

Bioprospecção de Fungo Endofítico Isolado de *Passiflora* sp. com Potencial Biotecnológico

Mariana Sanches Santos¹, Ravelly Casarotti Orlandelli¹, Vânia Specian¹, Adriana Garcia¹, Maria Carolina dos Santos e Silva², João Lúcio de Azevedo², e João Alencar Pamphile¹

¹Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular CEP 87020-900 Maringá – Paraná - E-mail: mari_sanches_s@hotmail.com

² Universidade de São Paulo – Centro de Energia Nuclear na Agricultura CEP 13400-970 Piracicaba – São Paulo.

RESUMO

*Os endofíticos são microrganismos, geralmente fungos e bactérias, que vivem sistematicamente no interior das plantas, sem causar aparentemente dano a seus hospedeiros. A cultura do maracujazeiro possui significativa participação no mercado nacional. A evolução da produção do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.*) ajudou a permitir o destaque do Brasil como maior produtor mundial. Fungos endofíticos são capazes de produzir substâncias de interesse biotecnológico, entre elas algumas enzimas que possuem aplicações em processos industriais. O objetivo deste trabalho foi realizar a avaliação da atividade enzimática, como a produção de celulase e amilase, de fungo endofítico isolado de *Passiflora spp.**

Palavras-chave: fungos endofíticos, enzimas, caracterização.

INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos vivem no interior de plantas habitando, de modo geral, suas partes aéreas como caules e folhas, sem causar, aparentemente, qualquer dano aos seus hospedeiros. Eles distinguem-se dos patogênicos, que causam doenças nas plantas, e dos epifíticos que vivem na superfície dos vegetais¹.

A primeira descrição de fungos endofíticos foi feita por Bary em 1866 e até 1970 eram considerados assintomáticos, ou seja, não produziam efeitos prejudiciais nem benéficos a suas plantas hospedeiras². Os endófitos podem co-evoluir com a sua planta hospedeira de forma que apresentem uma interação genótipo-específico³. Por haver esta associação entre endófito e planta, surgiu a hipótese de microrganismos exercerem efeitos benéficos em suas plantas hospedeiras tais como o controle biológico de pragas e sua utilização como bioherbicidas, a produção de metabólitos de interesse farmacológico⁴, a promoção de crescimento e controle de fitopatógenos⁵.

Plantas medicinais ou com propriedades terapêuticas estão sendo cada vez mais analisadas a partir de pressupostos de sua interação com microrganismos endofíticos os quais tem apresentado diversos benefícios como produtores de antibióticos, metabólitos secundários de interesse farmacológico⁴. O maracujá-azedo ou maracujá-amarelo é uma planta originária da América Tropical, com mais de 150 espécies nativas do Brasil, encontrada em todo território Brasileiro, onde apresenta excelentes condições ecológicas para o seu cultivo. Enzimas são proteínas essenciais para a realização de atividades metabólicas de todos os organismos vivos



além de terem um papel importante na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e deterioração dos alimentos⁶. Possuem duas características consideradas mais importantes, são elas a sua grande eficiência como catalisadoras de reações e seu alto grau de especificidade com os substratos⁷. A maioria dos processos industriais que empregam enzimas são relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e de baixo custo⁸.

Enzimas de origem animal e vegetal são as mais estudadas, porém sabe-se que as de origem microbiana apresentam grande potencial para a aplicação industrial, pois, via fermentação, são produzidas facilmente em larga escala. Além de serem facilmente expressas (clonadas) em organismos de cultivo já estabelecido⁹. Enzimas microbianas não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento e devido à descoberta de novas enzimas e aplicações, sua diversidade vem aumentando a cada dia¹⁰.

Objetivou-se com este trabalho avaliar o isolado (G1 P1.13) de *Passiflora spp.* pertencente ao estoque do laboratório de Biotecnologia Microbiana- UEM na prospecção enzimática de celulase e amilase.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a produção de enzimas, o fungo foi previamente cultivado em meio BDA (batata dextrose ágar) por sete dias. Três discos de micélio do endófito foram cultivados em meio líquido Solução de Manachini (KH_2PO_4 , 2 g.L⁻¹; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g.L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g.L⁻¹; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,9 g.L⁻¹; extrato de levedura, 1 g.L⁻¹; água destilada, 1000 mL), adicionado de substrato indutor (0,5%), e pH ajustado para cada enzima: amilase (amido de milho Maizena®, pH 6,0) e celulase (carboximetilcelulose ou CMC Fluka, pH 5,0). A incubação foi conduzida a 28 °C, sob agitação a 140 RPM, durante 120 horas¹¹ e o experimento foi realizado em triplicata.

Após o período de incubação em meio líquido, as amostras foram filtradas com gaze esterilizada, para a separação da massa micelial. Quantidades de 100 µL do filtrado foram inoculadas em cup plates de 6 mm de diâmetro perfurados na superfície de meios de cultura sólidos adequados para a detecção de cada enzima em placa de Petri. Para amilase utilizou-se ágar-amido (ágar, 18 g.L⁻¹; amido, 10 g.L⁻¹, tampão citato-fosfato 0,1 M, pH 5,0). Para celulase, ágar-CMC (ágar, 18 g.L⁻¹, carboximetilcelulose, 10 g.L⁻¹, tampão acetato de Na⁺ 0,1 M, pH 5,0).

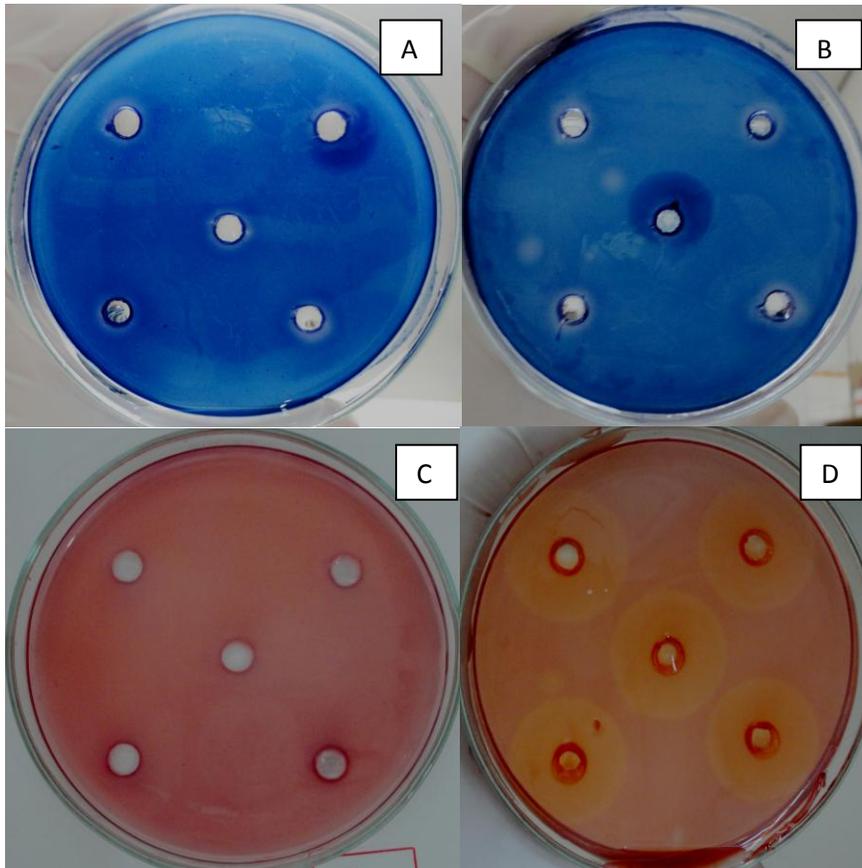
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a técnica de cup plate foi possível detectar se o isolado produziu celulases e amilases. As placas de ágar-CMC foram reveladas com corante Vermelho do Congo, e a formação de uma zona clara em forma de halos indicou a ação enzimática da celulase, enquanto que a parte não afetada pela enzima corou-se de vermelho¹². As amilases foram visualizadas revelando-se as placas de ágar-amido com tintura de iodo. O amido corou-se de azul e a área de degradação enzimática apresenta halos translúcidos. O isolado G1 p3.13, de *Passiflora sp.* se destacou quanto a produção de amilase e teve resultado inferior para a produção de celulase.

O controle positivo da amilase exibiu halos de degradação enzimática de 11 mm, valor muito próximo ao do endófito testado, que obteve halos de 10 mm. Já a celulase, o controle positivo gerou halos de 27 mm, enquanto que o isolado testado não gerou halos.



Figura 1 – Fotos das placas coradas mostrando a formação dos halos. A- halos gerados pelo isolado pela produção de amilase; B- controle positivo para amilase; C – halos gerados pelo isolado pela produção de celulase; D- controle positivo para celulase



CONCLUSÕES

O isolado de *Passiflora* sp., G1 P3.13 é capaz de produzir amilase, possuindo potencial biotecnológico nas indústrias de alimentos, papel e têxtil.

REFERÊNCIAS

1. AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR., W.; ARAUJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUSC, cap. 8, p. 235-268, 2002.
2. AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada?. **Revista brasil. Bot.** São Paulo, v. 22, n. 2 (supl.), p. 225-229, out. 1999.



III SIMBBTEC
Londrina 2013

Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia
Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER

3. PAMPHILE, J.A.; ROCHA, C.L.M.S.C. da; AZEVEDO, J L. Co-transformation of a tropical maize fungal endophyte isolate of *Fusarium verticillioides* (synonym *F. moniliforme*) with *gusA* and *nia* genes. **Genetics and Molecular Biology**, Brasil, v. 27, n. 2, p. 253-258, 2004.
4. PILEGGI, M.; RAIMAN, M. P.; MICHELI, A.; BEATRIZ, S.; BOBATO, V. Ação Antimicrobiana e interação endofítica em *Symphytum officinale* L. Publicatio UEPG -**Biological and Health Sciences**. Ponta Grossa, v. 8 n.1, p. 47-55, 2002.
5. SILVA, H. S.; BETTIOL, W.; TERRASAN, C. R. F.; TOZZI, J. P. L.; MELO, I. S.; NUNES, F. V. Microrganismos Endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, n. 38, 25p, 2006.
6. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, p. 839, 1995.
7. PELCZAR, M; REID R. CHAN E.C.S. **Microbiologia**. 1. ed. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, p. 566, 1980.
8. PIZARRO, A. V. L.; PARK, E. Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1077-1082, 2003.
9. GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, n. 6, p. 621-634, 1997.
10. COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
11. MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. **Biotechnology Letters**, v. 9, n. 3, p. 219-224, 1987.
12. MULLINGS, R. Measurement of saccharification by cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 586-591, 1985.