

LEVEDURAS RECUPERADAS DE LIQUENS DA ANTÁRTICA: ISOLAMENTO E SCREENING DE ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Mayanne K Silva^{1*}, Luiz Henrique Rosa², Rosalinda C. Montone³, Alysson W. F. Duarte⁴

1. Estudante de IC de Biologia da UFAL, *Campus Arapiraca*
2. Pesquisador do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
3. Pesquisadora do Instituto de Oceanografia da USP
4. UFAL, *Campus Arapiraca* / Orientador

Resumo:

A Antártica é o ambiente dos superlativos, com extremos de temperatura, alta radiação solar, baixa precipitação pluviométrica e solos congelados e secos. Ocupando uma vasta área, esse habitat frio abriga várias formas de vida que desenvolvem mecanismos especiais de adaptação. Os microrganismos, em particular, desenvolvem estratégias adaptativas que comporta desde modificações morfológicas, metabólicas até fisiológicas. O objetivo deste trabalho foi isolar leveduras de líquens da Antártica e prospectar a produção de enzimas como lipase, celulase, amilase, protease e ligninase. Foi recuperado um total de 409 isolados de leveduras a partir de 28 amostras de líquens coletados durante as Operações Antártica XXXIX (2015/2016) e XXXX (2016/2017), e, entre eles, com exceção da ligninase, houve atividade positiva para as enzimas triadas.

Palavras-chave: Extremófilos; Líquens; Microorganismos.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas – FAPEAL (60030 1074/2016).

Introdução:

Os microrganismos presentes na Antártica possuem alta habilidade de moldar suas estruturas celulares em prol das variantes desse meio, sobretudo, em resposta aos baixos valores de temperatura e da pouca disponibilidade hídrica e nutricional, fatores que atuam diretamente sobre o metabolismo, composição da membrana celular e na capacidade de produzir metabólitos secundários necessários ao processo de adaptação. Encontra-se em fase inicial de descoberta a compreensão dos mecanismos adaptativos que os microrganismos desenvolveram para suportar essa região extrema (CARRASCO et al., 2016; SANTIAGO et al., 2015). Estudos com as leveduras desse continente são relativamente recentes, e tem apresentado dados bem significativos na elucidação da vida microbiana desse continente frio. Ademais, os líquens desse continente tem sido substratos poucos estudados (DUARTE et al., 2016).

Das múltiplas estratégias fisiológicas dos microrganismos isolados, a produção de enzimas ativas em baixas temperaturas tem sido bastante promissora (VAZ et al., 2011). Atividade de lipase, protease, celulase e amilase na presença de macromoléculas específicas refletem aptidão das leveduras e filamentosos em reagir às condições do ambiente inserido. E essa produção enzimática entre os isolados pode ser aplicada com finalidades diversas em indústrias de interesse, o que pode suprir a demanda por novas moléculas mais versáteis em muitas ferramentas biotecnológicas atuais (CARRASCO et al., 2016).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento de leveduras de líquens da Antártica, além da prospecção de enzimas com potencial aplicação biotecnológica.

Metodologia:

As etapas de amostragem, isolamento e triagem enzimática compulsaram a metodologia simplificada do referido trabalho. Na amostragem, procedeu-se a coleta de diferentes líquens no arquipélago das *Shetlands* do Sul (Antártica marítima), durante expedições realizadas nos verões de 2015/2016 e 2016/2017 com um número total de 36 amostras

Para a etapa de processamento das amostras de líquens, inicialmente essas amostras foram homogeneizadas em solução salina (0,85%), diluídas e em seguida foram realizados os plaqueamentos em dois meios de cultura: **i) Ágar Yeasts Malt (YMA)** (3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de extrato de malte, 5,0 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de glicose e 15 g.L⁻¹ de ágar) e **ii) Sabouraud Dextrose Ágar (SDB)** diluído 10 vezes (2 g.L⁻¹ de batata e 15 g.L⁻¹ de ágar), ambos suplementados com amoxicilina (500 mg.L⁻¹) e clorafenicol (100 µg.mL⁻¹). As placas de Petri foram incubadas a 8,0 ± 2,0 °C e o crescimento acompanhado durante 60 dias. Os isolados foram então repicados para um novo meio de cultura e confirmada a pureza, a preservação dos isolados foi realizada através de ultracongelamento em solução de glicerol 20%, no ultrafreezer do Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica (LABMEG) da UFAL/Arapiraca.

Para a triagem enzimática utilizou-se a metodologia descrita por Martorell et al. (2017). Nesse sentido, avaliou-se a produção de 5 enzimas: celulase, protease, amilase, lipase e ligninase. Os isolados de

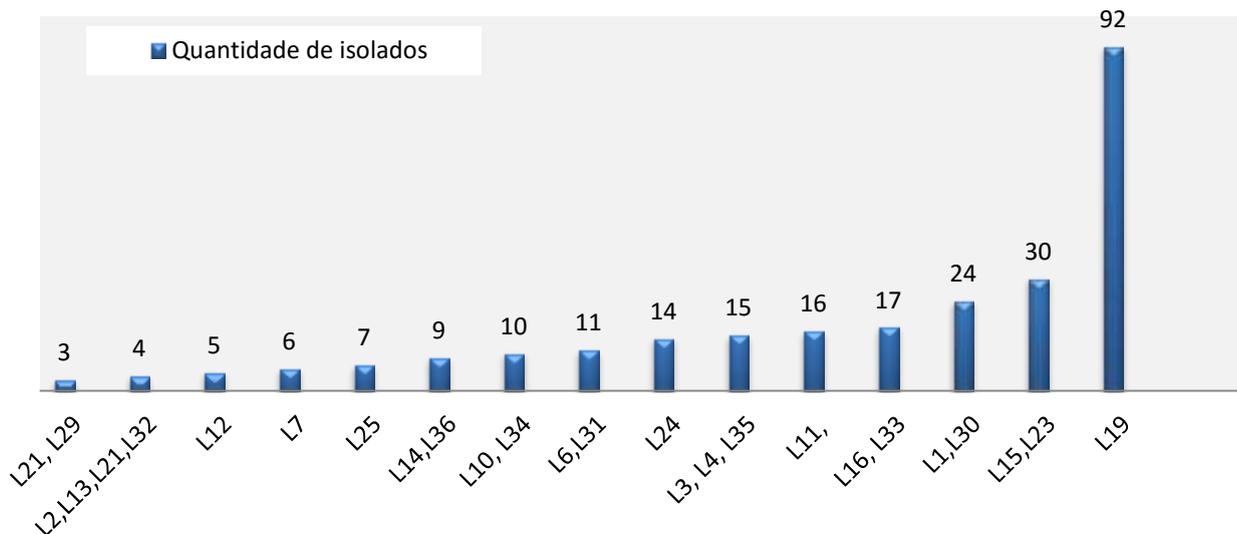
leveduras foram cultivados em meio de cultura sólidos YMA diluído 10 vezes e acrescidos de substratos específicos, conforme a especificidade da enzima, incubado-se durante 30 dias a $8,0 \pm 2,0$ °C (MARTORELL et al., 2017). Para celulase, o meio de cultura foi suplementado com carboximetilcelulose e a para revelação do halo de hidrólise utilizou-se vermelho do congo e solução salina; para lipase, utilizou-se o azeite de oliva (indutor) e a rodamina B como corante revelador; para protease, utilizou-se leite em pó desnatado; para a amilase, o amido foi adicionado ao meio de cultura e solução de iodo utilizada para revelação do halo de hidrólise, e, por fim, para a análise da enzima ligninolítica, o guaiacol consistiu no agente indutor. Posteriormente, foi avaliado o índice enzimático (IE) que corresponde a razão entre o diâmetro da colônia e o halo de hidrólise, confirmando os isolados com maior atividade enzimática extracelular.

Resultados e Discussão:

Das 36 amostras de líquens coletadas, foram 28 processadas e submetidas ao isolamento fúngico. Em termos quantitativos, 409 isolados de leveduras foram recuperados dessas amostras de líquens. Dentre as amostras exploradas, o líquen L19 (coletado na Ilha Dee, Antártica Marítima) foi o que apresentou maior número de isolados ($n = 92$), seguido do líquen L15 e L23, ambos com um total de 30 isolados obtidos. Os outros líquens apresentaram variações entre 3 a 24 isolados (Figura 1).

Esses números são indícios favoráveis da presença microbiana nos líquens antárticos, cuja diversidade é quase que totalmente desconhecida, e, nas concepções atuais esse tipo substrato tem recebido destaque por representar um ambiente pouco explorado (SANTIAGO et al., 2015). A diversidade microbiana em líquens tem revelado um ambiente muito além da interação mutualística entre um fotobionte e um micobionte apenas. Atualmente este substrato Antártico é caracterizado como um microambiente (ou ainda microecossistema) que abriga muitas outras formas de vida, incluindo bactérias diversas e outros seres, que ultrapassam as conhecidas dessa associação. Demonstra, portanto, que na ecologia de líquens existentes, há um potencial de vida microscópica complexa adaptada as variáveis radicais do ambiente Antártico.

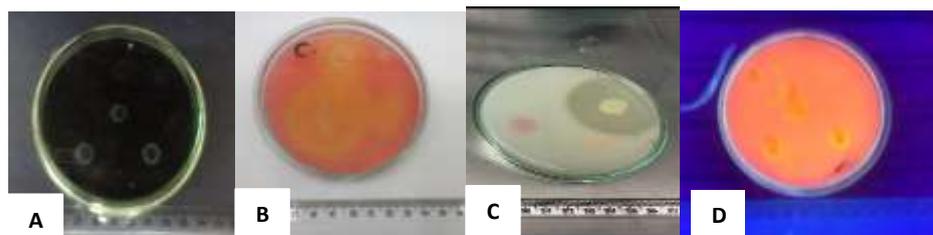
Figura 1: Leveduras isoladas de amostras de líquens coletadas no arquipélago *Shetland* do Sul, Antártica marítima, utilizando-se os meios de cultura YMA e SDB e incubação a $8,0 \pm 2,0$ °C.



Essa quantidade de isolados entre os líquens contribui para a inferência da posição adaptativa que leveduras possuem de viver nesse ambiente frio, com um patrimônio molecular que permite mudanças drásticas em estruturas específicas como a membrana plasmática das células, síntese de compostos intra e extracelulares, assimilação de nutrientes no metabolismo e respostas morfológicas múltiplas no tamanho, cor e textura. Existe a hipótese de esses líquens com mais isolados, serem endêmicos da Antártica, ou de regiões frias no geral, mais também de o serem beneficiados pelas circunstâncias do meio de crescimento que foram submetidas, ou ainda, de terem um valioso poder de adaptação as quaisquer situações de estresse impostas muito mais do que os outros organismos, obviamente dentro de limites bem estabelecidos (SHIVAJI & PRASAD, 2009).

A capacidade da extremofilia desses isolados também se reflete na produção de metabólitos que auxiliam no processo de adaptação à Antártica, especialmente enzimas extracelulares que atuam em diferentes vias metabólicas e ativas em temperaturas baixas. Na etapa da triagem enzimática, aproximadamente 8,3% dos isolados foram testados ($n = 34$ dos isolados). No total, 11 isolados produziram lipase e 8 isolados apresentaram atividade de celulase, protease e amilase e nenhum produziu enzima ligninolítica (em meio suplementado com guaiacol), figura 2. O guaiacol inclusive inibiu o crescimento de alguns isolados.

Figura 2: Enzimas produzidas por isolados de leveduras da Antártica: (A) amilase, (B) Celulase, (C) Protease, (D) Lipase. As leveduras foram incubadas a $8,0 \pm 2,0$ °C durante 28 dias.



Nenhum isolado apresentou atividade para as 4 enzimas testadas. Por outro lado, apenas os isolados 3.L2 e 18.L15 apresentaram atividade positiva para 3 das enzimas avaliadas, exceto para amilase. Foi então avaliado o Índice Enzimático (IE), que é a razão entre o halo de hidrólise pelo diâmetro da colônia e observou-se que o maior IE foi para enzima celulase com o isolado 3.L25 (IE = 3,26), seguido da enzima lipase com o isolado 19.L15 (IE = 3,0), Tabela 1. Quanto maior o IE, maior a atividade enzimática extracelular do microrganismo avaliado.

Tabela 1: Índice Enzimático para as enzimas lipase, celulase, amilase e protease produzidas por leveduras isoladas de líquens coletados na Antártica. O IE = Halo de hidrólise / diâmetro da colônia.

Levedura (Código)	Índice Enzimático (IE) (Halo de hidrólise/Diâmetro da colônia)			
	Lipase	Celulase	Amilase	Protease
2. L31	-	1,95	1,10	-
3. L2	1,33	1,83	-	1,93
3. L24	1,12	-	-	-
3. L25	-	3,26	1,16	-
6. L10	1,09	-	1,66	-
9. L10	-	-	-	1,17
9. L16	1,50	-	-	-
18. L15	1,06	1,33	-	1,42
19. L15	3,00	-	-	-
20. L25	1,06	-	-	-
B. L14	1,10	-	1,42	-
N. L19	-	1,21	-	1,23
O. L19	1,18	-	1,28	-
P. L19	1,16	-	1,25	-
Q. L19	-	-	-	-
R. L19	1,22	-	-	-
T. L19	-	1,33	1,28	-
U. L19	-	1,18	-	1,50
V. L19	-	-	-	1,46
X. L19	-	2,00	-	1,20
AD. L19	-	-	1,1	-
AF. L19	-	-	-	1,90

A levedura 19.15 com IE de 3,0 pode ser um ótimo candidato para possível produção e aplicação da lipase, bem como a celulase produzida pelo isolado 3. L25, a amilase pelo isolado 6. L10 e protease com o isolado 3.L2 apresentaram resultados bastante interessantes. Além do fato de as enzimas dessas leveduras com os maiores índices enzimáticos poderão ser purificadas e destinadas para uso biotecnológico em setores industriais de aplicabilidade de cada uma delas. Denota-se que a produção de enzimas extracelulares ativas à baixas temperaturas configura um dos mecanismo de adaptação das leveduras em hidrolisar macromoléculas em moléculas mais simples quando sujeitadas a presença dessas no meio. Além de que essas enzimas não são somente úteis aos microrganismos que as produzem, elas podem ser destinadas em fins biotecnológicos múltiplos.

Lipase é uma enzima atuante no catabolismo de lipídios, os microrganismos as produzem com o intuito maior de adquirir fosfolipídios, os maiores componentes das membranas celulares, juntamente com a protease que degrada ligações peptídicas das proteínas, o segundo maior composto das membranas. Essas 2 enzimas, em particular, quando somada a celulase e amilase que agem degradando a celulose e o amido, respectivamente, podem ser extraídas e então utilizadas em vários procedimentos industriais, como no processamento e conservação de alimentos, na produção de surfactantes, produtos farmacêuticos, hidrólise de

resíduos agroindustriais, obtenção de peptídios com atividade biológica/médica, e uma imensa rede de aplicações dessas enzimas citadas e extraídas dos isolados testados, obtidas de leveduras que prosperam em um espaço quase inabitável a maioria dos seres vivos. Existe uma necessidade singular dos diversos setores tecnológicos sempre aludir a eficiência dos processos, pela busca de moléculas mais práticas e econômicas, o que torna as enzimas extracelulares desses isolados Antárticos ótimos candidatos para esses fins já que possuem, por valia, uma versatilidade maior que outros organismos mesófilos e termófilos empregados nos últimos tempos.

Conclusões:

O êxito dos objetivos traçados tanto no isolamento, como no screening enzimático demonstra as potencialidades das leveduras antárticas recuperadas de líquens, no que tange a capacidade de adaptabilidade a esse complexo ambiente e de produzir enzimas específicas, que podem ser realocadas funcionalmente para usos variados. Dessa forma, o número de isolados de leveduras traz à tona os questionamentos sobre o limite da faixa de vida desses microrganismos, aqui chamados de extremófilos.

Além disto, observou-se um elevado número de isolados de levedura positivos para lipase, seguido de celulase, amilase e protease positivos. Essas enzimas podem ser destinadas para diferentes finalidades biotecnológicas, com maior possibilidade de eficiência em processos que ocorrem em temperaturas baixas e médias, quando comparadas as enzimas de microrganismos mesofílicos.

Referências bibliográficas

CARRASCO, M.; et al. **Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts**. BMC Microbiology, 2016.

DUARTE, A. W. F. et al. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**. 2013, 17: 1023–1035.

NASCIMENTO, T. C. E. S.; SENA A. R.; GOMES, J. E. G. et al. **Extracelular serine proteases by Acremonium sp. L1-4B isolated from Antarctica: overproduction using cactus pear extract with reponse surface methodology**. Biocatal Agricultural Biotechnology. 2015; 4:737–744.

SANTIAGO, I. F.; SOARES, M. A.; ROSA C. A.; ROSA, L. H. Lichensphere: a protected natural microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of Antarctica. **Extremophiles**. 2015, 19: 1087-1097.

SHIVAJI, S.; PRASAD, G. S. Antarctic Yeasts: Biodiversity and Potential Applications. In: KUNZE, G.; SATYANARAYANA, T. **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**. Springer, 2009.

SPRIBILLE, T.; TUOVINEN, V.; RESL, P. et al. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. **Science**, DOI: 10.1126/science.aaf8287, 2016.

VAZ, A. B. M.; et al. **The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica**. Brazilian Journal of Microbiology, 2011.