferecendo aquele abraço amigo e força para continuar: Ângela Denise Hubert Neufeld, Caroline Borges Bevilacqua, Daiane Fiuza Montagner, Rosângela Gonçalves Nunes, Daniel Eckardt Pazzini, Ana Paula Zemolin e Manoeli Lupatini;

Aos amigos iluminados que ganhei na pós graduação: Angélica Rossana C. de Souza, Andressa de Oliveira Silveira, Antonio Carlos Bassaco, Caroline Borges Bevilacqua, Daiane Fiuza Montagner, Edicarla Trentin, Luana Orlandi, Liziane Barassuol Morandini, Sabrina de Fátima Barbosa Dahmer e Taís Backes;

Ao Professor Marcio Antonio Mazutti, Rafael Ferraz e a Cristiane Bianchi Loureiro pelos ensinamentos em planejamento de experimentos e otimização de processos;

Ao professor Juliano T. Boldo pela orientação e contribuições;

Aos alunos de IC Luana Orlandi e Valdemir Bittencourt pela ajuda nas etapas experimentais;

A Caroline Borges Bevilacqua e Nariane Trindade pela ajuda no Laboratório de Biologia Molecular.

A Juliane Schmitt, Valéria Ortaça, Anderson Moro, Alex Muraro por toda ajuda nos experimentos com nematoides. Sabemos muito bem da importância desse trabalho em equipe!

A equipe do Laboratório de Biologia do Solo e Microbiologia do Ambiente - UFSM pelo excelente convívio!

A Mirian Barbieri pelo auxílio no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos.

A Liziane Barassuol Morandini pela amizade e parceria nos trabalhos com metabólitos secundários (dados não apresentados nessa tese);

Ao Pós-doutorando Marcelo Aloisio Sulzbacher pela amizade e revisão dos manuscritos;

Ao secretário do PPGCS Heverton pelo excelente trabalho que desenvolve junto a secretaria do PPG;

Aos meus colegas de trabalho da Universidade Federal do Pampa-SG pelo apoio;

Aos meus amigos não citados acima, que me deram força e luz para continuar nessa caminhada;

Ao programa de Pós Graduação em Ciência do Solo pela excelência e qualidade de ensino.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de Bolsa de Doutorado;

A Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, pela concessão de horário especial para realização do curso de Doutorado no período que trabalhei na Instituição;

A Universidade Federal do Pampa campus São Gabriel pela concessão de horário especial para realização das últimas etapas do curso de Doutorado;

Registro aqui minha eterna gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e aprendizado.

Não me diga onde chegaste, mas de onde partiste.

Assim posso mensurar a dimensão de seu feito.

Provérbio Chinês

“Eu disse a uma amiga:

– A vida sempre superexigiu de mim.

Ela disse:

– Lembre-se que você também superexige dela.

Sim.”

Clarice Lispector

Não há saber mais ou saber menos: Há saberes diferentes.

Paulo Freire

RESUMO

PROSPECÇÃO DE FUNGOS QUITINOLÍTICOS E PRODUÇÃO DE QUITINASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Autora: Daiana Bortoluzzi Baldoni
Orientadora: Zaida Inês Antonioli

Os fungos são organismos que apresentam elevada importância, pois são os decompositores primários dos ecossistemas terrestres, possuem funções ecológicas críticas na ciclagem de nutrientes e nas associações com outros organismos. A diversidade metabólica dos fungos desperta grande interesse para exploração tecnológica, pois novos produtos naturais estão continuamente sendo produzidos por estes. Entretanto, apenas uma pequena parte da diversidade fúngica tem sido cultivada e selecionada como recurso biotecnológico. Grande parte desse potencial dos fungos se deve a diversidade da produção de enzimas hidrolíticas, como as quitinases, que podem ser utilizadas para diversos fins. As quitinases hidrolisam as ligações β -1,4 no polímero de quitina, resultando na liberação de quitina-oligômeros. Essas enzimas são estudadas para várias aplicações, como na produção de bioinseticidas para uso na agricultura. Apesar dessa relevância, alguns fatores restringem uma exploração comercial mais ampla das quitinases, como a escassez de microrganismos com altas taxas de produção, o alto custo de produção, e a baixa atividade e estabilidade das quitinases disponíveis. Os objetivos deste estudo foram isolar e identificar fungos produtores de quitinases, avaliar a produção desta enzima em fermentação em estado sólido (FES), otimizar a produção de quitinases pelo isolado maior produtor desta enzima, avaliar diferentes fontes de quitina para a produção de quitinase, testar diferentes solventes para a extração das enzimas produzidas durante o processo fermentativo e avaliar a efetividade do extrato enzimático e do controle biológico na mortalidade dos nematoides fitopatogênicos *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*. Foram isolados 51 fungos a partir do exoesqueleto de percevejos *Tibraca limbativentris* em 5 pontos de coleta distribuídos no Rio Grande do Sul, Brasil. Dos isolados, 50 produziram quitinases e dez foram selecionados como os melhores produtores desta enzima, em FES utilizando farelo de trigo e solução de macro e micro nutrientes. Esses dez isolados foram identificados pela região ITS1-5.8S-ITS2 do nrDNA. O isolado selecionado *Trichoderma* sp. UFSMQ40 com 13,07 U gds⁻¹ de quitinase, seguido dos isolados *Fusarium* sp. UFSMQ32 (11,35 U gds⁻¹), *Trichoderma* sp. UFSMQ24 (10,11 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ18 (10,05 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ1 (9,84 U gds⁻¹), *Lecanicillium* sp. UFSMQ6 (9,71 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ27 (9,11 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ12 (8,92 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ49 (8,16 U gds⁻¹) e *Fusarium* sp. UFSMQ17 (8,05 U gds⁻¹) apresentaram elevada produção de quitinases em FES. Após essa etapa, o isolado *Trichoderma* sp. UFSMQ40 foi identificado como *Trichoderma koningiopsis* pela amplificação do fragmento do gene *tef1*. Como resultado da otimização, a maior produção de quitinases por este fungo em FES foi de 10,76 U gds⁻¹ e ocorreu quando foi utilizado no substrato farelo de trigo: 55% de umidade, 15% de quitina coloidal, 100% de água de maceração de milho, dois discos de inóculo à 30 °C por 72 h. A quitina coloidal, em pó e em flocos, podem ser utilizadas como indutores enzimáticos sem alterar a produção de quitinase pelo isolado. A utilização da razão 1:15 de tampão citrato-fosfato foi o melhor extrator avaliado para as quitinases produzidas por este isolado em FES. O isolado *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 apresenta potencial para a produção industrial de quitinases utilizando resíduos agroindustriais como substratos e elevado efeito nematicida contra *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*.

Palavras-Chave: fungos filamentosos. quitina. bioprocesso.

ABSTRACT

PROSPECTION OF CHITINOLYTIC FUNGI AND CHITINASE PRODUCTION IN SOLID STATE FERMENTATION

AUTHOR: DAIANA BORTOLUZZI BALDONI

ADVISOR: ZAIDA INÊS ANTONIOLLI

Fungi are organisms that have high importance as they are the primary decomposers of all terrestrial ecosystems and have critical ecological functions in nutrient cycling and associations with other organisms. Metabolic diversity of fungi aroused great interest for technological research, as new natural products are continually being produced by fungi. However, only a small part of fungal diversity has been grown and selected as biotechnology resource. Much of the potential of fungi is due to the diversity in production of hydrolytic enzymes such as chitinase, which can be used for various purposes. The chitinases hydrolyze the β -1.4 linked in chitin polymer resulting in the release of chito-oligomers. These enzymes are studied for numerous applications such as the production of biopesticides for agriculture use. Despite this relevance, some factors limit a wider commercial use of chitinases such as the lack of organisms with high production rates, high production cost, and low activity and stability of available chitinases. The objectives of this study were to isolate and identify producers of chitinase fungi, evaluate the production of this enzyme in solid state fermentation (SSF), optimize the production of chitinase by largest producer in SSF, evaluate different sources of chitin for the production of chitinase and various solvents for extraction of the enzymes produced during the fermentation process and evaluate the effectiveness of the enzyme extract and biological control in mortality of phytopathogenic nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. 51 fungi were isolated from the exoskeleton of *Tibraca limbativentris* bugs in 5 collection points distributed in Rio Grande do Sul, Brazil. From the isolated, 50 produced chitinases and ten were selected as the best producers of this enzyme in SSF utilizing wheat bran and macro- and micro-nutrients solution. The ten isolated were identified by ITS1-5.8S-ITS2 nrDNA region. The isolated selected *Trichoderma* sp. UFSMQ40 with 13.07 U gds⁻¹ of chitinase, followed by the isolated *Fusarium* sp. UFSMQ32 (11.35 U gds⁻¹), *Trichoderma* sp. UFSMQ24 (10.11 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ18 (10.05 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ1 (9.84 U gds⁻¹), *Lecanicillium* sp. UFSMQ6 (9.71 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ27 (9.11 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ12 (8.92 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ49 (8.16 U gds⁻¹) and *Fusarium* sp. UFSMQ17 (8.05 U gds⁻¹) showed high production of chitinase in SSF. Subsequently this step, the isolated *Trichoderma* sp. UFSMQ40 was identified as *Trichoderma koningiopsis* by amplification of the *tefl* gene fragment. As an optimization result the increased production of chitinases by this fungus in SSF was 10.76 U gds⁻¹ and occurred when the wheat bran substrate was used with 55% moisture, 5 g of corn steep liquor, two inoculum disks at 30 °C for 72 h. The colloidal chitin, powders and flakes, should be used as enzyme inducers without altering the production of the chitinase isolated. The use of 75 mL of citrate-phosphate buffer was the best extractor evaluated for the chitinase produced by this isolated in SSF. The *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 presents potential for the industrial production of chitinase using agricultural residues as substrates and high nematicide effect against *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*.

Keywords: filamentous fungi. chitin. bioprocess.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	HIPÓTESE.....	11
3	OBJETIVOS.....	12
3.1	OBJETIVO GERAL	12
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
4.1	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS.....	13
4.1.1	<i>Trichoderma</i>.....	13
4.1.2	<i>Lecanicillium</i>.....	15
4.1.3	<i>Fusarium</i>	16
4.2	ENZIMAS QUITINOLÍTICAS	17
4.3	FUNÇÕES BIOLÓGICAS DAS QUITINASES EM FUNGOS FILAMENTOSOS	19
4.4	RESÍDUOS QUITINOSOS.....	20
4.5	APLICAÇÕES DAS ENZIMAS QUITINOLÍTICAS	22
4.6	PRODUÇÃO DE QUITINASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	25
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
6	ARTIGO I.....	35
7	ARTIGO II.....	60
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países com a maior megadiversidade do mundo (LEWINSOHN; PRADO, 2005), sendo o habitat de 10% do número total das espécies conhecidas de animais, plantas e fungos (ALHO, 2008). A diversidade biológica é um recurso importante com potencial para o desenvolvimento de ferramentas sustentáveis para gestão de ecossistemas e oportunidades de bioprospecção. Apesar do reconhecimento, a diversidade microbiana brasileira é considerada como amplamente desconhecida em relação a outros grupos, como os animais e as plantas (PYLRO et al., 2013). Nesse sentido, há um vasto campo propício à descoberta e a utilização biotecnológica de novas espécies que habitam ambientes naturais ou manejados (MANFIO, 2003; PERES; VERCILLO; DIAS, 2011).

Estima-se que existam no Brasil 150.000 a 264.000 espécies de fungos (LEWINSOHN; PRADO, 2005). Porém, apenas uma pequena parcela, 5.719 espécies, foram devidamente registradas até o ano de 2015 (MAIA et al., 2015). Essas espécies estão distribuídas em 1.246 gêneros, havendo predomínio de espécies dos Filos Basidiomycota (2.741 espécies) e Ascomycota (1.881 espécies). Além disso, os Estados de São Paulo (1.846), Pernambuco (1.611) e Rio Grande do Sul (1.377 espécies) são os considerados com maior diversidade de espécies fúngicas registradas no país (MAIA et al., 2015).

O grande desafio para o uso racional da biodiversidade brasileira é, sem dúvida, como transformar um enorme patrimônio genético natural em riqueza biotecnológica (PYLRO et al., 2013). Sabe-se que, os fungos apresentam uma ampla gama de aplicações, principalmente por sua elevada produção de enzimas hidrolíticas, que podem ser utilizados nos mais variados fins (CHAVAN; DESHPANDE, 2013).

Os fungos são organismos que apresentam elevada importância, pois são os decompositores primários em todos os ecossistemas terrestres e possuem funções ecológicas críticas no ciclo do carbono e na ciclagem de nutrientes. Do mesmo modo, são essenciais para a sobrevivência de muitos grupos de organismos os quais possuem associações com estes microrganismos. Entretanto, muitas espécies fúngicas são patógenos de humanos, plantas e aos diversos grupos de animais. Além disso, também possuem significativo potencial para utilização na agricultura e apresentam potencial para produção biológica e biotecnológica (BAKER et al., 2008; CHAMBERGO; VALENCIA, 2016).

Os fungos filamentosos são considerados um importante recurso genético, pois podem sintetizar uma vasta variedade de compostos de interesse econômico, incluindo peptídeos, enzimas, vitaminas, ácidos orgânicos, antibióticos, e outras substâncias de relevância na

indústria farmacêutica, alimentar, de alimentação animal, química e biotecnológica (ANDERSEN, 2014; LANGE, 2014; CHAMBERGO; VALENCIA, 2016) . Ao mesmo tempo, os fungos tem a capacidade de degradar, transformar e mineralizar compostos químicos orgânicos, sendo considerados como fonte potencial para remediação e decomposição de poluentes ambientais (SETTE; PAGNOCCA; RODRIGUES, 2013). Diante do exposto, os fungos filamentosos são considerados como eficientes células-fábricas por sua diversidade metabólica, elevada capacidade de produção e eficiência de secreção (KRULL et al., 2013).

Grande parte do potencial biotecnológico dos fungos se deve a diversidade da produção de enzimas hidrolíticas secretadas em meio extracelular como as lipases, proteases, quitinases, amilases, celulasas, hemicelulasas e as xilases, entre outras (CHAVAN; DESHPANDE, 2013). Essas enzimas, além da função nutricional, apresentam diferentes funções biológicas no ciclo de vida do fungo.

As quitinases são enzimas produzidas por fungos, plantas, bactérias, vírus e animais (KARTHIK; AKANKSHA; PANDEY, 2014). Entretanto, algumas espécies de fungos apresentam uma elevada taxa de produção dessas enzimas, em face disso, torna-se muito atrativa a sua utilização em estudos de bioprocessos.

Nesse sentido, existe um crescente interesse na produção das quitinases fúngicas, devido sua extensa possibilidade de emprego em várias áreas da pesquisa, como na produção de quitoooligosacarídeos bioativos na área farmacêutica, na produção de biopesticidas e na inibição de fitopatógenos para agricultura; na produção de protoplastos para a engenharia genética e na bioconversão de resíduos quitinosos em etanol para indústria de biocombustíveis.

Apesar dessa relevância, alguns fatores restringem uma exploração comercial mais ampla das quitinases, dentre os quais destaca-se a escassez de microrganismos com altas taxas de produção, o alto custo de produção, e a baixa atividade e estabilidade das quitinases purificadas disponíveis (BINOD et al., 2007a; SURESH; KUMAR, 2012; HALDER et al., 2013). Diante disso, torna-se de suma importância estudos que visem à prospecção de espécies de fungos quitinolíticos a partir da seleção de estirpes com elevado potencial de produção dessas enzimas. Além disso, é necessário o desenvolvimento de um processo de baixo custo de produção de quitinases.

2 HIPÓTESE

Os fungos isolados a partir de percevejos *Tibraca limbativentris* Stal apresentam elevada produção de quitinases e essa produção pode ser aumentada pela otimização das condições do processo fermentativo, utilizando farelo de trigo e água de maceração de milho como substrato para o crescimento dos fungos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar fungos filamentosos capazes de produzir quitinases em fermentação em estado sólido e otimizar a produção de quitinases utilizando resíduos agroindustriais como substrato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) isolar fungos produtores de quitinases a partir de percevejos *Tibraca limbativentris* Stal;
- b) selecionar os isolados fúngicos com elevado potencial de produção de quitinases em fermentação em estado sólido;
- c) identificar com ferramentas de biologia molecular os isolados que apresentaram as maiores produções de quitinases em fermentação em estado sólido;
- d) otimizar a produção de quitinases em fermentação em estado sólido do melhor isolado selecionado, utilizando farelo de trigo e água de maceração de milho como substrato para o seu desenvolvimento;
- e) avaliar diferentes fontes de quitina como indutor para a produção da quitinase;
- f) avaliar diferentes solventes para a extração das enzimas produzidas durante o processo fermentativo.
- g) avaliar a efetividade do extrato enzimático e do controle biológico na mortalidade dos nematoides *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos são distribuídos em 8 Filos: Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Entomophthoromycota, Glomeromycota, Neocallimastigomycota e Zygomycota (HIBBETT et al., 2007). Entre esses, os mais estudados para utilização biotecnológica são relacionados aos Ascomycota e Basidiomycota. Os gêneros *Fusarium*, *Lecanicillium* e *Trichoderma* pertencem ao Filo Ascomycota, são muito utilizados em biotecnologia e amplamente estudados pelo seu potencial de uso em diversas áreas da pesquisa.

4.1.1 *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* foi descrito por Persoon em 1794 e inclui as espécies extensivamente estudadas em diversas aplicações, como no controle de fitopatógenos. Nesses estudos, foram reportadas elevada eficiência da utilização de espécies no controle biológico (ANEES et al., 2010; FONTENELLE et al., 2011; LOPES et al., 2012; WIDMER, 2014). No mesmo sentido, o isolado *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf & Nirenberg, apresentou efetivo potencial na supressão de fungos causadores da podridão parda em cacauzeiro. Essa supressão foi causada pela produção das enzimas laminarinase e carboximetilcelulose, capazes de degradar a parede celular do fungo *Phytophthora* sp. Bary durante o micoparasitismo (TONDJE et al., 2007). Esta associação mostra o potencial dos fungos em produção de enzimas importantes para o uso em sistemas ambientalmente amigáveis.

Devido a versatilidade metabólica das espécies de *Trichoderma*, alguns estudos avaliaram a eficiência desses isolados no controle de outras pragas agrícolas, como os nematoides fitopatogênicos. Um exemplo importante é o *Trichoderma longibrachiatum* Rifai eficaz no controle do estágio juvenil J2 (mais que 88% de paralisação) do nematoide *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood (ZHANG; GAN; XU, 2015). Além disso, os isolados *Trichoderma harzianum* Rifai e *Trichoderma viride* Pers. suprimiram a reprodução do nematoide *Meloidogyne javanica* e estimularam o crescimento de plantas de tomate (AL-HAZMI; TARIQJAVEED, 2016).

A importância do *Trichoderma* não é apenas no controle de patógenos, mas também na produção vegetal. Estudo realizado por Moreno et al. (2009) demonstraram que um isolado

de *Trichoderma koningiopsis* (Samuels, C. Suárez e H.C. Evans) foi capaz de promover o crescimento e induzir a resistência de plantas de tomate contra o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* Schltdl. Existe uma boa variabilidade na capacidade de ação antagonista e/ou bioestimulante entre os isolados do gênero *Trichoderma*, podendo haver predomínio de uma atividade ou de outra em cada isolado (LÓPEZ-BUCIO; PELAGIO-FLORES; HERRERA-ESTRELLA, 2015). Nesse sentido torna-se de suma importância estudos de isolamento, identificação e seleção de novos isolados fúngicos para otimizar a sua utilização.

Os isolados de *Trichoderma* também são apontados como importantes fontes de produção de enzimas hidrolíticas de interesse industrial, apresentando elevadas taxas de produção. Um exemplo é o isolado de *Trichoderma koningiopsis* que produz a enzima Endo-1,4- β -Glucanases em meio de cultivo semi-sintético com serragem de *Pinus*. Essa enzima é utilizada na bioconversão de celulose cristalina em celulose solúvel, consistindo uma etapa importante no processo de produção de bioetanol (CASTRILLO et al., 2015). Da mesma forma, o isolado *Trichoderma harzianum* produziu as enzimas celulase, β -glicosidase e xilanase, as quais realizam a hidrólise de compostos lignocelulósicos em meio de cultivo com bagaço de cana de açúcar, como um resíduo alternativo de baixo custo comercial para produção de bioetanol (GELAIN; DA CRUZ PRADELLA; DA COSTA, 2015).

As enzimas quitinases também são produzidas por isolados de *Trichoderma* em diferentes meios de cultivo, que servem como suprimento de crescimento e indução da produção dessas enzimas. Em estudo recente, o isolado *Trichoderma harzianum* produziu quitinases e β -1,3-glucanase em resposta a presença de fungos fitopatogênicos e não fitopatogênicos em meio de cultivo (TING; CHAI, 2015). No mesmo sentido, os isolados de *Trichoderma harzianum* (ThJt1) e *Trichoderma viridi* (TvHt2) apresentaram elevada produção de quitinase e β -1,3-glucanase em meio de cultivo suplementado com quitina ou parede celular do fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc. como indutor da produção enzimática (MALLIKHARJUNA RAO; SIVA RAJU; RAVISANKAR, 2016).

Além da produção enzimática, os isolados de *Trichoderma* apresentam elevado potencial de bioadsorção de Níquel e Cádmio em meio de cultivo. Devido a essa capacidade os isolados podem ser utilizados como biorremediadores de ambientes contaminados com esses metais (NONGMAITHEM; ROY; BHATTACHARYA, 2016). Além disso, as espécies de *Trichoderma* podem produzir nanopartículas de prata como o isolado *Trichoderma harzianum* onde as nanopartículas produzidas apresentaram atividade bactericida (AHLUWALIA et al., 2014).

4.1.2 *Lecanicillium*

O gênero *Lecanicillium* pertence ao Filo Ascomycota e foi descrito por Gams e Zare no ano de 2000 (GAMS; ZARE, 2000). Isolados deste gênero são amplamente estudados no controle biológico de fungos fitopatogênicos e de insetos considerados pragas agrícolas. No controle de fungos fitopatogênicos os isolados *Lecanicillium longisporum* (Petch) Zare e W. Gams (Vertalec[®]) e *Lecanicillium attenuatum* Zare e W. Gams (CS625) apresentaram efetiva supressão no desenvolvimento e na produção de conídios do fungo *Sphaerotheca fuliginea* (Schltld.) Pollaci, agente causador do oídeo em pepinos (KIM; GOETTEL; GILLESPIE, 2007).

Estudos relatam a utilização de espécies de *Lecanicillium* no controle biológico de insetos (MASCARIN et al., 2013; LU et al., 2015). Do mesmo modo, os isolados de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare e W. Gams e *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. foram avaliados no controle do pulgão-do-algodão (*Aphis gossypii* Glover) e obtiveram a redução da sobrevivência e da fecundidade do inseto, após a inoculação de conídios e de metabólitos secundários de ambos os fungos (GURULINGAPPA; MCGEE; SWORD, 2011).

Segundo Goettel et al. (2008) os isolados do gênero *Lecanicillium* apresentam um potencial para o desenvolvimento de um agente microbiano efetivo, de controle único, contra doenças em plantas, insetos pragas e nematoides fitopatogênicos, devido ao antagonismo, parasitismo e a características que induzem a resistência a doenças. Também foram encontrados estudos sobre utilização de isolados de *Lecanicillium* para a produção de quitinases. A produção de quitinase foi avaliada após a seleção de *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Zare e W. Gams entre 15 isolados testados. Nesse estudo, os isolados apresentaram elevada produção de endoquitinase (747 U mg^{-1}) e N-acetilhexosaminidase (410 U mg^{-1}) em fermentação submersa (RAMÍREZ-COUTIÑO et al., 2006).

Alguns estudos relatam uma menor produção de enzimas quitinolíticas como do isolado *Lecanicillium lecanii* que produziu $0,14 \text{ U mg}^{-1}$ de N-acetilhexosaminidase e $0,26 \text{ U mg}^{-1}$ de endoquitinase em fermentação submersa (VILLA-LERMA et al., 2013). Também em fermentação submersa outro isolado de *Lecanicillium lecanii* produziu $18,2 \text{ mU mL}^{-1}$ de quitinase (LIU et al., 2003).

Entretanto, apesar de poucos estudos registrados na literatura com a utilização de isolados de *Lecanicillium* em fermentação em estado sólido foi encontrada uma maior produção de enzimas quitinolíticas quando utilizado esse método. Em um desses estudos, o isolado *Lecanicillium lecanii* produziu 540 U gds^{-1} de β -N-acetilhexosaminidase sob

fermentação submersa e aumentou a produção desta enzima para 1.016 U gds^{-1} quando foi utilizada a fermentação em estado sólido, com silagem de casca de camarão e bagaço de cana de açúcar como meio de cultivo (MATSUMOTO et al., 2004). Além do aumento na produção, esses resíduos são considerados alternativos para baixar o custo de produção tornando viável economicamente o processo de produção de enzimas.

4.1.3 *Fusarium*

Embora muitas espécies do gênero *Fusarium* Link sejam fitopatogênicas responsáveis por elevadas perdas na agricultura, o gênero tem sido bastante estudado nas últimas décadas e registradas diversas aplicações biotecnológicas. Os isolados de *Fusarium* são muito utilizados na produção de enzimas de interesse industrial como a transaldolase produzida por um isolado de *Fusarium oxysporum*. Essa enzima é capaz de transformar xilose diretamente em etanol (KOURTOGLOU et al., 2008). Outra enzima produzida por *Fusarium oxysporum* é a cutinase. Essa enzima lipolítica apresenta características versáteis na sua utilização para remoção de gorduras, na fabricação de detergentes, e para aumentar o efeito farmacológico de produtos químicos agrícolas (PIO; MACEDO, 2007).

Além disso, isolados de *Fusarium oxysporum* apresentam boa produção de celulases como observado por Yuan et al. (2012). Os autores realizaram o *screening* de isolados produtores de celulases e obtiveram 5 isolados dessa espécie com elevada produção. Essa enzima é muito utilizada na indústria têxtil, na fabricação de alimentos, de papel entre outros. Do mesmo modo, os isolados de *Fusarium oxysporum* têm potencial para produzir enzimas quitinolíticas como a N-acetil- β -D-glicosaminidase (23 U gds^{-1}) em fermentação em estado sólido utilizando quitina como indutor da produção enzimática e farelo de trigo como substrato (GKARGKAS et al., 2004).

Os isolados do gênero *Fusarium* foram avaliados no controle biológico, onde três estirpes de *Fusarium oxysporum* (V5W2, Eny 7.11, Emb 2.4°) foram efetivos no controle dos nematoides fitopatogênicos (*Pratylenchus goodeyi* Sher e Allen e *Helicotylenchus multicinctus* Cobb) na espécie de banana *Musa* sp. Cheesman (WAWERU et al., 2014). Nesse estudo, os autores enfatizam que as espécies de fungos endofíticos não patogênicas têm potencial para melhorar o rendimento da produção e proteção contra pragas agrícolas.

Além disso, os isolados de *Fusarium* também são utilizados para a produção de nanopartículas de prata com forte atividade antimicrobiana e efeito citotóxico em células tumorais (HUSSEINY; SALAH; ANTER, 2015). No mesmo sentido, o isolado *Fusarium*

oxysporum PTCC 5115 realizou a produção de nanopartículas de Zinco as quais são utilizadas na indústria de eletrônicos (MIRZADEH et al., 2013). Ainda, um isolado de *Fusarium* foi avaliado para bioestimulação favorecendo o aumento e função do sistema radicular, da biomassa vegetal, e da disponibilidade dos metais (Zinco, Cádmio, Chumbo e Cobre) no solo para a planta hiperacumuladora *Sedum alfredii* Hance (ZHANG et al., 2012).

Ao mesmo tempo, os isolados de *Fusarium* são utilizados para a biodegradação de corantes têxteis (azo glicoconjugado) com 100% de degradação por *Fusarium oxysporum* após 24 horas em meio de cultivo (PORRI et al., 2011). Os autores ainda relatam que a capacidade de degradação deste isolado o coloca como um bom candidato para o desenvolvimento de um novo tratamento biológico de águas residuárias para a indústria têxtil.

Os fungos são reconhecidamente produtores de metabólitos secundários de interesse na indústria farmacêutica e alimentar. Diante disso, espécies de *Fusarium* são estudadas para a produção de *camptothecin*, um metabólito efetivo contra células cancerígenas (VENUGOPALAN et al., 2016). Do mesmo modo, novos derivados de pirona foram produzidos por *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (TRISUWAN et al., 2013) e a produção do componente bioativo (*beauvericin*) por *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach e Nirenberg, com efeito antibacteriano sobre diversas bactérias enteropatogênicas (MECA et al., 2010).

Contudo, a diversidade metabólica dos fungos desperta grande interesse para exploração tecnológica, pois novos produtos naturais estão continuamente sendo produzidos por fungos. Entretanto, apenas uma pequena parte da diversidade fúngica tem sido cultivada e selecionada para produção destes compostos. Como resultado, temos apenas uma pequena parcela de metabólitos e outros compostos fúngicos, economicamente importantes, sendo estudados (SURYANARAYANAN et al., 2009; SETTE; PAGNOCCA; RODRIGUES, 2013).

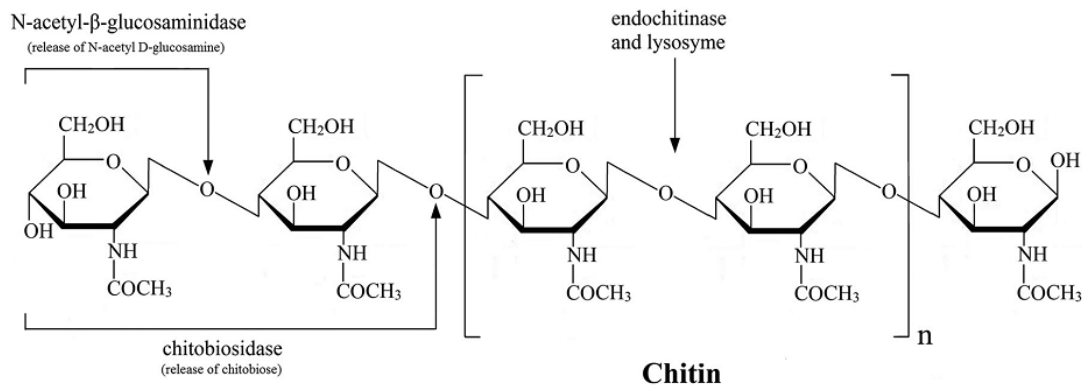
Nesse contexto, é fundamental a realização de estudos de isolamento, seleção e caracterização de novos isolados fúngicos, tendo em vista a grande diversidade de fungos na natureza com enorme potencial biotecnológico a ser explorado.

4.2 ENZIMAS QUITINOLÍTICAS

As enzimas quitinolíticas pertencem a grande família das β -glicosil hidrolases (GH) e podem ser divididas em N-acetilglicosaminidases e quitinases, as quais diferem nos seus padrões de clivagem no polímero de quitina (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). As quitinases

(EC3.2.1.14) são membros da família GH 18 e 19 e catalisam a hidrólise de ligações β -1,4 na quitina em quito-oligômeros, resultando na liberação de quito-oligômeros de cadeias curtas de baixo peso molecular. Além disso, dependendo dos padrões de clivagem, as quitinasas podem ser classificadas em 2 classes: endoquitinasas e exoquitinasas (quitobiosidases e β -N-acetilhexosaminidase), Figura 1. As endoquitinasas degradam a quitina em qualquer ponto ao longo do polímero, formando produtos de diversos tamanhos, multímeros como quitotetraose, quitotriose e diacetilquitobiose.

Figura 1 - Ação de enzimas quitinolíticas no polímero de quitina.



Fonte: (STOYKOV et al., 2015).

Em contraste, as exoquitinasas clivam a partir da extremidade não redutora da cadeia polimérica e liberam dímeros de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc ou NAG) (DUO-CHUAN, 2006; SEIDL, 2008; BOLDO et al., 2009). Ainda, existem aquelas enzimas que não podem ser diferenciadas em exo ou endoquitinasas, pois, possuem modo de clivagem tanto como exoquitinase como de endoquitinase (HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012).

As N-acetilglicosaminidases (EC 3.2.1.52) pertencem a família GH 20 e catalisam a liberação de monômeros de GlcNAc a partir de dímeros de GlcNAc, ou a partir da extremidade não redutora de multímeros de GlcNAc, Figura 1. Essa enzima possui alta afinidade por dímeros de N,N'-diacetilquitobiose convertendo-os em monômeros (SEIDL, 2008; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). As classes de enzimas quitinolíticas são consideradas importantes no controle biológico de pragas e doenças, na indústria de alimentos, em rações animais, na medicina, no manejo de resíduos e na indústria de adoçantes (PATIL; JADHAV, 2014).

4.3 FUNÇÕES BIOLÓGICAS DAS QUITINASES NOS FUNGOS FILAMENTOSOS ANAMÓRFICOS

As quitinases são sintetizadas por uma ampla gama de organismos incluindo fungos, vírus, bactérias, insetos, plantas e mamíferos (KARTHIK; AKANKSHA; PANDEY, 2014). Os organismos que possuem quitina como polímero constituinte de alguma estrutura morfológica tem a capacidade de produzir quitinases, bem como aqueles que utilizam a quitina como fonte de carbono e nitrogênio em seu metabolismo. Entretanto, as quitinases também são produzidas por organismos que a utilizam no processo de infecção em hospedeiros, como os fungos entomopatogênicos.

As quitinases são abundantes em fungos e desempenham múltiplas funções como no processo de morfogênese e durante o parasitismo (SEIDL, 2008). Entretanto, o número de quitinases varia consideravelmente entre espécies diferentes, como por exemplo, as leveduras produzem poucos tipos enquanto que os fungos filamentosos produzem uma diversidade muito grande destas enzimas. Segundo Seidl (2008) em geral o número de quitinases diferentes em fungos filamentosos varia de 10 a 25 das proteínas da família GH 18, mas as razões para o grande número de quitinases não são bem compreendidas.

Nos fungos filamentosos, as quitinases exercem funções vitais na degradação e remodelagem da parede celular (morfogênese), na aquisição de nutrientes e na autólise das hifas (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006; DUO-CHUAN, 2006; SEIDL, 2008). Também são utilizadas como mecanismos de defesa contra outros fungos ou artrópodes em seu habitat. Além disso, podem ser utilizadas no ataque a outros fungos (micoparasitismo), a insetos (fungos entomopatogênicos) e a nematoides (fungos nematófagos) (SEIDL, 2008).

Durante o processo de morfogênese, as quitinases são imprescindíveis para a germinação e diferenciação dos esporos, no alongamento, na ramificação, na fusão e na autólise das hifas e no reparo da parede celular. Nesses casos, as quitinases estão localizadas nas camadas internas da parede celular, próximas à membrana plasmática (HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012).

Muitas quitinases são responsáveis por funções nutricionais, atuando na degradação e utilização da quitina exógena para energia e biossíntese, presente na parede celular de fragmentos de hifas mortas ou no exoesqueleto de artrópodes mortos (SEIDL, 2008). Similarmente, no micoparasitismo as quitinases tem uma importante função no progresso do parasitismo, especialmente na penetração das hifas na parede celular e utilização dos

nutrientes pela degradação da parede celular do hospedeiro fúngico (DUO-CHUAN, 2006). Do mesmo modo, estão ligadas a funções mais agressivas de virulência nos fungos micoparasitas e nos fungos entomopatogênicos (HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012). Nos fungos entomopatogênicos, durante o avanço do processo de infecção no exoesqueleto dos artrópodes, são secretadas várias enzimas hidrolíticas (proteases, quitinases e lipases) as quais atuam sinergisticamente com a finalidade de dissolver a cutícula do hospedeiro, permitindo a penetração das hifas e o estabelecimento da infecção (BARROS et al., 2010).

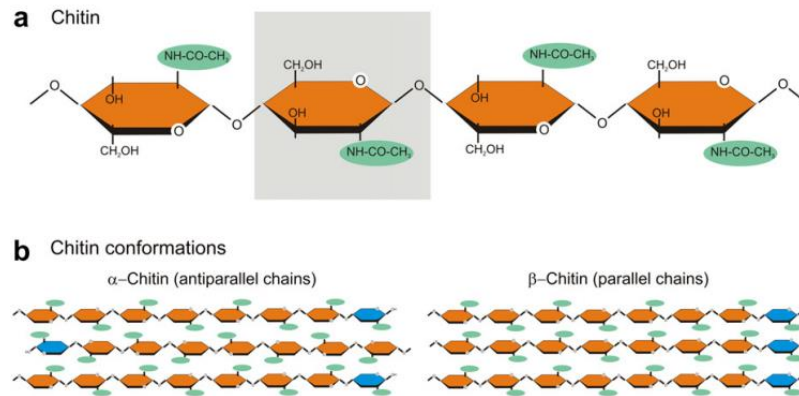
Em geral, a regulação da expressão de quitinases secretadas é mediada por um sistema de indução-repressão, no qual a quitina, a cutícula de diversos hospedeiros e/ou uma pequena quantidade de GlcNAc (0,1-0,5%) induzem a expressão de quitinases no meio extracelular. Por outro lado, a glicose, as concentrações mais elevadas de GlcNAc (1%) e o aminoácido alanina, regulam negativamente a expressão de quitinases por repressão catabólica (BARROS et al., 2010). Por esses motivos, para a produção de quitinases fúngicas extracelulares *in vitro* é necessária a elaboração de um meio de cultivo que favoreça o sistema de indução enzimático e o desenvolvimento da espécie utilizada.

4.4 RESÍDUOS QUITINOSOS

A quitina é um polissacarídeo linear, insolúvel, formado por ligações β -1,4 de unidades de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc; 2-acetamino-2-deoxi- β -D-glicose), Figura 2a. (SEIDL, 2008; HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012). Além disso, é um dos polímeros mais abundantes na biosfera depois da celulose, sendo considerada biocompatível, biodegradável e bioabsorvível (KHOUSHAB; YAMABHAI, 2010; KARTHIK; BINOD; PANDEY, 2015).

Em relação a essa estrutura, a quitina é polimórfica e ocorre em três diferentes formas cristalinas, as quais dependendo do tipo de empacotamento e da polaridade das cadeias de GlcNAc são classificadas em: α -quitina, β -quitina e γ -quitina.

Figura 2 - (a) Estrutura química da quitina. O destaque de cinza indica uma subunidade da cadeia de N-acetilglicosamina. (b) Os dois mais abundantes tipos de quitina que são caracterizados por arranjo das cadeias de N-acetilglicosamina na forma antiparalela (α -quitina) e na forma paralela β -quitina.



Fonte: (SEIDL, 2008).

A α -quitina é a forma mais abundante na natureza (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006; HARTL; ZACH; SEIDL-SEIBOTH, 2012) onde é caracterizada pelo arranjo das cadeias de N-acetil-D-glicosamina de forma antiparalela, Figura 2b. Entretanto a β -quitina apresenta o arranjo de cadeias N-acetil-D-glicosamina de forma paralela e as γ -quitinas as estruturas cristalinas são formadas por duas cadeias paralelas alternadas com uma única cadeia antiparalela (MERZENDORFER; ZIMOCH, 2003). Geralmente a α -quitina é encontrada como constituinte do exoesqueleto de artrópodes e tecidos conectivos, como principal componente da parede celular de fungos, e em alguns organismos marinhos como os crustáceos (incluindo: camarão, caranguejo, lagosta e krill), as ostras e as lulas (KARTHIK; AKANKSHA; PANDEY, 2014).

A estimativa de produção de quitina nos ambientes aquáticos é na ordem a 10^{11} toneladas por ano (HALDER et al., 2013). Desta produção, cerca de 75% provem dos mariscos como camarão, caranguejo e siri, pois a quitina corresponde a cerca de 20 a 58% do seu peso seco e é considerado um resíduo da indústria processadora destes pescados (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006).

Apesar da elevada produção de quitina, uma pequena fração desse resíduo tem sido utilizada para a produção de rações para alimentação animal e na purificação da quitina para outras utilizações. De acordo com Halder et al. (2013) os resíduos do processamento são descartados no oceano, incinerados e/ou depositados em aterros. Diante da elevada produção anual e da baixa utilização, a porção residual pode se tornar um problema ambiental, devido

ao alto grau de cristalinidade e insolubilidade desse resíduo (INOKUMA; TAKANO; HOSHINO, 2013; PAREEK et al., 2014).

Para a obtenção da quitina na sua forma pura, utilizada para a fabricação de derivados de quitina, são necessários processos de desmineralização e desproteíntização a partir da biomassa marinha. Esse processo é realizado pelo emprego de ácidos ou bases concentradas que podem ocasionar problemas ambientais no armazenamento e descarte desses resíduos, além do alto custo do processo de produção (KARTHIK; AKANKSHA; PANDEY, 2014).

As quitinases são enzimas cada vez mais utilizadas como uma alternativa ambientalmente segura para a conversão de resíduos quitinosos para as mais variadas aplicações. As quitinases hidrolisam a quitina resultando na produção de oligômeros e monômeros de N-acetil-D-glicosamina, que podem ser absorvidos e metabolizados por muitos organismos (ULHOA; PEBERDY, 1992).

4.5 APLICAÇÕES DAS ENZIMAS QUITINOLÍTICAS

Na última década, as quitinases fúngicas receberam grande atenção dos pesquisadores, devido a sua ampla gama de aplicações, como na produção de quito-oligossacarídeos e de N-acetil-D-glicosamina, ambos derivados de quitina. A N-acetil-D-glicosamina é um valioso agente farmacológico com princípio ativo anti-inflamatório, antitumoral e além disso, possui sabor adocicado (KUMAR; SHARMA; TEWARI, 2011). Já, os quitoligossacarídeos possuem diversas aplicações na medicina, alimentação e na agricultura, devido à sua variedade de propriedades biofuncionais, como antimicrobiano, antitumoral e os efeitos de reforço no sistema imunológico humano (SURESH; KUMAR; SACHINDRA, 2010).

O processo de produção de N-acetil-D-glicosamina foi realizado pelo isolado *Penicillium ochrochloron* Biourge MTCC 517 utilizando resíduos agroindustriais no processo fermentativo (PATIL; JADHAV, 2014). Nesse estudo, foi obtida a produção de quitinase para a hidrólise da quitina em elevadas quantidades de N-acetil-D-glicosamina. Em processo fermentativo similar, foi utilizada a quitinase do isolado *Trichoderma harzianum* para a conversão da quitina isolada de resíduos de camarão em N-acetil-D-glicosamina sendo obtida a taxa de 80% de conversão (DAS; ROY; SEN, 2012).

Nesse sentido, o sistema quitinolítico produzido pelo isolado *Penicillium monovercillium* Biourge CFR2 foi muito efetivo na hidrólise da quitina para a produção de quito-oligossacarídeos onde produziu 37,57% de N-acetilquitotriose e 62,43% de N-acetilquitohexose como produto final em fermentação em estado sólido. Estes resultados

indicam que as quitinases produzidas pelo isolado tem elevado potencial para a produção de N-acetilquitooligosacarídeos bioativos específicos (SURESH; KUMAR; SACHINDRA, 2010).

Geralmente os processos de produção de derivados de quitina de baixo peso molecular são realizados pela hidrólise ácida, os quais tem um alto custo, além de baixa produtividade e geração de grandes volumes de resíduos perigosos ao ambiente. Diante disso, a utilização de enzimas quitinolíticas é considerada uma boa estratégia para esta conversão, gerando menor quantidade de resíduos, aumentando efetivamente a produtividade e diminuindo o custo do processo de produção. Além de se obter maior controle sobre o desenvolvimento do processo.

As quitinases também estão sendo avaliadas no desenvolvimento de biopesticidas. Para isso, são necessários microrganismos com elevadas taxas de produção de quitinases e baixo custo do processo de produção enzimático. Nesse contexto, foi utilizado o filtrado do meio de cultivo de *Trichoderma harzianum* contendo quitinase (2.000 U mL^{-1}) em larvas de *Helicoverpa armigera* Hubner e foi obtida redução na proporção da alimentação e diminuição do peso das larvas, ocorrendo a mortalidade acima de 70% e zero de emergência de adultos (BINOD et al. 2007). Corroborando com esses resultados Patil; Jadhav (2015) utilizaram diferentes concentrações de quitinase purificada de *Penicillium ochrochloron* em *Helicoverpa armigera* e obtiveram sucesso na redução da pupação e aumento da mortalidade nos estádios larval e de pupa. Nesse estudo, os autores enfatizam que a formulação de pesticidas com base enzimática é uma ferramenta de manejo de pragas ambientalmente amigável. Além disso, as quitinases podem ser usadas no controle de insetos, com uma aplicação direta na produção de biopesticidas que apresentariam baixíssima toxicidade aos vertebrados, tendo em vista que estes organismos não apresentam quitinas como componentes estruturais (GOMAA, 2012). Os biopesticidas podem vir a substituir os inseticidas químicos, principalmente pelas consequências negativas desta utilização, como o aumento da resistência de pragas, baixa seletividade, elevado risco de contaminação da água e recalcitrância no solo (PETROSKI; STANLEY, 2009).

As quitinases também foram testadas no controle de nematoides *Meloidogyne javanica*, considerado uma importante praga agrícola. No estudo foi avaliado o efeito da preparação enzimática contendo uma protease e seis quitinases semi purificadas produzidas pelo isolado *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (251), sobre ovos do nematoide *Meloidogyne javanica*. Como resultado foi observado que a estrutura dos ovos foi drasticamente alterada, havendo diminuição da eclosão quando as enzimas foram aplicadas individualmente ou em combinação (KHAN; WILLIAMS; NEVALAINEN, 2004).

Nesse mesmo sentido, as quitinases não purificadas foram avaliadas no controle de larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus* Say apresentando dose letal de 50% em 48 horas na concentração de apenas 0,60 U ml⁻¹ (HALDER et al., 2012). Anteriormente, Mendonsa et al. (1996) observaram a eficiência na morte de larvas de primeiro e quarto ínstar do mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus após 48 h de contato com a preparação enzimática do isolado *Myrothecium verrucaria* (Alb. e Schwein.) Ditmar. Foi observado 100% de mortalidade dentro de 48 h no contato com endoquitinase purificada deste mesmo isolado.

Muitos estudos apresentam o uso das quitinases no controle biológico de fungos fitopatogênicos de interesse agrícola. Isso ocorre devido ao seu potencial de hidrólise da parede celular fúngica, composta predominantemente por quitina, ocorrendo a inibição do crescimento do fitopatógeno. Da mesma forma, apresentaram esse potencial a quitinase produzida por *Penicillium ochrochloron* (PATIL; WAGHMARE; JADHAV, 2013), por *Streptomyces* sp. Waksman e Henrici (KARTHIK; BINOD; PANDEY, 2015) e a endoquitinase de *Fusarium chlamydosporum* Wollenw. e Reinking (MATHIVANAN; KABILAN; MURUGESAN, 1998).

As quitinases fúngicas podem ser adicionadas como um suplemento para a formulação de fungicidas e inseticidas químicos comuns, não apenas para torná-los mais potentes, mas também para minimizar a concentração dos ingredientes quimicamente ativos, que são de outra maneira prejudicial ao meio ambiente e à saúde (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006). Como exemplo podemos citar o estudo de Wiwat et al. (1999) que produziram quitinase a partir de *Bacillus circulans* Jordan, para uso como suplemento de bioinseticida de *Bacillus thuringiensis* Berliner para o controle de larvas de lepidóptera.

No entanto, a produção de biopesticidas a base de quitinases envolve o desenvolvimento de várias etapas, que vão desde a seleção de uma estirpe microbiana apropriada para a produção de quitinases até a formulação final do produto. Outra forma de emprego das quitinases fúngicas é na produção de protoplastos, que são obtidos pela degradação da parede celular fúngica sendo muito utilizados em melhoramento genético (PATIL; WAGHMARE; JADHAV, 2013). Diante da elevada produção anual de quitina e da possibilidade desta se tornar um problema ambiental, foi demonstrado que algumas estirpes do gênero *Mucor* P. Michelli ex L. podem utilizar os substratos de N-acetilglicosamina e quitina como fonte de carbono para o crescimento e produção de etanol (INOKUMA; TAKANO; HOSHINO, 2013). Nesse estudo a produção do isolado *Mucor circinelloides* Tiegh. (NBRC 6746) foi de 18,6 ± 0,6 g l⁻¹ de etanol após 72 horas de incubação

apresentando a primeira produção de bioetanol a partir de 50 g l⁻¹ de GlcNAc e resíduos quitinosos.

A aplicação de enzimas quitinolíticas na indústria farmacêutica e na agricultura vem aumentando a produção e o interesse sobre a comercialização de quitinases por empresas privadas, evidenciando uma grande procura dessa enzima em diversas áreas de pesquisa (GALANTE, 2008). Apesar do grande potencial de uso biotecnológico, as quitinases tem sido pouco exploradas comercialmente, devido ao baixo número de organismos que apresentem altas taxas de produção, ao elevado custo da produção, e da baixa atividade e estabilidade dessas enzimas (CHAVAN; DESHPANDE, 2013; KARTHIK; AKANKSHA; PANDEY, 2014). Contudo, estudos de prospecção de espécies fúngicas com elevadas taxas de produção devem ser estimuladas para que ocorra o início do desenvolvimento do processo de produção.

4.6 PRODUÇÃO DE QUITINASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação em estado sólido (FES) é um bioprocessamento cujo crescimento microbiano ocorre na ausência de água. No entanto, o substrato deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento e a atividade metabólica do microrganismo. A matriz sólida pode ser a fonte de carbono e de outros nutrientes, ou pode ser um material inerte que sirva apenas de suporte para o crescimento do microrganismo sobre nele, necessitando de complementação nutricional pela adição de uma solução de nutrientes (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

Em geral os fungos filamentosos e as leveduras são mais utilizadas para FES, devido a sua exigência de atividade água ser menor (0,5–0,6_{a_w}) em relação a exigência das bactérias (0,8–0,9 _{a_w}) (SINGHANIA et al., 2009). Nos últimos anos, houve uma crescente utilização da FES nas indústrias de biotecnologia, devido a seu elevado potencial de aplicações como na produção de metabólitos secundários bioativos, na produção de alimentos, combustíveis, produtos químicos industriais e produtos farmacêuticos. Emergindo como uma alternativa atraente, no lugar da fermentação submersa, a qual ocorre em meio com presença de água livre e normalmente com substratos solúveis (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

Os substratos usados em fermentação em estado sólido são compostos por resíduos agroindustriais, como bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, farelo de trigo, farelo de soja, entre outros. Estes resíduos servem como suporte de ancoragem para as células e também suprem os nutrientes necessários para a produção das enzimas ou outros produtos de interesse

(PATIL; JADHAV, 2014). Nesse contexto, é possível reduzir o custo de produção pela utilização de resíduos que representam viabilidade econômica e sustentabilidade, sendo muito interessantes ao bioprocessamento (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Ao mesmo tempo, o uso da fermentação em estado sólido é particularmente atrativo em função da ausência de água livre, o que possibilita a obtenção de um produto mais concentrado (KARTHIK; AKANKSHA; PANDEY, 2014).

Na FES ocorre uma maior produção de enzimas hidrolíticas como as quitinases, devido as condições de cultivo mimetizarem as condições naturais de ocorrência do fungo (NAMPOOTHIRI et al., 2004; RUSTIGUEL; JORGE; GUIMARÃES, 2012). Ao mesmo tempo, o maior crescimento fúngico acontece na superfície do material sólido que, conforme demonstrado por diversos estudos, ocorre excreção em maior quantidade e diversidade de enzimas, quando comparado com o mesmo processo por fermentação submersa (SINGHANIA et al., 2009; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

A produção de quitinase fúngica é predominantemente realizada pelo processo de fermentação submersa (KARTHIK; AKANKSHA; PANDEY, 2014). Entretanto, nos últimos anos, é crescente o número de estudos que utilizam a FES para a produção de quitinases por fungos filamentosos, como *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 que produziu elevada quantidade de quitinase, $2.447,71 \text{ U gds}^{-1}$, em farelo de trigo após 96 horas de cultivo (PATIL; JADHAV, 2014). Em contraste, Gkargkas et al. (2004) obtiveram com *Fusarium oxysporum* F3 uma produção máxima de $23,6 \text{ U gds}^{-1}$ em farelo de trigo após 12 dias de cultivo. Já o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (IBCB 360) produziu $7,36 \text{ U g}^{-1}$ em cutícula da pupa do bicho da seda, após 12 dias de cultivo (RUSTIGUEL; JORGE; GUIMARÃES, 2012).

Apesar da fermentação submersa ser amplamente utilizada, ter vantagens no controle do processo e na fácil recuperação das enzimas extracelulares, os produtos finais são muito diluídos quando comparado com os obtidos pela FES. Outros pontos favoráveis da FES são: os substratos de baixo custo obtidos de resíduos agroindustriais e a facilidade de operação dos equipamentos utilizados para o desenvolvimento do processo (KARTHIK; AKANKSHA; PANDEY, 2014).

A produção de quitinases por FES, depende de um grande número de fatores, cada um dos quais é fundamental para a viabilidade técnica e econômica do processo. Estes incluem o isolamento e a seleção do microrganismo e do substrato, parâmetros físico-químicos e biológicos ótimos e a recuperação e purificação do produto (NAMPOOTHIRI et al., 2004). Tendo em vista essa grande quantidade de variáveis que influenciam a produção das

quitinases, se faz necessário a otimização dos parâmetros utilizados no processo de fermentação em estado sólido visando a obtenção da máxima produção de enzimas quitinolíticas.

Contudo, resultados significativos e de baixo custo, estão sendo encontrados na fermentação em estado sólido, o qual é considerado um método promissor para o desenvolvimento de vários processos, incluindo a produção de enzimas em escala industrial.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLUWALIA, V. et al. Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 202–206, Abril 2014.
- AL-HAZMI, A. S.; TARIQJAVEED, M. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 288–292, mar. 2016.
- ALHO, C. J. R. The value of biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 1115–1118, nov. 2008.
- ANDERSEN, M. R. Elucidation of primary metabolic pathways in *Aspergillus* species: Orphaned research in characterizing orphan genes. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 6, p. 451–455, 1 nov. 2014.
- ANEES, M. et al. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. **Fungal Biology**, v. 114, n. 9, p. 691–701, Setembro 2010.
- BAKER, S. E. et al. Fungal genome sequencing and bioenergy. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 1–5, Fevereiro 2008.
- BARROS, N. M, et al. Fungos como agentes de controle de pragas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Orgs.). **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010. cap. 14, p. 491- 531.
- BINOD, P. et al. Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of N-acetyl-d-glucosamine from colloidal chitin. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2742–2748, Outubro 2007a.
- BINOD, P. et al. Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1845–1852, 1 nov. 2007b.
- BOLDO, J. T. et al. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. **Current Genetics**, v. 55, n. 5, p. 551–560, 1 ago. 2009.
- CASTRILLO, M. et al. Evaluation of Synthetic and Semi- synthetic Culture Media for Endo-1,4-β- Glucanases Secretion by *Trichoderma koningiopsis*. **Procedia Materials Science**, International Congress of Science and Technology of Metallurgy and Materials, SAM - CONAMET 2013. v. 8, p. 786–792, 2015.
- CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567–2577, mar. 2016.
- CHAVAN, S. B.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an appraisal as a product of commercial potential. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 4, p. 833–846, ago. 2013.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 773–782, 21 jul. 2006.

DAS, S.; ROY, D.; SEN, R. Utilization of Chitinaceous Wastes for the Production of Chitinase. In: RESEARCH, B.-A. IN F. AND N. (Ed.). . [s.l.] Academic Press, 2012.

DUO-CHUAN, L. Review of Fungal Chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, n. 6, p. 345–360, jun. 2006.

FONTENELLE, A. D. B. et al. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v. 30, n. 11, p. 1492–1500, nov. 2011.

GALANTE, R. S. **Estudos de quitinases de *Moniliophthora perniciosa* (stahel) Aime & Phillips-Mora, fungo causador da vassoura-de-bruxa no cacauero: purificação, caracterização e modelagem comparativa.** 2008. 101 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2008.

GAMS, L.; ZARE, R. A revision of *Verticillium* sect. Prostata. III. Generic classification. *Nova Hedwigia*, v. 72, p. 329–337, 2001.

GELAIN, L.; DA CRUZ PRADELLA, J. G.; DA COSTA, A. C. Mathematical modeling of enzyme production using *Trichoderma harzianum* P49P11 and sugarcane bagasse as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 101–107, Dezembro 2015.

GKARGKAS, K. et al. Studies on a N-acetyl- β -d-glucosaminidase produced by *Fusarium oxysporum* F3 grown in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1599–1605, 30 jul. 2004.

GOETTEL, M. S. et al. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. **Journal of Invertebrate Pathology**, Special Issue for SIP 2008SIP 2008. v. 98, n. 3, p. 256–261, jul. 2008.

GOMAA, E. Z. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. **The Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 103–111, 27 fev. 2012.

GURULINGAPPA, P.; MCGEE, P. A.; SWORD, G. Endophytic *Lecanicillium lecanii* and *Beauveria bassiana* reduce the survival and fecundity of *Aphis gossypii* following contact with conidia and secondary metabolites. **Crop Protection**, v. 30, n. 3, p. 349–353, mar. 2011.

HALDER, S. K. et al. Chitinolytic enzymes from the newly isolated *Aeromonas hydrophila* SBK1: study of the mosquitocidal activity. **BioControl**, v. 57, n. 3, p. 441–449, 27 ago. 2012.

HALDER, S. K. et al. Proficient biodegradation of shrimp shell waste by *Aeromonas hydrophila* SBK1 for the concomitant production of antifungal chitinase and antioxidant chitosaccharides. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 79, p. 88–97, Abril 2013.

HARTL, L.; ZACH, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 533–543, jan. 2012.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509–547, Maio 2007.

HUSSEINY, S. M.; SALAH, T. A.; ANTER, H. A. Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 225–231, Setembro 2015.

INOKUMA, K.; TAKANO, M.; HOSHINO, K. Direct ethanol production from N-acetylglucosamine and chitin substrates by *Mucor* species. **Biochemical Engineering Journal**, v. 72, p. 24–32, 15 mar. 2013.

KARTHIK, N.; AKANKSHA, K.; PANDEY, A. Production, purification and properties of fungal chitinases--a review. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 52, n. 11, p. 1025–1035, nov. 2014.

KARTHIK, N.; BINOD, P.; PANDEY, A. Purification and characterisation of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces* sp. **Bioresource Technology**, International Conference on Emerging Trends in Biotechnology. v. 188, p. 195–201, jul. 2015.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, v. 31, n. 3, p. 346–352, nov. 2004.

KHOUSHAB, F.; YAMABHAI, M. Chitin Research Revisited. **Marine Drugs**, v. 8, n. 7, p. 1988–2012, 28 jun. 2010.

KIM, J. J.; GOETTEL, M. S.; GILLESPIE, D. R. Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. **Biological Control**, v. 40, n. 3, p. 327–332, mar. 2007.

KOURTOGLOU, E. et al. Purification, characterization and mass spectrometric sequencing of transaldolase from *Fusarium oxysporum*. **Process Biochemistry**, Metabolic Engineering. v. 43, n. 10, p. 1094–1101, Outubro 2008.

KRULL, R. et al. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, From Gene to Product From Gene to Product. v. 163, n. 2, p. 112–123, 20 jan. 2013.

KUMAR, S.; SHARMA, R.; TEWARI, R. Production of N-Acetylglucosamine Using Recombinant Chitinolytic Enzymes. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 319–325, jul. 2011.

LANGE, L. The importance of fungi and mycology for addressing major global challenges*. **IMA Fungus**, v. 5, n. 2, p. 463–471, dez. 2014.

LEWINSOHN, T., M.; PRADO, P. INÁCIO. Quantas espécies há no Brasil? **MEGADIVERSIDADE**, v. 1, n. 1, p. 37–42, jul. 2005.

LIU, B.-L. et al. Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, The 8th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC 2002). v. 33, n. 4, p. 410–415, Setembro 2003.

LOPES, F. A. C. et al. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Biology**, v. 116, n. 7, p. 815–824, jul. 2012.

LÓPEZ-BUCIO, J.; PELAGIO-FLORES, R.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia Horticulturae**, Biostimulants in Horticulture. v. 196, p. 109–123, 30 nov. 2015.

LU, L. et al. Morphological, molecular and virulence characterization of three *Lencanicillium* species infecting Asian citrus psyllids in *Huangyan citrus* groves. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 125, p. 45–55, Fevereiro 2015.

MAIA, L. C. et al. Diversity of Brazilian Fungi. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1033–1045, 2015.

MALLIKHARJUNA RAO, K. L. N.; SIVA RAJU, K.; RAVISANKAR, H. Cultural conditions on the production of extracellular enzymes by *Trichoderma* isolates from tobacco rhizosphere. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 25–32, jan. 2016.

MANFIO, G. P. **Avaliação do estado atual do conhecimento sobre a diversidade microbiana no Brasil. Microbiota (versão preliminar)** UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP, 2003. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/microb1.pdf>

MASCARIN, G. M. et al. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. **Biological Control**, v. 66, n. 3, p. 209–218, Setembro 2013.

MATHIVANAN, N.; KABILAN, V.; MURUGESAN, K. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasitete groundnut rust, *Puccinia arachidis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 646–651, 1 jul. 1998.

MATSUMOTO, Y. et al. Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 665–671, Fevereiro 2004.

MECA, G. et al. Antibacterial effect of the bioactive compound beauvericin produced by *Fusarium proliferatum* on solid medium of wheat. **Toxicon**, v. 56, n. 3, p. 349–354, Setembro 2010.

MENDONSA, E. S. et al. An enzyme from *Myrothecium verrucaria* that degrades insect cuticles for biocontrol of *Aedes aegypti* mosquito. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 4, p. 373–

376, abr. 1996.

MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, SFB 431: Membrane proteins - Functional dynamics and coupling to cellular networks. v. 90, n. 9, p. 759–769, Setembro 2011.

MERZENDORFER, H.; ZIMMICH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 24, p. 4393–4412, 15 dez. 2003.

MIRZADEH, S. et al. Characterization of zinc sulfide (ZnS) nanoparticles Biosynthesized by *Fusarium oxysporum*. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 16, n. 2, p. 374–378, Abril 2013.

MORENO, C. A. et al. Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 2, p. 111–120, Abril 2009.

NAMPOOTHIRI, K. M. et al. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1583–1590, 30 jul. 2004.

NONGMAITHEM, N.; ROY, A.; BHATTACHARYA, P. M. Screening of *Trichoderma* isolates for their potential of biosorption of nickel and cadmium. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016.

PAREEK, N. et al. Mustard oil cake as an inexpensive support for production of chitin deacetylase by *Penicillium oxalicum* SAEM-51 under solid-state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 212–217, Outubro 2014.

PATIL, N. S.; JADHAV, J. P. Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine by solid state fermentation of chitinase by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 using agricultural residues. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 91, p. 9–17, jul. 2014.

PATIL, N. S.; JADHAV, J. P. Significance of *Penicillium ochrochloron* chitinase as a biocontrol agent against pest *Helicoverpa armigera*. **Chemosphere**, v. 128, p. 231–235, jun. 2015.

PATIL, N. S.; WAGHMARE, S. R.; JADHAV, J. P. Purification and characterization of an extracellular antifungal chitinase from *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 and its application in protoplast formation. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 176–183, jan. 2013.

PERES, M. B.; VERCILLO, U. E.; DIAS, B. F. DE S. Avaliação do Estado de Conservação da Fauna Brasileira e a Lista de Espécies Ameaçadas: o que significa, qual sua importância, como fazer? **Biodiversidade Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 45–48, 2011.

PETROSKI, R. J.; STANLEY, D. W. Natural Compounds for Pest and Weed Control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8171–8179, Setembro 2009.

PIO, T. F.; MACEDO, G. A. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum*

using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 5, p. 613–619, Outubro 2007.

PORRI, A. et al. *Fusarium oxysporum* degradation and detoxification of a new textile-glycoconjugate azo dye (GAD). **Fungal Biology**, v. 115, n. 1, p. 30–37, jan. 2011.

PYLRO, V. S. et al. Brazilian Microbiome Project: Revealing the Unexplored Microbial Diversity—Challenges and Prospects. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 2, p. 237–241, 31 out. 2013.

RAMÍREZ-COUTIÑO, L. et al. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1106–1110, Maio 2006.

RUSTIGUEL, C. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Optimization of the Chitinase Production by Different *Metarhizium anisopliae* Strains under Solid-State Fermentation with Silkworm Chrysalis as Substrate Using CCRD. **Advances in Microbiology**, v. 02, n. 03, p. 268–276, 2012.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, Highlights in Toxinology: Biodiversity in Toxins - Tools for Biological Research and Drug Development. v. 56, n. 7, p. 1267–1274, Dezembro 2010.

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 36–42, Fevereiro 2008.

SETTE, L. D.; PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A. Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation. **Fungal Genetics and Biology**, Fungal Biology in Brazil. v. 60, p. 2–8, nov. 2013.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Invited Review Issue 2009. v. 44, n. 1, p. 13–18, Abril 2009.

STOYKOV, Y. M.; PAVLOV, A. I.; KRASTANOV, A. I. Chitinase biotechnology: Production, purification, and application. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 1, p. 30–38, jan. 2015.

SURESH, P. V.; KUMAR, P. K. A. Enhanced degradation of α -chitin materials prepared from shrimp processing byproduct and production of N-acetyl-d-glucosamine by thermoactive chitinases from soil mesophilic fungi. **Biodegradation**, v. 23, n. 4, p. 597–607, 22 jan. 2012.

SURESH, P. V.; KUMAR, P. K. A.; SACHINDRA, N. M. Thermoactive β -N-acetylhexosaminidase production by a soil isolate of *Penicillium monoverticillium* CFR 2 under solid state fermentation: parameter optimization and application for N-acetyl chitooligosaccharides preparation from chitin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 1435–1447, 30 out. 2010.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 1–2, p. 9–19, Fevereiro 2009.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, Dezembro 2013.

TING, A. S. Y.; CHAI, J. Y. Chitinase and β -1,3-glucanase activities of *Trichoderma harzianum* in response towards pathogenic and non-pathogenic isolates: Early indications of compatibility in consortium. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 109–113, jan. 2015.

TONDJE, P. R. et al. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. **Biological Control**, v. 43, n. 2, p. 202–212, nov. 2007.

TRISUWAN, K. et al. Pyrone derivatives from the soil fungus *Fusarium solani* PSU-RSPG37. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 3, p. 495–497, Agosto 2013.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 3, p. 236–240, 1 mar. 1992.

VENUGOPALAN, A. et al. Effect of fermentation parameters, elicitors and precursors on camptothecin production from the endophyte *Fusarium solani*. **Bioresource Technology**, v. 206, p. 104–111, Abril 2016.

VILLA-LERMA, G. et al. Ultrasonication and steam-explosion as chitin pretreatments for chitin oligosaccharide production by chitinases of *Lecanicillium lecanii*. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 794–798, Outubro 2013.

WAWERU, B. et al. Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes provide field control of nematodes, improving yield of banana (*Musa* sp.). **Biological Control**, v. 74, p. 82–88, jul. 2014.

WIDMER, T. L. Screening *Trichoderma* species for biological control activity against *Phytophthora ramorum* in soil. **Biological Control**, v. 79, p. 43–48, Dezembro 2014.

WIWAT, C.; SIWAYAPRAHM, P.; BHUMIRATANA, A. Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No.4.1. **Current Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 134–140, set. 1999.

YUAN, L. et al. Screening and Identification of Cellulase-Producing Strain of *Fusarium oxysporum*. **Procedia Environmental Sciences**, 2011 International Conference of Environmental Science and Engineering. v. 12, Part B, p. 1213–1219, 2012.

ZHANG, S.; GAN, Y.; XU, B. Biocontrol potential of a native species of *Trichoderma longibrachiatum* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, v. 94, p. 21–29, Outubro 2015.

ZHANG, X. et al. A nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain enhances phytoextraction of heavy metals by the hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. **Journal of Hazardous Materials**, v. 229–230, p. 361–370, Agosto 2012.

6 ARTIGO I

SCREENING DE FUNGOS PRODUTORES DE QUITINASES NO SUL DO BRASIL¹

RESUMO

Os fungos apresentam uma ampla gama de aplicações biotecnológicas, por sua elevada produção de enzimas hidrolíticas utilizadas em diversos fins, como as quitinases. Na agricultura as quitinases podem ser utilizadas no controle de insetos, com aplicação na produção de bioinseticidas. Além disso são utilizadas para produção de quito-oligossacarídeos e N-acetil-D-glicosamina, derivados de quitina com ampla utilização na indústria farmacêutica. Porém, alguns fatores restringem sua extensa exploração comercial, como a falta de microrganismos com elevada produção de quitinases. O objetivo do trabalho foi isolar e identificar fungos produtores de quitinases e avaliar a produção desta enzima em fermentação em estado sólido (FES). Foram isolados 51 fungos a partir do exoesqueleto de percevejos *Tibraca limbativentris* em 5 pontos de coleta distribuídos no Rio Grande do Sul, Brasil. Dos 51 isolados, 50 produziram quitinases e dez foram selecionados como os melhores produtores desta enzima em FES e identificados pela região ITS1-5.8S-ITS2 do nrDNA. Os isolados selecionados *Trichoderma* sp. UFSMQ40 com 13,07 U gds⁻¹ de quitinase, seguido dos isolados *Fusarium* sp. UFSMQ32 (11,35 U gds⁻¹), *Trichoderma* sp. UFSMQ24 (10,11 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ18 (10,05 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ1 (9,84 U gds⁻¹), *Lecanicillium* sp. UFSMQ6 (9,71 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ27 (9,11 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ12 (8,92 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ49 (8,16 U gds⁻¹) e *Fusarium* sp. UFSMQ17 (8,05 U gds⁻¹) apresentaram elevada produção de quitinases em FES. O isolado *Trichoderma* sp. UFSMQ40 apresentou a maior produção de quitinase tornando-se um

¹ Artigo elaborado de acordo com as normas da revista Interciencia.

² Artigo submetido a Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology

resultado promissor para futuros estudos de otimização da produção, caracterização e purificação destas enzimas.

Palavras-chave: *Trichoderma* sp., bioprocessos, fungos quitinolíticos, fermentação em estado sólido, enzimas

SUMMARY

The fungi have a wide range of biotechnological applications, because of its high production of hydrolytic enzymes used in various purposes such as chitinases. In agriculture the chitinase can be used to control insects, as application in biopesticides production. Furthermore they are used for the production of chito-oligosaccharides and N-acetyl-D-glucosamine, chitin derivatives with extensive use in the pharmaceutical industry. However, some factors restrict their extensive commercial exploitation, such as lack of microorganisms with high production of chitinase. The objective of this study was to isolate and identify producers fungi of chitinase and evaluate the production of this enzyme in solid state fermentation (SSF). 51 fungi were isolated from the exoskeleton of *Tibraca limbativentris* bugs in 5 collection points distributed in Rio Grande do Sul state, Brazil. From 51 isolates fungi, 50 produced chitinase and ten were selected as the best producers of this enzyme in SSF and identified the genus level by ITS1-5.8S-ITS2 of nrDNA region. The selected *Trichoderma* sp. UFSMQ40 with 13.07 U gds⁻¹ chitinase, followed by isolates *Fusarium* sp. UFSMQ32 (11.35 U gds⁻¹), *Trichoderma* sp. UFSMQ24 (10.11 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ18 (10.05 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ1 (9.84 U gds⁻¹), *Lecanicillium* sp. UFSMQ6 (9.71 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ27 (9.11 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ12 (8.92 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ49 (8.16 U gds⁻¹) and *Fusarium* sp. UFSMQ17 (8.05 U gds⁻¹) showed high production of chitinase in SSF. The isolated *Trichoderma* sp. UFSMQ40 showed the highest

production of chitinase becoming a promising result for future optimization studies of production, characterization and purification of these enzymes.

Keywords: *Trichoderma* sp., bioprocess, chitinolytic fungi, solid state fermentation, enzymes.

RESUMEN

Los hongos presentan una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas, por su elevada producción de enzimas hidrolíticas utilizadas en diversos fines, tales como las quitinasas. En la agricultura las quitinasas pueden ser utilizadas en el control de insectos, con amplia producción de bioplaguicidas. Además se utilizan para la producción de quito-oligosacáridos y N-acetil-D-glucosamina, derivados de quitina con un amplio uso en la industria farmacéutica. Sin embargo, algunos factores limitan su extensa explotación comercial, tales como la falta de microorganismos con alta producción de quitinasa. El objetivo de este estudio fue aislar e identificar hongos productores de quitinasas y evaluar la producción de esta enzima en la fermentación en estado sólido (FES). Se aislaron 51 hongos del exoesqueleto de chinches *Tibraca limbativentris* colectados en 5 puntos distribuidos en Rio Grande do Sul (Brasil). De 51 los hongos aislados, 50 producen quitinasa y 10 fueron seleccionados como los mejores productores de esta enzima en la FES e identificaron a nivel de género en la Región ITS1-5.8S-ITS2 de nrDNA. Los aislados seleccionados fueron: *Trichoderma* sp UFSMQ40 con 13,07 U gds⁻¹ de quitinasa, seguido de *Fusarium* sp. UFSMQ32 (11,35 U gds⁻¹), *Trichoderma* sp. UFSMQ24 (10,11 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ18 (10,05 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ1 (9,84 U gds⁻¹), *Lecanicillium* sp. UFSMQ6 (9,71 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ27 (9,11 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ12 (8,92 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ49 (8,16 U gds⁻¹) y *Fusarium* sp. UFSMQ17 (8,05 U gds⁻¹) que presentaron una elevada producción de quitinasa en la FES. El hongo aislado *Trichoderma* sp. UFSMQ40 fue el que presentó la mayor producción de quitinasa

convirtiéndose en un resultado prometedor para futuros estudios de optimización de la producción, caracterización y purificación de estas enzimas.

Palabras clave: *Trichoderma* sp., bioprocesos, hongos, fermentación en estado sólido, enzimas.

Introdução

A diversidade biológica é um recurso importante e potencial para o desenvolvimento de novas e sustentáveis ferramentas de gestão de ecossistemas e oportunidades de bioprospecção (Pylro *et al.*, 2013). Apesar do reconhecimento da sua importância, a diversidade microbiana brasileira é considerada como amplamente desconhecida em relação a outros grupos, como os animais e as plantas superiores. Consequentemente, há um vasto campo propício à descoberta e utilização biotecnológica de novas espécies (Manfio, 2003; Peres *et al.*, 2011).

Estima-se que existam no Brasil 150.000 a 264.000 espécies de fungos (Lewinsohn e Prado, 2005), porém até 2015 foram registradas apenas 5.719 espécies distribuídas em 1.246 gêneros (Maia *et al.*, 2015). Os autores consideram os Estados de São Paulo (1.846 espécies), Pernambuco (1.611) e Rio Grande do Sul (1.377) como os que apresentam maior diversidade de espécies registradas.

Os fungos apresentam uma ampla gama de aplicações biotecnológicas, principalmente por sua elevada produção de enzimas hidrolíticas, que podem ser utilizados nos mais variados fins. As enzimas hidrolíticas mais comumente produzidas pelos fungos são as lipases, proteases, quitinases, amilases, celulasas e as hemicelulasas (Chavan e Deshpande, 2013).

Nos fungos filamentosos, as quitinases exercem funções vitais na degradação e remodelagem da parede celular, na autólise, na germinação dos esporos, na separação celular

e no desenvolvimento das hifas (morfogênese), na aquisição de nutrientes e no envolvimento durante os processos de infecção (parasitismo) (Felse e Panda, 2000; Schrank e Vainstein, 2010). As quitinases são abundantes em fungos entretanto, sua produção e diversidade varia consideravelmente entre as espécies. As leveduras produzem poucos tipos de quitinases, enquanto os fungos filamentosos produzem uma ampla diversidade destas enzimas (Dahiya *et al.*, 2006; Seidl, 2008).

Na última década, as quitinases foram avaliadas em relação a diversas aplicações (Almeida *et al.*, 2008; Patil *et al.*, 2013) incluindo o controle biológico de fungos fitopatogênicos por meio da degradação da quitina da parede celular (Patil *et al.*, 2013; Dahiya *et al.*, 2006), a bioconversão de resíduos quitinosos em etanol (Inokuma *et al.*, 2013), e a produção de quitoligossacarídeos bioativos para uso medicinal (Mahata *et al.*, 2014).

Na agricultura, as quitinases podem ser bioprospectadas para o controle de insetos, com uma aplicação direta na produção de bioinseticidas. Além disso, os bioinseticidas apresentariam baixa toxicidade aos vertebrados, tendo em vista que estes organismos-alvo não apresentam quitinas como componentes estruturais (Gomaa, 2012; Patil e Jadhav, 2015). Nesse sentido, estudos realizados utilizando quitinases fúngicas controlaram efetivamente larvas de *Helicoverpa armigera* (Binod *et al.* 2007; Patil e Jadhav, 2015), considerada importante praga agrícola que causa grandes prejuízos em lavouras de soja no Brasil.

Apesar dessa relevância, alguns fatores restringem uma exploração comercial mais ampla das quitinases, dentre os quais destaca-se a escassez de microrganismos com altas taxas de produção, o alto custo de produção, e a baixa atividade e estabilidade das quitinases purificadas disponíveis (Binod *et al.*, 2007; Suresh e Kumar, 2012; Halder *et al.*, 2013). Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi isolar e identificar fungos produtores de quitinases e avaliar a produção desta enzima em fermentação em estado sólido.

Material e Métodos

Coleta e isolamento de fungos quitinolíticos

As coletas de percevejos da espécie *Tibraca limbativentris* Stal foram realizadas em 5 pontos durante os meses de junho à agosto de 2014, em áreas de cultivo de arroz em municípios da região central do estado do Rio Grande do Sul (Brasil); Ponto 1: Restinga Seca (29° 43' 14" S; 53° 23' 36,17" W), Ponto 2: Santa Maria (29° 43' 68,1" S; W 53° 33' 69,7" W), Ponto 3: Agudo (29° 59' 36,7" S, W 51° 19' 9,14 W), Ponto 4: Paraíso do Sul (29° 48' 35,87" S; 53° 06' 13,84" W) e Ponto 5: Dona Francisca (29° 33' 46,21" S; O 53° 20' 24,13" W), Figura 1. Neste período de inverno no Rio Grande do Sul, os percevejos estão hibernando nos restos culturais e mais suscetíveis aos fungos entomopatogênicos. Foram coletados somente os percevejos que exibiram visivelmente a extrusão de massa de esporos sobre o exoesqueleto do inseto. As amostras foram acondicionadas individualmente em tubos de 15 mL estéreis e mantidas a 4 °C até o isolamento dos fungos.



Figura 1. Locais onde foram realizadas as coletas de percejos *Tibraca limbativentris* Stal, no estado do Rio Grande do Sul – Brasil. Ponto 1: Restinga Seca, ponto 2: Santa Maria, ponto 3: Agudo, ponto 4: Paraíso do Sul e ponto 5: Dona Francisca.

No laboratório, pequenas alíquotas da massa de esporos desenvolvida sobre a cutícula dos insetos foram inoculados em placas de Petri com meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA). As placas foram incubadas a 28 °C com fotoperíodo de 12 horas, durante 7 dias. As culturas foram repicadas até a obtenção de culturas puras e armazenadas a 4 °C no banco de fungos do Laboratório de Biologia do Solo e Microbiologia do Ambiente Professor Marcos Rubens Fries, na Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Seleção dos isolados produtores de quitinases

A quitina coloidal foi previamente preparada como descrito por Liu *et al.* (2014). Primeiramente, 4 g de quitina grau prático (Sigma-Aldrich®) foi eluída com 40 mL de (v/w) de HCl a 37% (v/v) sob agitação por 50 min. Logo após, 1 L de água destilada gelada foi adicionada à mistura. A mistura coloidal foi centrifugada e o *pellet* foi coletado e lavado com água destilada até atingir pH 5,0.

Para a seleção dos fungos produtores de quitinases foi utilizado o meio de cultivo seletivo Quitina Ágar, (Atlas 2004), composto por 15 g de Ágar, 3 g L⁻¹ de quitina coloidal (única fonte de carbono), 2 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,1 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,7 g L⁻¹ de KH₂PO₄, MgSO₄.7 H₂O, 1 mg L⁻¹ de FeSO₄, 1 mg L⁻¹ de MnSO₄, de água destilada, pH 5.8.

Um disco de 1 cm de diâmetro foi retirado das culturas puras em meio BDA e inoculado em meio Quitina Ágar. As placas foram incubadas à 28 °C, por 15 dias. As culturas fúngicas que apresentaram alo de crescimento foram testadas quanto a produção de quitinases em fermentação em estado sólido.

Produção de quitinase em fermentação em estado sólido (FES)

Os isolados fúngicos foram inoculados em frascos de Erlenmeyers de 250 mL com 5 g de farelo de trigo, 1% (m/m) de quitina coloidal (massa seca), 5 mL de solução de nutrientes:

1 g L⁻¹ de NaNO₃, 5 g L⁻¹ de KNO₃, 5 g L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄, 1 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 1 g L⁻¹ de NaCl e 1 mL de solução de elementos traço como segue: 0.8 g L⁻¹ de MnSO₄, 1,7 g L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O e 2,5 g L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O. O meio de cultivo foi ajustado a 60% (m/m) de umidade e foi autoclavado durante 30 minutos a 121 °C. Após, três Erlenmeyers para cada isolado foram inoculados com 2 discos de 1 cm de diâmetro e incubados a 28 °C por 96 horas, no escuro.

A extração enzimática foi realizada pela adição de 60 mL de água destilada estéril, sob agitação a 120 rpm por 60 min. O fluido extracelular foi obtido por filtração a vácuo e armazenado em tubos de 15 mL a -15 °C. A atividade da quitinase foi determinada utilizando quitina coloidal como substrato para a reação enzimática. A mistura de reação foi de 0,5 mL do extrato enzimático adicionado a 1 mL de quitina coloidal 3.5 % (m/v) em tampão fosfato de sódio 5 mM (pH 5.2). As amostras foram incubadas a 37 °C durante 1 hora. Após essa reação, a quantificação de açúcares redutores foi realizado pelo método do DNS (Miller, 1959). A uma alíquota de 1 mL da solução de reação foi adicionado 2 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) deixando ferver por 5 min. Após isso, as amostras foram resfriadas e a absorbância foi medida em 540 nm. A quantidade de açúcar redutor produzido foi determinada utilizando uma curva de calibração com N-acetilglicosamina pura (Sigma-Aldrich®). Uma unidade de atividade de quitinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de um µmol de N-acetilglicosamina por minuto a 37 °C. A atividade das quitinases foi expressa com base no massa seca do substrato (U gds⁻¹). Os resultados de produção de quitinases foram submetidos ao teste Scott Knott, ao nível de significância $\alpha=0.05$ na linguagem de programação R (R Core Team, 2016).

Identificação dos isolados

De todos os isolados, somente foram identificados os 10 espécimens que apresentaram a maior produção de quitinase em FES. O DNA foi extraído a partir de alíquotas do *pellet* do crescimento em meio de cultivo líquido Batata Dextrose (BD) usando o Kit de extração ZR Fungal/Bacterial DNA Mini Prep (Zymo Research, Irvine, EUA). Após a extração do DNA, a completa região do nrDNA (ITS1-5.8S-ITS2) para fungos foi amplificada com os primers ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). A reação de amplificação dos fragmentos alvo foi realizada conforme Baldoni et al. (2012). Após a amplificação, a eletroforese foi realizada para verificar a amplificação em gel de agarose a 1,5% e tampão TBE 1X. As amostras de DNA foram coradas com BlueGreen Loading Dye I[®] (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) e observadas em luz ultravioleta. Os produtos da PCR foram purificados com o kit Gen Elute PCR clean-up Kit[®] (Sigma, Saint Louis, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O sequenciamento das amostras foi realizado no sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster, EUA).

Os fragmentos seqüenciados foram analisados utilizando o *software* Staden Package 2.0.0b (Staden *et al.*, 2003) para a obtenção das sequências consenso. As sequências dos isolados fúngicos foram depositadas no banco de dados GenBank e receberam o seguinte número de acesso: UFSMQ1 (KX496875), UFSMQ6 (KX496884), UFSMQ12 (KX496876), UFSMQ17 (KX496877), UFSMQ18 (KX496878), UFSMQ24 (KX496882), UFSMQ27 (KX496879), UFSMQ32 (KX496880), UFSMQ40 (KX496883) e UFSMQ49 (KX496881).

Para a identificação dos microrganismos as sequências foram alinhadas no *software* BioEdit (Hall, 1999), utilizando o algoritmo ClustalW. A identificação molecular dos espécimes foi realizada com base em análises da região ITS no *software* MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2013), com base na análise de Máxima Verossimilhança em um total de 1.000 repetições para todas as reconstruções. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos para resolver os dados foi estimado utilizando o *software* Model Test (Posada e Crandall, 1998).

Para esta identificação também foram utilizadas sequências retiradas do GenBank de outros fungos que possuem uma relação de similaridade próxima utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Altschul *et al.*, 1990).

Resultados e Discussão

Foram isolados 51 espécimens fúngicos a partir da massa de esporos retirada do exoesqueleto de percevejos *Tibraca limbativentris* Stal, coletados nos cinco locais do estado do RS. Deste total foram isolados: 19 espécimens no ponto 1 (UFSMQ1 - UFSMQ19), 8 espécimens no ponto 2 (UFSMQ20 - UFSMQ27), 4 espécimens no ponto 3 (UFSMQ28 - UFSMQ31), 6 espécimens no ponto 4 (UFSMQ32 - UFSMQ37) e 14 espécimens no Ponto 5 (UFSMQ38 - UFSMQ51).

Após a realização da seleção quanto à produção de quitinases foi verificado que somente um isolado (UFSMQ51) originado do município de Dona Francisca, não apresentou alo de crescimento em meio de cultivo quitina Ágar, durante os 15 dias de incubação e foi descartado. Todos os demais isolados avaliados produziram quitinase em FES (Figura 2).

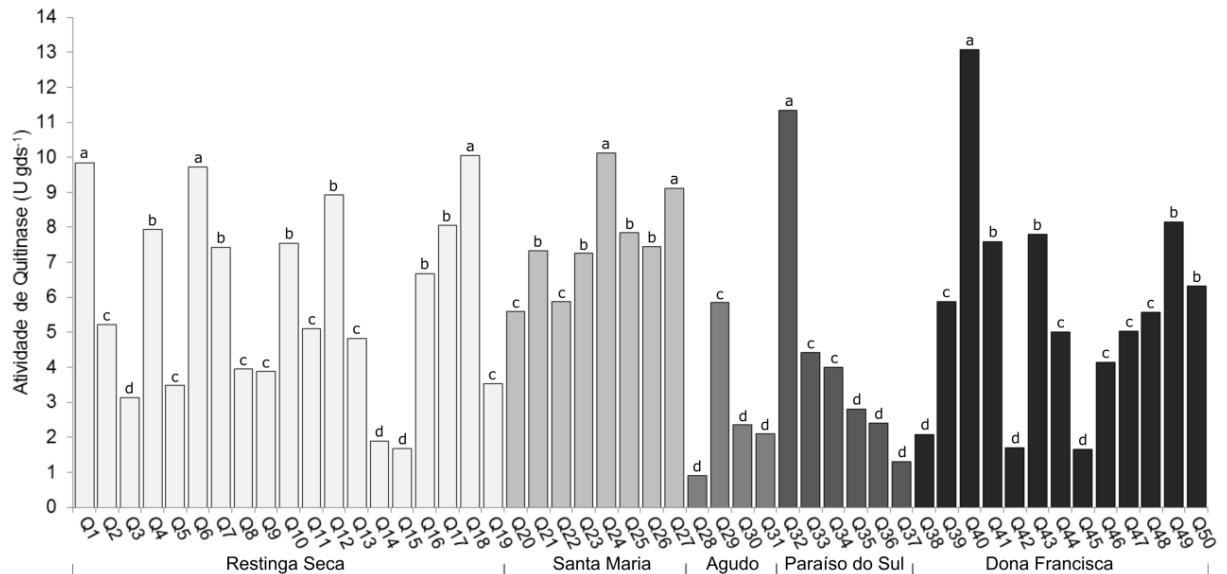


Figura 2. Média de produção de quitinase em meio de cultivo sólido dos espécimes isolados em 5 pontos de coleta. **Ponto 1:** Restinga Seca (Q1 - Q19), **Ponto 2:** Santa Maria (Q20 - Q27) **Ponto 3:** Agudo (Q28 - Q31), **Ponto 4:** Paraíso do sul (Q32 - Q37), **Ponto 5:** Dona Francisca (Q38 - Q51). As letras no topo das barras correspondem ao teste de Scott-Knott ao nível de significância de $\alpha= 0.05$.

Foram identificados pela região ITS1-5.8S-ITS2 do nrDNA os 10 isolados que apresentaram a maior produção de quitinase em FES: UFSMQ40 com $13,07 \text{ U gds}^{-1}$, seguido dos isolados UFSMQ32 ($11,35 \text{ U gds}^{-1}$), UFSMQ24 ($10,11 \text{ U gds}^{-1}$), UFSMQ18 ($10,05 \text{ U gds}^{-1}$), UFSMQ1 ($9,84 \text{ U gds}^{-1}$), UFSMQ6 ($9,71 \text{ U gds}^{-1}$), UFSMQ27 ($9,11 \text{ U gds}^{-1}$), UFSMQ12 ($8,92 \text{ U gds}^{-1}$), UFSMQ49 ($8,16 \text{ U gds}^{-1}$) e UFSMQ17 ($8,05 \text{ U gds}^{-1}$).

Por meio da comparação com as demais sequências nucleotídicas depositadas no Banco de Dados do NCBI utilizando-se a ferramenta BLASTn, as sequências dos 10 isolados fúngicos foram representadas em dendogramas conforme o seu respectivo gênero (Figuras 3-5). Os isolados UFSMQ40 e UFSMQ24 apresentaram elevada similaridade molecular (mais que 98%) com várias espécies do gênero *Trichoderma*, entre elas: *T. gamsii*, *T. koningii*, *T. koningiopsis* e *T. atroviride*. Na Figura 3, a análise de máxima verossimilhança mostra que os

isolados UFSMQ40 e UFSMQ24 foram considerados pertencentes ao gênero *Trichoderma*. Entretanto, não foi possível realizar a identificação em nível de espécie pois, a região do nrDNA (ITS1-5.8S-ITS2) não apresentou variação nucleotídica interespecífica suficiente para distinguir espécies do gênero *Trichoderma*, resultando na indistinção das espécies no dendograma.

Conforme estudo apresentado por Hermosa *et al.* (2004), pode não se estabelecer filogenia do gênero *Trichoderma* somente com uma sequência de genes pois, a variação nucleotídica ocorre em poucos pares de bases, porém com a amplificação de uma região do fator de alongação *tef1* é possível obter uma maior variação para resolver táxons do gênero *Trichoderma*.

Hoyos-Carvajal *et al.* (2009) também observaram que muitas espécies do gênero *Trichoderma* identificadas em nível de espécie com o auxílio de estudos morfológicos e moleculares utilizando-se a região do fator de alongação (*tef*), não foram diferenciadas pelo sequenciamento da região ITS, como as seguintes espécies: *T. gamsii*, *T. koningiopsis*, *T. dorotheae*, *T. ovalisporum*, *Hypocrea rufa*, *H. koningii*, *T. taiwanense*, *T. dingleyae*.

A sequência do isolado UFSMQ6 apresentou maior similaridade com as espécies *Lecanicillium* sp. AB378529 e *Lecanicillium* sp. AB378528 separando das espécies de *Lecanicillium primulinum* com elevado valor de *bootstrap* (99%) (Figura 4).

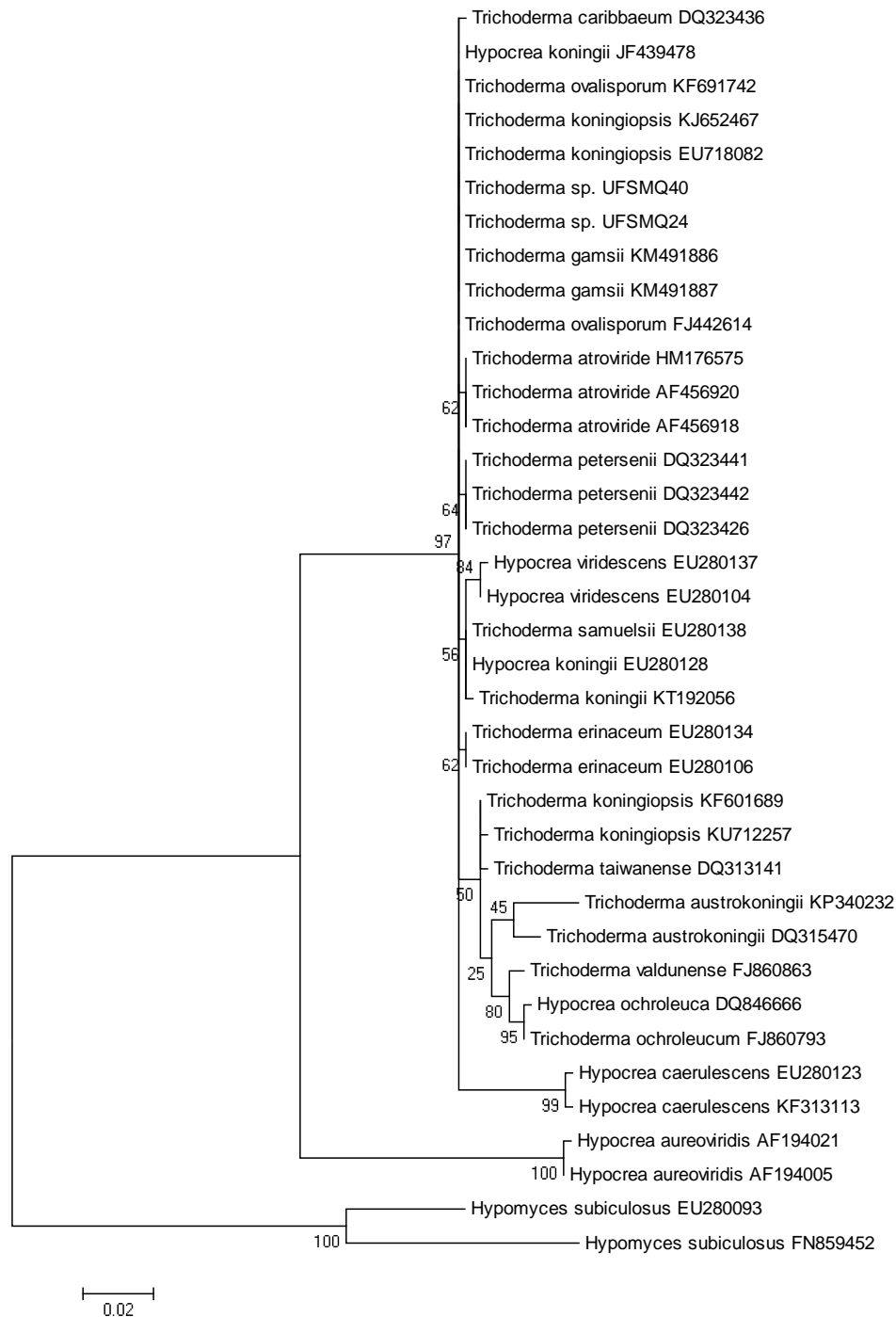


Figura 3. Dendrograma de *Trichoderma* spp., obtida a partir de sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do nrDNA. Análise de máxima verossimilhança foi realizada com o modelo Tamura Nei Plus Gama com 1000 replicatas. Valores de *Bootstrap* estão expressos em %. As sequências de *Hypocrea aureoviridis* AF194021, *Hypocrea aureoviridis* AF194005 (HERMOSA et al., 2004), *Hypomyces subiculosus* EU280093 e *Hypomyces subiculosus* FN859452 (HOYOS-CARVAJAL et al., 2009) foram utilizadas como *outgroup*.

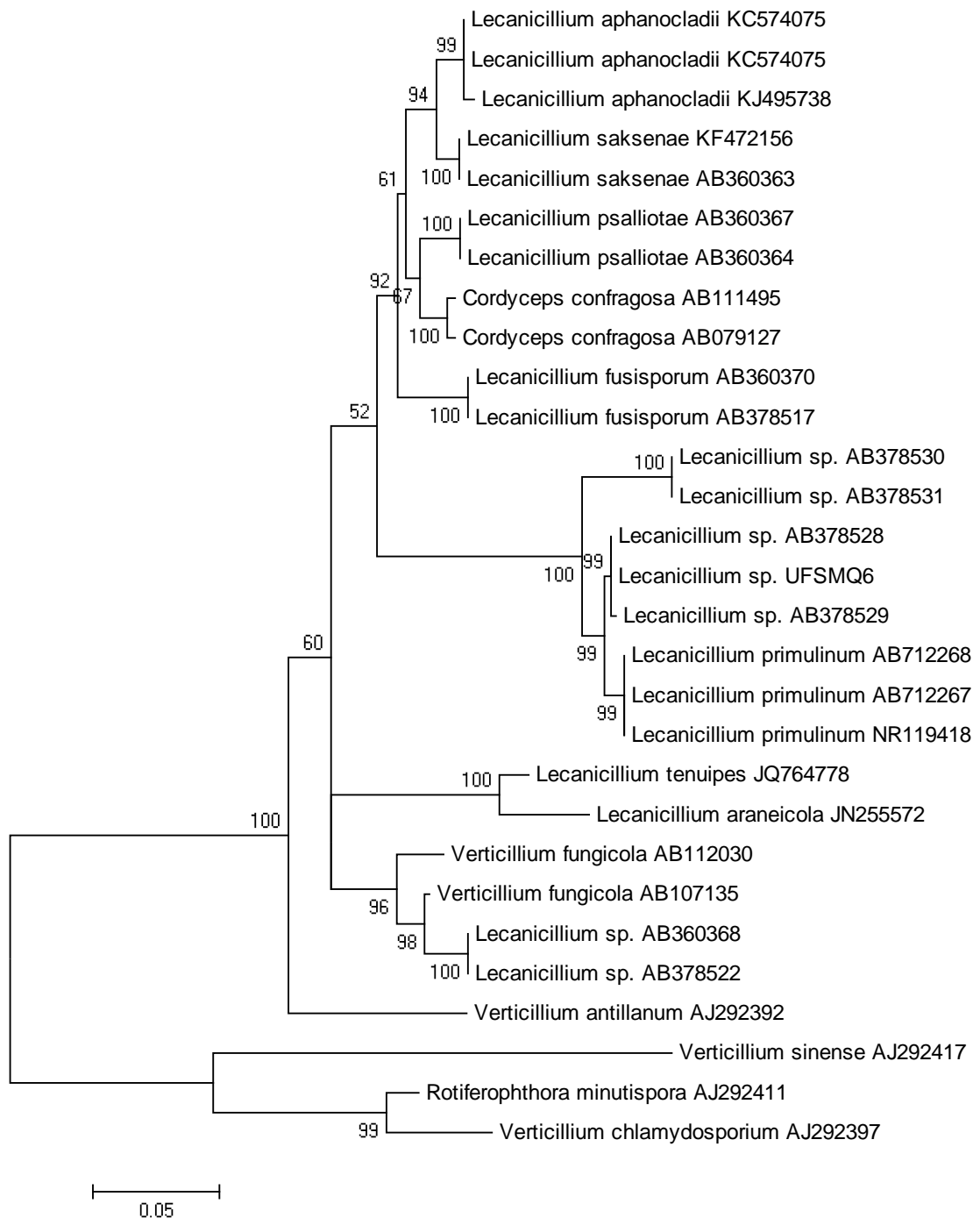


Figura 4. Dendrograma de *Lecanicillium* spp., obtida a partir de sequências da região nrDNA. Análise de máxima verossimilhança foi realizada com 1000 replicatas, utilizando o modelo Hasegawa-Kishino-Yano (G+I=5). Valores de *Bootstrap* estão em %. As sequências de *Verticillium sinense* AJ292417, *Verticillium chlamydosporium* AJ292397 e *Rotiferophthora minutispora* AJ292411 (SUKARNO et al., 2009) foram utilizadas como *outgroup*.

As sequências de *Lecanicillium* sp. AB378529 e *Lecanicillium* sp. AB378528 foram reportadas por Sukarno *et al.* (2009) como novas espécies para o gênero *Lecanicillium*, em análise de máxima parcimônia com 69 espécies, porém não foram identificadas a nível de espécie. Para isso, são necessários estudos morfológicos e a caracterização molecular de mais espécies para que aumente o número de sequências depositadas nos bancos de dados, permitindo novas comparações.

Na Figura 5, as sequências dos isolados UFSMQ1, UFSMQ12, UFSMQ17, UFSMQ18, UFSMQ27, UFSMQ32 e UFSMQ49 apresentaram maior similaridade (mais que 98%) com as espécies do gênero *Fusarium*. Na análise de máxima verossimilhança as espécies foram divididas em 2 cladogramas distintos (clado I e clado II) com elevado suporte de *bootstrap* (95%).

No clado I os isolados UFSMQ12 e UFSMQ27 apresentaram maior similaridade com *F. oxysporum* (JX915255) e *F. oxysporum* (KP942940) com elevado *bootstrap* (86%), confirmando a identificação desses isolados.

Os isolados UFSMQ1 e UFSMQ49 foram agrupados com as espécies de *F. begoniae* KM577645, *F. begoniae* KC464616 e *F. proliferatum* AB646795. Apesar dos isolados UFSMQ1 e UFSMQ49 formarem um agrupamento com separação das demais espécies do clado I, essa separação apresentou baixo suporte de *bootstrap* (58%), pois os isolados não apresentaram variação interespecífica suficiente para distinção entre as espécies, permanecendo ainda indefinidas dentro do gênero *Fusarium*.

O isolado UFSMQ32 apresentou baixa variação interespecífica e foi similar com várias espécies do gênero *Fusarium* do clado I, não sendo possível determinar sua espécie. No clado II os isolados UFSMQ17 e UFSMQ18 foram mais similares com as espécies de *F. solani* JN232140 e *F. solani* JQ625574. Embora apresentando distinção em 2 agrupamentos,

o suporte de bootstrap permaneceu baixo (43%) não sustentando a separação, confirmando a identificação dos isolados com a espécie de *Fusarium solani*.

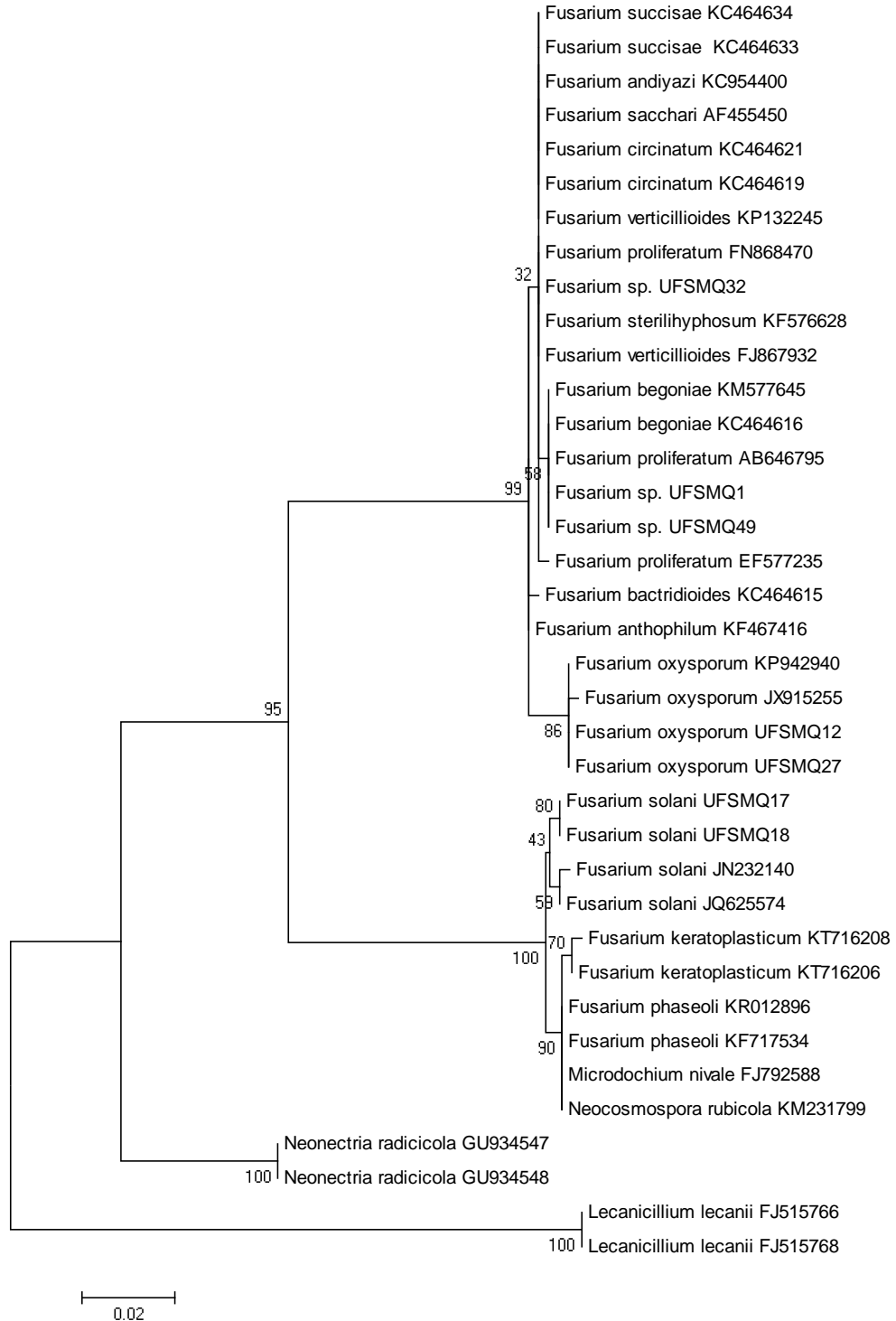


Figura 5. Dendrograma de *Fusarium* spp., obtido a partir de seqüências da região nrDNA. Análise de máxima verossimilhança foi realizada com 1000 replicatas utilizando o algoritmo General Time Reversible model com G+I=5. Valores de *Bootstrap* estão em %. As seqüências

de *Neonectria radiculicola* GU934547, *N. radiculicola* GU934548, *Lecanicillium lecanii* FJ515766 e *L. lecanii* FJ515768 foram utilizadas como *outgroups*.

O isolado *Trichoderma* sp. UFSMQ40 apresentou a maior atividade de quitinases, 13,07 U gds⁻¹, em relação a todos isolados fúngicos avaliados, porém, não diferiu significativamente da produção de quitinases dos isolados *Fusarium* sp. UFSMQ32 (11,35 U gds⁻¹), *Trichoderma* sp. UFSMQ24 (10,11 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ18 (10,05 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ1 (9,84 U gds⁻¹), *Lecanicillium* sp. UFSMQ6 (9,71 U gds⁻¹) e *Fusarium* sp. UFSMQ27 (9,11 U gds⁻¹) (Figura 2).

O isolado *Trichoderma* sp. UFSMQ24 produziu 10,11 U gds⁻¹ de quitinases, sendo considerada também uma elevada produção em FES. Em condições similares Nampoothiri *et al.* (2004) realizaram a otimização da produção de quitinase pelo isolado *T. harzianum* TUBF 781 e obtiveram a produção máxima de 3,18 U gds⁻¹ de quitinase em 96 horas de cultivo, utilizando também farelo de trigo como substrato no processo de FES.

A produção de quitinases dos isolados *Trichoderma* sp. UFSMQ24 e *Trichoderma* sp. UFSMQ40 foram 3 e 4 vezes maiores, respectivamente, em relação a produção reportada por Nampoothiri *et al.* (2004) pelo isolado *T. harzianum*, sob o mesmo tempo de cultivo. No mesmo sentido, Kovacs *et al.* (2004) também relataram uma menor produção em relação aos isolados *Trichoderma* sp. UFSMQ24 e *Trichoderma* sp. UFSMQ40. Nesse estudo, os autores utilizaram o isolado *T. longibrachiatum* IMI 92027 em FES com farelo de trigo como substrato e após a otimização obtiveram a produção de apenas 5,0 U gds⁻¹ de quitinase após 72 horas de incubação. Corroborando com esses resultados Binod *et al.* (2007) encontraram a produção de 3,2 U gds⁻¹ de quitinase em FES com farelo de trigo como substrato utilizando o isolado *T. harzianum* TUBF 927 em 72 horas de incubação. Diante desses resultados, os isolados *Trichoderma* sp. UFSMQ24 e *Trichoderma* sp. UFSMQ40 possuem elevado

potencial para produção de quitinases, visto que apresentaram elevada produção sob FES sem a otimização das condições do processo fermentativo.

O isolado *Lecanicillium* sp. UFSMQ6 apresentou a produção máxima de 9,71 U gds⁻¹ de quitinase, sendo o quinto isolado melhor produtor de quitinase sob FES, em relação aos isolados avaliados nesse estudo. Porém, entre os 10 melhores produtores de quitinases avaliados, a atividade quitinolítica somente diferiu dos isolados *Fusarium* sp. UFSMQ12 (8,91 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ49 (8,15 U gds⁻¹), e *Fusarium* sp. UFSMQ17 (8,05 U gds⁻¹). Entretanto, Xu *et al.* (2010) encontraram uma menor produção de quitinase utilizando o isolado *Lecanicillium lecanii*. Nesse estudo com FES, os autores encontraram a máxima atividade de quitinase em 3,3 U mg⁻¹, utilizando como substrato o bagaço de cana, e a atividade de quitinase em 3,0 U mg⁻¹ quando utilizaram o farelo de trigo como substrato.

Embora a produção de quitinase pelo isolado *Lecanicillium* sp. UFSMQ6 tenha sido maior do que o reportado na literatura, com isolados do gênero *Lecanicillium* em FES, a produção apresentada pelo isolado *Lecanicillium* sp. UFSMQ6 pode não ter sido a máxima em 96 horas nesse meio de cultivo. No estudo realizado por Mayorga-Reyes *et al.* (2012) o isolado *L. lecanii* apresentou a máxima produção de quitinase de aproximadamente 15 U mL⁻¹ após 144 horas de cultivo em FES utilizando bagaço de cana como substrato e quitina como indutor da produção enzimática. Nas condições avaliadas no presente estudo, o isolado *Lecanicillium* sp. UFSMQ6 permaneceu em cultivo por apenas 96 horas, podendo esse isolado, assim como os demais, não terem apresentado a máxima produção enzimática nesse reduzido tempo de cultivo.

Os isolados do gênero *Fusarium* também apresentaram uma elevada produção de quitinase. O isolado *Fusarium* sp. UFSMQ32 foi o que apresentou a melhor produção (11,35 U gds⁻¹ de quitinase) entre os isolados identificados desse gênero, seguido por *Fusarium* sp. UFSMQ18 (10,05 U gds⁻¹), UFSMQ1 (9,84 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ27 (9,11 U gds⁻¹),

Fusarium sp. UFSMQ12 (8,92 U gds⁻¹), *Fusarium* sp. UFSMQ49 (8,16 U gds⁻¹), e *Fusarium* sp. UFSMQ17 (8,05 U gds⁻¹). Suresh *et al.* (2014) em estudo com o isolado *F. oxysporum* CFR 8 encontrou uma menor produção de endoquitinase (7,8 U gds⁻¹) utilizando FES com 144 horas de incubação, com farelo de trigo como substrato e quitina em pó como indutor enzimático, em relação aos 10 isolados selecionados nesse estudo. Entretanto, Suresh e Kumar (2012) em condições similares, com tempo de incubação de 166 horas obtiveram 13,3 U gds⁻¹ de endoquitinase com o mesmo isolado fúngico. Thadathil *et al.* (2013) avaliaram a otimização da produção de várias enzimas e obtiveram a produção inicial de 7,8 U gds⁻¹ de endoquitinase pelo isolado *F. oxysporum* CFR 8 em 144 horas de incubação. Após a otimização o isolado apresentou um aumento da produção para 17,5 U gds⁻¹ de endoquitinase em 167 horas de cultivo.

A produção de quitinases fúngicas tem sido predominantemente realizada pelo processo de fermentação submersa. Entretanto, a utilização da FES vem sendo aplicada recentemente e tem sido apontada como uma estratégia mais econômica em relação a fermentação submersa, com um custo de produção mais baixo, pois podem ser utilizados resíduos agroindustriais no processo. Além disso, os equipamentos utilizados são de fácil manuseio e tem sido reportadas elevadas produções de enzimas hidrolíticas fúngicas durante o processo (Binod *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2013; Karthik *et al.*, 2014; Nidheesh *et al.*, 2015). Outro motivo para sua utilização é que as condições de fermentação são mais próximas das condições naturais de onde foram retirados os isolados. Esse pode ser o principal fator de maior produção de alguns produtos de interesse como as enzimas quitinolíticas (Thomas *et al.*, 2013).

O farelo de trigo tem sido o substrato mais utilizado e amplamente explorado em fermentação em estado sólido para a produção de enzimas quitinolíticas. A ampla utilização se deve as suas propriedades físicas favoráveis ao desenvolvimento fúngico (Nampoothiri *et*

al., 2004; Suresh e Kumar, 2012; Suresh *et al.*, 2014). Além disso, por se tratar de um resíduo agroindustrial possui baixo custo e pode viabilizar o processo de otimização para aumento de escala do processo fermentativo.

A quitina coloidal foi utilizada como substrato indutor da produção de quitinases pelos isolados avaliados. De acordo com Karthik *et al.* (2014) a quitina coloidal é considerada o melhor indutor da produção de enzimas quitinolíticas fúngicas, em comparação com outras fontes de quitina.

O conteúdo inicial de umidade também afeta a produção de enzimas quitinolíticas em FES, pois a umidade no meio de cultivo é um fator crítico para determinar o crescimento fúngico e o rendimento da produção de enzimas hidrolíticas (Pandey, 1992; Binod *et al.*, 2007). Nesse estudo foi utilizada a umidade de 60% na FES. De acordo com Patil e Jadhav (2014), usualmente em FES, o conteúdo de umidade ótimo para o crescimento e utilização do substrato varia entre 40 e 70% dependendo do isolado fúngico e do substrato utilizado para o cultivo.

Entretanto, nesse estudo foi fixado o tempo de incubação de 96 horas de cultivo sob FES, porém, o tempo para atingir a produção máxima de enzimas é bastante variável entre as espécies de fungos. Segundo Patil e Jadhav (2014) a máxima produção de quitinase é encontrada entre 72 a 96 horas de cultivo em FES. Corroborando com esses resultados, Nampoothiri *et al.* (2004) reportou a máxima produção de quitinase por *Trichoderma harzianum* em 96 horas sob FES. Contudo, Matsumoto *et al.* (2004) encontrou a máxima produção de quitinase em 120 horas em FES utilizando o isolado de *Verticillium lecanii*. Diante disso, os isolados avaliados podem não ter apresentado a máxima produção de quitinase sob FES em 96 horas de cultivo ou o nível máximo de produção pode ter ocorrido antes desse período. De acordo com Karthik *et al.* (2014) o tempo de cultivo afeta a produção de quitinases, ocorrendo a produção até um nível máximo e após essa fase a produção

decrece. A razão para a diminuição do nível de produção pode ser devido ao esgotamento de nutrientes no meio de cultivo e também devido à produção de produtos intermediários inibitórios resultando na inativação da produção pelo sistema de produção enzimático.

Conclusões

Os isolados *Trichoderma* sp. UFSMQ40, *Fusarium* sp. UFSMQ32, *Trichoderma* sp. UFSMQ24, *Fusarium* sp. UFSMQ18, *Fusarium* sp. UFSMQ1, *Lecanicillium* sp. UFSMQ6, *Fusarium* sp. UFSMQ27, *Fusarium* sp. UFSMQ12, *Fusarium* sp. UFSMQ49 e *Fusarium* sp. UFSMQ17 apresentaram elevada produção de quitinases sob fermentação em estado sólido e foram selecionados como os dez melhores produtores de quitinases entre os 51 isolados avaliados nesse estudo. Além disto, o isolado *Trichoderma* sp. UFSMQ40 apresentou a maior produção de quitinase, em relação a produção dos isolados avaliados, tornando-se um resultado promissor para futuros estudos de otimização da produção, caracterização e purificação destas enzimas.

REFERÊNCIAS

- Almeida APMM, Dias ES, Pereira RTG, Toledo RCC, and Pfenning LH (2008) Obtenção de protoplastos do fungo filamentoso *Aspergillus ochraceus*. *Ciênc Rural* 38: 1460-1462.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Baldoni DB, Coelho G, Jacques RJS, Silveira RMB, Grebenc T, Antonioli Z (2012) Brown rotting fungus closely related to *Pseudomerulius curtisii* (Boletales) recorded for the first time in South America. *Mycosphere* 3: 533-541.
- Binod P, Pusztahelyi T, Nagy V, Sandhya C, Szakács G, Pócsi I, and Pandey A (2005) Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme Microb Technol* 36: 880-887.
- Binod P, Sandhya C, Suma P, Szakacs G, and Pandey A (2007) Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of N-acetyl-d-glucosamine from colloidal chitin. *Bioresour Technol* 98: 2742-2748.
- Binod P, Sukumaran RK, Shirke SV, Rajput JC, and Pandey A (2007) Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. *J Appl Microbiol* 103: 1845-1852.
- Chavan SB, and Deshpande MV (2013) Chitinolytic enzymes: an appraisal as a product of commercial potential. *Biotechnol Prog* 29: 833-846.
- Dahiya N, Tewari R, and Hoondal GS (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 71: 773-782.
- Felse PA, and Panda T (2000) Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors - the influence of agitator speed. *Biochem Eng J* 4: 115-120.
- Gomaa EZ (2012) Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. *J Microbiol* 50: 103-111.
- Halder SK, Maity C, Jana A, Das A, Paul T, Das Mohapatra PK, Pati BR, and Mondal KC (2013) Proficient biodegradation of shrimp shell waste by *Aeromonas hydrophila* SBK1 for the concomitant production of antifungal chitinase and antioxidant chitosaccharides. *Int Biodeterior Biodegrad* 79: 88-97.
- Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hermosa MR, Keck E, Chamorro I, Rubio B, Sanz L, Vizcaíno JA, Grondona I, and Monte E (2004) Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol Res* 108: 897-906.

Hoyos-Carvajal L, Orduz S, and Bissett J (2009) Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genet Biol* 46: 615-631.

Inokuma K, Takano M, and Hoshino K (2013) Direct ethanol production from N-acetylglucosamine and chitin substrates by *Mucor* species. *Biochem Eng J* 72: 24-32.

Karthik N, Akanksha K, and Pandey A (2014) Production, purification and properties of fungal chitinases-a review. *Indian J Exp Biol* 52: 1025-1035.

Kovacs K, Szakacs G, Pusztahelyi T, and Pandey A (2004) Production of chitinolytic enzymes with *Trichoderma longibrachiatum* IMI 92027 in solid substrate fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 118: 189-204.

Lewinsohn T M, and Prado P Inácio (2005) Quantas espécies há no Brasil? *Megadiversidade 1*: 37-42.

Liu C-L, Lan C-Y, Fu C-C, and Juang R-S (2014) Production of hexaoligochitin from colloidal chitin using a chitinase from *Aeromonas schubertii*. *Int J Biol Macromol* 69: 59-63.

Mahata M, Shinya S, Masaki E, Yamamoto T, Ohnuma T, Brzezinski R, Mazumder TK, Yamashita K, Narihiro K, and Fukamizo T (2014) Production of chitoooligosaccharides from *Rhizopus oligosporus* NRRL2710 cells by chitosanase digestion. *Carbohydr Res* 383: 27-33.

Maia LC, Júnior C, De AA, Cavalcanti L de H, Gugliotta A de M, Drechsler-Santos ER, Santiago ALM de A, Cáceres ME da S, Gibertoni TB, Aptroot A, Giachini AJ, Soares AM da S, Silva ACG, Magnago AC, Goto BT, Lira CRS de, Montoya CAS, Pires-Zottarelli CLA, Silva DKA da, Soares DJ, Rezende DHC, Luz EDMN, Gumboski EL, Wartchow F, Karstedt F, Freire FM, Coutinho FP, Melo GSN de, Sotão HMP, Baseia IG, Pereira J, Oliveira JJS de, Souza JF, Bezerra JL, Neta LSA, Pfenning LH, Gusmão LFP, Neves MA, Capelari M, Jaeger MCW, Pulgarín MP, Menolli Junior N, Medeiros PS de, Friedrich RCS, Chikowski R dos S, Pires RM, Melo RF, Silveira RMB da, Urrea-Valencia S, Cortez VG, Silva VF da, et al. (2015) Diversity of Brazilian Fungi. *Rodriguésia* 66: 1033-1045.

Manfio GP (2003) Avaliação do estado atual do conhecimento sobre a diversidade microbiana no Brasil. Microbiota (versão preliminar). In: *Projeto Estratégia Nacional de Diversidade Biológica (BRA 97 G 31) MMA/GEF/PNUD*. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 80p.

Matsumoto Y, Saucedo-Castañeda G, Revah S, and Shirai K (2004) Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochem* 39: 665-671.

Mayorga-Reyes L, Calderón-Garza E, Gutiérrez-Nava A, González-Cervantes R, Azaola-Espinosa A, and Barranco-Florido E (2012) Caracterización y expresión del gen quitinasa chit II de *Lecanicillium lecanii* en cultivo sólido. *Rev Mex Ing Quím* 11: 97-104.

Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.

Nampoothiri KM, Baiju TV, Sandhya C, Sabu A, Szakacs G, and Pandey A (2004) Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochem* 39: 1583-1590.

Nidheesh T, Pal GK, and Suresh PV (2015) Chitooligomers preparation by chitosanase produced under solid state fermentation using shrimp by-products as substrate. *Carbohydr Polym* 121: 1-9.

Pandey A (1992) Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochem* 27: 109-117.

Patil NS, and Jadhav JP (2014) Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine by solid state fermentation of chitinase by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 using agricultural residues. *Int Biodeterior Biodegrad* 91: 9-17.

Patil NS, and Jadhav JP (2015) Significance of *Penicillium ochrochloron* chitinase as a biocontrol agent against pest *Helicoverpa armigera*. *Chemosphere* 128: 231-235.

Patil NS, Waghmare SR, and Jadhav JP (2013) Purification and characterization of an extracellular antifungal chitinase from *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 and its application in protoplast formation. *Process Biochem* 48: 176-183.

Peres MB, Vercillo UE, and Dias BF de S (2011) Avaliação do Estado de Conservação da Fauna Brasileira e a Lista de Espécies Ameaçadas: o que significa, qual sua importância, como fazer? *Biodiversidade Bras* 1: 45-48.

Posada D, and Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.

Pylro VS, Roesch LFW, Ortega JM, Amaral AM do, Tótola MR, Hirsch PR, Rosado AS, Góes-Neto A, Silva AL da C da, Rosa CA, Morais DK, Andreote FD, Duarte GF, Melo IS de, Seldin L, Lambais MR, Hungria M, Peixoto RS, Kruger RH, Tsai SM, Azevedo V, and Committee TBMP (2013) Brazilian Microbiome Project: Revealing the Unexplored Microbial Diversity—Challenges and Prospects. *Microb Ecol* 67: 237-241.

Schrank A, and Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56: 1267-1274.

Seidl V (2008) Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol Rev* 22: 36-42.

Staden R, Judge DP, and Bonfield JK (2003) Analyzing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS, in *Introduction to Bioinformatics* (Krawetz SA, and Womble DD eds) pp 393-410, Humana Press.

Sukarno N, Kurihara Y, Ilyas M, Mangunwardoyo W, Yuniarti E, Sjamsuridzal W, Park J-Y, Saraswati R, Inaba S, Widyastuti Y, Ando K, and Harayama S (2009) *Lecanicillium* and *Verticillium* species from Indonesia and Japan including three new species. *Mycoscience* 50: 369-379.

Suresh PV, and Kumar PKA (2012) Enhanced degradation of α -chitin materials prepared from shrimp processing byproduct and production of N-acetyl-d-glucosamine by thermoactive chitinases from soil mesophilic fungi. *Biodegradation* 23: 597-607.

Suresh PV, Sakhare PZ, Sachindra NM, and Halami PM (2014) Extracellular chitin deacetylase production in solid state fermentation by native soil isolates of *Penicillium monoverticillium* and *Fusarium oxysporum*. *J Food Sci Technol* 51: 1594-1599.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.

Thadathil N, Kuttappan AKP, Vallabaipatel E, Kandasamy M, and Velappan SP (2013) Statistical optimization of solid state fermentation conditions for the enhanced production of thermoactive chitinases by mesophilic soil fungi using response surface methodology and their application in the reclamation of shrimp processing by-products. *Ann Microbiol* 64: 671-681.

Thomas L, Larroche C, and Pandey A (2013) Current developments in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 81: 146-161.

White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. New York, USA pp. 315-322.

Xu X, Yu Y, and Shi Y (2010) Evaluation of inert and organic carriers for *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation. *Biotechnol Lett* 33: 763-768.

7 ARTIGO II

1 CHITINASE PRODUCTION BY *Trichoderma koningiopsis* VIA SOLID STATE FERMENTATIO²

3 ABSTRACT

4 The fungal chitinase have potential of biotechnological use and numerous applications. However, the chitinase
5 have been little exploited commercially, due to the low number of organisms that exhibit high rates of
6 production, the low activity and stability of these enzymes, and the high cost of production. The objective of this
7 study is i) to identify a chitinase producer microorganism and optimize its production in SSF, ii) to evaluate
8 different chitin sources for chitinase production, iii) to evaluate different solvents for the extraction of enzymes
9 produced during fermentation process, iv) to determine the nematicide effect of enzymatic extract and biological
10 control of *Trichoderma* sp. UFSMQ40 on *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* nematodes species.
11 The isolated *Trichoderma* sp. UFSMQ40 has been identified as *Trichoderma koningiopsis* by amplification of
12 *tefl* gene fragment. The largest chitinase production by this fungus was 10.76 U gds⁻¹ and occurred when it was
13 used in the wheat bran substrate at 55% moisture, 15% colloidal chitin, 100% of corn steep liquor, two discs of
14 inoculum at 30° C for 72 h. The colloidal chitin in powder and flakes can be used as enzymatic inducers without
15 altering the chitinase production by the isolated. The usage of 1:15 g:mL of sodium citrate-phosphate buffer was
16 the best ratio. The *Trichoderma* sp. UFSMQ40 showed high mortality of *Meloidogyne javanica* and
17 *Meloidogyne incognita* nematodes when was applied the treatments with enzymatic filtrated and the suspension
18 of conidia.

19 **Keywords:** filamentous fungi, chitinolytic enzymes, biopesticides, chitin, nematode

21 INTRODUCTION

23 Chitin is a linear polymer formed by Covalent β -(1.4) of *N*-acetyl-*D*-Glucosamine (GlcNAc), widely
24 distributed and abundant in nature, being found as structural polysaccharide of cell walls of fungi, in the
25 exoskeletons of arthropods, in the carapace of crustaceans and in nematodes eggs [1, 2]. Chitin degradation is
26 mainly carried out by fungi and bacteria, which use it as a carbon and nitrogen source in their metabolism [3, 4].

² Artigo submetido a Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology

27 The hydrolysis of chitin is performed by chitinolytic enzymes, belonging to the large family of β -Glycoside
28 Hydrolase and can be divided into GlcNAc and chitinase, which differ in their patterns of cleavage [5, 6].

29 Recently, due to its biotechnological potential, researchers have performed studies with extracellular
30 chitinase produced by microorganisms [1, 7, 8]. Among the numerous applications, fungal chitinase have been
31 used in the development of biopesticides. Khan et al. [9] observed usefulness of fungal chitinase in the hatch
32 control of *Meloidogyne javanica* nematode eggs, an organism that causes major losses in agriculture. The
33 chitinase are efficient on biological control and on the development of biopesticides with enzymatic base, being
34 a friendly environmentally alternative for the management of agricultural pests [10, 11]. Despite the vast
35 biotechnological potential, the chitinase have been little exploited commercially, due to the low number of
36 organisms that exhibit high production rates, the low activity and stability of these enzymes, and the high cost of
37 production [12, 13].

38 A production alternative of these enzymes is the usage of solid state fermentation (SSF), which results
39 in low amount of residue, greater production efficiency, facility in product recovery and low cost [13]. However,
40 the production of chitinolytic enzymes in SSF are influenced by a lot of variables, such as the temperature, the
41 carbon source, the nitrogen source, and the amount of inoculum [13, 14], and for this reason is necessary to
42 optimize the production process.

43 The objective of the current study is i) to identify a chitinase producer microorganism and optimize its
44 production in SSF, ii) to evaluate different chitin sources for chitinase production, iii) to evaluate different
45 solvents for the extraction of enzymes produced during fermentation process, iv) to determine the nematicide
46 effect of enzymatic extract and biological control of *Trichoderma* sp. UFSMQ40 on *Meloidogyne javanica* and
47 *Meloidogyne incognita* nematodes species.

48

49 **MATERIAL AND METHODS**

50 **Maintenance of microorganism and pre-inoculum**

51 The isolated fungal *Trichoderma* sp. UFSMQ40 was previously isolated from bedbugs *Tibraca*
52 *limbativentris* Stal (Hemiptera: Pentatomidae) and selected among 51 isolated fungal as the largest producer of
53 chitinolytic enzymes in SSF. To obtain the discs for inoculations in SSF and for DNA extraction, the isolated
54 fungal was peaked and cultivated for 7 days in potato dextrose agar (PDA) at 28° C without photoperiod.

55

56 **Identification of the microorganism**

57 The isolated DNA extraction was performed using cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) reagent
58 according to the method described by Doyle and Doyle [15]. The extraction was performed from the fungal
59 mycelium cultivated in potato-dextrose and triturated in microtubes with plastic pestle. The genomic DNA
60 was submitted to the polymerase chain reaction (PCR) for the amplification of the gene segment translation
61 elongation factor 1 α (EF). The primers for the elongation factor were EF-1 (5'-
62 ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') and EF-2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') [16]. The PCR
63 reaction was performed using the primers in the final concentration of 0.2 μ M, dNTPS at 0.2 mM, 1U of GoTaq
64 Green enzyme (Promega), in final volume of 50 μ L. The scheme used for the EF was: initial denaturation at 94°
65 C for 2 min, 40 cycles at 94° C for 30 s, 54° C for 30 s, 72° C for 40 s, and final extension at 72° C for 4 min.
66 The verification of amplified products was accomplished by electrophoresis in 0.8% agarose gel stained with
67 ethidium bromide. The amplified products were purified by precipitation with polyethylene glycol [17]
68 submitted to the sequencing reaction by the chain termination method using the Big Dye 3.1 reagent (Applied
69 Biosystems) and analyzed in automatic capillary sequencer 3500 XL (Applied Biosystems).

70 Sequenced fragments were analyzed using the Staden Package 2.0.0b software [18] for obtaining the
71 consensus sequence. The sequence of the isolated fungal was deposited in the GenBank database and received
72 the following number of access: KX859489. For the identification of the isolated fungal, the sequences were
73 aligned by BioEdit software [19] using the ClustalW algorithm. Molecular identification of the isolated fungal
74 was based on analyses of *tefl* gene fragment carried out by MEGA 5.0 software [20], with the maximum
75 likelihood analysis, for a total of 1000 repetitions for all reconstructions. The best model of nucleotide
76 substitution to solve the data was estimated using the Model Test software [21]. For this identification, GenBank
77 sequences from other fungi having close similarity relation were used using the tool Basic Local Alignment
78 Search Tool (BLAST) from National Center for Biotechnology Information (NCBI).

79

80 **Production of colloidal chitin**

81 The colloidal chitin was prepared according to Liu [22]. First, 4 g of powdered chitin (Sigma-Aldrich[®],
82 St. Louis, USA) was eluted with 40 mL of HCl at 37% (v/v) stirring for 50 min. Afterwards, 1 L of iced cold
83 distilled water was added to the mixture. Subsequently, the colloidal mixture was centrifuged and the pellet was
84 collected and washed with distilled water until reaching pH 5.0.

85

86 **Chitinase production**

87 SSF were conducted in Erlenmeyer flasks of 250 mL containing 5 g of wheat bran. The quantities used
88 for corn steep liquor (CSL), inoculum, colloidal chitin, temperature, and humidity have been described below.
89 Each flask was covered with hydrophilic cotton cap and autoclaved at 121° C for 30 min. After refrigeration,
90 inoculation was performed with 1 cm diameter disks of isolated *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 and
91 incubated at 28° C for 96 h in the dark. A Plackett-Burman factorial design was conducted with 12 experiments
92 plus 3 central points (PB12) to evaluate the effects of temperature (25° to 35° C), the amount of CSL (0 to 30%
93 (w/w)), the moisture content (50 to 70% (w/w)), the amount of colloidal chitin (10 to 20% (w/w)), and the
94 amount of inoculum (1 to 3) in chitinase production. Based on analysis of data obtained in the PB12 design, a
95 central composite rotational design (CCRD) was to evaluate the concentration effects of CSL and the moisture
96 content in chitinase production. The remaining variables were kept fixed at the center point of the PB at 30° C
97 with 2 disks as inoculum and 15% (w/w) of colloidal chitin for 96 h of culture medium. In both designs, the
98 results were submitted to analysis of variance (ANOVA) with significance level of 0.1 using Statistica 8.0
99 software (StatSoft® Inc., Tulsa, OK, USA).

100 After optimizing the SSF, the kinetics of chitinase production, until 240 h of fermentation, was
101 evaluated in order to determine the time in which occurs the higher production. The flasks were incubated in
102 triplicates and removed every 24 h for the extraction and determination of enzyme activity, as described next. On
103 optimized condition CCRD, the chitinolytic enzyme production was assessed using different chitin sources:
104 powder chitin (Sigma-Aldrich®), colloidal chitin, chitin flakes (Sigma-Aldrich®), and crushed shrimp shell (3
105 mm) (fish waste) within 96 h in culture medium. In addition, the use of different solvents for chitinase recovery
106 was evaluated. The following solvents were used (100 mL): acetate buffer 50 mM (pH 4.8), sodium citrate-
107 phosphate buffer 50 mM (pH 4.0), tween® 80 (0.1%) (v/v), NaCl 0.1% (v/v), and sterile distilled water.
108 Subsequently, different solid:liquid (g:mL) ratios of the selected extractor were evaluated: 1:5, 1:7, 1:10, 1:12,
109 1:15, and 1:18. All tests were conducted on optimized condition, in triplicates, after 96 h in SSF, and the results
110 were submitted to Scott-Knott test for the comparison of means with the significance level of 0.05, carried out by
111 R programming language [23].

112

113 **Enzyme activity**

114 Chitinolytic enzymes were extracted from fermentation with 100 mL of sterile distilled water, stirring at
115 120 rpm, at 28° C for 1 h. Afterward, the solutions were filtered under vacuum with qualitative filter paper and
116 30 mL of enzymatic extracts were stored in 50 mL tubes under freezing until the determination of the enzymatic

117 activity and evaluation of the nematicide effect. Chitinolytic activity was determined using colloidal chitin as a
 118 substrate. The amount of 1 mL of enzymatic extract was mixed with 2 mL of colloidal chitin solution 3.5% (w/v)
 119 in sodium phosphate buffer 50mM (pH 5.2) and incubated at 37° C for 60 min. After the reaction the
 120 quantification of reduced sugars was performed by dinitrosalicylic acid (DNS) method [24]. An aliquot of 1 mL
 121 of the reaction solution was mixed with 2 mL of DNS boiled for 5 min and cooled in ice bath. The amount of
 122 reduced sugars produced was determined by absorbance of 540 nm using a calibration curve with GlcNAc pure
 123 (Sigma-Aldrich®). A unit of chitinase activity was defined as the amount of enzyme required to catalyze the
 124 formation of 1 µmol of GlcNAc per minute at 37° C. Chitinase activity was expressed based on the dry mass of
 125 the substrate (U gds⁻¹).

126

127 **Nematicide effect**

128 The evaluation of the nematicide effect of isolated *Trichoderma* sp. UFSMQ40 was performed in vitro
 129 and the enzymatic extract in the optimum condition (experiment 6 in CCRD, Table 2) on *Meloidogyne javanica*
 130 and *Meloidogyne incognita* nematode species. The suspension of conidia was obtained after 15 days of growth at
 131 28° C using two discs (1 cm) of isolated in culture medium containing 30 g of rice and 40 mL of distilled water,
 132 autoclaved at 121° C for 30 min. The conidia were removed by adding 100 mL Tween® 80 (0.01%) to the
 133 culture medium and the amount of inoculum estimated in a Neubauer chamber. After that, the solution was
 134 adjusted to 1x10⁸ conidia mL⁻¹.

135 Following, the nematode eggs were obtained as the methodology of Hussey and Barkey [25] and the
 136 suspension of nematodes in the development stage J2 was obtained from the hatching Chamber with tissue
 137 paper. From this suspension, 30 nematodes were removed per individual capture to 20 µL of water and added to
 138 80 µL of enzymatic filtered or spore suspension containing 1x10⁸ conidia mL⁻¹ in 24 well cell culture plate. The
 139 control treatments consisted the addition of 80 µL of sterile distilled water in the solution of 20 µL of water with
 140 30 J2 nematodes. Each treatment contained five repetitions, retained at 25° C in the dark, and the assessment of
 141 mortality was performed after 24 h to the filtered enzymatic treatments and after 72 h for the treatments with the
 142 suspension of conidia. The nematodes considered dead were captured and immersed in sterile distilled water for
 143 24 h for confirmation of results. The efficiency of the control is determined by Abbott's formula [26] (Eq. 1).

144

$$145 \text{ Control (\%)} = \frac{(X-Y)}{X} * 100 \quad (1)$$

146

147 where, X is the number of live individuals in the control treatment, Y is the number of live individuals in the
148 treatment.

149

150 **RESULTS AND DISCUSSION**

151

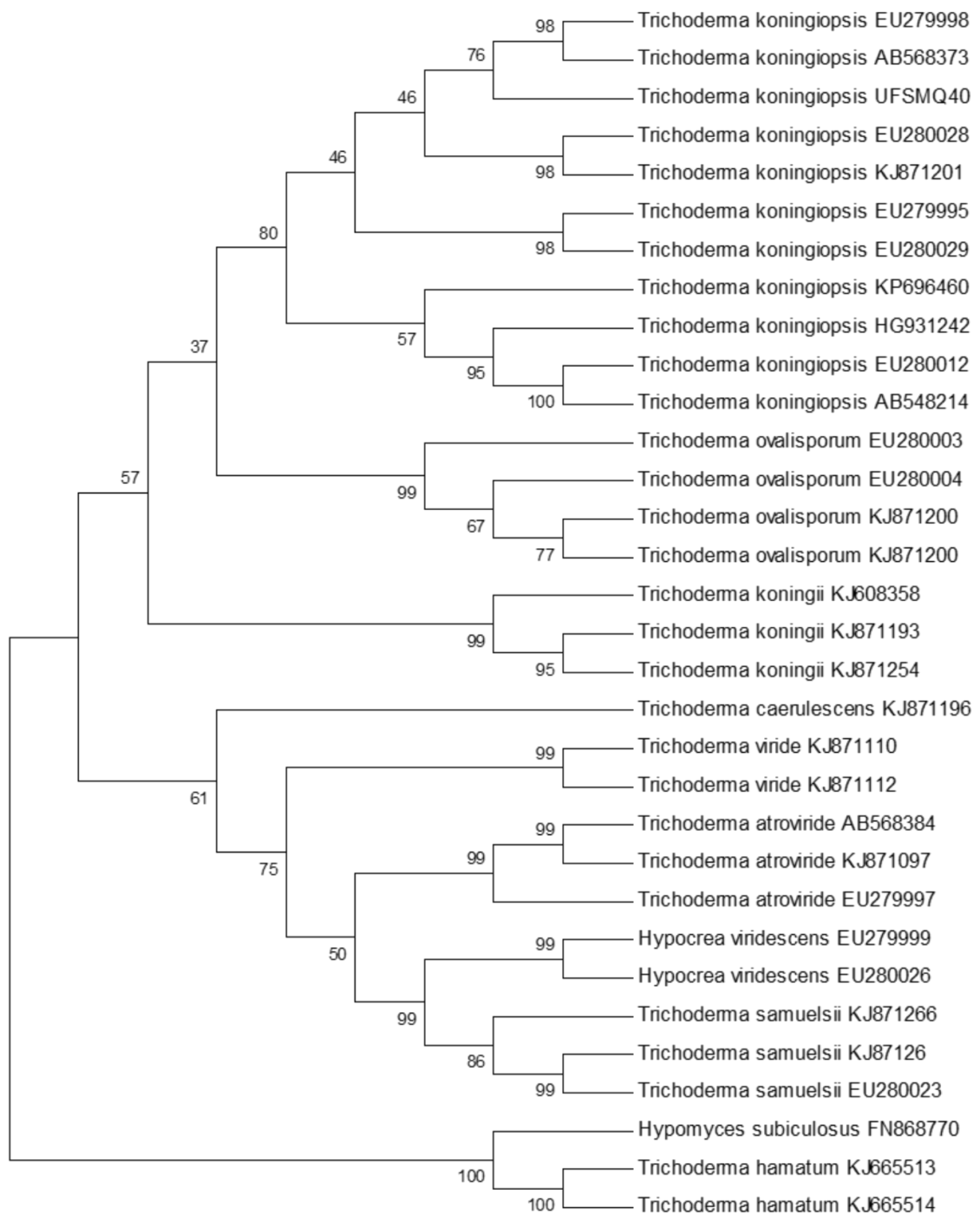
152 **Identification of the microorganism**

153 The isolated *Trichoderma* sp. UFSMQ40 was previously identified by the region ITS1-5.8S-ITS2 in
154 maximum likelihood analysis as belonging to the genus *Trichoderma*, however its species was not possible to
155 distinguish. Therefore, the amplification of *tefl* gene fragment was performed and further, the comparison of the
156 species most closely related to *Trichoderma* sp. UFSMQ40 was performed using the BLASTn tool from the
157 NCBI.

158 On maximum likelihood analysis the isolated showed the highest similarity to the species of
159 *Trichoderma koningiopsis* EU279998, *T. koningiopsis* AB568373, *T. koningiopsis* EU280028, *T. koningiopsis*
160 KJ871201, *T. koningiopsis* EU279995 and *T. koningiopsis* EU280029, with high bootstrap support (80%),
161 separating this group from other species of *T. koningiopsis* and confirming the identification of the isolated in
162 this species (Fig. 1).

163 The ITS region of DNAr have been widely used as a reliable target for species-level identifications [27,
164 28]. However, in some species this region is closely related [29] not being possible to differentiate them.
165 According to Anees [27], the sequences of *tefl* gene fragment, which encodes the elongation factor, are more
166 variables and can be used to differentiate closely related species, such as *Trichoderma*.

167



168

169 **Fig. 1** Dendrogram of *Trichoderma* spp. obtained from the sequences of *tefl* gene fragment. Maximum
 170 likelihood analysis was conducted with 1000 replicates and bootstrap values are in percent. Arm's length does
 171 not reflect evolutionary differences. The sequences of *Hypomyces subiculosus* FN868770, *Trichoderma*
 172 *hamatum* KJ665513 and *T. hamatum* KJ665514 were used as outgroups.

173

174

175

176 **Optimization of solid state fermentation**

177 Chitinase production by SSF ranged from 0.02 to 6.10 U gds⁻¹ depending on conditions established
 178 (Table 1). The highest and the lowest production was achieved by experiment 11 and the 1, respectively.

179

180 **Table 1** Experimental matrix of Plackett-Burman to evaluate the influence of variables on production process of
 181 chitinase in SSF by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40.

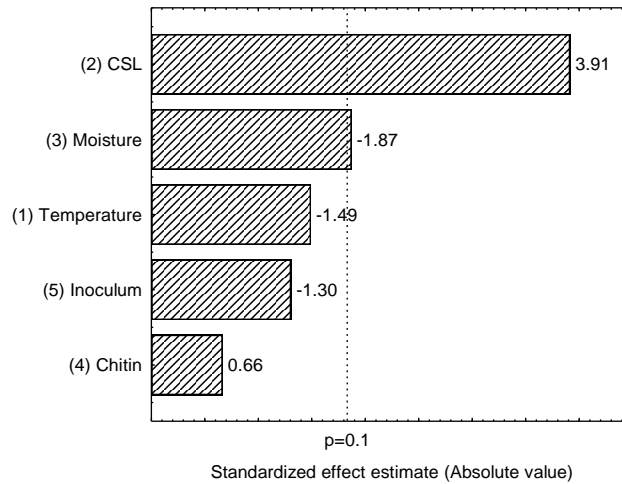
Experiment	T ¹ (°C)	CSL ² (%)	Moisture (%)	Chitin (%)	Inoculum (disks)	CA ³ (U gds ⁻¹)
1	(+1) 35	(-1) 0	(+1) 70	(-1) 10	(-1) 1	0.022
2	(+1) 35	(+1) 30	(-1) 50	(+1) 20	(-1) 1	2.871
3	(-1) 25	(+1) 30	(+1) 70	(-1) 10	(+1) 3	1.319
4	(+1) 35	(-1) 0	(+1) 70	(+1) 20	(-1) 1	0.713
5	(+1) 35	(+1) 30	(-1) 50	(+1) 20	(+1) 3	5.272
6	(+1) 35	(+1) 30	(+1) 70	(-1) 10	(+1) 3	3.018
7	(-1) 25	(+1) 30	(+1) 70	(+1) 20	(-1) 1	5.956
8	(-1) 25	(-1) 0	(+1) 70	(+1) 20	(+1) 3	0.975
9	(-1) 25	(-1) 0	(-1) 50	(+1) 20	(+1) 3	1.714
10	(+1) 35	(-1) 0	(-1) 50	(-1) 10	(+1) 3	0.931
11	(-1) 25	(+1) 30	(-1) 50	(-1) 10	(-1) 1	6.103
12	(-1) 25	(-1) 0	(-1) 50	(-1) 10	(-1) 1	3.222
13	(0) 30	(0) 15	(0) 60	(0) 15	(0) 2	2.039
14	(0) 30	(0) 15	(0) 60	(0) 15	(0) 2	2.926
15	(0) 30	(0) 15	(0) 60	(0) 15	(0) 2	1.836

182 ¹T = Temperature; ²CSL = Corn steep liquor; ³CA = Chitinase activity. In bold is the highest chitinase activity
 183 production.

184

185 In order to identify the significant variables in the SSF process the data were submitted to statistical
 186 analysis and are represented in the Pareto chart (Fig. 2). Considering the five variables applied only CSL and
 187 moisture showed significant influence on the chitinase production. The remaining variables did not affect the
 188 production of enzyme regardless of value employed. The analysis of effects indicated the increasing amount of
 189 CSL and the reduction of moisture from the culture medium conducted to an increase enzyme production (Fig.

190 2). In CCRD, the concentration of CSL and moisture was evaluated in the range of 20-100% (w/w) and 40-70%
 191 (w/w), respectively. The remaining parameters were maintained in the central point values in PB12 experiment
 192 (15% colloidal chitin, 2 discs of inoculum, 30° C) for 96 h in culture medium.
 193



194

195 **Fig. 2** Pareto chart displaying the experimental parameters of Plackett-Burman to evaluate the influence of
 196 variables on SSF. (2) Corn steep liquor, (4) colloidal chitin, (5) inoculum (*Trichoderma koningiopsis*
 197 UFSMQ40). $p = 0.1$ is the significant level.

198

199 An increase of 54% in chitinase production of experimental matrix of CCRD in relation to the
 200 maximum value of PB12 (experiment 11 in Table 1). The maximum production rate was 9.42 U gds^{-1} obtained
 201 in experiment 6 (Table 2) for the moisture of 55%, level (0), and 100% of CSL, level (+1.41), followed by the
 202 experiment 2 (8.40 U gds^{-1}) for the moisture of 50%, level (-1), and 80% of CSL, level (1). Chitinase activity in
 203 average of all experiments was 6.39 U gds^{-1} .

204

205 **Table 2** Experimental matrix of CCRD to evaluate the effect of moisture and the amount of corn steep liquor in
 206 chitinase production.

Experiment	Moisture (%)	CSL ¹ (%)	Chitinase activity (U gds^{-1})
1	(-1) 50	(-1) 40	5.10
2	(-1) 50	(1) 80	8.40
3	(1) 60	(-1) 40	3.75
4	(1) 60	(1) 80	8.28

5	(0) 55	(-1.41) 20	4.20
6	(0) 55	(1.41) 100	9.42
7	(-1,41) 40	(0) 60	7.35
8	(1,41) 70	(0) 60	3.15
9	(0) 55	(0) 60	7.35
10	(0) 55	(0) 60	6.93
11	(0) 55	(0) 60	6.36

207 ¹CSL = Corn steep liquor. In bold is the highest chitinase activity production.

208

209 The results of Table 2 were used to estimate the parameters of a quadratic model expressing chitinase
 210 production according to the independent variables (Eq. 2). Analyzing the parameters of model (Eq. 2), it is
 211 possible to verify the increased amount of CSL led to an increase in chitinase production, while increasing the
 212 moisture has a negative effect on production. The quadratic term of moisture indicates that within the range
 213 evaluated there is a maximum point, which is the optimum value.

214

$$215 \quad CA = 6.87 + 3.80 * CSL - 1.85 * M - 1.45 * M^2 \quad (2)$$

216

217 where *CA* is chitinase activity in U gds⁻¹, *M* is moisture and *CSL* is corn steep liquor. Significant level of 0.1.

218

219 To confirm the effect of variables on chitinase production the above model was validated by the
 220 ANOVA (Table 3). The model presented a F-value of 3.47 times greater than the value of F-table and a R² of
 221 0.92, indicating that 92% of the total variation of the data is explained by the model. Thereby, the model is
 222 suitable to estimate chitinase production based on the independent variables expressed by the contour curve (Fig.
 223 3).

223

224 Maximum chitinase production was achieved when the concentration of CSL was maximum (100%)
 225 and when the moisture was in 55%. These results are similar to those found by Dhillon [30] who have obtained
 226 70.28 U gds⁻¹ of chitinase activity in 55% of moisture using the isolated *Aspergillus niger* NRRL-567 in SSF. In
 227 addition, Thadathil [31] similarly found the range of 52-56% of moisture for maximum endochitinase production
 228 by the isolated *Aspergillus flavus* CFR 10 e *Fusarium oxysporum* CFR 8.

228

229

230 **Table 3** The ANOVA of CCRD experiment for production of chitinase by isolated *Trichoderma koningiopsis*
 231 UFSMQ40, cultivated in SSF.

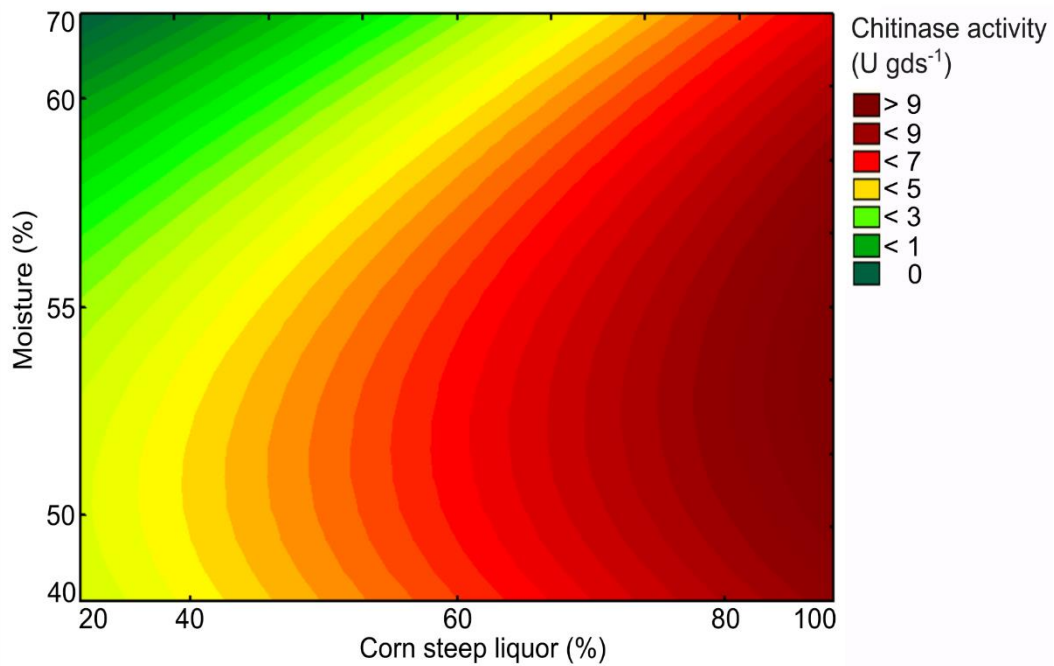
Factor	SS	DF	MS	F	P
(1) CSL (L)	28.92884	1	28.92884	44.09571	0.001167*
CSL (Q)	0.01721	1	0.01721	0.02624	0.877665
(2) Moisture (L)	6.85059	1	6.85059	10.44223	0.023169*
Moisture (Q)	2.97895	1	2.97895	4.54075	0.086305*
1L por 2L	0.37823	1	0.37823	0.57652	0.481921
Erro	3.28023	5	0.65605		
Total SS	42.85620	10			

232 $R^2 = 0.92$. *Significant at 0.10 level.

233

234 The presence of moisture levels above the optimum required by fungus, on chitinase production by SSF,
 235 are capable of decrease the porosity, change the structure of substrate particles, reducing the transfer of oxygen
 236 and increase the formation of aerial mycelium [32].

237



238

239 **Fig. 3** Contour curve for optimization of chitinase production in SSF with wheat bran by *Trichoderma*
 240 *koningiopsis* UFSMQ40, considering the variables Corn steep liquor versus Moisture.

241 However, low levels of moisture compromise the fungal metabolism, since it reduces the solubility of
242 nutrients in solid substrate, reduce the degree of hydration of the substrate and increase solid-liquid tension [32,
243 33]. The positive effect of CSL in chitinase production in SSF indicates this supplement can be utilized as an
244 alternative to the use of expensive reagents such as yeast extract.

245 The use of industrial residue as a source of alternative nutritional in SSF are able to decrease
246 considerably production cost from 38% up to 73% [35, 36]. Regarding chitinase production, few studies were
247 found using CSL as nutritional supplementation and studies for the optimization of CSL in SSF were not found.
248 The CSL is a residue from the industrial processing of maize, which has in its composition amino acids,
249 vitamins, minerals [34], high carbon content (38%), and nitrogen (6.49%), all important for the metabolism of
250 microorganisms [35]. Fenice [37] used the isolated *Penicillium janthinellum* P9 in culture medium under
251 submerged fermentation with CSL as nutritional supplementation to analyze the influence of temperature,
252 aeration, stirring, and pH for optimization of chitinase production. Additionally, Kovacs [38] and Rattanakit [39]
253 verified the supplementation of standard culture medium with CSL and found no significant effect of this factor
254 in chitinase production by fungi in SSF. Although, the authors used CSL along with salt solutions containing
255 nitrogen.

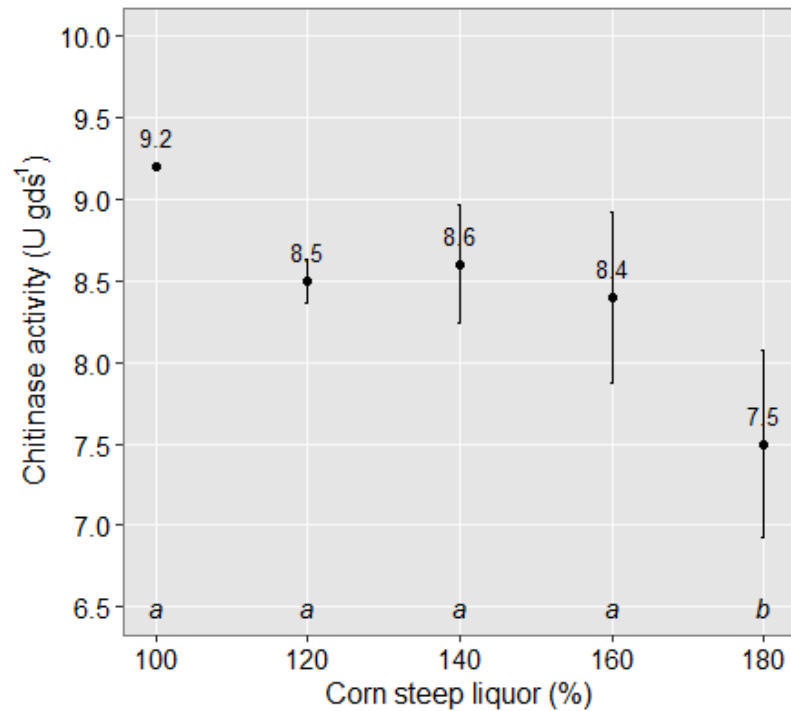
256 Considering the increase amount of CSL increases chitinase production in SSF, a test was conducted
257 rising the amount of CSL from 120 to 180% in optimal condition of SSF based on experiment 6 of CCRD (Table
258 2), in order to assess the highest chitinase activity production. With the increased amount of CSL was observed a
259 decrease in chitinase activity (Fig. 4), which is probably due to the amount of 100% to be the limit of maximum
260 chitinase production, besides being the optimum condition for CSL.

261

262 **Influence of different chitin sources as inductor**

263 Firstly, colloidal chitin was used to induce chitinase production by the fungus. However, obtaining
264 colloidal chitin requires a series of steps, resulting in a massive amount of work, high cost and generating acid
265 residues. For this reason, additional assessments were conducted in order to compare chitinase production in SSF
266 with different enzymatic inducers. The highest enzymatic activity was achieved in the presence of chitin powder
267 (9.72 U gds⁻¹), followed by colloidal chitin (9.63 U gds⁻¹), chitin flakes (9.29 U gds⁻¹), and chitin of crushed
268 shrimp shell (4.70 U gds⁻¹). Nampoothiri [32] found larger chitinase production by *Trichoderma harzianum*
269 using colloidal chitin as enzymatic inducer. The authors emphasized the facility of microorganisms to metabolize
270 chitin due to its colloidal nature.

271



272

273 **Fig. 4** Scott-Knott test to chitinase activity produced by *Trichoderma koningiopsis* UF5MQ40 in optimized
 274 condition of SSF with different amounts of Corn steep liquor. Significance level of 0.05. Bars represent the
 275 standard deviation.

276

277 According to Binod [40] colloidal chitin is the most easily assimilable chitin source by microorganisms
 278 from all forms of chitin. However, the isolated *Trichoderma koningiopsis* UF5MQ40 used in a very similar form
 279 of powdered, colloidal and flakes chitin, demonstrating high degradation capacity of chitin sources when the
 280 degradation difficulty increase. Nawani [41] applying three isolated from *Streptomyces* sp. NK1057, NK528 and
 281 NK951 observed superior chitinase production with chitin flakes as a substrate in culture medium. The authors
 282 reported that although the chitin is effective as colloidal substrate inductor, chitinase production may be
 283 extended if chitin flakes is used in the culture medium. This is due to its high crystallinity of chitin flakes, which
 284 allows initially only a gradual release of oligomers followed by suitable growth and production of enzyme [41,
 285 42].

286

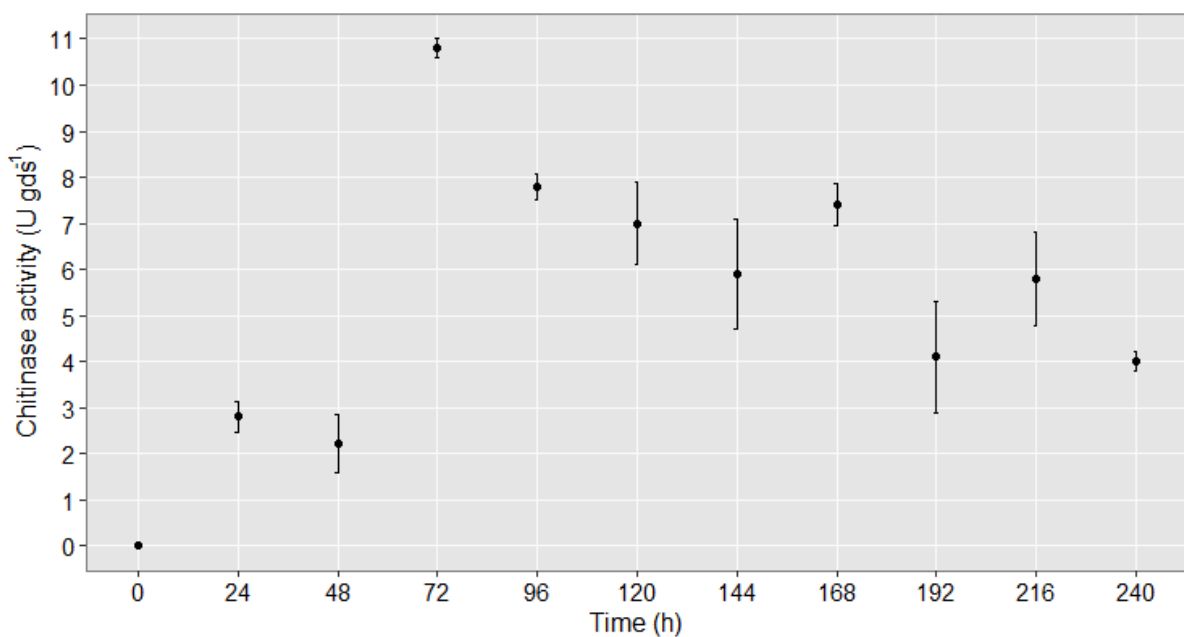
287 **Time of chitinase production**

288 Chitinase production by fungus increased progressively until it reaches the maximum value of 10.76 U
 289 gds⁻¹ at 72 h of cultivation, and afterwards the production decreased (Fig. 5). Binod [40] also found maximum

290 endochitinase production of 4.62 U gds^{-1} by isolated *Penicillium aculeatum* in 72 h and considerable reduction of
 291 production occurred subsequently this incubation time.

292 The decreased production, after reaching the maximum period of production at 72 h, probably occurred
 293 due to reduction of nutrient levels in the culture medium, and to enzymatic denaturation of proteases secreted by
 294 the fungus [40]. In addition, Nawani [41] reported the usage of easy chitin source assimilation, such as colloidal
 295 chitin, cause a rapid enzymatic repression production, since the generation of final products are greater and
 296 faster.

297



298

299 **Fig. 5** Production of chitinase in optimized condition of SSF by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 in the
 300 period from 0 to 240 h. Bars represent the standard deviation.

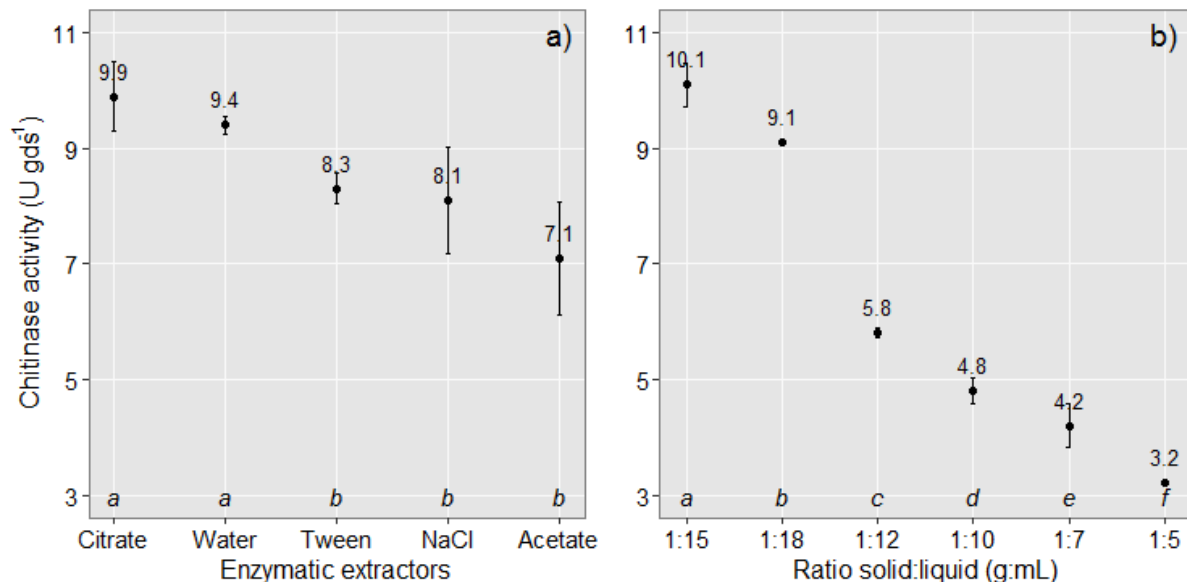
301

302 Solvents for chitinase extraction

303 Chitinase extraction from the substrate subsequent to SSF was applied in five extractors (Fig. 6a). The
 304 sodium citrate-phosphate buffer presented the best performance, producing an extract with 9.94 U gds^{-1} of
 305 chitinase activity, followed by distilled water (9.38 U gds^{-1}), with no statistical difference between these two
 306 extractors. Several studies in the literature utilized sterile distilled water as chitinase extractor in SSF [43-48].
 307 However, the 50 mM sodium citrate-phosphate buffer (pH 4.0) allowed greater enzymatic activity and promoted
 308 the solution stability of pH, being selected to evaluate different solid:liquid ratios in order to achieve the greatest
 309 chitinase extraction in SSF (Fig. 6b).

310 The addition of 50 mM sodium citrate-phosphate buffer (pH 4.0) in 1:15 ratio resulted the higher
 311 enzymatic activity (10.15 U gds^{-1}), statistically differing from the remaining ratios. However, Patidar [49]
 312 applied enzymatic extractors Tween[®] 80 (0.1%), NaCl (1.0%), glycerol (3%) plus ethanol (10%) and the Tween
 313 was considered suitable for chitinase recovery produced by isolated *Beauveria feline* RD 101 in SSF. The
 314 authors have assessed the extractors in chitinase recovery of isolated *Penicillium chrysogenum* in SSF and the
 315 superior results were observed for NaCl (1.0%) [50]. According to Fernández-Lahore [51] the location of
 316 enzyme and the hydrophobic/hydrophilic nature of fungal mycelia, ionic bonds, hydrogen bonds and Van Der
 317 Waals forces appeared to determine the effectiveness of the extraction agent.

318



319 **Fig. 6** Scott-Knott test to chitinase activity produced by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 in SSF (extracted
 320 with 100 mL). Enzymatic extractors: (a) Citrate (50 mM sodium citrate-phosphate buffer, pH 4.0), Water (sterile
 321 distilled water), Tween (Tween[®] 0.1%), NaCl (NaCl 0.1%) and Acetate (50 mM acetate buffer, pH 4.8); (b)
 322 Sodium citrate-phosphate buffer in different solid:liquid ratios (g:mL). Significance level of 0.05.

324

325 Nematicide effect

326 In the mortality of juvenile (J2) nematodes in vitro was observed after 24 h of treatment. The filtrated of
 327 *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 promoted the mortality of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne*
 328 *incognita* nematodes with a mortality efficiency of 63.2% and 90.4%, respectively. In addition, it was detected
 329 high mortality of these species of J2 nematodes when the conidia of isolated as a form of control was used,
 330 presenting a mortality efficiency of 95.9% in *Meloidogyne javanica* and 80.3% in *Meloidogyne incognita*, after

331 72 h of treatment. Similar results were found by Freitas [52] who observed the filtrates of *Trichoderma* sp. were
 332 efficient in promoting the mortality of *Meloidogyne incognita* J2 nematodes in vitro. Corroborating with these
 333 results, Zhang [53] observed strong lethal and parasitic effect (> 88%) in of *M. incognita* J2 nematodes after 14
 334 days of treatment with 1.5×10^7 conidia ml⁻¹ of isolated *Trichoderma longibrachiatum*. No reports were found
 335 applying isolated *Trichoderma koningiopsis* or filtered from the culture medium to the control of nematodes.

336 *Trichoderma* species are recognized by the biocontrol activity against phytopathogenic fungi and
 337 nematodes, both by antibiosis, mycoparasitism and enzymatic hydrolysis, presented by these species. In addition,
 338 promote growth and induce resistance of plants against pathogens [54].

339

340 **Table 4** Effectiveness of in vitro control of isolated *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 and of enzymatic
 341 extract on *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita*.

Treatments	Control (%)	
	<i>Meloidogyne javanica</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>
Biologic control ¹	95.9	80.3
Enzymatic extract ²	63.2	90.4

342 ¹ 72 h after treatment, concentration of 1×10^8 conidia ml⁻¹; ² 24 h after treatment, chitinase activity of 10.76 U
 343 gds¹.

344

345 CONCLUSION

346

347 The isolated UFSMQ40 belonging to *Trichoderma koningiopsis* species. The highest production of
 348 chitinase by this fungus under the conditions evaluated in SSF occurs when the wheat bran substrate present 55%
 349 of moisture, the supplementation of CSL is 100%, the amount of colloidal chitin is at 15%, the inoculum is
 350 accomplished with 2 disks, and the incubation occurs at 30° C for 72 h.

351

352 The colloidal chitin, in powder and flakes can be used as enzymatic inducers without altering chitinase
 353 production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40. The addition of sodium citrate-phosphate buffer in 1:15
 354 g:ml ratio is the best extractor evaluated for chitinase produced by this fungus under optimized conditions in
 355 SSF. *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40 presents potential for industrial production of chitinase using wheat
 bran residues and CSL as substrates. The isolated presented high mortality effectiveness of phytopathogenic

356 nematodes *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita* when utilized the treatments as filtrate enzymatic
 357 and the suspension of conidia.

358

359 **REFERENCES**

360

- 361 1. Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review.
 362 Appl Microbiol Biotechnol 71:773–782. doi: 10.1007/s00253-005-0183-7
- 363 2. Halder SK, Maity C, Jana A, et al (2013) Proficient biodegradation of shrimp shell waste by *Aeromonas*
 364 *hydrophila* SBK1 for the concomitant production of antifungal chitinase and antioxidant chitosaccharides.
 365 Int Biodeterior Biodegrad 79:88–97. doi: 10.1016/j.ibiod.2013.01.011
- 366 3. Brzezinska MS, Jankiewicz U, Walczak M (2013) Biodegradation of chitinous substances and chitinase
 367 production by the soil actinomycete *Streptomyces rimosus*. Int Biodeterior Biodegrad 84:104–110. doi:
 368 10.1016/j.ibiod.2012.05.038
- 369 4. Merzendorfer H (2011) The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: Common principles and
 370 differences. Eur J Cell Biol 90:759–769. doi: 10.1016/j.ejcb.2011.04.014
- 371 5. Schrank A, Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. Toxicon 56:1267–1274.
 372 doi: 10.1016/j.toxicon.2010.03.008
- 373 6. Halder SK, Maity C, Jana A, et al (2012) Chitinolytic enzymes from the newly isolated *Aeromonas*
 374 *hydrophila* SBK1: study of the mosquitocidal activity. BioControl 57:441–449. doi: 10.1007/s10526-011-
 375 9405-3
- 376 7. Patil NS, Waghmare SR, Jadhav JP (2013) Purification and characterization of an extracellular antifungal
 377 chitinase from *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 and its application in protoplast formation. Process
 378 Biochem 48:176–183. doi: 10.1016/j.procbio.2012.11.017
- 379 8. Halder SK, Jana A, Das A, et al (2014) Appraisal of antioxidant, anti-hemolytic and DNA shielding
 380 potentialities of chitosaccharides produced innovatively from shrimp shell by sequential treatment with
 381 immobilized enzymes. Food Chem 158:325–334. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.115
- 382 9. Khan A, Williams KL, Nevalainen HKM (2004) Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase
 383 on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. Biol Control 31:346–352. doi:
 384 10.1016/j.biocontrol.2004.07.011

- 385 10. Binod P, Sukumaran R k., Shirke S v., et al (2007) Evaluation of fungal culture filtrate containing
386 chitinase as a biocontrol agent against *Helicoverpa armigera*. J Appl Microbiol 103:1845–1852. doi:
387 10.1111/j.1365-2672.2007.03428.x
- 388 11. Patil NS, Jadhav JP (2015) Significance of *Penicillium ochrochloron* chitinase as a biocontrol agent
389 against pest *Helicoverpa armigera*. Chemosphere 128:231–235. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.01.038
- 390 12. Chavan SB, Deshpande MV (2013) Chitinolytic enzymes: an appraisal as a product of commercial
391 potential. Biotechnol Prog 29:833–846. doi: 10.1002/btpr.1732
- 392 13. Karthik N, Akanksha K, Pandey A (2014) Production, purification and properties of fungal chitinases--a
393 review. Indian J Exp Biol 52:1025–1035.
- 394 14. Stoykov YM, Pavlov AI, Krastanov AI (2015) Chitinase biotechnology: Production, purification, and
395 application. Eng Life Sci 15:30–38. doi: 10.1002/elsc.201400173
- 396 15. Doyle JJ, Doyle J (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13–15.
- 397 16. O'Donnell K, Cigelnik E (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a Monophyletic
398 Lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Mol Phylogenet Evol 7:103–116. doi:
399 10.1006/mpev.1996.0376
- 400 17. Schmitz A, Riesner D (2006) Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene
401 glycol 6000. Anal Biochem 354:311–313. doi: 10.1016/j.ab.2006.03.014
- 402 18. Staden R, Judge DP, Bonfield JK (2003) Analyzing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS.
403 In: Krawetz SA, Womble DD (eds) Introd. Bioinforma. Humana Press, pp 393–410
- 404 19. Hall TA (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment program for Windows 95/98/NT.
405 Nucleic Acids Symp Ser 41:95–98.
- 406 20. Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
407 Version 6.0. Mol Biol Evol 30:2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- 408 21. Posada D, Crandall KA (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics
409 14:817–818. doi: 10.1093/bioinformatics/14.9.817
- 410 22. Liu C-L, Lan C-Y, Fu C-C, Juang R-S (2014) Production of hexaoligochitin from colloidal chitin using a
411 chitinase from *Aeromonas schubertii*. Int J Biol Macromol 69:59–63. doi:
412 10.1016/j.ijbiomac.2014.05.028
- 413 23. R Core Team (2016) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for
414 Statistical Computing. Vienna, Austria.

- 415 24. Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal Chem
416 31:426–428. doi: 10.1021/ac60147a030
- 417 25. Hussey RS, Barker K (1973) A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp.,
418 including a new technique. Plant Dis Report 57:1025–1028.
- 419 26. Abbott WS (1925) A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. J Econ Entomol 18:265–
420 267. doi: 10.1093/jee/18.2.265a
- 421 27. Anees M, Tronsmo A, Edel-Hermann V, et al (2010) Characterization of field isolates of *Trichoderma*
422 antagonistic against *Rhizoctonia solani*. Fungal Biol 114:691–701. doi: 10.1016/j.funbio.2010.05.007
- 423 28. Kullnig-Gradinger CM, Szakacs G, Kubicek CP (2002) Phylogeny and evolution of the genus
424 *Trichoderma*: a multigene approach. Mycol Res 106:757–767. doi: 10.1017/S0953756202006172
- 425 29. Samuels GJ (2006) *Trichoderma*: Systematics, the Sexual State, and Ecology. Phytopathology 96:195–
426 206. doi: 10.1094/PHYTO-96-0195
- 427 30. Dhillon GS, Brar SK, Kaur S, et al (2011) Chitinolytic and chitosanolytic activities from crude cellulase
428 extract produced by *A. niger* grown on apple pomace through Koji fermentation. J Microbiol Biotechnol
429 21:1312–1321.
- 430 31. Thadathil N, Kuttappan AKP, Vallabaipatel E, et al (2013) Statistical optimization of solid state
431 fermentation conditions for the enhanced production of thermoactive chitinases by mesophilic soil fungi
432 using response surface methodology and their application in the reclamation of shrimp processing by-
433 products. Ann Microbiol 64:671–681. doi: 10.1007/s13213-013-0702-1
- 434 32. Nampoothiri KM, Baiju TV, Sandhya C, et al (2004) Process optimization for antifungal chitinase
435 production by *Trichoderma harzianum*. Process Biochem 39:1583–1590. doi: 10.1016/S0032-
436 9592(03)00282-6
- 437 33. Patil NS, Jadhav JP (2014) Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine by solid state fermentation
438 of chitinase by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 using agricultural residues. Int Biodeterior
439 Biodegrad 91:9–17. doi: 10.1016/j.ibiod.2014.03.003
- 440 34. Nascimento R de AL, Alves MHM, Freitas JHE, et al (2015) Aproveitamento da água de maceração de
441 milho para produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger* (UCP/WFCC 1261). E-Xacta 8:15–29.
- 442 35. Berger LRR, Stamford TCM, Stamford-Arnaud TM, et al (2014) Effect of Corn Steep Liquor (CSL) and
443 Cassava Wastewater (CW) on Chitin and Chitosan Production by *Cunninghamella elegans* and Their

- 444 Physicochemical Characteristics and Cytotoxicity. *Molecules* 19:2771–2792. doi:
445 10.3390/molecules19032771
- 446 36. Hamano PS, Kilikian BV (2006) Production of red pigments by *Monascus ruber* in culture media
447 containing corn steep liquor. *Braz J Chem Eng* 23:443–449. doi: 10.1590/S0104-66322006000400002
- 448 37. Fenice M, Leuba J-L, Federici F (1998) Chitinolytic enzyme activity of *Penicillium janthinellum* P9 in
449 bench-top bioreactor. *J Ferment Bioeng* 86:620–623. doi: 10.1016/S0922-338X(99)80020-8
- 450 38. Kovacs K, Szakacs G, Pusztahelyi T, Pandey A (2004) Production of chitinolytic enzymes with
451 *Trichoderma longibrachiatum* IMI 92027 in solid substrate fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*
452 118:189–204.
- 453 39. Rattanakit N, Yang S, Wakayama M, et al (2003) Saccharification of chitin using solid-state culture of
454 *Aspergillus* sp. S1-13 with shellfish waste as a substrate. *J Biosci Bioeng* 95:391–396. doi:
455 10.1016/S1389-1723(03)80073-7
- 456 40. Binod P, Sandhya C, Suma P, et al (2007) Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid
457 state fermentation and their application for the production of N-acetyl-d-glucosamine from colloidal
458 chitin. *Bioresour Technol* 98:2742–2748. doi: 10.1016/j.biortech.2006.09.030
- 459 41. Nawani NN, Kapadnis BP (2005) Optimization of chitinase production using statistics based
460 experimental designs. *Process Biochem* 40:651–660. doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.048
- 461 42. St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK (1986) Cuticle-degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi:
462 Regulation of Production of Chitinolytic Enzymes. *Microbiology* 132:1509–1517. doi:
463 10.1099/00221287-132-6-1509
- 464 43. Barranco Florida E, Bustamante Camilo P, Mayorga-Reyes L, et al (2009) β -N-acetylglucosaminidase
465 production by *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* ATCC 26854 by solid-state fermentation utilizing
466 shrimp shell. *Interciencia* 34:356–360.
- 467 44. Barranco-Florido JE, Alatorre-Rosas R, Gutiérrez-Rojas M, et al (2002) Criteria for the selection of
468 strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme Microb Technol*
469 30:910–915. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00032-7
- 470 45. Gkargkas K, Mamma D, Nedev G, et al (2004) Studies on a N-acetyl- β -d-glucosaminidase produced by
471 *Fusarium oxysporum* F3 grown in solid-state fermentation. *Process Biochem* 39:1599–1605. doi:
472 10.1016/S0032-9592(03)00287-5

- 473 46. Rattanakit N, Plikomol A, Yano S, et al (2002) Utilization of shrimp shellfish waste as a substrate for
474 solid-state cultivation of *Aspergillus* sp. S1-13: Evaluation of a culture based on chitinase formation
475 which is necessary for chitin-assimilation. J Biosci Bioeng 93:550–556. doi: 10.1016/S1389-
476 1723(02)80236-5
- 477 47. Rattanakit N, Yano S, Plikomol A, et al (2007) Purification of *Aspergillus* sp. S1-13 chitinases and their
478 role in saccharification of chitin in mash of solid-state culture with shellfish waste. J Biosci Bioeng
479 103:535–541. doi: 10.1263/jbb.103.535
- 480 48. Rustiguel CB, Jorge JA, Guimarães LHS (2012) Optimization of the Chitinase Production by Different
481 *Metarhizium anisopliae* Strains under Solid-State Fermentation with Silkworm Chrysalis as Substrate
482 Using CCRD. Adv Microbiol 02:268–276. doi: 10.4236/aim.2012.23032
- 483 49. Patidar P, Agrawal D, Banerjee T, Patil S (2005) Chitinase production by *Beauveria felina* RD 101:
484 optimization of parameters under solid substrate fermentation conditions. World J Microbiol Biotechnol
485 21:93–95. doi: 10.1007/s11274-004-1553-5
- 486 50. Patidar P, Agrawal D, Banerjee T, Patil S (2005) Optimisation of process parameters for chitinase
487 production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation. Process
488 Biochem 40:2962–2967. doi: 10.1016/j.procbio.2005.01.013
- 489 51. Fernández-Lahore HM, Fraile ER, Cascone O (1998) Acid protease recovery from a solid-state
490 fermentation system. J Biotechnol 62:83–93. doi: 10.1016/S0168-1656(98)00048-0
- 491 52. Freitas MA, Pedrosa EMR, Mariano RLR, Maranhão SRVL (2012) Screening *Trichoderma* spp. as
492 potential agents for biocontrol of *Meloidogyne incognita* in sugarcane]. Nematropica 42:115–122.
- 493 53. Zhang S, Gan Y, Xu B (2015) Biocontrol potential of a native species of *Trichoderma longibrachiatum*
494 against *Meloidogyne incognita*. Appl Soil Ecol 94:21–29. doi: 10.1016/j.apsoil.2015.04.010
- 495 54. Mascarin GM, Junior MFB, Jerocirc, Filho NV de A (2012) *Trichoderma harzianum* reduces population
496 of *Meloidogyne incognita* in cucumber plants under greenhouse conditions. J Entomol Nematol 4:54–57.
497

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria das espécies fúngicas são capazes de produzir inúmeras enzimas hidrolíticas com potencial biotecnológico. Entre essas enzimas, as quitinases apresentam uma grande possibilidade de utilização na produção de bioinseticidas e biofungicidas para o controle de pragas na agricultura. Entretanto, ainda não temos um banco destas espécies disponíveis para uso, sendo necessário o desenvolvimento de diversas etapas de que vão desde o isolamento, seleção e identificação das espécies fúngicas com elevada produção de quitinases até a formulação final destes produtos.

No presente estudo foram selecionados e identificados 10 isolados fúngicos com capacidade da produção de quitinases em fermentação em estado sólido. Esses isolados pertencem aos gêneros *Fusarium*, *Lecanicillium* e *Trichoderma*, os quais estão reportados na literatura como espécies que possuem grande potencial para utilização biotecnológica.

O isolado *Trichoderma koningiopsis* (UFSMQ40) apresentou a maior produção de quitinases em fermentação em estado sólido, e foi selecionado para a otimização da produção dessa enzima. Após a otimização, foi possível obter a produção máxima de 10,72 U gds⁻¹ de quitinase reduzindo o tempo de cultivo de 96 para 72 horas. Além disso, dos substratos avaliados, a quitina em pó e a quitina em flocos podem ser utilizados como indutores enzimáticos menos dispendiosos em relação à quitina coloidal, sem alterar a produção de quitinases.

O isolado *Trichoderma koningiopsis* (UFSMQ40) mostrou ser uma estirpe potencial para a elevada produção de quitinases utilizando os resíduos agroindustriais farelo de trigo e água de maceração de milho como substratos para o seu desenvolvimento. Esses resíduos são considerados uma alternativa promissora para reduzir o custo do processo de produção dessas enzimas em um aumento de escala do processo fermentativo. Além da elevada produção de quitinases apresentada pelo isolado, esse estudo caracteriza-se como o primeiro relato da produção de quitinases por um isolado da espécie *Trichoderma koningiopsis*.

Nesse contexto ainda são necessários estudos de isolamento e purificação das quitinases produzidas por esse isolado, bem como a sua caracterização para a verificação da sua estabilidade e especificidade a diferentes substratos. Do mesmo modo, são necessários futuros estudos, *in vitro* e em casa de vegetação, para avaliar a efetividade dessas enzimas no controle de pragas agrícolas como a lagarta *Helicoverpa armigera* e os nematoides fitopatogênicos *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* que causam grandes prejuízos na agricultura no Brasil.

É importante também, isolar e otimizar a produção de quitinase de outras espécies fúngicas, para evitar a dependência de uma única espécie. Bem como, pode-se obter informações importante para o controle de outras pragas e/ou doenças na área agrícola.