

Produção de celulases por actinobactérias cultivadas em diferentes substratos**Production of cellulases by actinobacteria cultivated on different substrates**

DOI:10.34117/bjdv5n7-206

Recebimento dos originais: 13/07/2019

Aceitação para publicação: 06/08/2019

Juliana Gisele Corrêa Rodrigues

Engenheira Química pela Universidade do Estado do Amazonas

Instituição: Universidade do Estado do Amazonas

Endereço: Av. Darcy Vargas, 1200 - Bairro Parque Dez de Novembro, Manaus – AM, Brasil

E-mail: juliana.gcr@gmail.com

Raiana Silveira Gurgel

Farmacêutica pela Faculdade Estácio Amazonas

Instituição: Universidade do Estado do Amazonas

Endereço: Av. Darcy Vargas, 1200 - Bairro Parque Dez de Novembro, Manaus – AM, Brasil

E-mail: raianagurgel@hotmail.com

Rafael Lopes e Oliveira

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas

Instituição: Universidade do Estado do Amazonas

Endereço: Av. Darcy Vargas, 1200 - Bairro Parque Dez de Novembro, Manaus – AM, Brasil

E-mail: loprafa@gmail.com

Patrícia Melchionna Albuquerque

Doutora em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina

Instituição: Universidade do Estado do Amazonas

Endereço: Av. Darcy Vargas, 1200 - Bairro Parque Dez de Novembro, Manaus – AM, Brasil

E-mail: palbuquerque@uea.edu.br

Sergio Duvoisin Junior

Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina

Instituição: Universidade do Estado do Amazonas

Endereço: Av. Darcy Vargas, 1200 - Bairro Parque Dez de Novembro, Manaus – AM, Brasil

E-mail: duvoisin66@hotmail.com

RESUMO

As celulases são enzimas responsáveis pela degradação da celulose, principal composto presente no tecido vegetal. O pré-tratamento da celulose é um elemento chave para sua conversão biológica, tornando o processo mais ecológico e econômico, pois diminui os custos com máquinas e aterros. Dessa forma, a busca por microrganismos produtores de celulases, bem como o estudo de sua produção utilizando resíduos agroindustriais torna-se relevante. Neste trabalho foi investigada a produção de celulases por actinobactérias em cultivo submerso utilizando diferentes substratos como fonte de carbono. Foram utilizadas três linhagens de actinobactérias e os substratos carboximetilcelulose, sabugo de milho, casca de maracujá, resíduo sólido urbano e resíduo da hidrodestilação de pau-rosa. Os cultivos foram realizados durante 7 dias a 37°C e 180 rpm em shaker.

A atividade endoglucanásica foi avaliada diariamente. As três actinobactérias avaliadas demonstraram potencial para produção de celulases a partir dos diferentes resíduos. A linhagem isolada do solo de Pernambuco foi a mais promissora, em especial quando cultivada no resíduo da hidrodestilação do pau-rosa.

Palavras-Chave: Streptomyces, endoglucanase, resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

Cellulases are enzymes responsible for the degradation of cellulose, the main compound present in plant tissue. Pre-treatment of cellulose is a key element for its biological conversion, making the process more environmentally friendly and economical as it reduces machine and landfill costs. Thus, the search for cellulase-producing microorganisms, as well as the study of their production using agro-industrial waste becomes relevant. In this work we investigated the production of actinobacterial cellulases in submerged culture using different substrates as carbon source. Three strains of actinobacteria were used and the substrates were carboxymethylcellulose, corncob, passion fruit shell, urban solid residue and rosewood hydrodistillation residue. Cultures were performed for 7 days at 37°C and 180 rpm in shaker. Endoglucanase activity was assessed daily. The three actinobacteria evaluated showed potential for cellulase production using the different residues. Pernambuco soil strain was the most promising one, especially when grown in the rosewood hydrodistillation residue.

Keywords: Streptomyces, endoglucanase, agroindustrial residues.

1 INTRODUÇÃO

As celulases têm uma gama de aplicações industriais, como na indústria alimentícia para produção de sucos de frutas, 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 (LIMA et al., 2005; BHAT, 2000). Além disso, as celulases são empregadas na produção do etanol 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 bioetanol é produzido a partir de biomassa lignocelulósica, que pode ser composta por resíduos agroindustriais. 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, outras enzimas são empregadas, devido à variedade de polissacarídeos que compõe a parede celular (KIMURA et al., 1999; TAIZ e ZEIGER, 2004).

Dentre os microrganismos conhecidos como produtores de celulases encontram-se as actinobactérias ou actinomicetos, bactérias gram-positivas presentes em ambientes terrestres e aquáticos com algumas características semelhantes as dos fungos, uma vez que apresentam crescimento filamentosos e produção de micélio. No entanto, ao contrário dos fungos, são organismos

procarióticos e em sua grande maioria aeróbios. São conhecidos como produtores de metabólitos secundários, como antibióticos e enzimas (ARORA et al., 2005; SAINI et al., 2015).

Actinomicetos isolados do solo, como *Streptomyces* spp., *Thermonospora* e *Thermoactinomyces* são conhecidos por produzirem celulases, além de serem capazes de degradar a lignina (ARORA et al., 2005). Estudos com actinobactérias do gênero *Streptomyces* vem sendo realizados há mais de 50 anos e demonstram a eficiência de diferentes espécies quanto à produção de enzimas celulolíticas (ISHAQUE & KLUEPFEL, 1980; THÉBERGE et al., 1992; RAMIREZ & COHA, 2003; DAS et al., 2007; EL-SERSY et al., 2010; CHU et al., 2011).

As actinobactérias, assim como os fungos, são capazes de utilizar resíduos agroindustriais como fonte de carbono. Em um estudo realizado em nosso laboratório, a actinobactéria *S. capoamus* foi empregada na produção de endoglucanase em cultivo submerso, utilizando a casca de maracujá como fonte de carbono, apresentando-se como uma fonte promissora de enzimas do complexo celulolítico (OLIVEIRA et al. 2016). Em outro estudo, Nascimento et al. (2009) utilizaram farelo de trigo e resíduo da indústria cervejeira para o cultivo de *S. malaysiensis* e produção de enzimas celulolíticas. Já a espécie *S. drozdowiczii* foi cultivada em sub-produtos agroindustriais para a produção de celulases (LIMA et al., 2005).

Para a produção de celulase e de enzimas em geral, o uso de resíduos agroindustriais como substrato é especialmente interessante em países onde existe abundância desses resíduos, o que garante a redução dos custos de produção (NASCIMENTO et al., 2009; ROJAS-REJON et al., 2016). Portanto, o uso de resíduos agroindustriais aparece como uma estratégia interessante na obtenção de celulases a partir de actinobactérias.

Uma vez que pouco se conhece sobre a microbiota dos solos tropicais, os quais apresentam excelentes habitats ainda inexplorados para a bioprospecção de novas espécies de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas (DA VINHA et al., 2011), as quais apresentam crescente aplicabilidade em processos industriais, torna-se importante avaliar espécies de actinobactérias isoladas de solos brasileiros produtores do complexo celulolítico. Portanto, no presente estudo, foram utilizadas linhagens de actinobactérias na produção de celulase, cultivadas em diferentes substratos, a fim de avaliar a produção enzimática em resíduos agroindustriais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas duas linhagens de actinobactérias isoladas da região amazônica (7N e 20G) e uma isolada de uma plantação de guaranazeiro localizada em Pernambuco (178). As actinobactérias

foram gentilmente cedidas pela coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

2.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES EM MEIO SÓLIDO

As actinobactérias foram inicialmente reativadas em meio ISP-2 composto por 4,0 g/L de extrato de levedura, 10,0 g/L de extrato de malte, 4,0 g/L de glicose e 18 g/L de ágar. Após a reativação as actinobactérias foram inoculadas em meio sólido indutor específico para verificar a produção de celulase, contendo como uma única fonte de carbono a carboximetilcelulose (CMC). Em seguida foram incubadas à 37°C por 48 horas, sendo acompanhadas a cada 12 horas, para verificar a produção de halo, indicativo da produção de enzimas celulolíticas (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

2.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES EM MEIO LÍQUIDO

O cultivo foi realizado em meio composto por 1,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g/L de K_2PO_4 e 3,8 g/L de KCl, acrescido de 1 % (m/v) da fonte de carbono (BORBA, 2014). Foram utilizadas como fonte de carbono: carboximetilcelulose (CMC), sabugo de milho (SM), casca de maracujá (CM), resíduo sólido urbano (RSU) e resíduo da hidrodestilação de pau-rosa (RHPR).

Após o preparo do pré-inoculo feito em meio ISP-2, um volume de 1,0 mL da solução de cultivo foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio. Os frascos foram incubados a 37°C, por 7 dias sob agitação de 180 rpm em shaker. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Decorrido o período de incubação, o caldo metabólico foi centrifugado a 1.000 rpm por 5 minutos, para a obtenção do extrato bruto (sobrenadante) que posteriormente foi utilizado para quantificação da atividade enzimática celulolítica extracelular e dosagem de proteína. Os extratos enzimáticos foram mantidos a 4 °C, em refrigerador.

2.4 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENDOGLUCANÁSICA (CMCÁSICA)

Em microtubos de 2 mL foram adicionados 50 µL do extrato enzimático, 50 µL de solução de CMC a 1%, em tampão acetato-fosfato, pH 5,5. A mistura foi incubada imediatamente a 50 °C por 30 min. Decorrido o tempo reacional, foram adicionados 100 µL de reagente de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), seguido de incubação a 100 °C por 5 min. Após este período, foram adicionados 0,75 mL de água, seguido de homogeneização. A intensidade da cor formada foi detectada em espectrofotômetro a 540 nm, a partir de uma curva padrão preparada com glicose (MILLER, 1959).

2.5 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE CARBONO

Após a seleção da actinobactéria mais promissora e da fonte de carbono que promoveu a maior atividade enzimática, avaliou-se o efeito da concentração do substrato sobre a atividade endoglucanásica. Para tanto foram preparados ensaios como descrito no item 2.3 contendo diferentes concentrações da fonte de carbono selecionada, de 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5% e 3,0% (m/v). Os cultivos foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRODUÇÃO DE CELULASE NOS DIFERENTES SUBSTRATOS

Os resultados obtidos a partir do cultivo das actinobactérias nos diferentes substratos estão apresentados nas Figuras 1-3. Observa-se na Figura 1C que para a actinobactéria amazônica 7N, o RHPR foi a fonte de carbono que promoveu as maiores atividades enzimáticas, seguido do RSU (Figura 1B) e da CMC (Figura 1A). Quando cultivada nos demais substratos avaliados (SB e CM), a linhagem 7N não foi capaz de produzir celulase. A máxima atividade endoglucanásica foi observada em 168 h de cultivo em RHPR (Figura 1C).

Figura 1 - Atividade endoglucanásica da actinobactéria 7N cultivada em CMC (A), em resíduo sólido urbano (B) e no resíduo da hidrodestilação de pau-rosa (C).

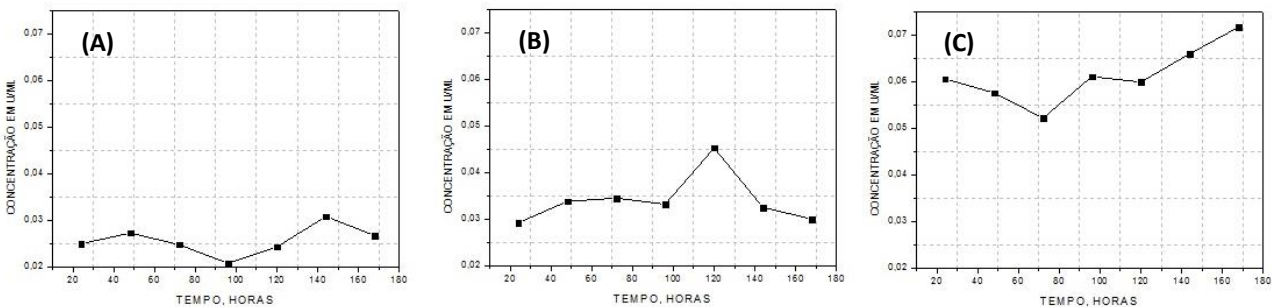


Figura 2 - Atividade endoglucanásica da actinobactéria 20G cultivada em CMC (A), em resíduo sólido urbano (B) e no resíduo da hidrodestilação de pau-rosa (C).

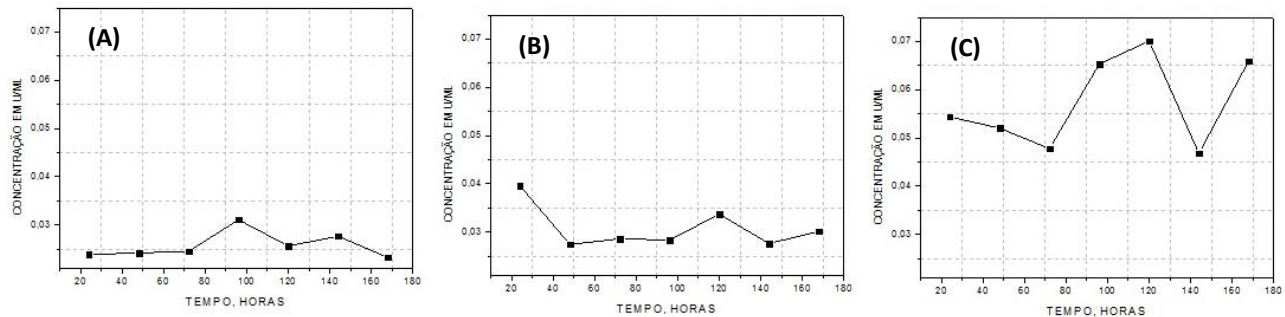
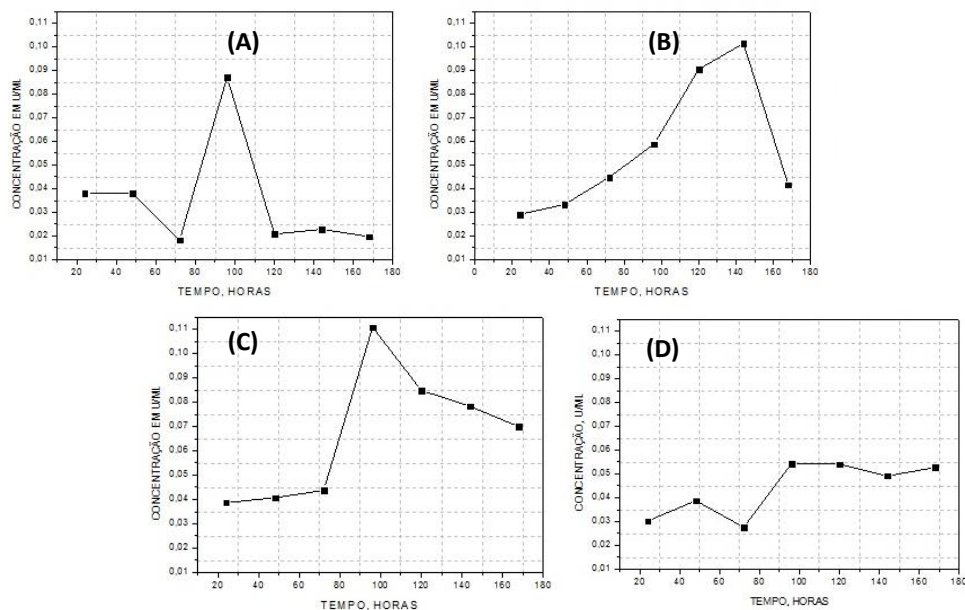


Figura 3 - Atividade endoglucanásica da actinobactéria 178 cultivada em CMC (A), em resíduo sólido urbano (B), no resíduo da hidrodestilação de pau-rosa (C) e em sabugo de milho (D).



Para a actinobactéria 20G isolada da região amazônica, assim como observou-se para a linhagem 7N, o RHPR mostrou-se como o substrato mais promissor para a produção de celulases (Figura 2C). Foi observada atividade de endoglucanase nos extratos enzimáticos obtidos a partir do cultivo da linhagem 20G em RSU (Figura 2B) e em CMC (Figura 2A). Já os substratos SM e CM não se mostraram interessantes para a produção de enzimas celulolíticas nas condições avaliadas. O pico de produção enzimática foi observado em 120 h de cultivo em RHPR (Figura 2C).

Na Figura 3 observa-se que a linhagem 178 isolada do nordeste brasileiro foi capaz de produzir celulase em 4 substratos diferentes, sendo as maiores atividades enzimáticas obtidas nos cultivos em RSU e RHPR (Figuras 3B e 3C, respectivamente). Diferente das outras duas linhagens de actinobactérias, a 178 foi capaz de produzir celulase em sabugo de milho, demonstrando potencial no uso de resíduos agroindustriais de composições variadas para a produção de celulases.

Quanto ao tempo de produção enzimática, observa-se que em CMC, RHPR e no SM a actinobactéria 178 apresentou pico de atividade enzimática em 96 h de cultivo. Em RSU a atividade máxima foi observada em 144 h.

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que os substratos de baixo custo testados favoreceram a produção do complexo celulolítico. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Ramirez e Cocha (2003) e Ishaque e Kluepfel (1980), que reportaram a produção de celulases por isolados de *Streptomyces* em 72 horas de crescimento. Levando em consideração o tempo que as actinobactérias utilizadas neste trabalho levaram para produzir o complexo celulolítico, as espécies testadas podem ser consideradas promissoras como fontes de celulase.

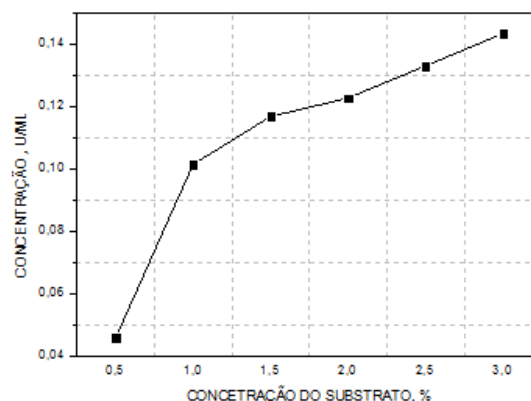
Lima e colaboradores (2005) observaram a produção máxima de celulase pela actinobactéria *Streptomyces drozdowiczii* em 3 dias de cultivo, utilizando resíduos agroindustriais como fontes de carbono e de nitrogênio. Em outro estudo, Nascimento et al. (2009) verificaram o pico de atividade de celulase produzida por *S. malaysiensis* após 4 dias de cultivo em resíduo da indústria cervejeira. Verifica-se, portanto, que os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com o reportado na literatura para a produção de celulase por actinobactérias cultivadas em resíduos agroindustriais.

A actinobactéria 178 apresentou capacidade de produzir a enzima de interesse em um maior número de substratos que as demais linhagens estudadas. Além disso, apresentou a maior atividade enzimática (0,11 U/mL) quando cultivada em RHPR. Portanto, a linhagem 178 isolada do solo de Pernambuco foi selecionada para o estudo da concentração de substrato, visando o aumento da atividade celulolítica.

3.2 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

A atividade enzimática de endoglucanase da actinobactéria 178 cultivada em diferentes concentrações do RHPR está apresentada na Figura 4. Observa-se que a partir do aumento da concentração de substrato de 1,0% para 3,0% foi possível aumentar a atividade enzimática em 30%. Além disso, nota-se que maiores concentrações de substrato devem ser avaliadas, pois claramente a atividade aumenta com o aumento da concentração de substrato.

Figura 4 - Atividade endoglucanásica da actinobactéria 178 cultivada no resíduo da hidrodestilação de pau-rosa em diferentes concentrações.



Um parâmetro de suma importância a ser avaliado em trabalhos que visam melhorar a produção de complexos enzimáticos excretados por microrganismos é a concentração de fonte de carbono disponível no meio fermentativo. Neste contexto, verifica-se que a atividade do complexo celulolítico produzido pelo microrganismo selecionado (actinobactéria 178) variou significativamente em resposta à concentração da fonte de carbono utilizada no meio de cultura para seu crescimento. A

produção da celulase foi significativamente maior conforme o aumento da concentração do RHPR (Figura 4).

Na última década muitos trabalhos têm 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

As actinobactérias avaliadas no presente estudo foram capazes de produzir celulase quando cultivadas em diferentes substratos de baixo custo. Dentre as linhagens estudadas, a actinobactéria 178, isolada de solo do nordeste brasileiro, apresentou-se como a mais promissora na produção da enzima, com pico de produção do complexo celulolítico em 96 horas quando cultivada em resíduo da hidrodestilação de pau-rosa. Esta linhagem se mostrou promissora na produção de celulase do RHPR, aumentando a atividade enzimática com o aumento da concentração de resíduo no meio de cultivo.

Estudos que visam a otimização das condições de cultivo da linhagem 178 se fazem necessários, assim como a identificação da espécie da actinobactéria, com o intuito de aumentar a produção enzimática.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e à Universidade do Estado do Amazonas - UEA pelo apoio financeiro. Agradecem também à Central de Análises Químicas - CAQ/UEA pelo apoio nas análises.

REFERÊNCIAS

ARORA, A.; NAIN, L.; GUPTA, J. K. Solid-state fermentation of wood residues by *Streptomyces griseus* B1, a soil isolate, and solubilization of lignins. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 303-308, 2005.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BORBA, C. B. A. **Otimização de produção de endoglucanase de interesse biotecnológico excretada por *Streptomyces capuamus***. 43p. Monografia. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2014.

CHU, F. J.; LIN, C. W.; YET-PO I.; WU, C. H.; CHEN, D. H. Hydrolysis of bamboo cellulose and cellulase characteristics by *Streptomyces griseoaurantiacus* ZQBC691. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, p. 220-225, 2011.

DA VINHA, F. N. M.; GRAVINA-OLIVEIRA, M. P.; FRANCO, M. N.; ANDREW MACRAE, A.; BOM, E. P. S.; NASCIMENTO, R. P.; COELHO, R. R. R. Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, p. 256-267, 2011.

DAS, S. K.; ALAM, M. Z.; MANCHUR, M. A.; ANWAR, M. N. Effect of nutrients and cellobiose octaacetate on cellulolytic enzyme productions by *Streptomyces albolongus*. **Bangladesh Journal of Microbiology**, v. 24, p. 70-72, 2007.

EL-SERSY, N. A.; ABD-ELNABY, H.; ABOU-ELELA, G. M.; IBRAHIM, H. A. H.; EL-TOUKHY, N. M. K. Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. **African Journal of Biotechnology**. v. 9, p. 6355-6364, 2010.

GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G; MCQUEEN-MASON, S. J. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. **New Phytologist**, v. 178, n. 3, p. 473-485, 2008.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

ISHAQUE, M.; KLUEPFEL, D. Cellulase complex of a mesophilic *Streptomyces* strain. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 26, p. 183-189, 1980.

KIMURA, S.; LAOSINCHAI, W.; ITOH, T.; CUI, X. J.; LINDER, C. R.; BROWN, R. M. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. **The Plant Cell**, v. 11, p. 2075-2085, 1999.

LIMA, A. L. G. de; NASCIMENTO, R. P. do; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 272-277, 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428. 1959.

NASCIMENTO, R. P.; JUNIOR, N. A.; PEREIRA JR, N.; BOM, E. P. S.; COELHO, R. R. R. Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 529-535, 2009.

OLIVEIRA, R. L.; BORBA, C. B. A.; DUVOISIN JR., S.; ALBUQUERQUE, P. M.; GUSMÃO, N. B.; ANDRADE, E. V.; SILVA, L. A. O. Production and characterization of endoglucanase secreted by *Streptomyces capoamus* isolated from Caatinga. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 42, p. 2394-2401, 2016.

RAMIREZ, P.; COHA, J. M. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. **Revista Peruana de Biología**, v. 10, n. 1, p. 67-77, 2003.

ROJAS-REJON, O. A.; POGGI-VARALDO, H. M.; RAMOS-VALDIVA, A. C.; PONCE-NOYOLA, T.; CRISTIANI-URBINA, E.; MARTINEZ, A.; TORRE, M. Enzymatic Saccharification of sugar cane bagasse by continuous xylanase and cellulase production from *Cellulomonas flavigena* PR-22. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 2, p. 321-326, 2016.

SAINI, A.; AGGARWAL, N. K.; SHARMA, A.; YADAV, A. Actinomycetes: a source of lignocellulolytic enzymes. **Enzyme Research**, v. 2015, Article ID 279381, 2015.

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.

Brazilian Journal of Development

THÉBERGE, M.; LACAZE, P.; SHARECK, F.; MOROSOLI, R.; KLUEPFEL, D. Purification and characterization of an endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 815-820, 1992.