

# PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A CAULES DE MANDIOCA

Daniela Schiavon Ieno<sup>1</sup>, Andreia de Araújo Morandim-Giannetti<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Departamento de Engenharia Química, Centro Universitário FEI  
danielasieno@hotmail.com preamorandim@fei.edu.br

**Resumo:** Inicialmente foram obtidas e purificadas as linhagens de fungos endofíticos associadas a caules de mandioca. Após a obtenção das linhagens (17 no total), as mesmas foram cultivadas em meio de cultura BDA e submetidas a extração enzimática para avaliação da presença de proteases, sendo identificada a maior concentração em 10 fungos. Os fungos selecionados foram submetidos ao crescimento em meio específico para produção de celulases visando o aumento da concentração dessa enzima.

## 1. Introdução

Os fungos endofíticos são um grupo diversificado de ascomycetos encontrados em tecidos vegetais, internos e subcuticulares, de ocorrência assintomática encontrados em ambientes tanto terrestres, como marinhos [1].

Devido a sua grande diversidade, os mesmos têm se tornado ótimas fontes de componentes bioativos e de enzimas de uso industrial, como o foco desse estudo, que visa a obtenção de celulases a partir de fungos endofíticos associados a caules de mandioca [2,3].

As celulases, formadas por endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases, pertencem às oxidasas e são responsáveis por quebrar ligações glicosídicas presentes em carboidratos. Elas representam cerca de 20% do mercado de enzimas atuais e, dessa forma, têm tido lugar de destaque nas pesquisas atuais que visam novas fontes da mesma [4,5].

Assim, justifica-se o reaproveitamento de resíduos provenientes de plantações de mandioca para a obtenção de fungos produtores de celulases e aumento do potencial dessa espécie, muito cultivada no Brasil e consumida pela população, principalmente na obtenção de enzimas de potencial industrial como as celulases visando à futura aplicação em processos biotecnológicos.

## 2. Materiais e métodos

Inicialmente foram coletados os caules de mandioca, esterilizados, cortados assepticamente e colocados 5 cortes de aproximadamente 1,5 cm em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) autoclavado previamente por 15 min. As placas foram cultivadas em câmara climatizada a 25°C até o crescimento dos fungos (7 dias) e, posteriormente, foram repicados em meio BDA até a obtenção das linhagens puras, sendo estas submetidas ao processo de cultivo para obtenção dos fungos em larga escala.

Todos os fungos foram submetidos ao processo de extração enzimática utilizando-se tampão acetato pH 4,8 e PVPP e, os extratos enzimáticos analisados por espectrofotometria UV para verificação da presença de

proteases. A determinação foi feita pela reação entre a azocaseína e os extratos enzimáticos, sendo as absorbâncias determinadas a 430 nm. Também foi determinada a concentração proteica utilizando-se, para isso, o método de Bradford, sendo as absorbâncias determinadas a 595 nm.

Com relação a identificação dos fungos, a mesma foi realizada na BPI Biotecnologia (Botucatu) através do sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no GenBank. Todos os fungos analisados apresentaram 99% de identidade com o fungo do banco de DNA.

Selecionados os fungos que mostraram maior acúmulo de proteases (10 no total), os mesmos foram colocados em solução nutriente juntamente com palha de milho, que serviu de estímulo para a produção de celulase, e submetidos a um processo de crescimento em um *shaker* a 30°C e 120 rpm por sete dias. Após esse período, os extratos enzimáticos foram filtrados, centrifugados a 4°C e 4000 rpm e armazenados para realização da posterior quantificação de celulases.

## 3. Resultados e Discussões

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, inicialmente foram obtidos, purificados e identificados os fungos endofíticos associados aos caules de mandioca (Figura 1, Tabela 1). Para isso, foi realizado, inicialmente, o crescimento em meio BDA e, após essa etapa, 3 repiques utilizando-se o mesmo meio.



Figura 1 – Exemplo de fungos obtidos após purificação

Todos os fungos isolados foram submetidos a extração enzimática e, posteriormente, a quantificação de proteases (Figura 2) utilizando-se a metodologia da azocaseína e, dosagem proteica (Figura 3) utilizando-se o método de Bradford, sendo identificada a maior

produção por dez dos fungos isolados (CA1, CA2, CA3, CA5, CA7, CA9, CA12, CA13, CA15 E, CA17) (Figura 4).

Salienta-se que, durante a seleção dos fungos foi levada em consideração a atividade por mg de proteína, uma vez que, embora alguns fungos tenham demonstrado baixa atividade por mL de extrato, ao analisar-se a concentração proteica, verificou-se uma baixa concentração de proteína. Dessa forma, a atividade se mostrou elevada ao determinar-se a atividade por mg de proteína presente no extrato.

Tabela I – Identificação dos fungos isolados.

Fungo	Caules	Fungo	Caules
<i>Microdochium lycopodium</i>	CA1	<i>Vouchered mycorrhizae</i>	CA10
<i>Colletotrichum sp</i>	CA2	<i>Phanerochaete australis</i>	CA11
<i>Cladosporium sp.</i>	CA3	<i>Diaporthe caatingaensis</i>	CA12
<i>Colletotrichum brevisporum</i>	CA4	<i>Stenocarpella maydis</i>	CA13
<i>Alternaria sp</i>	CA5	<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	CA14
<i>Phyllosticta elongata</i>	CA6	<i>Sordariomycetes sp</i>	CA15
<i>Phomopsis sp</i>	CA7	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CA16
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	CA8	<i>Phanerochaetaceae sp.</i>	CA17
<i>Diaporthe endophytica</i>	CA9		

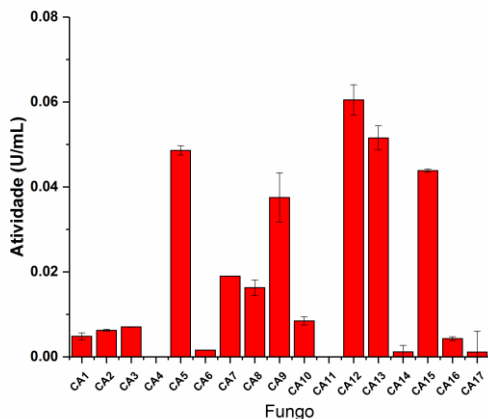


Figura 2 – Atividade de protease

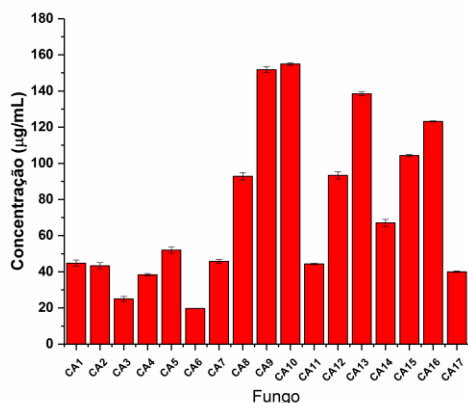


Figura 3 – Dosagem proteica para cada fungo estudado

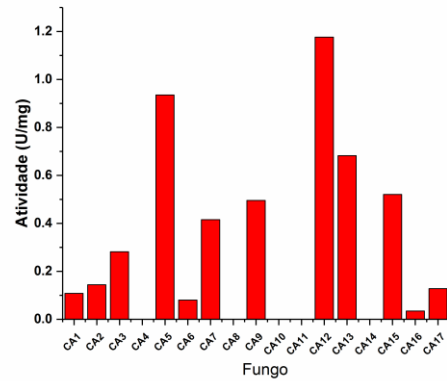


Figura 4 – Avaliação da produção de proteases por miligrama de proteínas

Levando-se em consideração os resultados obtidos, os fungos que mostraram maior produção de proteases foram submetidos a crescimento em um meio específico para produção de celulases e, durante a próxima etapa, será realizada a quantificação de celulases em todos os 10 extratos obtidos.

Os que mostrarem maior acúmulo de celulases serão selecionados e, a partir desses dados, será realizada a pré purificação dessa classe de enzimas através da realização de precipitação salina com sulfato de amônio utilizando-se concentrações de 25%, 50% e 75%.

#### 4. Conclusões

Levando-se em consideração os resultados obtidos até o momento, verifica-se uma maior produção de proteases por dez dos dezessete fungos obtidos a partir dos caules de mandioca (CA1, CA2, CA3, CA5, CA7, CA9, CA12, CA13, CA15 E, CA17).

Quantificações específicas para celulases serão realizadas para verificação dos melhores fungos a serem utilizados em trabalhos futuros de obtenção dessa classe de enzimas a partir de fungos endofíticos.

#### 5. Referências

- [1] S.C. Vries et al. Biomass and Bioenergy, **34** (2010) 588–601.
- [2] P.S. Rajesh et al. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, **2** (2013) 120–124.
- [3] N. P. Marques et al. Industrial Crops and Products, **122** (2018) 66–75
- [4] N. Srivastava et al. Renewable and Sustainable Energy Reviews, **82** (2018) 2379–2386
- [5] N. Sankarraaj et al. Carbohydrate Polymers, **191** (2018) 95–102

#### Agradecimentos

Ao Centro Universitário FEI pela realização das medidas ou empréstimo de equipamentos.

<sup>1</sup> Aluno de IC do Centro Universitário FEI. Projeto com vigência de 05/2018 a 04/19.