



## PRODUÇÃO DA ENZIMA PROTEASE POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DA PLANTA MEDICINAL *Piper hispidum* Sw

Ravely Casarotti Orlandelli<sup>1</sup>; Tiago Tognolli de Almeida<sup>2</sup>; João Lúcio de Azevedo<sup>3</sup>; João Alencar Pamphile<sup>4</sup>

**RESUMO:** Fungos endofíticos habitam o interior de plantas sadias sem causar-lhes danos. Entre suas aplicações biotecnológicas estão o controle biológico de pragas e doenças, a biorremediação de compostos tóxicos, a produção de metabólitos secundários com ação terapêutica e a produção de enzimas. Entre as enzimas de interesse industrial, as proteases produzidas por microrganismos são úteis em vários segmentos, incluindo produção de alimentos, tecidos e medicamentos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de protease por 28 fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Piper hispidum* (falso-jaborandi). Os fungos foram crescidos em meio líquido para induzir a produção extracelular de protease. Este meio fermentado foi então empregado na técnica *cup plate*, onde atividade enzimática foi observada pela formação de halos incolores em meio sólido. Todos os fungos testados apresentaram atividade proteolítica, com halos que variaram entre 1,33 e 16,40 mm de diâmetro. Os resultados obtidos demonstram o potencial biotecnológico destes fungos para a produção da enzima industrial protease, com destaque para sete isolados endofíticos que produziram halos acima de 10 mm de diâmetro.

**PALAVRAS-CHAVE:** Atividade proteolítica; Endófitos; Fermentação.

### INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos e têm um papel importante na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e deterioração dos alimentos (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). Constituem o principal alvo da pesquisa biotecnológica devido a sua importância nos mecanismos celulares e a sua aplicação em vários processos industriais, com destaque para a indústria de alimentos, que está entre as principais consumidoras de enzimas, seja em processos tradicionais ou inovadores (SENA et al., 2006).

Tradicionalmente, as enzimas mais estudadas são aquelas de origem animal ou vegetal, contudo as de origem microbiana apresentam grande potencial para a aplicação

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná. Bolsista CAPES. [ravelycasarotti@gmail.com](mailto:ravelycasarotti@gmail.com)

<sup>2</sup>Aluno de Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná. [tiagotognollidealmeida@gmail.com](mailto:tiagotognollidealmeida@gmail.com)

<sup>3</sup>Pesquisador visitante nível 1 do CNPq no Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná. [jazevedo@esalq.usp.br](mailto:jazevedo@esalq.usp.br)

<sup>4</sup>Docente do Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá, Paraná. [prof.pamphile@gmail.com](mailto:prof.pamphile@gmail.com)

industrial, já que são facilmente produzidas em larga escala, via fermentação. São também mais facilmente expressas (clonadas) em organismos de cultivo já estabelecido (GANDHI, 1997).

Entre as enzimas de interesse industrial, estão as proteases. Proteases microbianas possuem particular importância por terem especificidades a diferentes substratos, tornando-se úteis em várias áreas da bioquímica e biotecnologia, incluindo indústrias alimentícias, têxteis e de medicamentos (RAJAK et al., 1994). As proteases de origem microbiana já correspondem a aproximadamente 40% da venda mundial total de enzimas (SAID; PIETRO, 2002).

As proteases bacterianas possuem como desvantagem a necessidade de metodologias de filtragem de custo elevado para obtenção de enzimas livres de bactérias, enquanto as proteases de origem fúngica podem ser facilmente separadas do micélio do organismo produtor por filtração simples (PHADATARE; DESHPANDE; SRINIVASAN, 1993).

Alguns fungos, conhecidos como endófitos ou endofíticos, colonizam o interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas e ramos. Esses fungos não causam danos aos seus hospedeiros, ao contrário, os beneficiam atuando como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos, insetos-pragas e herbívoros. Além disso, podem ser utilizados nos mais diversos segmentos da Biotecnologia, incluindo a produção de enzimas e a biorremediação de compostos tóxicos (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Considerando-se o potencial dos endófitos para a produção de enzimas, este trabalho tem como objetivo avaliar a produção da enzima protease por fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Piper hispidum* (falso-jaborandi).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 28 fungos endofíticos isolados de *P. hispidum* e pertencentes ao Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Maringá.

Para a fermentação em meio líquido, três discos (6 mm) de colônia de 7 dias de cada endófito foram inoculados em Erlenmeyers contendo 50 mL de meio líquido de indução, descrito por Sena et al. (2006): 7 g  $H_9N_2O_4P$ ; 1,5 g  $K_2HPO_4$ ; 0,4 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 5 g leite em pó desnatado; 100 mL solução de glicose 30%; 2,5 mL solução de traços de sais (0,1 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,1 g  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ; 0,1 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  em 100 mL de água destilada autoclavada); água destilada completada para 1000 mL; pH 7.0). Os erlenmeyers foram incubados em B.O.D. a 28°C por 10 dias. Os meios foram filtrados com gaze autoclavada, para separação da massa micelial e do meio líquido. O meio líquido foi reservado.

Para o ensaio qualitativo *cup plate* para a detecção da atividade enzimática, cinco perfurações circulares (6 mm) foram feitas em placas de Petri contendo 20 mL de meio ágar-gelatina-leite (18 g ágar, 10 g leite em pó desnatado; 10 g de gelatina em pó incolor sem sabor; 1000 mL de água destilada). Em cada perfuração foram inoculados 50  $\mu$ L do meio de cultura anteriormente reservado. Os testes foram feitos em triplicata e as placas foram incubadas em B.O.D. a 28°C por 24 h. A produção de enzimas foi observada pela formação de halos enzimáticos incolores, os quais foram medidos e expressos em mm.

Para o controle positivo foi utilizada a enzima protease obtida de *Aspergillus oryzae*, Sigma ( $\geq 500$  U/g). Para o controle negativo foi utilizado o meio de cultura incubado sem a inoculação de micélio fúngico.

As médias foram avaliadas estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) com auxílio do programa estatístico SISVAR 4.3 (FERREIRA, 1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância mostrou diferenças estatisticamente significativas entre a produção enzimática dos fungos endofíticos testados. Foi observada a produção de protease por todos os fungos testados. Os halos de degradação enzimática variaram entre 1,33 e 16,40 mm e o melhor produtor foi o isolado G25-51. O isolado G62-75 apresentou produção estatisticamente semelhante (ver Tabela 1).

Tabela 1. Atividade proteolítica dos fungos endofíticos de *Piper hispidum* em meio sólido (*cup plate*) após fermentação em meio líquido.

Fungos utilizados	Médias dos halos (mm)*
Controle positivo**	23,60 <sup>a</sup>
G25-51	16,40 <sup>b</sup>
G62-75	15,40 <sup>b</sup>
G23-54	15,00 <sup>c</sup>
G13-109	14,46 <sup>c</sup>
G38-111	14,00 <sup>c</sup>
G42-108	10,20 <sup>d</sup>
G13-13	10,00 <sup>d</sup>
G20-20	9,53 <sup>d</sup>
G04-24	9,46 <sup>d</sup>
G17-101	8,26 <sup>d</sup>
G59-82	6,66 <sup>d</sup>
G14-86	6,00 <sup>d</sup>
G04-04	6,00 <sup>d</sup>
G34-52	5,66 <sup>e</sup>
G36-112	5,46 <sup>e</sup>
G39-39	5,46 <sup>e</sup>
G03-90	5,40 <sup>e</sup>
G07-23	5,20 <sup>e</sup>
G55-117	4,86 <sup>e</sup>
G07-138	4,46 <sup>e</sup>
G01-01	3,93 <sup>f</sup>
G54-69	3,93 <sup>f</sup>
G53-83	3,66 <sup>f</sup>
G08-64	3,60 <sup>f</sup>
G62-127	3,53 <sup>f</sup>
G11-11	3,46 <sup>f</sup>
G05-05	2,26 <sup>g</sup>
G35-35	1,33 <sup>g</sup>

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

\*\*Protease extraída de *Aspergillus oryzae* (Sigma), aplicada diretamente no meio sólido.

Em estudo semelhante, dos 20 fungos testados por Sena et al. (2006), 12 apresentaram atividade proteolítica, onde o maior halo produzido foi de 14 mm de diâmetro.

El-Diasty e Salem (2007) testaram a atividade proteolítica de 89 isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Cladosporium* *Penicillium*. A produção de protease variou entre fraca, moderada e forte, alguns isolados não apresentaram esta produção. Em nosso estudo, também foi observada esta variação, já que a análise de variância dividiu os endófitos em diferentes grupos de acordo com os valores apresentados para os halos de degradação enzimática.

No estudo de Djamel, Ali e Nelly (2009) um total de 253 isolados fúngicos do gênero *Penicillium* foram testados quanto a sua atividade proteolítica, onde apenas 10 isolados (3,9%) foram selecionados como mais promissores, com medidas de hidrólise do meio sólido acima de 9 mm. Considerando-se esta medida, 9 isolados endofíticos de *P. hispidum* podem ser considerados mais promissores.

## CONCLUSÃO

Entre os fungos endofíticos testados, os isolados G25-51 e G62-75 foram os mais promissores para a produção da enzima protease, segundo a análise estatística utilizada. Porém, todos os fungos utilizados apresentaram produção desta enzima, o que confirma o potencial destes endófitos para a produção de enzimas de interesse industrial.

## REFERÊNCIAS

DJAMEL, C.; ALI, T.; NELLY, C. Acid protease production by isolated species of *Penicillium*. **European Journal of Scientific Research**, v. 25, n. 3, p. 469-477, 2009.

EL-DIASTY, E. M.; SALEM, R. M. Incidence of lipolytic and proteolytic fungi in some milk products and their public health significance. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 12, p. 1684-1688, 2007.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3 - Sistema de análises estatísticas**. UFLA, Lavras, 1999.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, n. 6, p. 621-634, 1997.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: Interação com as plantas e potencial biotecnológico. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

PHADATARE, S. U.; DESHPANDE, V. V.; SRINIVASAN, M. C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 15-72, 1993.

RAJAK, N. N.; SAMAD, M. Y.; BASRI, M.; YUNUS, W. M. Z. W.; AMPON, K.; SALLEH, A. B. Thermostable extracellular protease of *Bacillus streatothermophilus*: factors affecting its production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 260-263, 1994.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro: Eventos Editora, 2002. 121 p.

SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; GÓES NETO, A.; UETANABARO, A. P. T. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, n. 35, p. 91-98, 2006.