



Autor(es): THAÍS TIEMI YOSHINAGA, SÉRGIO AVELINO MOTA NOBRE, EDMILSON MENDES DE FARIA, RONIZE VIVIANE JORGE FARIA, LUDMILLA LOUISE CERQUEIRA MAIA PRATES

PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DO CERRADO, COM POTENCIAL USO EM PROCESSOS FERMENTATIVOS E INDUSTRIAL.

Introdução:

O Brasil é cientificamente reportado como um grande reservatório da biodiversidade mundial, possuindo imensurável valor genético com potencial uso ambiental e industrial. O cerrado abrange cerca de 25% do território brasileiro, com uma alta diversidade de fauna e flora endêmica, e a estas está associada uma microbiota igualmente diversa. A combinação das diversas características do bioma (solos, altitude, precipitação, composição florística e outros) influencia diretamente os micro-organismos associados ao local. (QIU et al. 2015; MINOTTO et al. 2014)

Micro-organismos são amplamente explorados pelos seu bioprodutos, dentre os mais procurados encontra-se os antibióticos, enzimas, cofatores, anticancerígenos e outros. Aproximadamente 45% dos compostos metabólicos com aplicação na indústria são produzidos por bactérias da ordem Actinomycetales. A prospecção a partir de enzimas permite definir aplicação e escolha de substrato mais apropriado para processos fermentativos, além de serem usuais em processos de produção e tratamento de alimentos, bebidas e diversos substratos. (GOODFELLOW et al. 2012; MINOTTO et al. 2014)

O trabalho teve como objetivo investigar a presença e a intensidade da atividade enzimática de Actinobactérias endofíticas isoladas de plantas nativas do cerrado.

Material e métodos

a) Origem e preparação dos microrganismos

Foram utilizados 18 actinobactérias isoladas do interior de tecidos de espécies vegetais residentes no cerrado brasileiro. Culturas puras foram obtidas, posteriormente caracterizadas e conservadas a -80°C, em caldo Czapek (CZP). Para os procedimentos experimentais, os isolados foram cultivados em meio Czapek por 7 dias a 30°C, e os esporos foram suspensos em caldo CZP agarizado (0,3%) e 3 alíquotas de 10µL do inóculo foram dispostos superficialmente nos meios enzimáticos, e foram realizadas três repetições por isolado, totalizando 9 colônias para análise.

b) Meios de Cultura para Análise Enzimática

A avaliação enzimática é realizada através do cultivo de isolados em meios específicos para a enzima desejada. Sendo assim os meios usados foram:

- (i) Amilase, utilizou-se Meio Amido Nutriente (0,2%) segundo NOGUEIRA, CAVALCANTI (1996);
- (ii) Celulase, Meio CMC (Carboximetilcelulose 1%), segundo MINOTTO et al. (2014).
- (iii) Pectinase, Meio TSA + pectina cítrica 1%, segundo MINOTTO et al. (2014);
- (iv) Gelatinase, Meio Gelatina Nutriente, segundo McDADE, J. WEAVER, R. (1959);
- (v) Esterase, meio específico, segundo HABBA et al. (2000);
- (vi) Lipases, meio específico, segundo SIERRA, Gonzalo (1956);
- (vii) Caseinase, meio específico, segundo MINOTTO et al. (2014).

c) Avaliação de Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi avaliada em três intervalos de tempo: 4, 11 e 18 dias após início do cultivo, e a atividade enzimática foi confirmada pela presença de halos de hidrólise. Para as algumas enzimas, usou-se substâncias reveladoras como marcadores colorimétricos.

A atividade de Lipases e Esterases foi confirmada a olho nu, e a atividade positiva definida pela presença de halos de cristais ao redor da colônia.

A atividade das Caseinases foi mensurada a olho nu, e a presença da enzima, indicada por halos translúcidos ao redor da colônia.

10^o

FEPEG FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

RESPONSABILIDADE SOCIAL: INDISSOCIABILIDADE
ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA



ISSN 1806-549 X

A atividade amilolítica foi mensurada com a adição de 5 mL de solução contendo I₂ e KI (1 e 2% respectivamente) 5 minutos após o descarte do excesso. A mensuração se fez através das dimensões do halo translúcido em contraste com o meio corado.

A atividade celulolítica foi revelada com solução de vermelho do congo, 10 mL por 30 minutos. Após o descarte do corante adicionou-se 10 mL de solução de NaCl por 5 minutos. A mensuração se fez através das dimensões do halo translúcido em contraste com o meio corado.

Para Gelatinase foi utilizada uma solução supersaturada de (NH₄)₂SO₄, onde 10 mL foram adicionados sobre a placa por 15 minutos. Após o descarte do excesso, mensuraram-se halos translúcidos em contraste com o meio opaco.

A atividade pectinolítica foi mensurada com a adição de 5 mL de solução de CaCl₂ (1M) por 5 minutos. Após o descarte do excesso, mensuraram-se halos translúcidos em contraste com o meio opaco..

Resultados e Discussão

A presença de Amilase foi observada em 72% dos isolados, 22% expressaram Caseinase, 55% expressaram Celulase, 77% expressaram a presença de Esterase, 33% expressaram Gelatinase, 88% expressaram atividade lipolítica e apenas 5% dos isolados apresentaram atividade pectinolítica (Figura 1).

Dentre as enzimas avaliadas, as presenças de atividades esterásica, lipolítica, amilolítica e celulolítica foram predominantes, representando de 50% e 88% de expressão destas enzimas entre as actinobactérias estudadas. Houve entretanto, expressão de todas as enzimas avaliadas na coleção, alguns poucos isolados apresentaram atividade para caseína, pectina, gelatina, entre 5% e 30% de expressão dentro da coleção (Figura 1).

Os estágios do cultivo observados para expressão das enzimas, de modo geral foram similares aos referidos na literatura. Assim: atividade amilolítica no dia 4 de cultivo, esterásica e lipolítica próximo ao dia 11 e atividade caseinolítica e gelatinolítica próximos ao dia 18. A atividade pectinolítica foi constante nos três dias de avaliação, contudo, a expressão foi mais intensa no dia 18 de avaliação, o que discorda da literatura, bem como a atividade celulolítica, com expressão maior aos 4 dias de cultivo (Tabela 1).

Considerações Finais

Várias actinobactérias endofíticas aqui avaliadas se mostraram promissoras para inclusão em escala de fermentação e estudos mais detalhados de cinética de cultivo e produção metabólica.

Referências Bibliográficas

- GOODFELOW, M; KÄMPFER, P; BUSSE, H-J; TRUJILLO, M; SUZUKI, K; LUDWIG, W; WHITMAN, W. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2ª edição, Vol.5: The Actinobacteria. Springer, 2012.
- HABA, E. et al. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 26, p. 40-44, 2000.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycologia*, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.
- KASHYAP, D. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*. Amsterdam, v. 77, p. 215-227, 2001.
- LOPERENA, L. et al. Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 5, p. 2249-2256, 2012.
- MCDADE, J. J.; WEAVER, R. H. Rapid Methods for the Detection of Gelatin Hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, p. 60-64, 1958.
- MINOTTO, E; MILAGRE, L; OLIVEIRA, M; VAN DER SAND, S. Enzyme characterization of Endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. *Journal of Advanced Scientific Research*, Vol.5, No.2, P.16-23, 2014.
- NOGUEIRA, E.B.S.; CAVALCANTI, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 27, p. 7-9, 1996.
- SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957.
- QIU, P. et al. Diversity, bioactivities, and metabolic potentials of endophytic actinomycetes isolated from traditional medicinal plants in Sichuan, China. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 13, n. 12, p. 942-953, 2015.

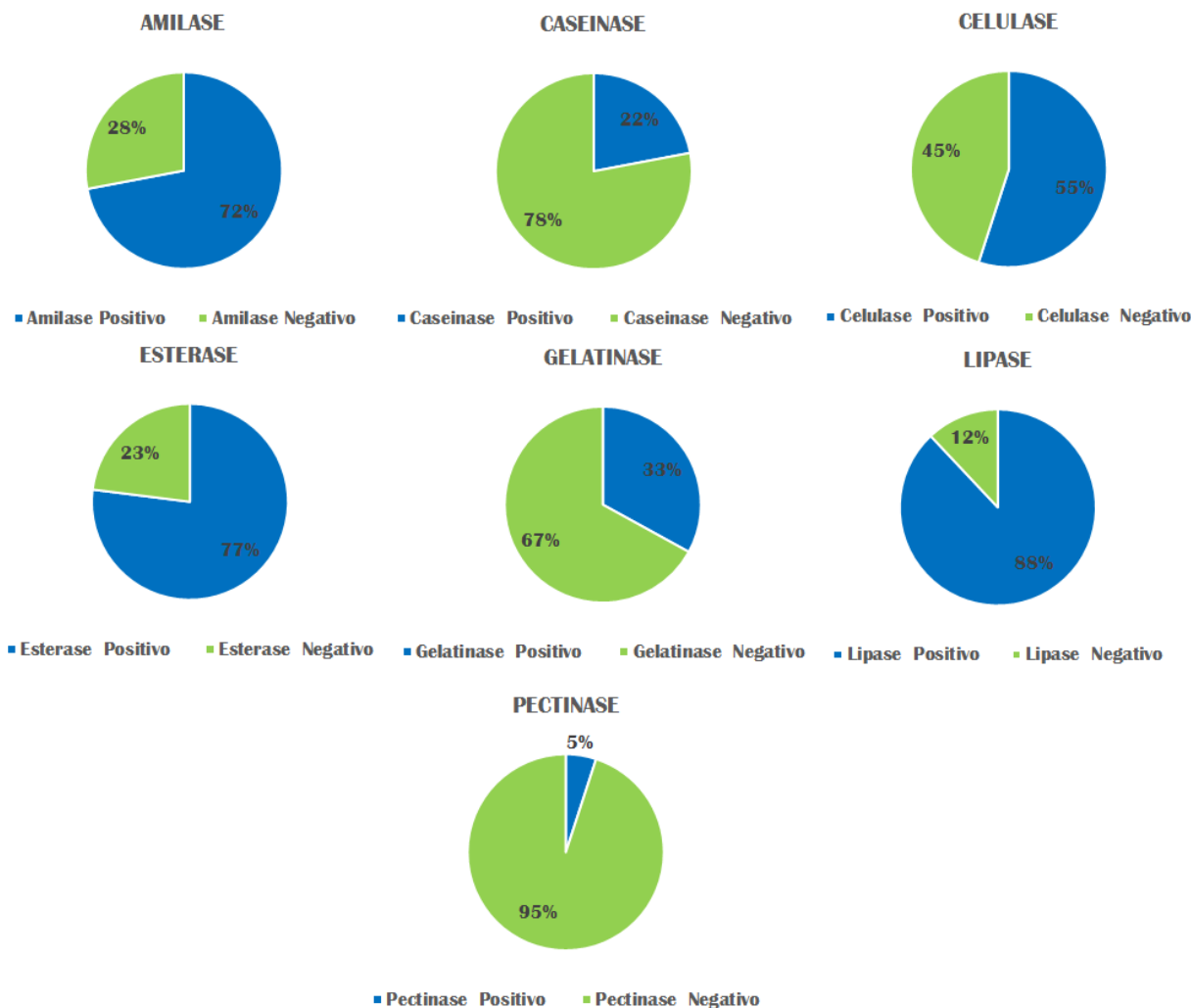


Figura 1 – Frequência de observação da atividade enzimática em actinobactérias endofíticas obtidas em plantas nativas do cerrado brasileiro.

Tabela 1 – Numero de actinobactérias com expressão positiva para amilase, caseinase, celulase, esterase, gelatinase, lipase e pectinase em função do tempo de cultivo.

Enzima	Número de actinobactérias com expressão confirmada		
	Aos 4 dias de cultivo	Aos 11 dias de cultivo	Aos 18 dias de cultivo
Amilase	13	8	10
Caseinase	3	2	4
Celulase	10	5	4
Esterase	2	14	12
Gelatinase	5	4	6
Lipase	5	11	16
Pectinase	1	1	1