

Produção E Caracterização Enzimática Das Celulases Produzidas Por Actinobactérias.

J. G. C. Rodrigues¹, R. L. e Oliveira² e S. D. Junior².

¹Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Tecnologia,

²Centro de Apoio multidisciplinar, Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

E-mail para contato: juliana.gcr@gmail.com

RESUMO – Ao longo dos anos um grande número de micro-organismo incluindo bactérias, leveduras e fungos estão sendo estudados para produção de enzimas. As celulases produzidas por micro - organismos são enzimas responsáveis pela degradação da celulose, principal composto presente no tecido vegetal. Têm-se a celulase como a principal enzima responsável pela decomposição prévia do resíduo celulolítico. O pré-tratamento da celulose é um elemento chave para sua conversão biológica, tornando o processo mais ecológico e econômico, pois diminui o gasto com máquinas e diminui os custos com aterros. Este projeto tem por objetivo analisar e caracterizar as propriedades físico-químicas das enzimas na tentativa de explicar as diferenças bioquímicas por elas exibidas. Analisou-se 3 espécimes de actinobactérias. Para essa caracterização inicialmente fez-se o fez o inóculo em 5 substratos diferentes. Fez-se esse acompanhamento durante 7 dias a 37oC, 180 rpm no shaker. Para cada amostra retirada fez a quantificação da atividade endoglucanásica, onde foi possível obter a atividade CMCásica.

1. INTRODUÇÃO

As celulases têm uma gama de aplicações industriais, como na indústria alimentícia para produção de sucos de fruta, vinho e café; na indústria têxtil para processamento das fibras de algodão, finalização do produto (stoning) e em detergentes para lavagem; na indústria de papel e polpa para descoloração e modificação das fibras; na indústria de ração animal para melhorar a digestibilidade de produtos derivados de plantas, entre outros. Uma aplicação tecnológica que vem sendo atualmente estudada é na produção do bioetanol de segunda geração, impulsionada pela busca por fontes alternativas de energia. Enquanto o etanol de primeira geração é produzido a partir da fermentação do caldo de cana-de-açúcar, o de segunda é produzido a partir de biomassa lignocelulósica. Para isso, é necessário o prévio tratamento da biomassa, para hidrólise da parede celular vegetal e liberação dos açúcares fermentáveis. Nesse caso, além das celulases, uma gama de outras enzimas é empregada, devido à variedade de polissacarídeos que compõem a parede celular. Essa abordagem permite a utilização de diversas fontes vegetais para produção de etanol, incluindo, por exemplo, a palha e o bagaço de cana-de-açúcar (KIMURA et al., 1999; TAIZ e ZEIGER, 2004).

As actinobactérias ou actinomicetos são bactérias gram-positivas com algumas características semelhantes a dos fungos, e por isso são constantemente confundidas com os

mesmos. No entanto, ao contrário dos fungos, são organismos procarióticos e em sua grande maioria aeróbios. São bem conhecidos como produtores de metabolitos secundários e, consequentemente, de interesse farmacológico e comercial elevado (PANDEY et al, 2000).

Diante de tal capacidade de produção de metabolitos as actinobactérias tem despertado o interesse de vários grupos que pesquisam enzimas. Pois além de serem um grupo de bactérias filamentosas bem diverso com capazes de sobreviver em um grande número de nichos ecológicos. Eles são uma fonte promissora de enzimas importantes, alguns dos quais são produzidos em escala industrial.

Estudos recentes com uma actinobactéria do gênero *Streptomyces* da espécie *S. lividans* relatou a eficiência quanto a produção de enzimas. Esse microrganismo foi descrito como um bom produtor de celobiohidrolase e xilanoglicosidades.

Devido o grande potencial das actinobactérias e a crescente aplicabilidade de enzimas na área biotecnológica, torna-se viável selecionar e identificar microrganismos produtores do complexo celulolítico. No entanto, a necessidade de instrumentos para a transformação biotecnológica, sendo o pré-tratamento um elemento chave para a conversão biológica da celulose tornando o processo mais ecológico e econômico, pois diminui o gasto das máquinas, reduz a formação de lodo e diminui os custos com aterro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Linhagem de actinobactérias utilizadas

Foram utilizados no desenvolvimento deste trabalho 2 actinobactérias amazônicas e 1 da plantação do guaranazeiro de Pernambuco, gentilmente cedidos pela coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Esta coleção também é responsável pela manutenção e preservação destas linhagens.

2.2. Triagem de actinobactérias produtoras de celulase

As actinobactérias isoladas foram reativadas na placa de petri em meio ISP-2 e inoculadas em meio sólido indutor específico para verificar a produção de celulase, contendo uma única fonte de carbono carboximetilcelulose (CMC). Em seguida foram incubadas à 37°C por 48 horas, sendo acompanhadas a cada 12 horas.

2.3. Seleção de várias fontes de carbono

Para selecionar a melhor fonte de carbono indutora da produção do complexo celulolítico excretado pela actinobactérias selecionada foram utilizados, carboximetilcelulose, sabugo de milho, casca de maracujá, resíduo sólido urbano, resíduo de Pau-Rosa.

2.4. Obtenção do complexo celulolítico produzido pela actinobactéria selecionada

Após o preparo do pré-inóculo, um volume de 1,0 mL da solução de cultivo, foi inoculado, em erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido indutor de celulase,

acrescido de 1 % (m/v) da fonte de carbono. Os frascos foram incubados a 37°C, por 7 dias sob agitação de 180 rpm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Decorrido o período de incubação, o caldo metabólico foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos, para a obtenção do extrato bruto (sobrenadante) e posteriormente foi utilizado para quantificação da atividade enzimática celulolítica extracelular e dosagem de proteína pelos métodos: ácido 3,5-dinitrosalicílico – DNS, respectivamente, mantendo-se o restante do material para posteriores análises conservado a 4 °C, em refrigerador. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5. Quantificação da atividade endoglucanásica (CMCásica)

Em microtubos Eppendorfs de 2 mL, onde foi adicionada 50 µL do extrato enzimático, em seguida, foi adicionada 50 µL de solução de CMC 1% pH 5,5 em tampão acetato-fosfato. A mistura foi incubada imediatamente a 50 °C por 30 min. Decorrido o tempo reacional, foram adicionados 100 µL de reagente de DNS, seguido de incubação a 100 °C por 5 min. Após este período, foi adicionada 0,75 mL de água, seguido de homogeneização. A intensidade da cor formada foi detectada em espectrofotômetro a 540 nm, após a calibração do equipamento com o branco reacional.

2.6. Otimização das concentrações das fontes de carbono

Após a seleção das fontes de carbono que afetam a produção de celulase, realizou-se a otimização das concentrações deste componente visando a máxima produção do complexo enzimático. Para tanto foram preparados ensaios em triplicata contendo concentrações diferentes da fonte de carbono selecionada, as concentrações estudadas foram de 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0% e 2,5%. Cada ensaio foi realizado em erlenmeyer de 250 mL de capacidade, com volume final do meio de cultivo de 50 mL, incubadas a temperatura 37 °C, sob agitação de 180 rpm e o período de incubação onde obteve-se o pico de produção do complexo descrito no item 2.4.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Quantificação da atividade endoglucanásica (CMCásica) e Otimização das concentrações das fontes de carbono

A partir dos resultados obtidos das 3 actinobactérias pôde-se observar o pico de atividade enzimática de cada actinobactéria para os determinados substratos assim podendo determinar qual espécime e qual substrato obteve a maior atividade endoglucanásica.

Figura 1 - Atividade Enzimática da Actinobactéria 7N.

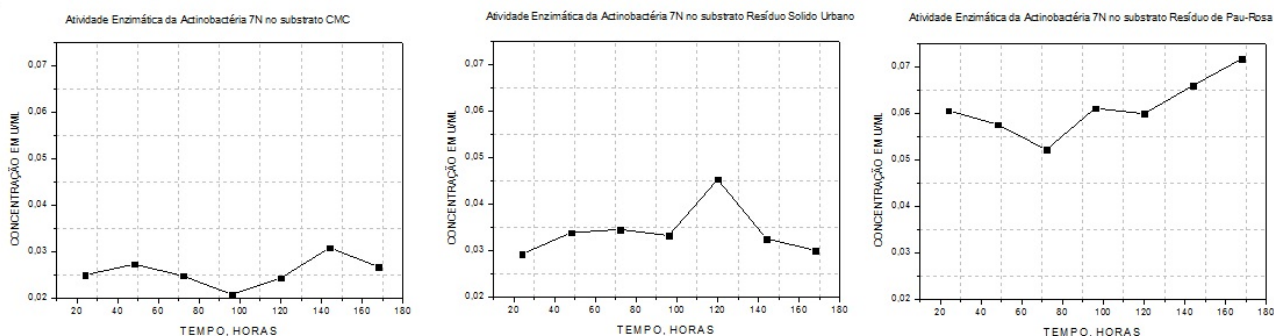


Figura 2 - Atividade Enzimática da Actinobactéria 20G.

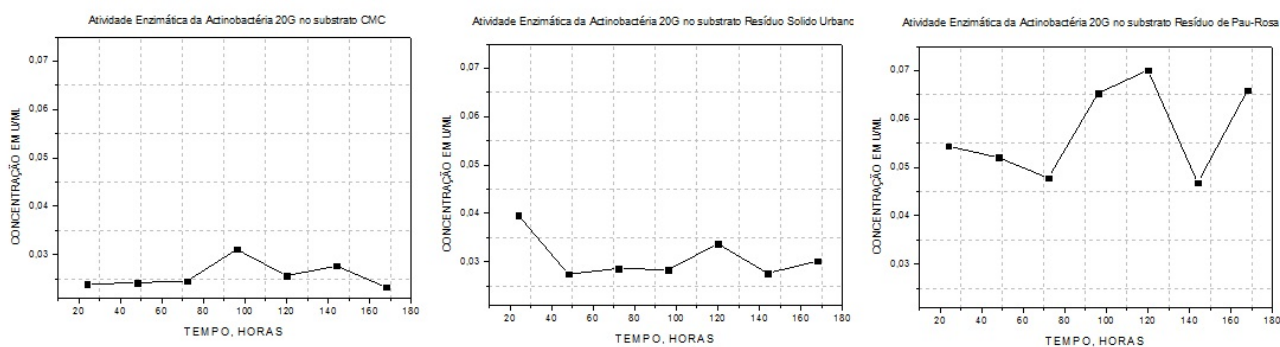
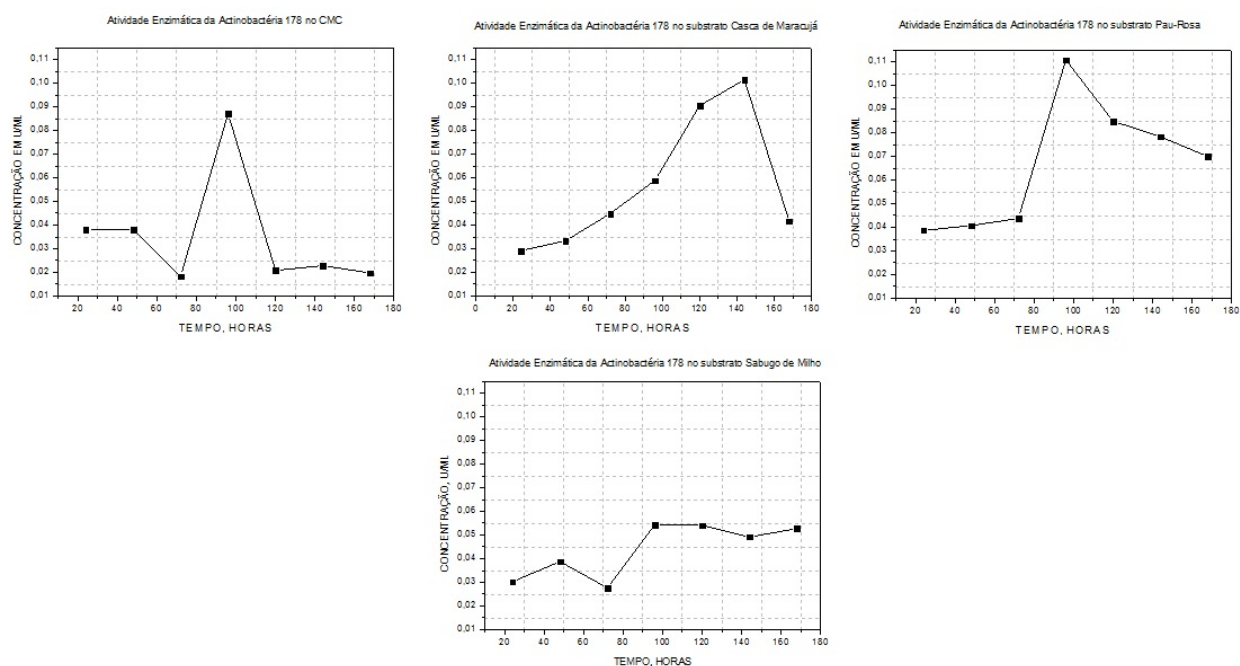
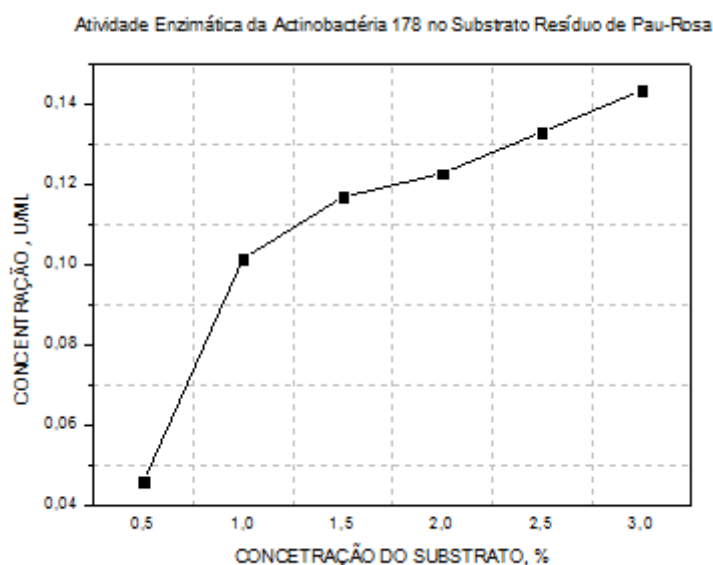


Figura 3 - Atividade Enzimática da Actinobactéria 178.



A partir da análises feitas para a concentração da atividade enzimática, foi decidido desenvolver procedimentos com actinobactérias de Pernambuco no substrato de Pau-Rosa, pois, devido à comparação com outros resultados relacionados mostrou que esta possui picos de atividade enzimáticas mais elevadas do que os obtidos com as actinobactérias Amazônicas. A partir desses dados, pode-se determinar a concentração de substrato ideal da actinobactéria para se obter a maior atividade enzimática.

Figura 4 - Atividade Enzimática da Actinobactéria 178 no subtrato Pau-Rosa.



A partir dos dados obtidos foi possível observar que os substratos de baixo custo testados favoreceram a produção do complexo celulolítico, resultados semelhantes aos encontrados por Santos e colaboradores (2011) ambos trabalhavam com fungos filamentosos. Além disso esses em ambos pesquisas o pico de produção com 72 horas de cultivo. Ramirez e Coxa (2003) reportaram a produção de celulases por 10 isolados de *Streptomyces*, com 72 horas de crescimento. Os valores de máxima atividade celulolítica também foram atingidos a partir das 72 horas de crescimento por outros isolados de *Streptomyces*, no estudo realizado por Ishaque & Kluepfel (1980). Levando em consideração o tempo que a actinobactéria utilizada neste trabalho levou para produzir o complexo celulolítico a espécie testada pode ser considerada mais promissora para utilização industrial no entanto este é apenas um dos critérios de avaliação.

Outro parâmetro de suma importância a ser avaliado em trabalhos que visam melhorar a produção de complexo enzimáticos excretados por microrganismos é a concentração de fonte de carbono disponível no meio fermentativo. Neste contexto a atividade do complexo celulolítico produzido pelo microrganismo selecionado (178) variou significativamente em resposta à concentração da fonte de carbono utilizada no meio de cultura para o crescimento do microrganismo. A produção da celulase foi significativamente maior conforme o aumento da concentração de Pau-Rosa (Figura 4).

Na última década muitos trabalhos tem descrito que o aumento da concentração da fonte de carbono pode proporcionar o aumento na produção do composto de interesse, principalmente no que se trata de enzimas hidrolíticas (GOMEZ et al., 2004). No entanto, ainda não se provou se é a concentração aumentada do substrato que afeta a produção da enzima, se é a falta de outro composto no meio que desperta essa produção ou se são os produtos de degradação ou metabólitos formados durante a fermentação, que estimulam a síntese da enzima (SARATALE et al., 2010).

4. CONCLUSÕES

A partir deste projeto foi possível confirmar o grande potencial que as actinobactérias possuem ao produzir celulase. Esse potencial foi possível ao definir o pico de produção do complexo celulolítico para as actinobactérias analisadas.

Determinou-se também que a actinobactéria 178 obteve a maior pico de produção do complexo celulolítico em 48 horas e que seu crescimento da produção do complexo celulolítico está com o aumento da concentração do substrato de Pau-Rosa.

6. REFERÊNCIAS

- GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G; MCQUEEN-MASON, S. J. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. **New Phytologist**, Cambridge, v. 178, n. 3, p. 473-485, 2008.
- ISHAQUE, M.; KLUEPFEL, D. Cellulase complex of a mesophilic *Streptomyces* strain. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, Canada, v. 26, p. 183-189, 1980.
- KIMURA, S.; LAOSINCHAI, W.; ITOH, T.; CUI, X. J.; LINDER, C. R.; BROWN, R. M. Jr. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. **The Plant Cell**, v. 11, p. 2075-2085, 1999.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, p. 69-80, 2000.
- RAMIREZ, P.; COHA, J. M. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: Aislamento, caracterización y determinación de La actividad celulolítica. **Revista Peruana de Biología**, v. 10, n. 1, p. 67 - 77, 2003.
- SANTOS, F. A.. Utilização das Cinzas de Cana-de-açúcar como Material Pozolânico na Produção de Concreto.. -- Araçatuba, SP : Fatec , 2013.
- SARATALE, G.D.; SARATALE, R.G.; LO, Y-C.; CHANG, J.S. Multicomponent cellulase production by *Cellulomonas biazotea* NCIM-2550 and their applications for cellulosic biohydrogen production. **Biotechnology Progress**, v.26, p.406-416, 2010.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 343-353.