

Isolamento e caracterização de celulase termoestável produzida por *Streptomyces sp* do bagaço de cana-de-açúcar.

Carolina Cândida de Queiroz BRITO¹
Fabrícia Paula de FARIA²

Orientador: Luiz Artur BATAUS¹

¹Laboratório de Engenharia Genética, ICB, UFG, Goiânia-GO

²Laboratório de Biotecnologia de Fungos, ICB, Goiânia-GO

carolqueirozbrito@hotmail.com

Palavras-chave: *Streptomyces sp*, atividade celulolítica, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo.

INTRODUÇÃO

A celulose é um homopolissacarídeo linear composto por unidades de D-glicose unida através de ligações glicosídicas do tipo β -1,4. É a mais abundante biomassa renovável disponível na terra (Sandgren et al., 2005). A celulose é o principal constituinte estrutural das células vegetais, representando 35 a 50%, seu papel é exclusivamente estrutural, conferindo proteção à célula. (Bayer & Lamed, 1992)

Celulases catalisam a hidrólise de ligações β -1,4-glicosídicas, são importantes enzimas usadas industrialmente para sacarificação industrial; tratamento de resíduos de polpa de celulose na indústria de papel; aumentar a extração de substâncias fermentáveis na produção de cerveja e nas indústrias de fermentação alcoólica. (Joo, 2009).

Um dos maiores entraves para a exploração comercial das celulases é o elevado custo de produção. A alta produtividade, aliada com a redução do custo na produção, torna o processo de fermentação no estado sólido uma tecnologia promissora para a produção de celulases (Krishna, 1999).

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) se acumula nas usinas em grande quantidade e tem se tornado o resíduo lignocelulósico de escolha para a produção de bioetanol. Diversos trabalhos têm descrito que o BCA é um ótimo indutor da produção de celulases e xilanases, assim como uma ótima fonte para o isolamento de microrganismos capazes de produzir estas enzimas.

O objetivo do presente trabalho consiste em detectar e caracterizar celulasas termoestáveis produzidas por microorganismos de solo. Visando uma futura aplicação da enzima em processos biotecnológicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção de isolados de *Streptomyces sp* a partir de bagaço de cana-de-açúcar (BCA).

Para a obtenção dos isolados, 50 g de BCA foram homogeneizados com 450 mL de solução salina 0,9% sob agitação mecânica em vortex. A mistura foi submetida à centrifugação (3.000 g, 10 min) e o sobrenadante foi diluído até 1×10^{-9} , em solução salina, plaqueado em meio mínimo suplementado com Carboximetilcelulose (CMC) 0,5% (Rastogi et al., 2009a) e incubado a 45°C com rotação 120 rpm por dez dias.

Seleção dos isolados produtores de celulasas em placa.

Os isolados obtidos foram selecionados de acordo com a atividade enzimática determinada pelo teste de atividade em placa de acordo com o protocolo descrito a seguir: os isolados foram inoculados em placas contendo meio mínimo contendo: 0.1 g ácido trinitroacético, 1 mL de solução FeCl₃ (0.03%), 0.05 g CaCl₂·2H₂O, 0.1 g MgSO₄·7H₂O, 0.01 g NaCl, 0.01 g KCl, 0.3 g NH₄Cl, 1.8 g de 85% H₃PO₄, 0.005 g metionina, 0.05 g extrato de levedura, e 1 mL de solução traço (2,2g de MnSO₄, 0,5g de ZnSO₄, 0,5g de H₃BO₃, 0,016g de CuSO₄, 0,025g de Na₂MoO₄ e 0,046g de CoCl₂·6H₂O) (Rastogi et al., 2009a) suplementado com 0,5% de carboximetilcelulose (CMC), 1% de xilana “oat spelt”, e incubados a 45°C por 10 dias. Para a revelação dos halos de atividade, foi adicionada a solução de vermelho do Congo a 0,1% e as placas foram agitadas suavemente durante 10 min. Então, a solução de vermelho do Congo foi descartada, as placas lavadas com solução de NaCl 1 M e o contraste obtido pela adição de HCl 0,1 M sobre a solução de NaCl utilizada na lavagem das placas. A atividade enzimática foi visualizada como um halo claro ao redor da cultura (Carvalho, 2008).

Indução da produção de celulasas e pelos isolados em meio líquido.

Para a análise da produção de celulasas os isolados foram cultivados em meio mínimo contendo diferentes fontes de carbono: 0,5% de CMC, 0,5% xilana “oat spelt”, 0,5% bagaço de cana-de-açúcar e 0,5% farelo de trigo segundo as condições descritas por Carvalho (2003). Após 240 h de cultivo a cultura foi submetida à centrifugação (3.000 g por 15 min) e o sobrenadante de cultura foi analisado quanto

a atividade de: FPAse, CMCCase, Avicelase e Xilanase seguindo o protocolo descrito no item a seguir.

Ensaio Enzimático.

Carvalho (2008), para a dosagem da atividade celulolítica utilizam-se os seguintes substratos: Celulose micro-cristalina (CMC de baixa viscosidade – Sigma®), Celulose semi-cristalina (Avicel - Sigmacell – Sigma®), papel de filtro quantitativo Whatman nº1 (1 x 6 cm) e xilana. Os açúcares redutores liberados pela ação das enzimas foram quantificados pelo método de DNS (Miller, 1959).

Caracterização parcial da enzima bruta: influência de pH, temperatura e termoestabilidade.

Sobrenadante do meio de cultura foi utilizado como fonte de enzima. Perfil de temperatura para a atividade CMCCase, foi determinado pela variação da temperatura de incubação entre 20 ° C e 100 ° C na pH 4,8. Da mesma forma, a atividade foi determinada CMCCase na faixa de pH de 2,0-10,0, com as seguintes buffers (0,05 mol l) incubados a 45°C: citrato de sódio pH 3,0-6,0, de fosfato de sódio para pH 6,0-8,0 e Tris-HCl para pH 8,0-10,0. Para o estudo da CMCCase termo estabilidade, o sobrenadante foi pré-incubada a 40, 50 e 60° C para 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h. Todos os experimentos foi realizados em triplicata e os resultados expressos em valores médios.

Zimograma.

Os sobrenadantes de cultura de células cultivadas em meio foram analisados por eletroforese em gel de SDS-PAGE contendo 10% poliacrilamida e CMC (Sigma) 0,2%. Amostras de diferentes volumes contendo 0,5 U de atividade. Para a atividade CMCCase, os géis foram incubados por 1 hora em triton X-100 a 1% em temperatura ambiente. Incubou por 12 horas a 50°C em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e submersas em solução 0,1% de Vermelho Congo por 20 min. O gel foi lavado com NaCl 1M até a visualização de bandas da enzima. Para determinação da massa molecular foi utilizado marcador de massa molecular o gel corado utilizando o método de coloração pela prata (Gonçalves, et al. 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 13 isolados a partir do BCA que foram plaqueados em meio mínimo com 0,5% de CMC, foram selecionados os três isolados que apresentaram maior atividade. Os três isolados foram inoculados, durante 10 dias à 45°C, em meio mineral suplementado com diferentes fontes de carbono: CMC, farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, foram feitos os ensaios enzimáticos para Avicelase, CMCase, FPase e Xilanase e observou-se que o isolado de número 3 apresentou maior atividade e que a melhor fonte de carbono foi o farelo de trigo. O isolado de número 3 foi inoculado em meio mineral com farelo de trigo durante 12 dias à 45°C e foi acompanhado a sua produção enzimática. A maior produção enzimática para o ensaio de Avicelase foi no segundo dia de cultivo (1,213 UmL⁻¹). A maior produção enzimática para o ensaio de CMCase foi no sexto dia de cultivo (3,872 UmL⁻¹). A maior produção enzimática para o ensaio de FPase foi no sexto dia de cultivo (0,09466 UmL⁻¹). A maior produção enzimática para o ensaio de Xilanase foi no segundo dia de cultivo (71,720 UmL⁻¹). Os dados sugerem que mais de uma celulase está sendo produzida por esse isolado, visto que os ensaios apresentaram picos de atividade em dias diferentes. A realização do zimograma irá permitir a caracterização da massa molecular das enzimas produzidas.

CONCLUSÕES

Foi isolado um microorganismo produtor de celulase que pelas características morfológicas da colônia (aspecto seco, produção de esporos e produção de agarase), possivelmente pertence ao gênero *Streptomyces*. O isolado selecionado foi capaz de crescer e produzir bons níveis de celulases nos meios testados. A concentração máxima CMCase de 3,872UmL⁻¹, Fpase de 0,09466UmL⁻¹, Xilanase de 71,720UmL⁻¹ e Avicelase de 1,213UmL⁻¹. Possivelmente duas enzimas diferentes estão sendo produzidas. Os resultados obtidos tornam esta pesquisa potencialmente viável para aplicações biotecnológicas em diferentes áreas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAYER, E. A. & LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? **Review Biodegradation**, 3(2-3): 171-188. 1992.

CAIRNS, J. R. K. & ESEN, A. β -Glucosidase. **Cellular and Molecular Life Sciences** 67:3389-3405. 2010.

CARVALHO, W. R. Caracterização Bioquímica da Endoxilanase Recombinante (HXYN2r) do Fungo Termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* e Sua Aplicação na Sacarificação de resíduos Agrícolas. Tese (Doutorado), Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2008.

CHAUVE, M.; MATHIS, H.; HUC, D.; CASANAVE, D.; MONOT, F. & FERREIRA, N. L. Comparative Kinetic analysis of two fungal β -glucosidase. **Biotechnology for Biofuels** 3:1-8. 2010.

HARDIMAN, E.; GIBBS, M.; REEVES, R. & BERGQUIST, P. Directed evolution of a thermophilic β -glucosidase for cellulosic bioethanol production. **Appl Biochem Biotechnol** 161:301-312. 2010.

JOO, A. R.; JEYA, M.; LEE, K. M.; SIM, W. I.; KIM, J. S.; KIMI, W.; & LEE, J. K. Purification and characterization of a β -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Fomitopsis pinicola*. **Appl Microbiol Biotechnol** 83:285-294. 2009.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISKOPOULOS, P.; KEKOS, D. & MAKRIS, B.J. Performance of intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 207-213. 2003

KRISHNA, C. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. **Bioresource Technology**, v. 69, p.231-239. 1999.