

LEVEDURAS SELVAGENS ISOLADAS DO CALDO DE CANA COM PERFIL PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Revista da Universidade Vale do Rio Verde
ISSN: 1517-0276 / EISSN: 2236-5362
Vol. 17 | n. 2 | Ano 2019

Paula Mirella Gomes Barbosa

Universidade Federal da Grande Dourados
paulinha_mirella123@hotmail.com

Maria do Socorro Mascarenhas Santos

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
maria_mascarenhas@outlook.com

Elane Galvão dos Santos

Universidade Federal da Grande Dourados
elanegalvao.santos@gmail.com

Margareth Batistote

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
margareth@uem.br

Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Universidade Federal da Grande Dourados-UFGD
rodrigoleite@ufgd.edu.br

RESUMO

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* estão entre os microrganismos mais estudados, pois possuem uma capacidade metabólica e uma vasta diversidade genética possibilitando tanto a sua utilização em processos biotecnológicos como de seus metabólitos. Assim, este estudo visa realizar o isolamento e a caracterização morfológica de leveduras selvagens e avaliar a produção da enzima invertase para a aplicação biotecnológica. Foram coletadas amostras de mosto de caldo de cana de uma usina da Região da Grande Dourados. Foi realizado plaqueamento com 0,1 mL das diluições seriadas até 1.10^{-5} em placas de Petri contendo o meio sólido YPD 2% e incubadas por 72 horas a 30 °C. Posteriormente foram submetidas à análise macroscópica. A capacidade fermentativa foi realizada com tubos de Durham com o mosto com concentração de 12 °Brix. Para a avaliação de produção da enzima invertase as células foram inoculadas no meio YEPS 2% e incubadas por 48 horas a 28 °C a 150 rpm. A biomassa foi recuperada e para a análise da enzima intracelular que foi realizado uma lise e para a extracelular o sobrenadante do meio fermentativo foi utilizado. A quantificação foi realizada segundo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico - DNS. Foram isoladas 17 leveduras selvagens. As colônias dos isolados apresentaram características morfológicas distintas. Apenas 6 isolados apresentaram capacidade fermentativa. O isolado A-1 apresentou valores superiores aos demais isolados quanto a produção de enzimas invertase tanto a extracelular como a intracelular, 9,58 U mL⁻¹ e 24,70 U mL⁻¹ respectivamente. A maior produção da enzima invertase foi no meio intracelular.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Capacidade fermentativa. Microrganismo. Processos biotecnológicos. Fermentação.

WILD YEASTS ISOLATED FROM CANE JUICE WITH PROFILE FOR THE PRODUCTION OF ENZYMES

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae yeasts are among the most studied microorganisms, since they have a metabolic capacity and a wide genetic diversity that allows both their use and their metabolites in biotechnological processes. Thus, this study aims to perform the isolation and morphological characterization of wild yeasts and evaluate the production of the invertase enzyme for the biotechnological application. Samples of cane juice were collected from a plant in the Grande Dourados Region. Plating was performed with 0.1 mL of the serial dilutions up to 1.10^{-5} in Petri dishes containing the 2% YPD solid medium, incubated for 72 hours at 30° C and, subjected to macroscopic analysis. The fermentative capacity was performed with Durham tubes with the must with 12° Brix concentration. To evaluate the production of the enzyme invertase the cells were inoculated in 2% YEPS medium incubated for 48 hours at 28° C at 150 rpm. The biomass was recovered, and for analysis of the intracellular enzyme that

was performed to the lysis, and the supernatant of the fermentative medium was used for the extracellular. The quantification according to the 3,5-dinitrosalicylic acid-DNS method. Seventeen wild yeasts were isolated. The colonies of the isolates had different morphological characteristics. Only 6 isolates presented fermentative capacity. The A-1 isolate presented higher values than the other isolates for the production of extracellular and intracellular invertase enzymes, 9.58 U mL⁻¹ and 24.70 U mL⁻¹, respectively. The highest production of the enzyme invertase was in the intracellular medium.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. Fermentation capacity. Microorganism. Biotechnological processes. Fermentation

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos são considerados como as principais fontes produtoras de enzimas utilizadas em processos industriais. Isso se deve as características destes organismos, uma vez que podem gerar grandes quantidades de produto em tempo relativamente curto (ZIMMER et al., 2009). As enzimas são catalisadores biológicos e, em sua grande maioria, de origem protéica (SAYALI; SADICHHA; SUREKHA, 2013). A vantagem da sua utilização como catalisadoras em processos está na agilidade em que a reação ocorre e por ser ambientalmente sustentáveis (MONTEIRO e SILVA, 2009). Assim, são aplicadas em processos diversos como nas indústrias de cosméticos, alimentícias, farmacêuticas e outros. Estima-se que este segmento de produção de enzimas cresça 5% a cada ano, sendo impulsionada tanto pelas novas tecnologias como pelo aumento da utilização de compostos orgânicos como as biomassas (PITMAN, 2011).

As *Saccharomyces cerevisiae* estão entre os microrganismos mais estudados, pois possuem uma capacidade metabólica e uma vasta diversidade genética que possibilita tanto a sua

utilização como a de seus metabólitos em processos biotecnológicos (COUTINHO, 2013), deixando o processo mais barato devido ao rendimento do produto em relação ao tempo de conversão ou catalise, compondo um exemplo de sucesso em biotransformação (SHARMA e SATYANARAYANA, 2012). Desse modo, são consideradas como uma fonte produtora de biomoléculas e enzimas tais como: lipases, desidrogenases e invertase (DEMAIN e VAISHNA, 2009).

A enzima invertase (β fructofuranosídeo frutohidrolase) é uma enzima que hidrolisa a sacarose, originando partes equivalentes de glicose e frutose. Sua atividade foi detectada pela primeira vez em linhagens de leveduras de panificação ao fermentar a sacarose em meio aquoso (NOVAKI et al., 2010). Assim como toda enzima, a invertase está sujeita à inibição pela alteração dos componentes do meio, visto que apresentam pH ótimo de 4,0 a 5,5, sendo inativadas em meios com pH superior a 6,0 e inferior a 3,0. As invertases apresentam temperaturas ótimas de 55°C para soluções diluídas de sacarose e de 65°C a 70°C para soluções com concentração superior a 10% (KOBLOITZ, 2010).

Notadamente, estudos voltados para a busca de novas leveduras que possuam tanto um bom perfil fermentativo são importantes, uma vez que uma levedura com alto desempenho fermentativa pode vir a colaborar com o desenvolvimento tecnológico, pois pode possuir um potencial para a produção de biomoléculas (ROMO-SÁNCHEZ et al., 2010). Com isso, o isolamento e a identificação destes microrganismos são fundamentais para os processos biotecnológicos e, de acordo com Azhar et al. (2017), as etapas iniciais consistem em realizar as análises das características morfológicas, fisiológicas e genéticas baseando-se na comparação com outras já identificadas.

O isolamento de novas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentem potencial de resistência ao estresse do meio fermentativo constitui-se em uma estratégia para o processo de bioconversão. Ademais, estes microrganismos podem estar presentes no caldo de cana, sendo que ao longo do processo fermentativo as leveduras selvagens apresentam-se como potenciais candidatas a dominarem as dornas de fermentação ao final da safra. Diante do exposto, o presente estudo visa isolar e caracterizar morfológicamente leveduras selvagens bem como avaliar a produção da enzima invertase para a aplicação biotecnológica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento das leveduras e caracterização morfológica

O caldo de cana foi obtido em uma usina localizada na região da Grande Dourados no decorrer de dois anos. O caldo de cana foi transportado a 4°C para o Laboratório do Centro

de Estudos em Recursos Naturais - CERNA da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul.

Para o isolamento foram realizadas diluições seriadas com solução salina (0,85%) estéril até 1.10^{-5} cel.mL⁻¹, e 0,1 mL das diluições foram dispostas em placas de Petri contendo o meio sólido YPD 2%, composto de 1,0% de extrato de levedo (p.v⁻¹), 1,0% de peptona (p.v⁻¹), 2,0% glicose (p.v⁻¹) e 2,0% de Agar (p.v⁻¹), na presença de corante rosa bengala (0,003%) e ácido propiônico (0,19%). O método utilizado foi o espalhamento em superfície com auxílio de uma alça de Drigalski e realizado em triplicata. As placas foram mantidas incubadas em estufa a 30°C por 72 horas. Após o período de crescimento, as linhagens foram submetidas às análises morfológicas macroscópicas com o auxílio de uma lupa.

2.2. Teste da capacidade fermentativa

Na análise da capacidade fermentativa, o mosto passou por duas filtrações, uma em algodão, para retirar as impurezas maiores, e outra posterior, em papel filtro. Para acertar a concentração de sólidos solúveis totais (°Brix) do mosto foi utilizado um refratômetro portátil e sacarose para ajustar a concentração em 12°Brix. Foram adicionados 10,0 mL de mosto com o auxílio de uma pipeta em tubos de ensaio contendo tubo de Durhan invertido, e o conjunto foi esterilizado em autoclave, a 120°C por 20 minutos. Uma colônia de levedura selvagem foi inoculada com o auxílio de uma alça de platina em cada tubo e incubados em estufa a 30°C durante 24 horas. Observou-se a formação de bolhas no interior do tubo de Durhan e espuma, sendo este um indicativo do processo fermentativo.

2.3 Avaliação da produção intracelular e extracelular da enzima invertase

Para a avaliação de produção da enzima invertase os isolados foram cultivados em meio YEPS 2 % contendo 2 % de peptona (p.v⁻¹), 2 % de sacarose (p.v⁻¹) e 1 % (p.v⁻¹) de extrato de levedura; o pH foi ajustado para 5,0 com ácido clorídrico (1N) e esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos; os frascos contendo as células foram incubados por 48 horas a 28°C a 150 rpm. Após o cultivo as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e a massa celular foi ressuspensa em 5,0 mL de tampão acetato de sódio 0,1M e centrifugada. O procedimento foi repetido por duas vezes e após a última centrifugação a massa celular foi ressuspensa em 10,0 mL de tampão acetato, sendo denominada biomassa celular não rompida. Para a obtenção das enzimas intracelulares a biomassa celular foi submetida a três séries de agitação por 3 minutos cada em vortex utilizando 50g de pérolas de vidro. A biomassa rompida foi centrifugada e o sobrenadante obtido foi denominado extrato enzimático intracelular. Os extratos extracelulares e intracelulares foram utilizados para os ensaios de determinação da invertase. Para a determinação enzimática a mistura reacional foi composta por 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0, contendo 1 % de sacarose e 0,1 de extrato enzimático, mantido por 10 minutos a temperatura de 50°C. O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico- DNS, descrito por Mueller (1959). A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima que produz 1µmol de produto por minuto (U mL⁻¹).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, as caracterizações morfológicas das leveduras selvagens isoladas em caldo de cana apresentaram colônias de aspectos morfológicos distintos. Foram isoladas 17 leveduras selvagens. Os dados mostraram que houve uma variação em relação ao tamanho das colônias dos isolados na faixa de 1 mm a 10 mm. Em relação ao aspecto morfológico textura o que predominou foi a característica brilhante em 65% das colônias e 35% fosca. As colônias apresentaram uma pequena variação quanto ao aspecto cor, sendo observada a cor rosa para 53% das colônias, seguida das cores branca, 29%, e creme, 18%. Para o aspecto superfície, 17,6% das colônias apresentaram-se rugosas e 82,4% lisas; em relação à borda houve predominância da lisa, com 65%. Já para a elevação, a predominância foi para o tipo convexo, com 100%. A caracterização morfológica de leveduras é um fator básico, porém importante para a determinação de semelhanças e diferenças entre os microrganismos haja vista que o caldo de cana apresenta uma microbiota diversificada (Figura 1).

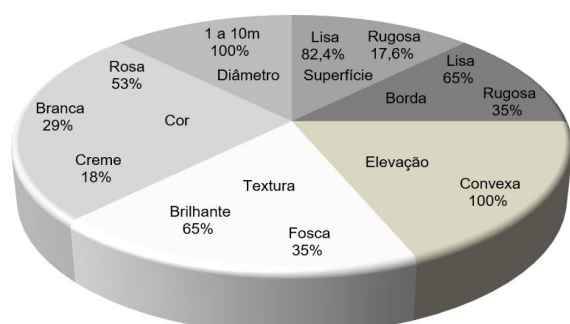
Estudos de isolamento de leveduras industriais com potencial para a produção de etanol realizados por Batistote et al., (2010), mostraram uma pequena diferença nos aspectos morfológicos, os isolados apresentaram crescimento de colônias com aspectos morfológicos semelhantes, contudo houve uma variação de tamanho entre as colônias, de 1 mm a 2 mm, e todas as linhagens apresentaram uma textura brilhante. A cor predominante foi branca, com exceção para a linhagem Fleischman que

apresentou coloração rosa. A superfície das colônias apresentou-se lisa para a maioria das leveduras, sendo o mesmo observado para as bordas. A elevação predominante foi do tipo convexa.

Em estudos realizados por Reis et al. (2013), que utilizaram 22 isolados de leveduras visando a caracterização genética e morfo-fisiológica e a resistência ao estresse, foi observado que 11 possuíam características rugosas e 11 lisas; 10 isolados rugosos apresentaram característica floculante e entre as lisas a floculação foi muito baixa. As leveduras que apresentaram colônias com aspecto rugoso mostraram capacidade fermentativa inferior às linhagens com colônias lisas em sistema de batelada mostrando, ainda, velocidade de fermentação mais lenta.

Comparando os dados de nossos estudos com o da literatura podemos observar que na avaliação da caracterização morfológica de linhagens padrão industriais para produção de etanol os aspectos morfológicos analisados apresentaram semelhanças entre si. No entanto, os isolados selvagens mostraram uma maior diferença nos aspectos morfológicos analisados, evidenciando que há uma maior diversidade de microrganismos presentes no caldo de cana.

Figura 1 - Caracterização Morfológica dos Isolados de leveduras selvagem em caldo de cana.



Fonte: Autores.

A análise da capacidade fermentativa dos morfotipos de leveduras selvagens demonstrou que houve diferenças entre os isolados analisados. Foi observado que 5 isolados apresentaram capacidade fermentativa (A-1, A-8, A-9, A-11, A-12, A-15 e A-16) e os demais não (Tabela 1). A busca de novos isolados, ou leveduras personalizadas pode ser uma alternativa segura e viável para aumentar o número de linhagens de leveduras que apresentem uma eficiência fermentativa com alto potencial para a produção de bioetanol.

Nos estudos de Reis et al. (2013), utilizando 22 isolados de leveduras visando a caracterização genética e morfo-fisiológica e a resistência ao estresse, foi observado que 11 possuíam características rugosas e 11 lisas; 10 isolados rugosos apresentaram característica floculante e entre as lisas a floculação foi muito baixa. As leveduras que apresentaram colônias com aspecto rugoso mostraram capacidade fermentativa inferior às linhagens com colônias lisas em sistema de batelada mostrando, ainda, velocidade de fermentação mais lenta.

Estudos qualitativos da capacidade fermentativa de leveduras utilizadas nas indústrias para a produção de etanol foram realizados por Moreira et al. (2015), no qual foram analisadas diferentes concentrações de graus Brix (12, 15, 24 e 30) em mosto a base de caldo de cana à temperatura de 30°C. As linhagens utilizadas foram a Pedra-2, Catanduva-1, Red Star e Ragi Instan, as quais apresentaram nas concentrações de graus Brix de 12, 15 e 24 indicativos da presença de espumas e bolhas no tubo de Durhan para o teste de capacidade fermentativa, uma importante característica de linhagens tidas como boas fermentadoras. Na

concentração de 30°Brix as linhagens não apresentaram capacidade fermentativa, talvez isto tenha ocorrido devido à alta concentração de açúcar no meio e possivelmente tenha causado o efeito da pressão osmótica nestes microrganismos ocasionando uma repressão fisiológica.

De acordo com Pacheco (2010), as leveduras são os agentes ativos responsáveis pelo processo fermentativo, sendo necessária a escolha da linhagem apropriada para assegurar o êxito da fermentação e a produção de etanol.

Tabela 1 – Capacidade fermentativa de isolados de leveduras selvagens presentes em caldo de cana, cultivada em concentração de 12 °Brix na temperatura de 30 °C por 24 horas.

Isolados	Fermenta (+)	Não fermenta (-)
A-1	+	
A-2		-
A-3		-
A-4		-
A-5		-
A-6		-
A-7		-
A-8	+	
A-9	+	
A-10		-
A-11	+	
A-12	+	
A-13		-
A-14		-
A-15	+	
A-16	+	
A-17		-

Fonte: Autores.

Na avaliação da produção da enzima invertase extracelular e intracelular dos isolados selvagens os dados apresentaram diferenças no perfil enzimático (Figura 2). Dentre as leveduras selvagens isoladas que apresentaram maiores concentrações de invertase extracelular destacam-se os isolados A-1 com uma produção de 9,58 U mL⁻¹, o A-5 com cerca de 5,59 U mL⁻¹ e o A-10 com cerca de 4,15 U mL⁻¹. Para a produção da invertase intracelular os isolados que apresentaram as maiores concentrações foram o A-1 24,70 U mL⁻¹, A-10 com 13,80 U mL⁻¹, o A-17 com cerca 12,01 U mL⁻¹ e o A-11 com 11,70 U mL⁻¹.

A viabilidade da produção de enzimas por processos fermentativos em alta escala ocorre pela facilidade e oferta de compostos nutricionais no substrato (BON; FERRARA; CORVO, 2008), sendo que as fontes mais promissoras de produção de enzimas industriais são os microrganismos em função de sua grande atividade catalítica.

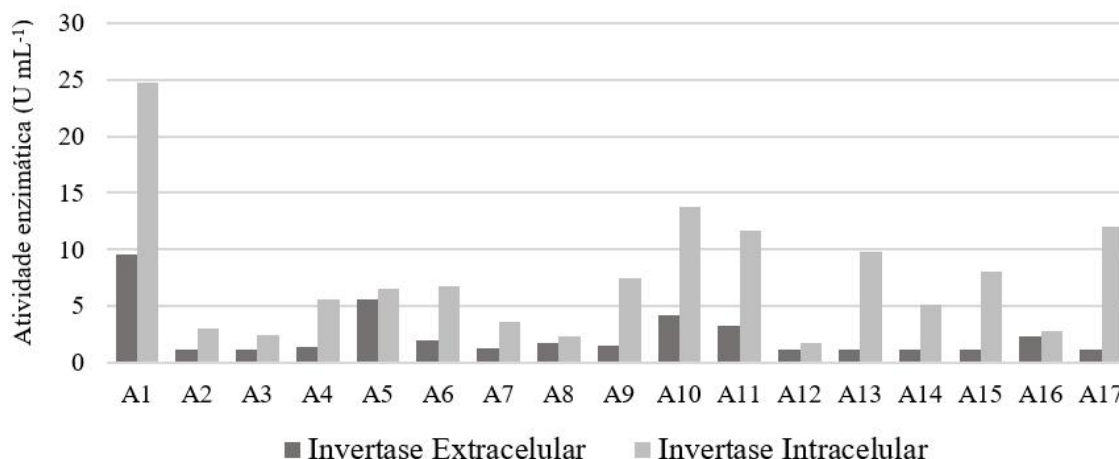
As *Saccharomyces* sp produzem inúmeras enzimas, dentre as quais a invertase, que pode ser tanto intracelular quanto extracelular, sendo que as condições ideais de ação desta enzima ocorrem na temperatura de 55°C para soluções diluídas de sacarose e, de 65°C a 70°C, para soluções com concentração

superior a 10%. Contudo, para as soluções acima de 20% apresentam taxas decrescentes de hidrólise em virtude da reduzida disponibilidade de água no meio reacional (KOBLOITZ, 2008).

Os isolados estudados apresentaram produção de enzimas, notadamente, foi

observado que a produção foi mais expressiva para o quantitativo de enzima invertase intracelular. Isso demonstra o potencial destes isolados para trabalhos futuros, principalmente em processos biotecnológicos.

Figura 2 - Avaliação da enzima invertase extracelular e intracelular de isolados de leveduras selvagens presentes em caldo de cana.



Fonte: Autores.

4. CONCLUSÃO

Na avaliação da caracterização morfológica, as leveduras selvagens apresentaram diferenças em relação aos aspectos morfológicos analisados.

Entre os 17 isolados analisados 6 apresentaram a capacidade fermentativa, uma importante característica a ser analisada como indicativo de potencial fermentativo de uma levedura.

A maior produção ocorreu para a enzima invertase intracelular, isolado A1.

REFERÊNCIAS

AZHAR, S. H. M; ABDULLA, R; JAMBO, S. A; MARBAWI, H; GANSAU, J. A; FAIK, A. A. M; RODRIGUES, K, F. Yeasts in sustainable

bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports.**, v.10, p. 61, 2017.

BATISTOTE, M.; CARDOSO, C. A. L RAMOS, D. D.; ERNANDES, J. R. Desempenho de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de cana-de-açúcar. **Ciência e Natura**, n. 32 p.83-95, 2010.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em Biotecnologia. **Interciência**, Rio de Janeiro, cap. 6. p.124-147, 2008.

COUTINHO, F. S; MARQUEZ, D. R.; DIAS, D.S.; SILVA, J. A.; GRANJEIRO, P. A.; GONÇALVES, D. B.; GALDINO, A. S. Perfil de degradação de amido de mandioca por *Saccharomyces cerevisiae* expressando uma amilase de *Cryptococcus flavus*. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, p. 15-21, 2013.

DEMAIN, A. L.; VAISHNA, V. P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297-306, 2009.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro Editora Guanabara Koogan, p. 242, 2010.

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de alimentos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 2, p. 62-68, 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-429, 1959.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, p. 9-23, 2009.

MOREIRA, C. S.; SANTOS, M. do S. M.; BARROS, N. S.; CARDOSO, C. A. L.; BATISTOTE, M. Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 55-63, 2015.

NOVAKI L, HASAN S. D. M, KADOWAKI M. K, ANDRADE D. Produção de Invertase por fermentação em estado sólido a partir de farelo de soja. **Engevista**, v. 12, p. 131-140, 2010.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. (Dissertação) Faculdade de Eng. Química -Universidade Federal de Uberlândia- MG, p. 96.

PITMAN, S. **Growth in enzyme market driven by cosmetic demand**. 2011. Disponível em: <http://www.cosmeticsdesign-asia.com/FormulationScience/Growth-in-enzymes-market-driven-by-cosmeticsdemand?utm_source=copyright&utm_medium=OnSite&utm_campaign=copyright> Acesso em: 03 fev. de 2018.

REIS, V. R.; BASSI, A. P. G.; SILVA, J. C. G. da; CECCATO-ANTONINI, S. R. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. **Braz. J. Microbiol**, v. 44, p. 1121-1131, 2013.

ROMO-SÁNCHEZ, S.; ALVES-BAFFI, H.; ARÉVALO-VILLENA, H.; UBEDA-IRANZO, J.; BRIONES-PÉREZ, U. M. A. Yeast biodiversity from oleic ecosystems: study of their

biotechnological properties. **Food Microbiology**, v. 27, p. 487- 492, 2010.

SAYALI, K.; SADICHHA, P.; SUREKHA, S. Microbial Esterases: An overview. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, p. 135-146, 2013.

SHARMA, A.; SATYANARAYANA, T. Production of acid-stable and high-maltose-forming α -amylase of *Bacillus acidicola* by solid-state fermentation and immobilized cells and its applicability in baking. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 168, p. 1025-34, 2012.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, C. W.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v. 10, p. 123-137, 2009.

Paula Mirella Gomes Barbosa
Universidade Federal da Grande Dourados
Mestra em Ciência e Tecnologia Ambiental

Maria do Socorro Mascarenhas Santos
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Mestra em Recursos Naturais

Elane Galvão dos Santos
Universidade Federal da Grande Dourados
Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental

Margareth Batistote
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Docente do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais

Rodrigo Simões Ribeiro Leite
Universidade Federal da Grande Dourados-UFGD
Docente do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
