

PRODUÇÃO DE LACTASE POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A CAULES E FOLHAS DE MANDIOCA

Thais Silva Rocha¹, Andreia de Araújo Morandim-Giannetti¹
¹ Departamento de Engenharia Química, Centro Universitário FEI
 thaisrcha@hotmail.com preamorandim@fei.edu.br

Resumo: Inicialmente, foram obtidas as linhagens puras de fungos endofíticos associados a caules e folhas de mandioca. Posteriormente, as mesmas foram cultivadas em meio de cultura BDA e, em seguida, submetidas a extração enzimática para avaliação da presença de proteases, verificando-se uma maior concentração em 10 dos 21 fungos avaliados. Após essa etapa, os fungos selecionados foram submetidos ao crescimento em meio específico para produção de lactase, sendo averiguados os fungos mais promissores.

crescimento em meio BDA obtendo-se, assim, os fungos purificados.

1. Introdução

Com aumento do consumo de laticínios dentre a população mundial, evidenciou-se problemas relacionados a sua ingestão, bem como, a intolerância a lactose [1]. Assim, ocorreu um crescimento em pesquisas relacionadas a produção da enzima lactase, que auxilia no processamento da lactose no intestino (Figura 1).

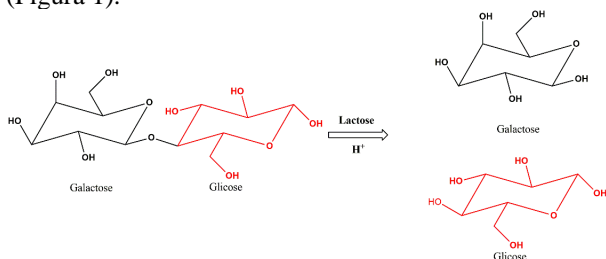


Figura 1 – Quebra da lactose pela enzima lactase.

Dessa forma, ocorreu um aumento no número de trabalhos relacionados a busca por novas fontes promissoras para a produção da enzima lactase, sendo os fungos endofíticos uma excelente alternativa, visto que são organismos que se desenvolvem rapidamente e de fácil obtenção.

Neste contexto, verificou-se a possibilidade de se obter a enzima lactase a partir de fungos endofíticos associados a diversas partes de espécies vegetais como, por exemplo, a partir de folhas e de caules da mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz), foco do presente trabalho, que visa o isolamento de fungos endofíticos a partir da mandioca e, verificação da produção da enzima lactase.

2. Materiais e métodos

Inicialmente, foram cultivados caules e folhas de mandioca em meio batata dextrose ágar (BDA), no qual foram adicionados 30 µg/mL de sulfato de gentamicina, para evitar o crescimento de bactérias (Figura 1). As placas foram mantidas a 25°C em uma câmara climatizada por cerca de uma semana, ou até que cada fungo atingisse o diâmetro de 5 cm. Posteriormente, os mesmos foram repicados e, novamente submetidos ao



Figura 2 – Caule em meio BDA.

Após essa etapa, todos os fungos foram enviados para identificação na BPI Biotecnologia (Botucatu - SP), sendo a mesma realizada pelo Sequenciamento automático por eletroforese capilar e alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no GenBank.

Realizada a identificação dos materiais, foram obtidos os extratos enzimáticos a partir dos fungos isolados (21 no total) e, avaliou-se a produção de proteases, visando a seleção dos fungos mais promissores para continuidade do trabalho e, obtenção da enzima lactase.

Também foi realizada a determinação da concentração proteica pelo método de Bradford em cada um dos extratos.

Em seguida, os fungos que apresentaram maior acúmulo de proteases foram submetidos ao crescimento em um meio específico para a produção de lactase, contendo 2% de palha, 0,4% de peptona, 0,4% de extrato de levedura, 0,2% de fosfato de levedura, 0,8 de fosfato de sódio e 0,25% de sulfato de magnésio [1]. Posteriormente, será avaliada a produção da enzima nos extratos mais promissores sendo, o mesmo, submetido a uma etapa de pré purificação através da realização de precipitação salina utilizando-se sulfato de amônio.

3. Resultados e discussões

Durante o desenvolvimento do presente projeto foram obtidos 21 fungos associados a caules e folhas de mandioca (Figura 3, Tabela 1).



Figura 3 – Exemplificação de um fungo purificado.

Tabela 1 – Identificação dos fungos isolados

Identificação	Fungo	Identificação	Fungo
<i>Microdochium</i>		<i>Diaporthe</i>	
<i>lycopodium</i>	CA1	<i>caatingaensis</i>	CA12
<i>Colletotrichum</i>	CA2	<i>Stenocarpella</i>	CA13
		<i>maydis</i>	
<i>Cladosporium</i>	CA3	<i>Annulohyphoxylon</i>	CA14
<i>sp.</i>		<i>stygium</i>	
<i>Colletotrichum</i>	CA4	<i>Sordariomycetes</i>	CA15
<i>brevisporum</i>		<i>sp.</i>	
<i>Alternaria</i>	CA5	<i>Colletotrichum</i>	CA16
<i>Phyllosticta</i>	CA6	<i>gloeosporioides</i>	CA17
<i>elongata</i>		<i>Phanerochaetaceae</i>	
<i>Phomopsis</i>	CA7	<i>sp.</i>	FO1
<i>Diaporthe</i>		<i>Cladosporium</i>	
<i>phaseolorum</i>	CA8	<i>xanthochromaticum</i>	FO2
<i>Diaporthe</i>	CA9	<i>Xylaria</i>	FO3
<i>endophytica</i>		<i>sp.</i>	
<i>Vouchered</i>	CA10	<i>Phaeosphaeria</i>	FO4
<i>mycorrhizae</i>		<i>podocarpi</i>	
<i>Phanerochaete</i>	CA11	<i>Peniophora</i>	
<i>australis</i>		<i>sp.</i>	

Dos fungos isolados, 10 apresentaram elevada atividade de proteases, podendo ser visualizada na Figura 4, as espécies mais promissoras para a continuidade do trabalho, levando-se em consideração a atividade por mL de extrato.

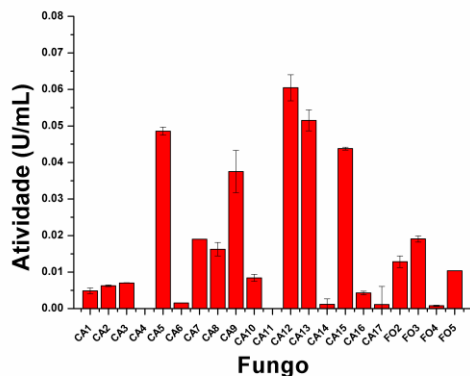


Figura 4 – Avaliação da atividade de protease.

Também foi realizado um estudo para determinação do conteúdo proteico de cada extrato (Figura 5) visando a determinação da atividade de protease por mg de proteína (Figura 6) e, assim, a realização da seleção dos fungos mais promissores na produção da enzima de interesse, a lactase.

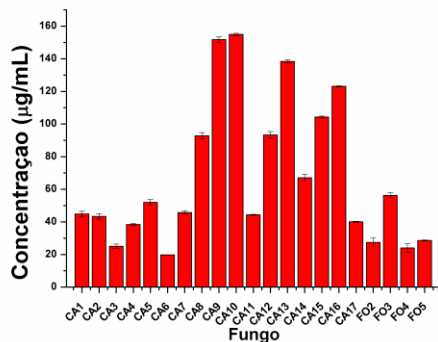


Figura 5 – Concentração proteica nos extratos.

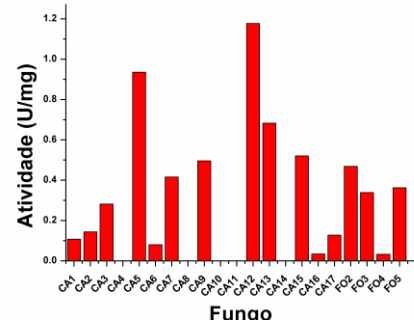


Figura 6 – Atividade por miligrama de proteína.

Analisados os resultados, confirmou-se o maior acúmulo de proteases nos fungos CA5, CA7, CA8, CA9, CA12, CA13, CA15, F02, FO3 e F05. Também pôde ser verificado, através da análise de concentração e atividade por mg de proteína, uma elevada atividade enzimática, levando-se em consideração que, durante essa etapa do projeto, não foi realizada nenhuma metodologia de purificação dos extratos enzimáticos.

Concluída a análise dos fungos que apresentaram elevada atividade quanto a presença de proteases, os fungos citados foram colocados em meio específico para produção de lactase, a fim de que seja definido o melhor meio de produção da mesma.

4. Conclusões

Verificou-se a existência de 21 linhagens de fungos endofíticos associados a folhas e caules da mandioca, dos quais mais da metade apresentaram alto índice de atividade de proteases. Desse modo, até o presente momento, a realização do projeto tem sido promissora.

Vale ressaltar que os métodos aplicados têm se demonstrado eficientes para a obtenção da lactase, pois ao serem adicionados os fungos em meio específico, para produção dessa enzima, verificou-se por meio análises preliminares a quebra da lactose, conforme desejado. Análises quantitativas serão realizadas posteriormente, para confirmação dos resultados observados.

5. Referências

- [1] A. A. Mortoza. Curso de Pós-graduação em Ciências, UNB, 2012. p. 4-7.
- [2] M. Rocha, Conceitos Fundamentais, Spring-Verlag, 1999.

Agradecimentos

Ao Centro Universitário FEI e à professora Andreia de Araújo Morandim-Giannetti pela dedicação e orientação.

¹ Aluno de IC do Centro Universitário FEI. Projeto com vigência de 03/2018 a 02/19.

² Professora orientadora.