

Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *S. cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana-de-açúcar.

Immobilization efficiency comparison between *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerant) and *S. cerevisiae* ATCC 9763 yeasts in sugar cane bagasse.

AUTORES AUTHORS

✉ **Daniele Cristina dos Santos BOFO**¹
Heizir Ferreira de CASTRO²
Maria Bernadete de MEDEIROS¹

¹Departamento de Biotecnologia - FAENQUIL,

²Departamento de Química - FAENQUIL,

Faculdade de Engenharia Química de Lorena,

Rodovia Itajubá-Lorena, Km 74,5, Caixa Postal 116,

CEP: 12600-970, Lorena-SP, Brasil,

e-mail: danibofo@bol.com.br

RESUMO

Análises das atividades invertase em células livres foram realizadas utilizando-se as linhagens *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX com propriedade osmotolerante e *S. cerevisiae* ATCC 9763, como referência. Os resultados foram 110,0 e 50,6 U/mg de células (peso seco), respectivamente. As células das leveduras foram imobilizadas em bagaço de cana-de-açúcar previamente tratado e ativado com polietilenoamina. Foi determinada a relação ideal de células e suporte ativado para obter o maior rendimento de imobilização, como também, a atividade invertase das células imobilizadas. Para a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX, a atividade invertase foi 16,4 U/mg de células, com uma eficiência de imobilização de 31,67%. Entretanto, no sistema imobilizado com *S. cerevisiae* ATCC 9763 a eficiência de imobilização foi de 2,10% e não foi possível determinar a atividade invertase. Provavelmente, a propriedade osmotolerante da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX contribuiu para uma eficiência de imobilização de 31,67 contra 2,10%, encontrada na *S. cerevisiae* ATCC 9763.

ABSTRACT

Invertase activity analysis in free cells was made using *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX lineages, with osmotolerant properties, and *S. cerevisiae* ATCC 9763, as a standard lineage. The results found were 110 and 50.6 U/mg of cells (dry weight) respectively. The yeast cells were immobilized in sugar cane bagasse previously treated and activated with polyethylene amine. The ideal cells relation (proportion) was determined and support activated to obtain the highest immobilization output, as well as invertase activity of the immobilized cells. For the lineage *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX, invertase activity was 16.4 U/mg of cells, with an immobilization efficiency of 31.67%. Yet, in the immobilization system using *S. cerevisiae* ATCC 9763 the immobilization efficiency was of 2.10%. Most probably, the osmotolerant properties of the *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX lineage contributed to an immobilization efficiency of 31.67%, against the 2.10% found on the *S. cerevisiae* ATCC 9763.

PALAVRAS-CHAVE KEY WORDS

Imobilização de células; bagaço de cana-de-açúcar;
levedura osmotolerante.

cells' immobilization; sugar cane bagasse;
osmotolerant yeast.

1. INTRODUÇÃO

A invertase (-frutofuranosídeo frutoidrolase) é a mais importante enzima de interesse industrial sintetizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A maior parte dos processos industriais que fazem uso dessa enzima emprega células *in vivo* de leveduras. Em *S. cerevisiae* foram identificadas duas diferentes formas de invertase: a glicosilada que está localizada no espaço periplasma e encontra-se associada à parede celular da levedura e, outra que não é glicosilada e está concentrada no citoplasma (ZARATE e BELDA, 1996). A atividade invertase da levedura está relacionada com a invertase do periplasma que hidrolisa a sacarose produzindo uma mistura equimolar de glicose e frutose.

A imobilização é um termo que descreve as muitas formas das células serem encapsuladas ou aprisionadas. Pesquisas na área de imobilização de células têm aumentado consideravelmente no setor da biotecnologia e muitos trabalhos estão sendo realizados, (MELO e D´SOUZA, 1999). Nessa perspectiva, a utilização de células de leveduras imobilizadas em suporte inerte e de baixo custo é hoje um dos enfoques para aplicação da invertase em processo de bioengenharia, como o bagaço de cana-de-açúcar que é o resíduo agro-industrial mais produzido no país (ORLANDO et al., 1994). Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são gerados em média 230 Kg de bagaço (SANTANA e SOUZA, 1984). A composição química do bagaço integral é de celulose 46,0%, hemicelulose 25,2% e de lignina (Klason) 20,7%. Os baixos custos do bagaço tornam atrativo o uso desse material, como matriz de imobilização para células de leveduras. A imobilização das células *S. cerevisiae* CB-IX, com propriedade osmotolerante e com expressivos níveis de atividade invertase é uma das propostas tecnológicas. Especialmente, para aplicação deste sistema, em processos de conversão da sacarose quando conduzido em elevada pressão osmótica. Nesse sentido, um dos parâmetros que deve ser determinado é a avaliação da eficiência de imobilização das células *S. cerevisiae* CB-IX, no suporte de bagaço de cana-de-açúcar tratado e ativado. Os dados obtidos de atividade invertase e de imobilização serão comparados com os da linhagem padrão *S. cerevisiae* ATCC 9763.

2. METODOLOGIA

2.1 Leveduras

Foram utilizadas as linhagens *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX com propriedade osmotolerante isolada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biotecnologia-FAENQUIL e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. As culturas estoques foram mantidas sob refrigeração em tubos com meio GYMP. A levedura osmotolerante foi mantida em meio ágar osmofílico (ATLAS, 1997).

2.2 Suporte de imobilização

Foi utilizado como suporte o bagaço de cana-de-

açúcar, moído e selecionadas as partículas de tamanho inferior ou igual a 20 mesh, para aumentar a relação superfície / volume. O bagaço foi tratado com uma solução de hidróxido de sódio e ativado com polietilenoamina (0,2% v/v).

2.3 Cultivo das Células de Leveduras para Imobilização

As leveduras foram repicadas do meio de conservação (GYMP) para 3,0 mL de caldo nutriente. O conteúdo de 3 tubos serviram de inóculo para 100 mL do meio nutritivo. O cultivo foi conduzido em frascos Erlenmeyers de 500 mL de capacidade sob agitação (160 rpm) a 30°C por 16 horas. O meio foi centrifugado e as células recuperadas foram lavadas e quantificadas a massa celular.

2.4 Meio para imobilização das células

Empregou-se o meio sintético (glicose 10,0 g/L; extrato de levedura 5,0g/L; fosfato de sódio monobásico monohidratado 2,0g/L); esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os frascos Erlenmeyers de 300 mL de capacidade e contendo 100 mL de meio foram inoculados com células de leveduras.

2.5 Imobilização de Células de Leveduras

O suporte ativado foi testado quanto à capacidade de retenção das células de levedura. O sistema foi composto de 100 mL de meio de cultura para 1,0 g de suporte (massa seca tratada e ativada) e 20,0 mg de massa celular (massa seca), em frasco Erlenmeyer de 300 mL de capacidade. Na ocasião foram efetuados os testes controles (frascos somente com células ou com suporte). Os frascos foram agitados a 80 rpm, a 30°C por 24 horas. A biomassa imobilizada foi recuperada por filtração a vácuo e quantificada.

2.6 Atividade da Invertase em Células Livres ou Imobilizadas

As células (0,5 mg de massa seca / mL da suspensão de células ou do sistema células imobilizadas/suporte) foram incubadas em solução tamponada de fluoreto de sódio 50 mM (SILVEIRA et al., 1996). O ensaio de atividade teve início com adição de 4 mL da solução de sacarose 300 mM (Sigma) em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,5. O sistema foi incubado a 30°C. Para interromper a reação enzimática o volume de 1,0 mL do meio reacional foi imediatamente centrifugado (8000 rpm) por dois minutos em tubo Eppendorff (centrifuga microfuge 12). A concentração de glicose foi determinada no aparelho Biochemistry Analyzer (YSI Bioanalytical). Uma unidade de atividade da invertase foi definida como sendo capaz de produzir 1 mol de glicose / min/ mL do meio reacional.

2.7 Dosagem de Glicídeos

A glicose foi quantificada no aparelho Biochemistry Analyzer (YSI BIOANALYTICAL). Na análise enzimática da glicose foram utilizados o tampão YSI 2367, o padrão de glicose YSI 2356 e as

condições de análise, conforme descrito no catálogo da YSI Bioanalytical.

2.8 Determinações Analíticas do Processo de Imobilização

A concentração de células livres no meio de cultivo foi determinada através da leitura da densidade óptica e correlacionada com a massa seca de células por meio de uma curva de calibração. A quantidade de células imobilizadas no suporte foi determinada por diferença da massa seca do suporte antes e depois do contato com as células no meio de cultivo. A pesagem em ambos casos foi feita em balança equipada com lâmpada de infravermelho (LJ16 Moisture Analyzer). O cálculo da eficiência de imobilização (%) foi efetuado pela equação 1:

$$(\%) = mf / mt \times 100$$

mf = massa seca de levedura fixada no suporte; mt = massa seca de levedura no processo (livres + imobilizada).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade invertase em células livres de leveduras

A invertase da fração periplasma é glicosilada e encontra-se associada à parede celular da levedura. Catalisa a inversão da sacarose produzindo glicose e frutose. A grande dificuldade de separar a fração protéica da parede celular propõe a utilização das células intactas de levedura, na determinação da atividade invertase.

Tabela 3.1 Atividade da invertase nas leveduras.

Linagem de levedura	Atividade invertase (U/mg de células)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	50.6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CB-IX	110.0

Os valores representam a média de três experimentos:

ATCC American Type Culture Collection, Estados Unidos
CB Centro Biotecnologia, FAENQUIL, S.Paulo.

Nas células de leveduras a síntese da invertase é controlada por uma família de genes SUC, que expressam a síntese da invertase para a hidrólise da sacarose. A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX, a ocorrência de ter sido isolada de matéria-prima sacarínea como melão diluído de cana-de-açúcar, provavelmente, contribuiu para os níveis de atividade invertase de 110 U/mg. Portanto, a linhagem de procedência da coleção de cultura American Type Culture Collection (ATCC) apresentou atividade de 50.6 U/mg de células (peso seco).

3.2 Comparação da eficiência de imobilização das células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *S. cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana-de-açúcar.

Foram realizados testes com o objetivo de determinar as concentrações de células e do suporte ativado (peso seco) ideal para um maior rendimento de imobilização (dados não apresentados no trabalho). Tal objetivo foi alcançado variando-se a concentração celular ou do suporte. O melhor rendimento de imobilização foi alcançado na relação de 1,0 grama de suporte para 0,02g de massa seca de levedura.

Tabela 3.2 Comparação da eficiência de retenção das células *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX e *S. cerevisiae* ATCC 9763, em suporte de bagaço de cana-de-açúcar.

Parâmetros	<i>S. cerevisiae</i> CB-IX	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763
Células imobilizadas (gramas)	0.20	0.09
Células livres (gramas)	0.44	4.51
Células totais (gramas)	0.64	4.60
Rendimento de imobilização (%)	31.67	2.10

No sistema de imobilização com a levedura osmotolerante, a relação de células livres para imobilizadas foi de 2.2 :1.0, no entanto, na linhagem *S. cerevisiae* ATCC 9763 esse índice foi de 50:1. A técnica de ativação do bagaço proporcionou condições favoráveis para a imobilização da *S. cerevisiae* CB-IX, com rendimento de 31.67%, entretanto, não foi eficiente para a imobilização da *S. cerevisiae* ATCC 9763 (2.10%), sugerindo, que a levedura osmotolerante tem afinidade pelo suporte tratado e ativado. O tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com solução de hidróxido de sódio faz com que os radicais hidroxilas presentes no bagaço sejam ativados, enquanto que, o polietilenoamina ativa os radicais amins, aumentando dessa maneira, a interação entre os radicais da parede celular da levedura osmotolerante e do bagaço de cana-de-açúcar tratado. A aplicação da solução de soda destrói o citoplasma das células, que compõe o bagaço, deixando o espaço livre para que as células de levedura fixem-se ao suporte. A figura 3.2 mostra-nos a parede celular do bagaço de cana-de-açúcar, composto por celulose, e células de

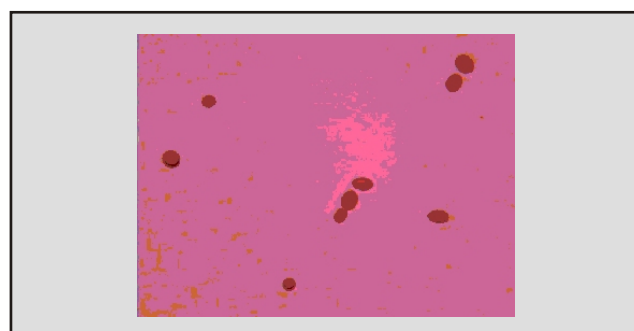


Figura 3.1 Células livres de levedura *S. cerevisiae* CB-IX

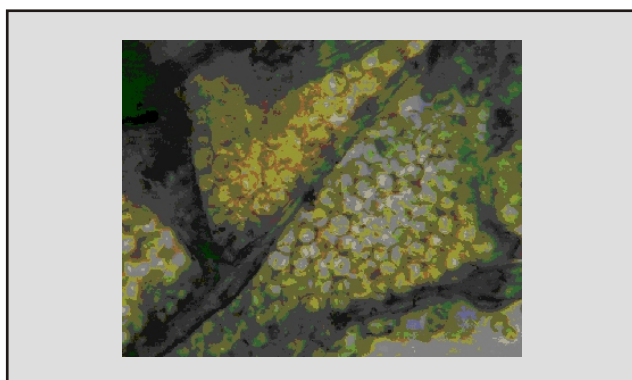


Figura 3.2 Células de *S. cerevisiae* CB-IX imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar tratado e ativado com polietilenoamina.

levedura dentro do citoplasma celular, sem nenhum interstício. As células livres de levedura apresentam uma morfologia típica de microrganismo unicelular apresentando algumas células gemulando (figura 3.1).

3.3- Atividade invertase das leveduras *S. cerevisiae* CB-IX e *S. cerevisiae* ATCC 9763 imobilizadas em matriz sólida.

O valor encontrado para atividade invertase de células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX foi de 16,4 U/mg de células, sendo este valor compatível com a eficiência de imobilização das células, indicando que o suporte é inerte à ação catalítica da invertase. Como a eficiência de retenção de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana-de-açúcar foi muito baixa (2.1%), não foi possível determinar a atividade invertase das células imobilizadas.

Tabela 3.3 Comparação da atividade invertase em células livres e imobilizadas

Linhagem de Leveduras	Atividade Invertase (U/ mg de células)		Eficiência de Imobilização (%)
	Células Livres	Imobilizadas	
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> CB-IX	110.0	16.4	31.67
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	50.6	ND	2.10

ND = não determinado.

A eficiência de imobilização da linhagem com propriedade osmotolerante ou quando comparada com a eficiência da linhagem padrão, sugere, que as características específicas da linhagem contribuíram para uma imobilização mais eficiente das células em suportes sólidos, como o bagaço de cana-de-açúcar tratado.

4. REFERÊNCIAS

ATLAS, R. M. Handbook of microbiological media. Editora Lawrence C. Parks, p.1047, 2º ed., 1997.

MELO, J.S.;KUBAL, B.S.;D`SOUZA, S.F. Production of inverted sucrose syrup using yeast cells adhered to polyethylenimine treated cotton threads. Food Biotechnol., 6:175-186, 1992.

ORLANDO, F.;J.CARMELO, Q.A.C.;PEXE, C.A.;GLORIA, A.M. Adubação de soqueira de cana-de-açúcar sob dois tipos de despalha: cana crua x cana queimada STAB, 12:7-11, 1994.

SANTANA, J.; SOUZA, S.O. Subproduto da cana-de-açúcar. Informe Agropecuário, 10:22-26, 1984.

SILVEIRA, M.C.F.; CARVAJAL, E.; BOM, E.P.S. Assay for in vivo invertase using NaF. Anal. Biochem., 238:26-28, 1996

ZÁRATE, V.E.; BELDA, F. Characterization of the heterologous invertase produced by *Schizosaccharomyces pombe* from the SUC2 gene *Saccharomyces cerevisiae*. J. Appl. Biotechnol. 80: 45-52, 1996.

5. AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem à FAPESP pelo incentivo financeiro proporcionado a essa pesquisa.