

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENDOGLICOLÍTICA DOS FUNGOS *FUSARIUM* SP. E *MUCOR* SP. ISOLADOS A PARTIR DA CASCA DO CAFÉ**

**Leidilene Cristina de Andrade<sup>1</sup> e Boutros Sarrouh<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João Del Rei – Campus Alto Paraopeba  
Caixa Postal 131 Ouro Branco – MG - E-mail:leidileneandrade@hotmail.com  
Depto. De Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos

#### **RESUMO**

*Os processos enzimáticos têm conquistado cada vez mais aceitação na área da indústria, pois conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. As celulasas são um complexo de enzimas que atuam em sinergia para a hidrólise de substratos celulósicos, gerando açúcares fermentescíveis. Neste trabalho, quantificou-se a atividade enzimática da enzima Endoglucanase obtida a partir dos fungos *Fusarium* sp. e *Mucor* sp. isolados a partir da casca do café. Ambos os fungos apresentaram uma atividade endoglicolítica máxima de  $0,386 \pm 0,011$  U/mL e  $0,5494 \pm 0,0003$  U/mL, respectivamente, após o décimo dia de cultivo em meio líquido enriquecido com CMC. Sendo assim, conclui-se que os fungos em estudo apresentam um potencial promissor para a produção da enzima endoglucanase, utilizada em diferentes processos biotecnológicos indústrias, especialmente na produção de etanol de segunda geração.*

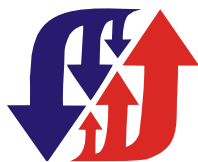
Palavras-chave: Celulasas, Endoglucanase, *Fusarium* sp., *Mucor* sp., Atividade enzimática

#### **INTRODUÇÃO**

As enzimas microbianas têm despertado grande interesse, por serem utilizadas em inúmeros processos nas mais diversas áreas tecnológicas. Este interesse se deve ao fato de as enzimas conferir vantagens operacionais e econômicas em relação aos processos químicos convencionais. Entre estas enzimas encontra-se as celulasas devido as suas múltiplas aplicações em diversos segmentos industriais.

As celulasas atuam na fase de hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, liberando glicose a partir da celulose presente na mesma, visando a produção de etanol de segunda geração (ALMEIDA, 2012). Assim para se obter açúcares fermentescíveis é imprescindível a atuação sinérgica de um complexo de enzimas composto por endoglucanases (E.C. 3.2.1.4); exoglucanases (E.C. 3.2.1.91) e  $\beta$ -glucanases (E.C. 3.2.1.21) (ARANTES; SADDLER, 2010).

Contudo o maior problema da aplicação de enzimas em processos industriais é o alto valor da sua produção. Assim, diversos estudos têm sido realizados e pesquisas para avaliar novos fungos produtores de enzimas celolulíticas, melhorar as condições de cultivo, realizar



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

bioprospecção de novos microrganismos que integram a biodiversidade brasileira, visando a produção de enzimas de interesse industrial a um baixo custo (BRITO, 2015).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo a avaliação da atividade da enzima endoglucanase produzida por fungos do gênero *Fusarium* e *Mucor*, isolados a partir da casca de café.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Produção de extrato enzimático por fermentação submersa

Para a inoculação em meio líquido foram retirados, com o auxílio de uma espátula, 4 discos de cada placa de petri contendo os fungos *Fusarium* sp. e *Mucor* sp. Posteriormente, foram inoculados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido mineral e CMC (carboximetilcelulose) 2% (p/v). O meio mineral foi composto de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,7%,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,4%,  $\text{MgSO}_4$  0,02%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1% e extrato de levedura 0,06% (SINGH *et al.*, 2009), o qual foi previamente autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Os frascos foram colocados em um *shaker* sob temperatura de 28°C e rotação de 180 rpm. As amostras foram coletadas, com o auxílio de uma micropipeta, em intervalos de aproximadamente 24 horas durante 12 dias. As mesmas foram transferidas para microtubos tipo *Eppendorf*® e centrifugadas por 15 minutos a 10.000 xg. Os extratos enzimáticos obtidos foram armazenados no freezer a 4°C.

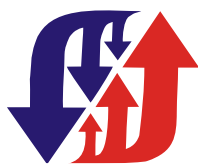
#### Determinação da atividade de Endoglucanase

A atividade de Endoglucanase foi determinada com base na capacidade de degradação de carboximetilcelulose (CMC), sendo que o açúcar redutor liberado foi determinado pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por Ghose (1987).

Foram retirados 250 µL dos extratos enzimáticos brutos dos dois fungos e colocados em tubos de ensaios contendo 250 µL de carboximetilcelulose 2% (p/v). Para o controle, colocou-se em substituição dos extratos enzimáticos, 250 µL do tampão acetato 0,1M pH 4,8. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 750 µL da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) que posteriormente foram direcionados novamente para banho fervente a 100°C por 5 minutos e em banho de gelo por mais 5 minutos. Finalmente os tubos foram completados com 3,75 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro, Biospectro SP 22®, a 540 nm.

Para a construção da curva padrão, utilizou-se soluções de glicose com concentrações variando entre 0,1 a 1,0 g/L. Nos tubos de ensaios foram adicionados 750 µL do reagente de DNS a 0,5 mL dessas soluções com concentrações diferentes de glicose, em seguida esses tubos foram levados à fervura por 5 minutos e completados com água destilada para um volume de 5 mL (GHOSE, 1987). A leitura foi realizada a 540 nm.

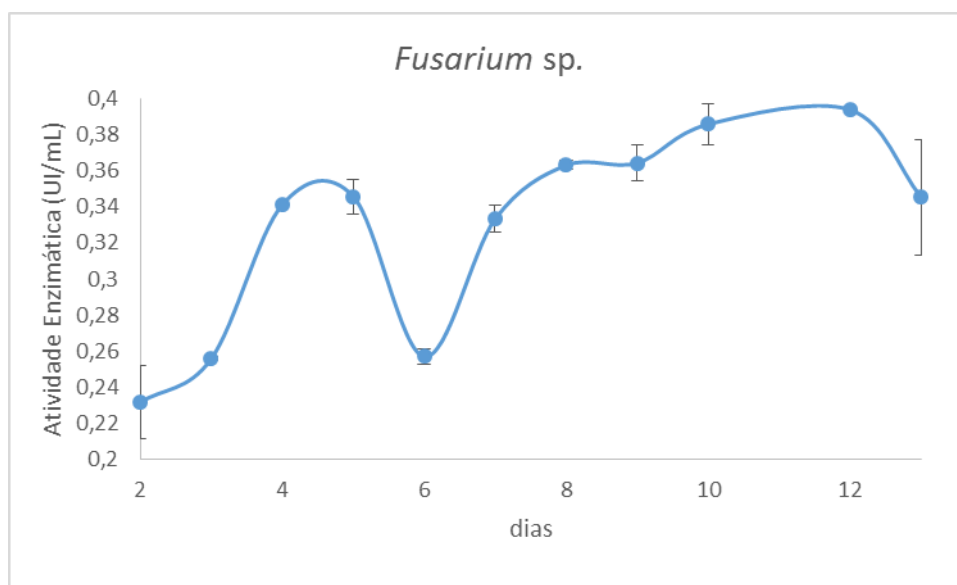
Os valores de absorbância foram convertidos em quantidades equivalentes de glicose a partir de curva padrão previamente construída; considerando que 1 Unidade Internacional (IU) equivale a 1 µmol de glicose liberada por minuto (BASSO *et al.*, 2010). Todo o experimento foi realizado em duplicata.



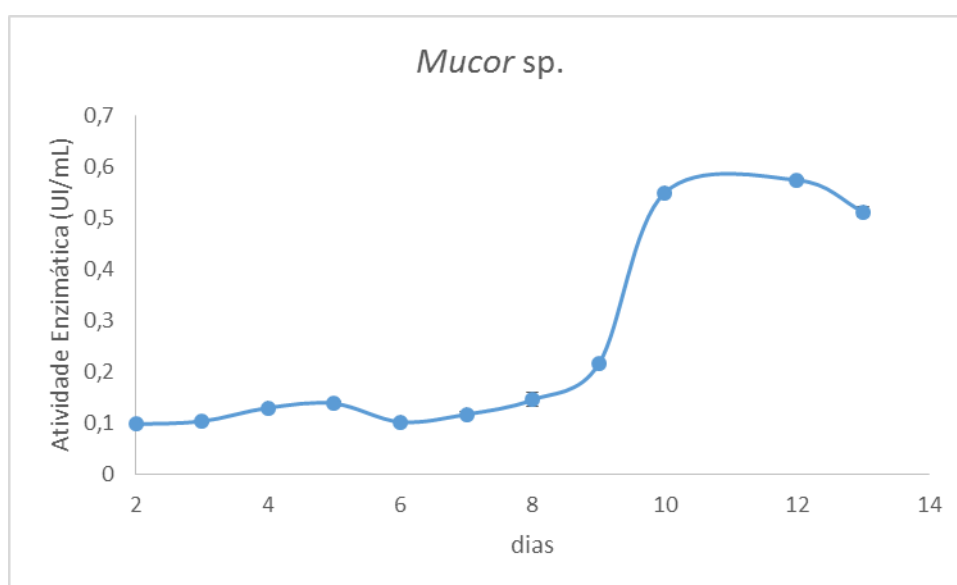
## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

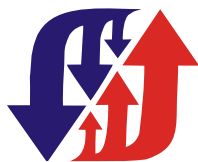
O método da fermentação submersa foi utilizado para os estudos cinéticos, tendo como parâmetros o crescimento celular e a quantidade de enzima produzida pelos microrganismos. Iniciou-se o experimento determinando a atividade da enzima Endoglucanase dos fungos *Fusarium* sp. e *Mucor* sp. presentes no meio de crescimento. No perfil da curva de crescimento dos fungos, Figuras 1 e 2, observa-se uma rápida adaptação dos mesmos no meio CMC utilizado.



**Figura 1** – Produção de Endoglucanase por *Fusarium* sp. em função do tempo de cultivo.



**Figura 2** – Produção de Endoglucanase por *Mucor* sp. em função do tempo de cultivo.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Segundo as Figuras 1 e 2 observou-se que, a produção de Endoglucanase do fungo *Fusarium* sp. foi máxima após 10 dias de cultivo, sendo que a sua atividade enzimática foi de  $0,386 \pm 0,011$  U/mL. Por outro lado, a máxima atividade de Endoglucanase produzida pelo fungo *Mucor* sp. foi alcançada após 10 dias do cultivo, apresentando um valor de  $0,5494 \pm 0,0003$  U/mL. A partir dos resultados obtidos observou-se que, o fungo *Mucor* sp. obteve uma atividade endoglicolítica 42% maior que a atividade máxima observada no caso do fungo *Fusarium* sp.

### CONCLUSÕES

Conclui-se que os fungos *Fusarium* sp. e *Mucor* sp., isolados de uma fonte lignocelulósica, a casca de café, apresentaram uma atividade endoglicolítica promissora após 10 dias de cultivo. Futuros trabalhos serão necessários para a caracterização da enzima produzida visando alcançar condições ótimas de atividade.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de São João Del Rei pela oportunidade em realizar este trabalho e a FAPMG e CNPq pelo apoio financeiro.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, M.C.O. Indução de celulasas e xilanase por *Trichoderma reesei* e *Penicillium variabile* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos. 2012. 145f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- Arantes, V. Saddler, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, v.3, n.4, p.1-11, 2010.
- Basso PT., Gallo R.C., Basso C.L., Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-acucar e madeira em decomposição. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.45, n.11, p.1282-1289, nov. 2010.
- Brito, A. R. Otimização da produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido sobre a casca de arroz e a casca de amendoim. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). - Itapetinga: UESB, 2015.
- Ghose, T.K. Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 59, p. 257-268. Oxford, 1987.
- Singh, R.; Varma, A.J.; Laxman, R.S.; Rao, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: comparison with commercial cellulose. *Bioresource Technology*, v.100, p.6679-6681, 2009.