

SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE CELULASES E XILANASES ISOLADAS DE RESERVAS NATURAIS BRASILEIRAS

**Maurício Pierozzi¹, Ellen Cristine Giese¹, Raquel Miranda Cadete¹,
Carlos Augusto Rosa², Silvío Silvério da Silva^{1*}**

¹Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Estrada Municipal do Campinho s/nº, Lorena-SP. ²Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte-MG * silvio@debiq.eel.usp.br

Resumo- O objetivo deste trabalho foi avaliar dez isolados leveduriformes da biodiversidade brasileira quanto à produção de celulases e xilanases, utilizando os polissacarídeos carboximetilcelulose e xilana, separadamente, como únicas fontes de carbono. As cepas avaliadas demonstraram potencial para a produção destas hidrolases extracelularmente, sendo que somente a cepa CLM 56.1 não apresentou atividade enzimática em nenhuma fonte avaliada. O isolado CLM 59.3, previamente identificado como *Trichosporon laibachii*, apresentou maior atividade celulásica e xilanásica na pré-seleção em meio líquido de cultivo estático, apresentando a produção de ≈0,4 U/ml de xilanase quando cultivado em meio líquido sob agitação constante.

Palavras-chave: Celulases, Xilanases, Leveduras
Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

As leveduras são amplamente utilizadas em processos fermentativos, principalmente nas indústrias de panificação, cervejeiras e de vinhos. Nos últimos anos, a exploração de novos aspectos biotecnológicos relacionados à produção de combustíveis renováveis impulsionou o uso destes microrganismos para a produção de etanol (WALKER, 1998).

Tecnologias sustentáveis para o aumento da produção de etanol sem aumentar a área destinada ao plantio da cana vêm sendo avaliados a partir do uso do resíduo lignocelulósico proveniente da produção de etanol após a extração do caldo da cana-de-açúcar. Para tanto, faz-se necessário o pré-tratamento deste material rico em celulose, hemicelulose e lignina, para que o mesmo seja utilizado nas fermentações visando a produção de etanol de segunda geração (BALAT et al., 2008; GOLDEMBERG, 2009; SARROUH et al., 2009, CANILHA et al. 2010).

O pré-tratamento do bagaço de cana pode ser realizado através de métodos físicos, químicos e/ou enzimáticos. A hidrólise enzimática tem sido mais indicada para a conversão da celulose em monossacarídeos após o pré-tratamento do bagaço uma vez que constitui uma etapa simplificada no processo e requer condições mais brandas, além de apresentarem maior especificidade pelo substrato, no caso a celulose (CASTELLANOS et al., 1995; REYES et al., 2008; FERREIRA et al., 2009).

Assim, o presente trabalho buscou avaliar a produção de celulases e xilanases por cepas de leveduras isoladas de diferentes reservas naturais brasileiras visando à futura aplicação destas enzimas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção de bioetanol.

Metodologia

Microrganismos

No presente trabalho foram utilizadas diferentes cepas de leveduras isoladas da biodiversidade brasileira descritas na Tabela 1, as quais foram previamente identificadas e selecionadas por crescerem em meio sólido contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono (CADETE, 2009).

Tabela 1- Cepas leveduriformes previamente selecionadas como produtoras de celulases.

Código	Espécie
CLM 9.1	<i>Cryptococcus humicola</i>
CLM 21.1	<i>Trichosporon mucoides</i>
CLM 44.3a	<i>Cryptococcus humicola</i>
CLM 47.3	<i>Trichosporon laibachii</i>
CLM 48.1a	<i>Trichosporon moniliiforme</i>
CLM 56.1	<i>Cryptococcus humicola</i>
CLM 57.5	<i>Cryptococcus humicola</i>
CLM 59.3	<i>Trichosporon laibachii</i>
CLM 61.3	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>
CLM 68.1	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>

Avaliação e seleção dos isolados produtores de celulasas e xilanases em meio de cultivo estático

Para selecionar as leveduras produtoras de celulasas e xilanases, as dez cepas isoladas foram crescidas em meio sólido de agar (20 g/l), glucose (10 g/l), extrato de malte (3 g/l), peptona (5 g/l) e extrato de levedura (3 g/l), codificado como meio EMA. As placas foram mantidas em estufa termostatizada a 30 °C durante 24 h. Após este período, as leveduras foram transferidas, com o auxílio de uma alça de platina, para tubos Falcon de 50 ml contendo 10 ml de meio mínimo de sais de Vogel (1956) e CMC (10 g/l) ou xilana (10 g/l). Os tubos foram vedados e mantidos em estufa termostatizada a 30 °C durante 2 semanas. Amostras de 5 ml foram retiradas ao final de cada semana para determinação de atividade enzimática e as 3 melhores cepas foram selecionadas para a avaliação da produção de celulasas e xilanases em meio líquido agitado.

Meio líquido de cultivo e condições de crescimento

Para o preparo dos pré-inóculos, as leveduras foram transferidas do meio sólido de EMA para frascos de Erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml de meio de cultivo contendo glucose (10 g/l), extrato de malte (3 g/l), peptona (5 g/l) e extrato de levedura (3 g/l). Os frascos foram incubados à 30°C, sob agitação constante de 200 rpm durante 24 h. Após este período, as células foram separadas por centrifugação (2000xg/20 min), lavadas em água destilada esterilizada, seguida de nova ressuspensão em água destilada esterilizada.

Alíquotas de 1 ml desta suspensão foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml de meio mínimo de sais de Vogel (1956) e CMC (5 g/l) ou xilana (5 g/l). Os frascos foram incubados à 30°C, sob agitação constante de 200 rpm durante 24 h. Após este período, as células foram separadas por centrifugação e ressuspensas em água destilada esterilizada. A referida solução foi diluída até se obter um valor de absorvância entre 0,4 e 0,5 a 600 nm no Espectrofotômetro UV Visível (modelo SP220, Biospectro) e utilizada como inóculo dos cultivos.

Os cultivos em meio líquido foram desenvolvidos em frascos de Erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml de meio mínimo de sais de Vogel (1956) e CMC (10 g/l) ou xilana (10 g/l), sob agitação constante a 200 rpm, durante 5 dias a 30 °C. Os cultivos foram realizados em duplicata e os resultados obtidos foram descritos como média e desvio-padrão.

Determinação das atividades enzimáticas

A medida das atividades de celulase e xilanase foram desenvolvidas pela quantificação dos açúcares redutores liberados de CMC e xilana (10 g/l) que foram utilizadas, respectivamente, como substratos. O volume final do ensaio foi igual a 0,5 ml, utilizando-se tampão acetato pH 5,0 (50 mM); à 50°C durante 20 minutos. A determinação dos açúcares redutores formados foi realizada de acordo com o método do cuproarsenato descrito por Nelson (1944) e Somogyi (1945). A unidade de atividade foi definida como o número de µmol de açúcares redutores liberados por minuto por ml de extrato enzimático nas condições de ensaio.

Resultados

A etapa de pré-seleção constitui um teste qualitativo importante no processo de seleção de microrganismos por facilitar a detecção da produção das enzimas de interesse de maneira mais rápida e com menos custos (MARTÍNEZ et al., 2009).

Através dos resultados obtidos nesta etapa (Tabela 2), os isolados CLM 59.3, CLM 61.3 e CLM 68.1 apresentaram maior atividade de celulase e os isolados CLM 48.1a, CLM 21.1 e CLM 59.3 apresentaram maior atividade de xilanase quando crescidos em meio estático contendo celulose e xilana, respectivamente, como únicas fontes de carbono. Apenas a cepa CLM 56.1 não apresentou atividade enzimática em nenhuma fonte de carbono avaliada.

Tabela 2- Avaliação da produção de celulasas e xilanases pelos isolados leveduriformes cultivados em meio estático.

Cepa	Atividade em CMC*	Atividade em Xilana*
CLM 9.1	+	-
CLM 21.1	++	+++
CLM 44.3a	-	-
CLM 47.3	++	+
CLM 48.1a	++	+++
CLM 56.1	-	-
CLM 57.5	+	++
CLM 59.3	+++	+++
CLM 61.3	+++	++
CLM 68.1	+++	++

*não apresentou atividade enzimática (-), apresentou diferentes níveis crescentes de atividade enzimática (+ < ++ < +++).

A partir destes resultados, as três cepas leveduriformes que apresentaram maior atividade

em cada fonte de carbono avaliada foram escolhidas para a realização de testes em cultivos líquidos agitados. De acordo com a Figura 1, pode-se observar que os isolados CLM 59.3 e CLM 61.3 apresentaram maiores níveis de celulases ($\approx 0,035$ U/ml) que a cepa CLM 68.1, embora os valores de atividade celulásica tenham sido baixos para as três cepas avaliadas.

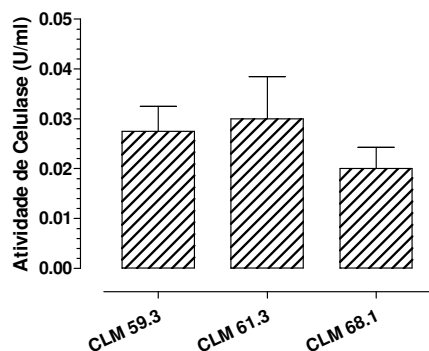


Figura 1- Produção de celulases pelos isolados leveduriformes cultivados em meio líquido agitado.

A Figura 2 ilustra a produção de xilanase pelas cepas selecionadas. As leveduras CLM 21.1 e CLM 59.3 foram as que apresentaram maior atividade xilanásica ($\approx 0,4$ U/ml). A produção desta hidrolase pela cepa CLM 48.1a foi cerca de 3 vezes menor em comparação com as demais.

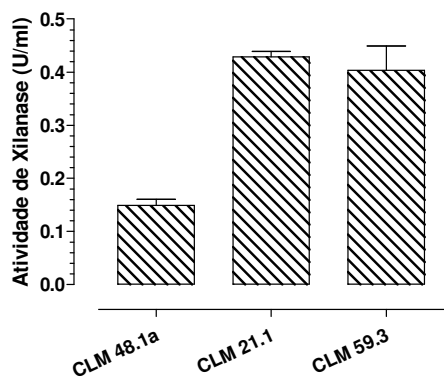


Figura 2- Produção de xilanases pelos isolados leveduriformes cultivados em meio líquido agitado.

Discussão

As celulases e xilanases extracelulares produzidas por leveduras apresentam interesse por apresentarem algumas características específicas necessárias para a conversão dos substratos lignocelulósicos em mono- e oligossacarídeos.

Uma celulase extracelular produzida por *Cryptococcus* sp. S-2 demonstrou estabilidade em pH ácido e em altas temperaturas (THONGEKKAEW et al., 2008). Por outro lado, as xilanases produzidas pela levedura *Pseudozyma*

hubeiensis demonstraram apresentar atividade específica para produção de xilooligossacarídeos com 3 a 7 unidades de xilose sem a formação de xilose e xilobiase (ADSUL ET AL., 2009).

Algumas leveduras têm sido descritas na literatura como produtoras de xilanases e celulases extracelulares (BASTAWDE et al., 1994; SONG; WEI, 2010), sendo necessária a seleção de novas espécies que apresentem proteínas com características específicas para a hidrólise de celulose e outros polissacarídeos da matriz polissacarídica presente nos materiais lignocelulósicos.

Conclusão

O presente trabalho descreve pela primeira vez a produção de celulases e xilanases pelos isolados leveduriformes avaliados, sendo que os resultados obtidos demonstraram a existência de um potencial biotecnológico para a aplicação destas leveduras na produção de hidrolases, as quais poderão ser futuramente aplicadas na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção de etanol de segunda geração.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (Processo nº 2008/5726-4) e CNPq pelo auxílio financeiro. Maurício Pierozzi agradece à FAPESP (Processo nº 2011/08440-4) pela bolsa de iniciação científica concedida. Ellen C. Giese agradece à FAPESP (Processo nº 2010/10446-8) pela bolsa de pós-doutorado concedida.

Referências

- ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Biochemical characterization of two xylanases from yeast *Pseudozyma hubeiensis* producing only xylooligosaccharides. **Bioresour. Technol.**, V.100, n.24, p.6488-6495, 2009.
- BALAT, M., BALAT, H., CAHIDE, O.Z. Progress in bioethanol processing. **Prog. Energy Comb. Sci.** V.34, n.5, p.551-573, 2008.
- BASTAWDE, K. B.; PUNTAMBEKAR, U. S.; GOKHALE, D. V. Optimization of cellulase-free xylanase production by a novel yeast strain. **J. Ind. Microb. Biotechnol.**, V.13, n.4, p.220-224, 1994.
- CADETE, R. M. Isolamento e caracterização de leveduras fermentadoras de D-xilose, L-arabinose ou D-celobiose e produtoras de celulases e xilanases associadas a madeira em decomposição. 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.

- CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; SILVA, S.S.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Rev. Anal.** n.44, p.48-54, 2010.
- CASTELLANOS, O. F.; SINITSYN, A. P.; VLASENKO, E. YU. Evaluation of hydrolysis conditions of cellulosic materials by *Penicillium cellulose*. **Biores. Technol.**, 52 (1995) 109-117.
- FERREIRA, S.; DUARTE, A. P.; RIBEIRO, M. H. L.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. **Biochem. Eng. J.** V.45, n.3, p.192-200, 2009.
- GOLDEMBERG, J. Biomassa e energia. **Quím. Nova**, V.32, n.3, p.582-587, 2009.
- MARTINEZ, G. C.; GIESE, E. C.; PEREIRA, O. J.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Seleção de isolados de *Colletotrichum* da biodiversidade da Amazônia como produtores de lacases utilizando uma metodologia simplificada. **Semina: Ciências Agrárias**, V.30, n.2, p.387-396, 2009.
- NELSON, N. A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **J. Biol. Chem.**, V.153, n.2, p.376-380, 1944.
- REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Quím. Nova**, V.21, n.2, p.140-143, 1998.
- SARROUH, B. F.; PHILIPPINI, R. R.; SILVA, S. S. Lignocellulosic bioethanol production: perspectives and challenges. **Inter. Rev. Chem. Eng.**, V.1, n.6, p.614-622, 2009.
- SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugars. **J. Biol. Chem.**, V.160, n.1, p.61-68, 1945.
- SONG, J-M.; WEI, D.-Z. Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. **Biomass Bioen.**, V.34, n.12, p.1930-1934, 2010.
- THONGEKKAEW, J.; IKEDA, H.; MASAKI, K.; IEFUJI, H. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein Expr. Pur.**, V.60, n.2, p.140-146, 2008.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microb. Gen. Bull.**, V.13, p.42-48, 1956
- WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. England: John Wiley & Sons Ltd, 1998.

XVINIC

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

XI EPG

Encontro Latino Americano
de Pós Graduação

VINIC Jr

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior