

Estudo da atividade enzimática do fungo endofítico *Diaporthe helianthi* utilizando diferentes substratos agroindustriais

Study of the enzymatic activity of the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* using different agro-industrial substrates

Vânia Specian^{1*}, Alessandra Tenório Costa², João Alencar Pamphile³

¹Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Maringá, PR, Brasil

²Universidade Estadual do Paraná – UNESPAR, Campus de Paranaguá, PR, Brasil

³Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Maringá, Brasil

*Autor correspondente. E-mail: specian82@hotmail.com

Recebido: 04/02/2021; Aceito: 24/03/2021

RESUMO

A utilização de enzimas microbianas desperta grande interesse em diversos setores industriais, sendo os micro-organismos endofíticos, em especial os fungos, uma fonte promissora para a obtenção dessas enzimas. Na produção de enzimas microbianas a fermentação submersa é um processo bastante utilizado, além disso, fontes alternativas de substratos, tais como resíduos agroindustriais, podem ser empregados. O estudo teve como objetivos detectar a produção enzimática pelo endofítico *Diaporthe helianthi* e estimar qualitativamente a produção de proteases e celulasas utilizando diferentes substratos, por meio de fermentação submersa. Os resultados obtidos pelo teste em *cup plate* mostram que o micro-organismo avaliado apresenta potencial enzimático para a produção de proteases e celulasas. A adição de resíduos, tais como, farelo de trigo, ou a junção de farelo de trigo e farinha de soja ao meio de cultura, propiciaram um resultado próximo ou superior ao valor encontrado para os meios frequentemente utilizados. A atividade de celulase também foi confirmada por espectrofotometria.

Palavras-chave: micro-organismo, enzimas, bioprospecção.

ABSTRACT

The use microbial enzymes to arouse great interest in several industrial sectors, being the endophytic microorganisms, special fungus, a promising source for obtaining these enzymes. In microbial enzymes productin submerged fermentation is great use, moreover, alternative sources of substrates, such as waste products, can be used. The study aimed to detect enzyme production by the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* and qualitatively estimate the production of proteases and cellulases using different substrates, by means of submerged fermentation. The results obtained by the test in cup plate demonstrate that microorganisms assess has enzymatic potential for the production of proteases and cellulases. Adding waste, such as wheat bran, or the combination of wheat bran

and soy flour to the culture medium, provided a result close or superior to the value found for frequently used media. Cellulase activity was also confirmed by spectrophotometry.

Keywords: *microorganism, enzymes, bioprospection*

INTRODUÇÃO

Os fungos são micro-organismos de grande importância na produção enzimática, em virtude de que, enzimas microbianas apresentam uma rentabilidade elevada, baixos custos de produção, estabilidade em várias condições extremas e susceptibilidade genética para manipulação (NIYONZIMA, 2015). As enzimas secretadas pelos micro-organismos despertam interesse em diferentes áreas industriais dentre elas: processamento de alimentos, indústria de tecidos, de couro, fabricação de detergentes, produtos farmacêuticos, terapia médica e na área de biologia molecular (CORRÊA et al., 2014; SRILAKSHMI et al., 2015; DABA et al., 2018; HYDE et al., 2019).

Micro-organismos isolados de diferentes locais, mesmo pertencendo à mesma espécie e gênero, podem produzir níveis variados de enzimas com propriedades distintas (HYDE et al., 2019). Inúmeros estudos já revelaram que fungos endofíticos podem produzir os mais diversos tipos de enzimas, tais como: amilases, lipases, proteases, pectinases e celulasas (FELBER et al., 2019; RIBEIRO et al., 2018; MONTEIRO et al., 2020).

Fungos endofíticos são uma fonte promissora para a obtenção de enzimas hidrolíticas extracelulares. Os endofíticos são micro-organismos que se desenvolvem intra ou intercelularmente por todos os tecidos da planta (FELBER et al., 2016; FELBER et al., 2019), sem provocar danos à sua hospedeira (FOUDA et al., 2015). Além disso, eles desempenham um importante papel protegendo sua hospedeira contra insetos e micro-organismos fitopatogênicos (MONTEIRO et al., 2020).

A produção de enzimas por micro-organismos, utilizando processos fermentativos, constitui um dos métodos mais antigos e extremamente empregados. Para tanto, há dois processos fermentativos mais utilizados, a fermentação em estado sólido (FES) que consiste no crescimento e na formação do produto em partículas sólidas na ausência (ou quase ausência) de água, contudo, o substrato contém a umidade necessária ao metabolismo microbiano, e a fermentação submersa (FS), onde o crescimento microbiano geralmente ocorre em substrato dissolvido em excesso de água livre, ou suspenso na fase líquida (NIYONZIMA, 2015; SANTOS; ORLANDELLI, 2019). A FS é um processo grandemente empregado na produção de enzimas (CAVALCANTI et al., 2017; MORE et al., 2018; PACHAURI et al., 2018) devido a facilidade dos micro-organismos crescerem em condições controladas de pH e temperatura, bem como, possibilitar a secreção extracelular de enzimas industriais em quantidades importantes no meio de produção (NIYONZIMA, 2015).

Uma forma de tornar o processo fermentativo mais econômico ocorre por meio da utilização de resíduos agroindustriais como substrato para a produção enzimática pelos micro-organismos (FELBER et al., 2019; NIYONZIMA, 2015). A aplicação de resíduos é uma forma de utilizar substratos alternativos contribuindo também para a solução de problemas, como diminuição da poluição ambiental provocada por esses subprodutos, permitindo assim, uma destinação desses resíduos evitando seu acúmulo na natureza, e reduzindo gastos no processo de produção enzimática (SANTOS et al., 2018).

Subprodutos como bagaço de cana, espiga de milho, farelo de arroz, casca de abacaxi, farelo de trigo, casca de amendoim e serragem vêm sendo pesquisados como substrato para a produção enzimática (ORLANDELLI et al., 2017; FERREIRA et al., 2018; RAVINDRAN et al., 2018; FELBER et al., 2019). Por isso, faz-se necessário cada vez mais o estudo de micro-organismos que produzam enzimas específicas frente a determinado substrato e diferentes processos de produção.

O estudo teve como objetivos detectar a produção enzimática pelo endofítico *Diaphorte helianthi* e estimar qualitativamente a produção de proteases e celulasas utilizando diferentes substratos, por meio de fermentação submersa.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo

O fungo endofítico *D. helianthi* (AJ312356.1), utilizado na realização deste trabalho foi isolado da planta *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae), por Bernardi-Wenzel et al., (2010) e faz parte do estoque do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (BIOMIC) do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular (DBC) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá – PR - Brasil.

Condições de cultivo para obtenção do extrato enzimático

Para o ensaio enzimático, o micro-organismo foi previamente crescido em BDA (Batata, Dextrose, Ágar) (SMITH; ONIONS, 1983), por 7 dias a 28 °C. Três discos de micélio com 6 mm de diâmetro do fungo endofítico foram inoculados em meio líquido Solução de Manachini (MANACHINI et al., 1987), (2 g.L⁻¹ KH₂PO₄; 1 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,1 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,9 g.L⁻¹ NaHPO₄.2H₂O; 1 g.L⁻¹ extrato de levedura; 1000 mL de água destilada), adicionado de substrato indutor (0,5%), e pH ajustado para as enzimas: protease (gelatina, pH 6,9); celulase (carboximetilcelulase ou CMC Fluka, pH 5,0); amilase (amido de milho Maizena®, pH 6,0); e pectinase (pectina cítrica Vetec, pH 2,5). Erlenmeyers de 150 mL, previamente esterilizados em autoclave, contendo 50 mL de meio foram incubados a 28 °C, durante 120 horas a 150 rpm. O experimento foi realizado em triplicata.

Ensaio qualitativo

Após o período de cultivo, as amostras foram transferidas para tubo Falcon de 50 mL e centrifugadas a 3500 rpm por 20 min obtendo-se o extrato enzimático. Alíquotas de 50 µL desse extrato foram colocadas em placas de Petri em *cup plate*, com cinco perfurações de 6 mm de diâmetro feitas na superfície dos meios contendo: ágar-gelatina-leite (18 g.L⁻¹ ágar; solução de gelatina 10%, solução de leite desnatado 10%, 0,1 M tampão citrato fosfato, pH 5,0); ágar-CMC (ágar 18 g.L⁻¹, CMC 10 g.L⁻¹, Na + 0,1 M tampão de acetato, pH 5,0); ágar-amido (18 g.L⁻¹ ágar; 10 g.L⁻¹ amido; 0,1 M tampão citrato-fosfato, pH 5,0) e ágar-pectina (18 g.L⁻¹ ágar; 10 g.L⁻¹ pectina; 0,1 M tampão acetato de sódio, pH 5,0). Como controle positivo foram utilizadas as enzimas comercialmente disponíveis (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): protease de *Aspergillus oryzae*, celulase de *Aspergillus* sp, α-amilase pancreática suína e pectinase de *Aspergillus niger*. O controle negativo consistiu em meio líquido incubado sem inoculação dos fungos.

As placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas e, posteriormente, coradas com solução de ácido acético 5% (protease); vermelho de Congo 0.1% (celulase); solução de iodo 1N (amilase); e solução de ácido clorídrico 5N (pectinase). A produção enzimática foi observada pela formação de halos decorrentes da hidrólise enzimática, que foram aferidos com régua milimétrica. O ensaio foi realizado em triplicata. Os valores médios obtidos foram comparados utilizando o teste de Tukey ($p < 0.05$), no programa estatístico Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2011).

Avaliação da atividade enzimática da protease e celulase com substratos alternativos

Para avaliação da atividade das enzimas protease e celulase com substratos alternativos, o micro-organismo foi previamente crescido em meio BDA por 7 dias a 28 °C. Três discos de micélio com 6 mm de diâmetro do fungo endofítico foram inoculados em meio líquido Solução de Manachini (MANACHINI et al., 1987), adicionado das seguintes fontes de carbono (0,5%): farelo de trigo, farelo de arroz, farinha de soja, além da junção entre eles da seguinte forma: farelo de trigo + farelo de arroz; farelo de trigo + farinha de soja; farelo de arroz + farinha de soja; farelo de trigo + farelo de arroz + farinha de soja. O pH foi ajustado de acordo com cada enzima, sendo para protease (pH 6,9) e celulase (pH 5,0). Erlenmeyers de 150 mL, previamente esterilizados em autoclave, contendo 50 mL dos meios foram incubados a 28 °C, durante 120 horas a 150 rpm.

A detecção da atividade enzimática teve seu ensaio realizado em triplicata, nas mesmas condições utilizadas no ensaio qualitativo.

Determinação da atividade de endoglucanase

A determinação da atividade de endoglucanase foi realizada segundo Ghose (1987) adaptado, por meio da análise de CMC. Uma alíquota de 0,5 mL do extrato bruto enzimático foi pipetada em tubos de ensaio, contendo 0,5 mL de solução de CMC (1% p/v) em tampão citrato de sódio (50 mM; pH 4,8), após um período de 30 e 60 minutos de incubação para a ocorrência da reação, a esses tubos foram adicionados 1 mL de DNS (3,5-dinitrosalicílico). Para o preparo da solução de DNS utilizou-se 4,0g de hidróxido de sódio dissolvidos em 50 mL de água destilada, ao qual foram adicionados 2,5 g do reagente DNS e homogeneizados. Enquanto isso, 75 g de tartarato duplo de sódio e potássio foram dissolvidos em 125 mL de água destilada sob constante agitação. Em seguida essas soluções foram misturadas, sob aquecimento até sua completa diluição. Após resfriamento seu volume foi ajustado para 250 mL e armazenada em temperatura ambiente protegida da luz.

Após homogeneização, os tubos foram submetidos à fervura (100 °C) durante 5 min., em seguida resfriados, e então 3 mL de água destilada foi adicionada em cada um, sendo posteriormente homogeneizados em vórtex. A absorbância da reação foi medida no comprimento de onda de 540 nm no espectrofotômetro. Em cada ensaio foi realizado um branco de cada amostra constituído de extrato bruto enzimático, com a solução de CMC (1% p/v) e DNS misturados imediatamente, correspondendo ao tempo zero da reação. O valor da absorbância obtido do branco de cada amostra foi descontado dos valores obtidos das leituras das amostras ensaiadas. Este valor foi comparado a uma curva padrão de glicose. Cada amostra foi ensaiada em triplicata.

Uma unidade de atividade de endoglucanase foi definida como a quantidade de enzimas necessária para liberar 1µmol/min de açúcar redutor por mL sob as condições de ensaio descrita acima utilizando glicose como uma curva padrão.

RESULTADOS

O fungo endofítico *D. helianthi* produziu protease e celulase detectadas por meio da técnica de *cup plate*. A aferição dos halos de degradação formados após adição do corante ácido acético 5% para protease e vermelho

congo para celulase mostraram zonas claras indicando a ação enzimática (Tabela 1), com média de 9,33 mm e 8,33 mm, respectivamente.

A partir desse resultado o endófito foi submetido a crescimento em diferentes fontes de carbono, para se estimar qualitativamente a produção de proteases e celulases em meio suplementado a 0,5% com farelo de trigo, farelo de arroz, farinha de soja e com a junção de farelo de trigo e farelo de arroz, farelo de trigo e farinha de soja, farelo de arroz e farinha de soja, e por fim, também foi avaliada a produção enzimática com a junção dos três substratos.

Tabela 1. Atividade enzimática para protease e celulase em diferentes meios

Substratos	Halos (mm)	Halos (mm)
	Protease	Celulase
Farelo de Arroz	7,40 ^d	7,53 ^c
Farelo de Trigo	9,13 ^{bc}	7,86 ^{bc}
Farinha de Soja	8,06 ^{bcd}	8,26 ^{bc}
Trigo + Arroz	7,60 ^{cd}	8,46 ^{bc}
Arroz + Soja	6,53 ^d	7,86 ^{bc}
Trigo + Soja	8,13 ^{bcd}	8,93 ^b
Arroz+Soja+Trigo	8,20 ^{bcd}	8,73 ^{bc}
Gelatina	9,33 ^b	-
Carboximetilcelulase	-	8,33 ^{bc}
Controle	18,86 ^a	26,40 ^a
Erro padrão*	±0,34	±0,26

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

Após o crescimento do fungo em meio líquido e realização de *cup plate* as aferições resultaram na formação de halos de degradação com média variando de 6,53 mm em meio contendo farelo de arroz e farinha de soja e 9,13 mm para suplementação com farelo de trigo para protease, enquanto que para celulase as médias ficaram entre 7,53 mm no meio suplementado com farelo de arroz a 8,93 mm em meio contendo farelo de trigo e farinha de soja (Tabela 1).

Os extratos enzimáticos do fungo endofítico suplementados com os substratos ao serem avaliados quanto à produção de celulase em espectrofotômetro resultaram numa produção enzimática de 0,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. de endoglucanase quando a fonte de carbono utilizada foi o CMC, contudo quando o mesmo foi substituído por farelo de trigo e farinha de soja a produção foi de 0,14 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação em espectrofotômetro da produção enzimática de celulase

Substratos	UI $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$
Carboximetilcelulase	0,25 ^a
Trigo + Soja	0,14 ^a
Erro padrão*	$\pm 0,03$

*Médias e erro padrão obtidos a partir de ensaios realizados em triplicatas.

DISCUSSÃO

A interação planta hospedeira e fungo endofítico resulta em uma produção enzimática específica. No decorrer do processo parasitário, os fungos endofíticos agem sobre fitopatógenos pela ação de enzimas degradativas da parede celular, como proteases, quitinases e lipases (RATNAWEERA; SILVA, 2017; DINIZ et al., 2020).

A utilização de resíduos agroindustriais ricos em proteínas para o meio de produção de proteases é uma prática que resulta do aumento da produção desta enzima quando micro-organismos são estimulados a excretá-las no meio para obter carbono ou nitrogênio a partir da hidrólise de proteínas (SCHUSTER et al., 2019). As proteases representam um dos maiores grupos de enzimas industriais capazes de hidrolisar a ligação peptídica em uma molécula de proteína.

No estudo de enzimas a degradação de halo enzimático realizado em meio sólido permite um *screening* rápido e simples de diversos fungos para presença ou a ausência de enzimas específicas úteis na seleção de isolados com elevados níveis de polissacarídeos (MONTEIRO et al., 2020).

Nas condições estabelecidas para esse experimento foi possível detectar o halo de degradação enzimática produzido pelo extrato bruto do fungo *D. helianthi*, e por meio das análises estatísticas verificar diferença nas médias da atividade enzimática entre os substratos utilizados. O resíduo que apresentou percentual mais significativo para a protease foi o farelo de trigo com média bem próxima do valor encontrado para o substrato gelatina frequentemente utilizado.

Kuzhalvaymani et al., (2019) isolaram o fungo endofítico *Warcupiella spinulosa* da floresta de mangue situada em Pichavaram, TamilNadu, Índia e estudaram a produção de protease utilizando como substratos caroço de algodão, bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, farelo de arroz, farelo de trigo, e a mistura de todos os substratos com penas, além disso, ajustaram aos substratos, fontes de nitrogênio, íons metálicos e a influência de parâmetros físicos, como tempo de incubação, tamanho do inóculo, pH e temperatura, através de fermentação em estado sólido. Os resultados mostraram que as condições ótimas para a produção de um nível muito alto de protease foram verificadas no 7º dia de incubação ($10.833 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), tendo como substrato mais adequado o bagaço de cana ($10.616 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), tamanho do inóculo 3% ($13.216 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), extrato de carne bovina como fonte de nitrogênio (1%) ($10.216 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), concentração de íons metálicos como Fe_2SO_4 (0,1%) ($14.083 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), em pH 7,0 e em temperatura ambiente.

Fungos endofíticos isolados de plantas medicinais e aromáticas (hortelã e manjeriço) coletados do Horto Florestal de Mamanguape-PB, Nordeste do Brasil foram avaliados quanto suas atividades proteolíticas e amilolíticas. Neste estudo, dos 47 fungos isolados 21 apresentaram atividade proteolítica, com predominância do gênero *Colletotrichum*. O maior índice enzimático, tanto nas atividades proteolíticas como amilolíticas foi verificado na espécie *Guignardia bidwellii* (SOUZA et al., 2019).

Alberto et al., (2016) estudando fungos endofíticos isolados das plantas *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini), *Trichilia elegans* A. Juss, *Sapindus saponaria* e *Saccharum* spp. analisaram a filogenia desses isolados e avaliaram semi-quantitativamente a capacidade de produção enzimática. O resultado da análise filogenética revelou a presença de endofíticos dos gêneros *Diaporthe*, *Saccharicola*, *Bipolaris* e *Phoma* nas plantas estudadas. Quanto a avaliação das propriedades enzimáticas dos fungos isolados, 64% exibiram atividade de protease, aproximadamente 93% de celulase, 62% de amilase e 50% de pectinase. Os isolados que se destacaram quanto a produção de protease, com a formação de halos de degradação, medindo em torno de 20 mm, foram G17 de *L. divaricata*, 2-68 de *T. elegans*, e Ss52, Ss01B e Ss31 de *S. saponaria*, sendo que com exceção dos isolados Ss52 e Ss31 que não foram identificados, os demais pertencem ao gênero *Diaporthe*. Isso indica que, assim como observado em nosso estudo, fungos do gênero *Diaporthe* possuem uma excelente capacidade de produção enzimática.

Distribuído mundialmente, o gênero *Diaporthe* compreende cerca de 800 espécies, com uma grande variedade de plantas hospedeiras. Os micro-organismos deste gênero podem apresentar-se como patogênicos, saprofíticos e endofíticos (GOMES et al., 2013; SANTOS et al., 2016). Endófitos do gênero *Diaporthe* são normalmente isolados de diversas plantas, tais como *Mikania glomerata* (POLONIO et al., 2015), *Sapindus saponaria* (GARCIA et al., 2012), *Vitis labrusca* (FELBER et al., 2016), *Eichhornia azurea* (ALMEIDA et al., 2015) inclusive a partir de culturas agrícolas de grande interesse econômico (RIBEIRO et al., 2018; SANTOS et al., 2019). No estudo realizado por Rhoden et al., (2012) observou-se uma abundância de 84,3% de fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* em folhas de *Trichilia elegans*, sendo também encontrado predominante e em folhas e raízes de *Vellozia gigantean* (FERREIRA et al., 2017).

A produção de endoglucanases por micro-organismos empregando subprodutos agroindustriais como matéria prima, em especial bagaço de cana e farelo de trigo vem sendo pesquisados a tempos (SANTOS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; FERREIRA et al., 2018, SANTOS; ORLANDELLI, 2019).

No presente estudo na aferição de celulase o melhor resultado foi observado na junção dos substratos farelo de trigo e farinha de soja, resultado este, melhor do que o encontrado para o substrato CMC normalmente empregado para indução da produção de celulase. Em relação aos valores de absorbância obtidos em espectrofotômetro dos extratos produzidos pelo fungo nos meios suplementados com CMC, com farelo de trigo e farinha de soja, não confirmam os resultados encontrados no experimento em *cup plate*, visto que as médias não diferiram estatisticamente, além disso, a média encontrada para a produção de celulase no substrato contendo resíduos foi menor do que o valor descrito para o substrato contendo CMC.

Ribeiro et al., (2018) isolaram e identificaram fungos endofíticos de folhas da planta ornamental *Pachystachys lutea* e avaliaram a atividade antagonista e a produção enzimática de celulase pelos fungos endofíticos. A análise de taxonomia molecular revelou que 78% dos fungos submetidos a identificação pertencem ao gênero *Diaporthe*. Os resultados para o teste de produção de celulase mostraram diferenças significativas entre o controle e os isolados de *Diaporthe* avaliados. Os resultados revelaram que os fungos endofíticos identificados como PL01 (*Diaporthe anacardii*), PL67 (*Diaporthe* sp.) e PL03 (*Diaporthe* sp.) apresentaram halos com médias de 15,02 mm, 12,89 mm e 11,18 mm respectivamente, para o substrato CMC. No caso da análise espectrofotométrica da produção de celulase, os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas, variando de 1,06 e 1,60 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ de endoglucanase.

Endofíticos do gênero *Diaporthe* sp isolados de *Sapindus saponaria*, após o crescimento em meio líquido foram testados quanto a produção de celulase, amilase e pectinase. Os ensaios enzimáticos revelaram que as cepas SS08, SS65 e SS93 apresentaram halo de 15,53 mm para o substrato CMC e na análise espectrofotométrica a cepa SS08 produziu 1,51 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ de celulose (SANTOS et al., 2019).

Os fungos endofíticos utilizam a enzima celulase para penetrar os tecidos da planta hospedeira, bem como, para a competição com outros micro-organismos patogênicos (FAN et al., 2016; SUDHA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018). A celulase é de grande interesse para aplicação industrial, por se tratar da terceira enzima mais utilizada, seguida de proteases e amilases (BAJAJ; MAHAJAN, 2019). A maioria dos trabalhos referentes a produção de celulases utilizaram como organismos modelos fungos filamentosos, tais como *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, e *Neurospora crassa* (RIBEIRO et al., 2018). Em processos industriais as celulases comerciais empregadas para a bioconversão são produzidas a partir de fungos como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phanerochaete* etc, sendo os mutantes derivados de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus* sp os mais predominantes (BAJAJ; MAHAJAN, 2019; GOUKANAPALLE et al., 2020).

Felber et al., (2019) avaliaram a produção de celulases por fungos endofíticos isolados das cultivares de videira Bordô e Concord (*Vitis labrusca*) pelo processo de fermentação submersa e, utilizando resíduos agroindustriais como substratos alternativos (cascas de amendoim e serragem). Na pesquisa realizada pelos autores, os resultados indicaram que oito micro-organismos foram capazes de produzir celulases em meio com CMC, com as médias dos halos variando de 10,8±0.02 a 15,5±0.07 mm. A maior atividade enzimática neste substrato foi de 3.52±0.98 µmol.min⁻¹, obtida pelo fungo *Diaporthe* sp. (KM362392). Quando substituído o substrato indutor por cascas de amendoim e serragem este fungo apresentou a formação de halos de degradação com média de 14.5±0.01 mm e 14,7±0.03 mm; e com atividade de endoglucanase de 2.93±0.23 µmol.min⁻¹ e 3.26±0.38 µmol.min⁻¹ respectivamente. Os resultados mostram que os fungos endofíticos isolados de *V. labrusca*, podem ser considerados fontes promissoras na produção de celulases, inclusive com o uso de substratos alternativos.

O emprego de resíduos industriais (água residuária de lavagem de destilaria e palha de arroz) como substratos alternativos para a produção de enzimas (celulase e xilanase) pelo fungo *Aspergillus heteromorphus* foi investigado por Bajar et al., (2020). Dentre os resultados obtidos verificou-se que as atividades de exoglucanase, xilanase e endoglucanase em condições otimizadas e ideais foram de 6,3 IU.mL⁻¹, 11,6 IU.mL⁻¹ e 8,1 IU.mL⁻¹, respectivamente. Estes resultados confirmam que o emprego de resíduos agroindustriais como substrato para a produção de enzimas microbianas pode ser uma alternativa econômica e ecologicamente correta.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o fungo endofítico *D. helianthi* apresenta potencial enzimático para a produção de proteases e celulases. A adição de resíduos agroindústriais tais como, farelo de trigo, ou a junção de farelo de trigo e farinha de soja ao meio de cultura, propiciaram um resultado em *cup plate* próximo ou superior ao valor encontrado para o meio frequentemente utilizado, tendo como fonte de carbono CMC ou a gelatina, indicando que a utilização desses resíduos na produção enzimática supriu as necessidades do fungo sem o uso de qualquer outro indutor. Contudo, investigações adicionais devem ser realizadas otimizando fatores como temperatura, pH e concentração dos substratos no cultivo submerso, visando aumentar a produção dessas enzimas. A prospecção do fungo endofítico *D. helianthi* para a detecção enzimática utilizando substratos alternativos não é apenas promissora, mas também vislumbra a possibilidade de se tornar uma alternativa para aplicação industrial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Prof. Dr^a Rosane Marina Peralta, do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá, pelo auxílio na adequação da metodologia de determinação da atividade de endoglucanase, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de uma bolsa de Pós-Doutorado.

As autoras também homenageiam com este trabalho, *in memoriam*, o Prof. Dr. João Alencar Pamphile pela sua destacada contribuição na carreira acadêmica no ensino, e em especial, na pesquisa com micro-organismos endofíticos.

REFERÊNCIAS

ALBERTO, R. N.; COSTA, A. T.; POLONIO, J. C.; SANTOS, M. S.; RHODEN, S. A.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Extracellular enzymatic profiles and taxonomic identification of endophytic fungi isolated from four plant species. **Genetics and Molecular Research**, v.15, n.4, p.1-12, 2016.

ALMEIDA, T. T.; ORLANDELLI, R. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J.A. Molecular characterization of the endophytic fungal community associated with *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.) (Pontederiaceae) native to the Upper Parana River floodplain, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.2, p.4920–4931, 2015.

BAJAJ, A.; MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.103, n.11, p.8711–8724, 2019.

BAJAR, S.; SINGH, A.; BISHNOI, N. R. Exploration of low-cost agro-industrial waste substrate for cellulose and xylanase production using *Aspergillus heteromorphus*. **Applied Water Science**, v.10, n.6, p.1-9, 2020.

BERNARDI-WENZEL, J.; GARCIA, A.; FILHO, C. J. R.; PRIOLI, A. J.; PAMPHILE, J. A. Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricate* (Martius et Zuccarini). **Biological Research**, v.43, n.4, p.375-384, 2010.

CAVALCANTI, R.M.F.; ORNELA, P. H. de O.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. *Screening*, selection and optimization of the culture conditions for tannase production by endophytic fungi isolated from Caatinga. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v.5, n.1, p.1-9, 2017.

CORRÊA, R.C.G.; RHODEN, S. A.; MOTA, T. R.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; SOUZA, C.G. M.; POLIZELI, M. L. T. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.41, n.10, p.1467–1478, 2014.

DABA, G. M.; ELKHATEEB, W. A.; THOMAS, P. W. This era biotechnological tools: an insight into endophytic mycobiota. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v.17, n.3, p.121-128, 2018.

DINIZ, F. V.; MAGALHÃES, Y. M.; PAZ, F. S.; SILVA, A. L. D.; GOMES, L. C.; SANTOS, G. S.; CARVALHO, C. M. Atividade enzimática de fungos endofíticos de bacaba (*Oenacarpus bacaba* Mart.). **Biota Amazônia**, v.10, n.3, p.7-11, 2020.

FAN, X.; YANG, R.; QIU, S.; CAI, X.; ZOU, H.; HU, F. The endo- β -1,4-glucanase of *Bacillus amyloliquefaciens* is required for optimum endophytic colonization of plants. **Journal of Microbial Biotechnology**, v.26, n.5, p.946–952, 2016.

FELBER, A. C.; SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; COSTA, A. T.; POLONIO, J. C.; MOURÃO, K. S. M.; PAMPHILE, J. A. Endoglucanase production by endophytic fungi isolated from *Vitis labrusca* L. with peanut hull and sawdust as substrates. **Bioscience Journal**, v.35, n.3, p.933-940, 2019.

FELBER, A. C.; ORLANDELLI, R. C.; RHODEN, A. S.; GARCIA, A.; COSTA, A. T.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. **Annals of Microbiology**, v.66, n.2, p.765-775, 2016.

FERREIRA, F. L.; DALL'ANTONIA, C. B.; SHIGA, E. A.; ALVIM, L. J.; PESSONI, R. A. Sugarcane bagasse as a source of carbon for enzyme production by filamentous fungi. **Hoehnea**, v.45, n.1, p.134-142, 2018.

FERREIRA, M. C.; CANTRELL, C. L.; WEDGE, D. E.; GONÇALVES, V. N.; JACOB, M. R.; KHAN, S.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity of the endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia gigantea* from the endangered Brazilian rupestrian grasslands. **Biochemical Systematics Ecology**, v.71, n.1, p.163-169, 2017.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FOUDA, A.H.; HASSAN, S.E.; EID, A. M.; EWAIS, E. E. Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). **Annals of Agricultural Science**, v.60, n.1, p.95-104, 2015.

GARCIA, A.; RHODEN, S.A.; RUBIN FILHO, C. J.; NAKAMURA, C. V.; PAMPHILE, J. A. Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. **Biological Research**, v.45, n.2, p.139-148, 2012.

GOMES, R.R.; GLIENKE, C., VIDEIRA, S. I. R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**, v.31, n.1, p.1-41, 2013.

GOUKANAPALLE, P. K. R.; KANDERI, D. K.; RAJOJI, G.; KUMARI, S. S.; BONTHA, R. R. Optimization of cellulase production by a novel endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora* TKBRR isolated from Thalakona forest. **Cellulose**, v.27, n.2, p.6299-6316, 2020.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, n.2, p.257-268, 1987.

HYDE, K. D.; XU, J.; RAPIOR, S. et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. **Fungal Diversity**, v.97, n.1, p.1-136, 2019.

KUZHALVAYMANI, K.; ELIZABETH JACQUINE, L.; SUBHA, T. S. Production, Characterization of Proteases by Solid State Fermentation Using Sugarcane Bagasse by *Warcuprella spinulosa*. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v.8, n.8, p.384-393, 2019.

MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. **Biotechnology Letters**, v.9, n.3, p.219-224, 1987.

MONTEIRO, M. C. P.; TAVARES, D. G.; NERY, E. M.; QUEIROZ, M. V.; PEREIRA, O. L.; CARDOSO, P. G. Enzyme Production by *Induratia* spp. Isolated from Coffee Plants in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.63, n.1, p.1-9, 2020.

MORE, S. S.; SWAMY, R.; MOHAN, N.; NAVYASHREE, M.; JANARDHAN, B.; NIYONZIMA, F. N. Purification and characterization of anti-cancer L-glutaminase of *Bacillus cereus* strain LC13. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v.88, n.1, p.695-705, 2018.

NIYONZIMA, F.N.; MORE, S.S. Coproduction of detergent compatible bacterial enzymes and stain removal evaluation. **Journal of Basic Microbiology**, v.55, n.10, p.1149-1158, 2015.

OLIVEIRA, M. M. Q.; GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R.; NASCIMENTO, R.P. Production of thermophilic and acidophilic endoglucanases by mutant *Trichoderma atroviride* 102C1 using agro-industrial by-products. **African Journal of Biotechnology**, v.15, n.11, p.423-430, 2016.

ORLANDELLI, R. C.; SANTOS, M. S.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Use of agro-industrial wastes as substrates for α -amylase production by endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. **Acta Scientiarum**, v.39, n.3, p.255-261, 2017.

PACHAURI, P.; MORE, S.; ARANGANATHAN, V.; SULLIA, S. B.; DESHMUKH, S. Kinetic study and characterization of cellulose enzyme from isolated *Aspergillus niger* subsp. Awamori for cellulosic biofuels. **Journal of Science and Industrial Research**, v.77, n.1, p.55-60, 2018.

POLONIO, J. C.; ALMEIDA, T. T.; GARCIA, A.; MARIUCCI, G. E.; AZEVEDO, J. L.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Biotechnological prospecting of foliar endophytic fungi of guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) with antibacterial and antagonistic activity against phytopathogens. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.3, p.7297-7309, 2015.

RATNAWEERA, P. B.; SILVA, E. D. Endophytic Fungi: A Remarkable Source of Biologically Active Secondary Metabolites. In: Maheshwari, D.; Annapurna, K. (eds) Endophytes: Crop Productivity and Protection. **Sustainable Development and Biodiversity**, v.16, n.1, p.191-212, 2017.

RAVINDRAN, R.; HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. **Bioengineering**, v.5, n.4, p.1-20, 2018.

RIBEIRO, A. S.; POLONIO, J. C.; COSTA, A.T.; SANTOS, C. M.; RHODEN, S. A.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Bioprospection of Culturable Endophytic Fungi Associated with the Ornamental Plant *Pachystachys lutea*. **Current Microbiology**, v.75, n.5, p.588-596, 2018.

RHODEN, S. A.; GARCIA, A.; RUBIN FILHO, C. J.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J.A. Phylogenetic diversity of endophytic leaf fungus isolates from the medicinal tree *Trichilia elegans* (Meliaceae). **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.3, p.2513–2522, 2012.

SANTOS, C. M.; RIBEIRO, A. S.; GARCIA, A.; POLLI, A. D.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Enzymatic and antagonist activity of endophytic fungi from *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). **Acta Biológica Colombiana**, v.24, n.2, p.322-330, 2019.

SANTOS, L. M.; ORLANDELLI, R. C. Xilanases fúngicas: aproveitamento do farelo de trigo em processos fermentativos e panificação. **Evidencia**, v.19, n.2, p.243-258, 2019.

SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; LIMA, G. S.; BRAGA Jr., A. C. R.; de ASSIS, F. G. V.; LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v.4, n.2, p.181-188, 2018.

SANTOS, T.T.; LEITE, T.S.; QUEIROZ, C.B.; ARAÚJO, E.F.; PEREIRA, O. L.; QUEIROZ, M.V. High genetic variability in endophytic fungi from the genus *Diaporthe* isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Applied Microbiology**, v.120, n.2, p.388–401, 2016.

SANTOS, D. B.; BISPO, A. S. R.; NASCIMENTO, R. P.; CAZETTA, M. L. Bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de sisal como substratos indutores para a produção de endoglucanase por actinobacteria isolada de solo de cultura de sisal. **Magistra**, v.27, n.2, p.245-254, 2015.

SOUZA, J. B.; SILVA, S.; SOUZA, R. S.; ANDRADE, A. M.; ALVES, C. A. B.; MEDEIROS, M. B. Atividade enzimática de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, v.13, n.3, p.5-22, 2019.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. The preservation and maintenance of living fungi. **Norwick**: Page Bros,1983.

SUDHA, V.; GOVINDARAJ, R.; BASKAR, K.; AL-DHABI, N. A.; DURAIKANDIYAN, V. Biological properties of endophytic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.59, n.1, p.1-7, 2016.

SCHUSTER, F. P. W.; MAFFEISSONI, C.; ANGELIS, D. A.; GIACHINI, A. J.; CARDOSO, D. H.; MORONI, L. S.; SKORONSKI, E.; KEMPKA, A. P. Screening and evaluation of filamentous fungi potential for protease production in swine plasma and red blood cells-based media: qualitative and quantitative methods. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.21, n.7, p.101313, 2019.

SRILAKSHMI, J.; MADHAVI, J.; LAVANYA, S.; AMMANI, K. Commercial Potential of Fungal Protease: Past, Present and Future Prospects. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v.2, n.4, p.218-234, 2015.