



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA

LAISY DANIELLA ALVES SANTOS

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR DUAS LINHAGENS DE
LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTOS DE PALMEIRAS**

Palmas- TO

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA

LAISY DANIELLA ALVES SANTOS

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR DUAS LINHAGENS DE
LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTOS DE PALMEIRAS.**

Dissertação apresentado a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Agroenergia da Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agroenergia. (Linha de pesquisa: Processos e obtenção de biocombustíveis e avaliação de aproveitamento de seus resíduos). Orientadora: Prof^a Dr^a Solange Cristina Carreiro

Palmas- TO

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA

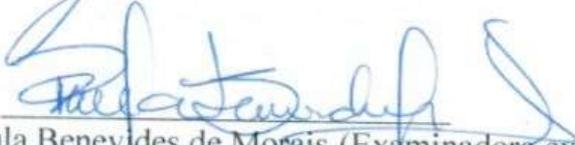
**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR DUAS LINHAGENS DE
LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTOS DE PALMEIRAS.**

Data da defesa: 29/07/2017

Banca Examinadora:


Prof.^a. Dr.^a. Solange Cristina Carreiro (Presidente da comissão)


Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda (examinador interno)


Prof.^a. Dr.^a. Paula Benevides de Moraes (Examinadora externa)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

S237a SANTOS, LAISY DANIELLA ALVES .
AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR DUAS
LINHAGENS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTOS DE PALMEIRAS. /
LAISY DANIELLA ALVES SANTOS. – Palmas, TO, 2017.

51 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em
Agroenergia, 2017.

Orientadora : Solange Cristina Carreiro

1. Indutores enzimáticos. 2. CMCase. 3. FPase. 4. Avicelase. I. Título

CDD 333.7

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

“Não é sobre ter todas as pessoas do mundo para si. É sobre saber que em algum lugar alguém zela por ti. É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz. É sobre dançar na chuva de vida que cai sobre nós”.

Começo meus agradecimentos com o trecho dessa música, Trem bala, que diz que na vida não precisamos de muitos, mas sim de bons amigos. É tão gratificante chegar ao fim do mestrado e ter a quem agradecer, ter a quem dizer MEU MUITO OBRIGADA.

Agradeço, a Deus e a Nossa Senhora por me permitir viver essa experiência que foi mágica. Por me doar seu amor, sua tranquilidade, seu afeto, por todo dia me cobrir com seu manto sagrado.

A você MÃE, não tenho palavras para te agradecer. Fiz tudo por você e para você. Muito obrigada, por se abdicar da sua vida, para que eu pudesse viver a minha. Muito obrigada por cada palavra, por cada abraço, por cada puxão de orelha. Te amo incondicionalmente.

Aos meus irmãos, Lara Camilla, Geraldo Aurélio e Louise Regina. Meu muito obrigado, por cada palavra dada, por cada gesto de ajuda. Bah, você foi fundamental nessa etapa da minha vida, muito obrigada por tudo que você fez e faz por mim.

Ao meu amor e noivo, palavras não seriam suficiente para descrever o meu sincero agradecimento nessa etapa da minha vida, muito obrigada por me aturar (nem eu estava me aguentando...rsrs), obrigada por segurar a barra, meus estresses, minha falta de tempo para você. Obrigada por estar mais uma vez ao meu lado. Te amo.

A minha família, tios, tias, primos e primas, em especial a Tia Marlene, Tia Rai, Gi, Ana Luísa, Antônio e Gizely. Por sempre, estarem ao meu lado, me apoiando e me dando amor.

Quero agradecer em especial à vocês Su, Joaquim, Rangel (in memória) e Lorena. Sem vocês meu sonho não seria concretizado. Su, Jocas e Rangel muito, muito, muito obrigada por me acolher na casa de vocês e me receber com tanto amor e carinho, obrigada por cada palavra, por cada abraço, por cada copo de cerveja (rsrs) em momentos de estresses. Lo, muito obrigada por cada gasolina gasta comigo, por cada tempo que você tirou da sua vida para está comigo incansáveis vezes na UFT (contando meus bichinhos). Vocês têm meu amor e gratidão.

Aos meus amigos de mestrado, em especial, ao Filipe Alves, Daysi Parente, Mirian das Mercês e Deny Alves muito obrigada por tudo que vocês fizeram por mim. Obrigada por cada tempo gasto comigo me ajudando, sempre com muita paciência e amor. Amo vocês, quero levar para sempre comigo.

Aos meus amigos da vida por terem acreditado em mim e me ajudaram com orações, com palavras de superação. As minhas Las Comadres, obrigada por tudo. Karlinha, obrigada amiga pelo seu apoio.

As minhas comadres Wandrielle e Cris e aos meus afilhados Miguel e Geovanna pelos momentos de descontração, meu muito obrigada.

A família CEM Taquaralto pelo incentivo e apoio sempre que precisei me ausentar, em especial, ao Diretor Adolfo, aos meus amigos Vitor, Juliana, Poly, Simone, Eliana e Erotides.

Aos meus colegas de Laboratório, Carla, Paulo Henrique, Eduardo e Ariadna. Meu muito obrigada por tudo, vocês foram essenciais para a finalização do meu sonho.

Aos laboratórios dos professores Waldessé, Paula Benevite e Emerson Guarda por sempre estarem de portas abertas para a realização da minha pesquisa. Em especial, a Cris, Márcia e Gizely por sempre estarem disposta a ajudar.

Aos professores Paula Benevite, Emerson Guarda e Thiago Lucas por aceitarem meu convite para a banca.

A Capes, que me permitiu a viver esse sonho com seu auxílio e apoio.

E por último, MUITO OBRIGADA vai para uma pessoa maravilhosa que foi mãe por muitas vezes, que me apoio, me incentivou, puxou minha orelha quando precisou, acreditou em mim, a você Professora Solange Cristina palavras não seriam suficiente para agradecer meu eterno carinho e admiração.

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. OBJETIVOS..... | 19 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 19 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 19 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 20 |
| 3.1. Enzimas..... | 20 |
| 3.2. Aplicações industriais das enzima | 21 |
| 3.3. Celulases | 22 |
| 3.4. Microrganismos produtores de celulases | 24 |
| 3.5. Fatores que afetam a produção de celulases | 26 |
| REFERÊNCIAS | 28 |
| ARTIGO | 33 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados no DCCR 2², determinação de temperatura e pH ótimos para as células produzidas pelas linhagens T194 e I1236.....31

Tabela 2. Atividade celulásica das Linhagens T194 e I1236 em diferentes fontes de carbono, após 24 horas de incubação.....33

Tabela 3. Valores reais e codificados para as atividades celulásicas (U. mL⁻¹) obtidos para a linhagem T194.....34

Tabela 4. Valores reais e codificados para as atividades celulásicas (U. mL⁻¹) obtidos para a linhagem I1236.....35

LISTA DE FIGURAS

REFERÊNCIAL TEÓRICO

Figura 1. Ação do complexo das celulasas.....20

ARTIGO

Figura 1. Atividade Celulásica da Linhagem T194 ao Longo do Tempo em meio contendo CMC.....32

Figura 2. Atividade Celulásica da Linhagem I1236 ao Longo do Tempo em meio contendo CMC.....33

Figura 3. Diagrama de pareto mostrando os efeitos animados do pH e temperatura na produção de CMCase (a), FPase (b) e Avicelase (c) para a linhagem T194.....37

Figura 4. Superfície de resposta para a atividade de CMCCase e FPase em função do pH e temperatura para a linhagem T19437

Figura 5. Superfície de resposta para a atividade de Avicelase em função do pH , temperatura para a linhagem T194.....38

Figura 6. Diagrama de pareto mostrando os efeitos estimados do pH e temperatura na produção de CMCCase (a), FPase (b) e Avicelase (c) para a linhagem I1236.....39

Figura 7. Superfície de resposta para a atividade de FPase e Avicelase em função do pH e temperatura para a linhagem I1236.....39

Figura 8. Estabilidade ao pH em relação a atividade residual (%) para a linha T194.....40

Figura 9. Estabilidade ao pH em relação a atividade relativa (%) para a linhagem I123.....41

Figura 10. Termoestabilidade das células produzidas pela linhagem T194 após 60 Minutos de estabilidade.....41

Figura 11. Termoestabilidade das células produzidas pela linhagem T194 após 60 Minutos de estabilidade.....42

RESUMO

Laisy Daniella Alves Santos. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR DUAS LINHAGENS DE LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTOS DE PALMEIRAS.

A demanda pelo consumo industrial das celulases tem aumentado em função do seu uso em diversos setores de suprimento, como setor alimentício, farmacêutico e usinas de álcool. Neste sentido, a busca por alternativas que potencializam a produção de celulases é de suma importância, tendo em vista a variedade de fontes disponíveis. O objetivo deste trabalho foi quantificar as celulases produzidas por duas linhagens de leveduras, além de avaliar o efeito da adição de monossacarídeos e dissacarídeos no meio de cultivo para a produção das enzimas e caracterizar parcialmente o extrato bruto enzimático. A produção das celulases foi feita em cultivo submerso em cinco meios contendo 5 g.L⁻¹ de carboximetilcelulose (CMC), arabinose, celobiose, glicose e/ou lactose. Os ensaios foram conduzidos a 40°C a 150 rpm durante 96 horas. No meio com CMC a maior atividade celulásica para a linhagem T194 foi de 0,056 U. mL⁻¹ para CMCCase, 0,063 U. mL⁻¹ para FPase e 0,096 U. mL⁻¹ para exoglucanase. Com o acréscimo dos indutores os valores máximos de atividades obtidos foram de 0,632 U. mL⁻¹ para CMCCase, 0,646 U. mL⁻¹ para FPase e 0,604 U. mL⁻¹ para exoglucanase no meio com arabinose. Para a linhagem I1236 no meio com CMC a maior atividade celulásica foi de 0,023 U. mL⁻¹ para CMCCase, 0,010 U. mL⁻¹ para FPase e 0,003 U. mL⁻¹ para exoglucanase. Com a adição de indutores os valores máximos de atividades obtidos foram de 0,619 U. mL⁻¹ para CMCCase, 0,514 U. mL⁻¹ para FPase e 0,427 U. mL⁻¹ exoglucanase, todos no meio com arabinose. A caracterização parcial da enzima bruta produzida por ambas as linhagens mostrou influência significativa do pH e da temperatura para FPase e Avicelase, mas não para a linhagem I1236. A faixa de pH ótimo encontrada foi de 5 a 6 para a linhagem T194 e de 4 a 6 para a linhagem I1236 e a faixa de temperatura ótima foi de 50 a 58°C para ambas as linhagens para as três enzimas estudadas. As celulases produzidas pela linhagem T194 apresentaram estabilidades superior a 70% na faixa de pH entre 7 e 8 e acima de 80% na faixa de temperatura entre 45 a 58°C. Para as celulases produzidas pela linhagem I1236 houve estabilidade em torno de 65% para a Avicelase e 80% para CMCCase e FPase em pH 6 e a estabilidade térmica foi superior a 80% entre 55 e 65°C para as três enzimas estudadas.

Palavras-chaves: indutores enzimáticos. CMCCase, FPase, Avicelase.

ABSTRACT

Laisy Daniella Alves Santos. EVALUATION OF CELL PRODUCTION BY TWO STRAINS OF ISOLATED YEAST OF PALM TREE FRUITS.

The demand for industrial consumption of cellulases has increased due to its use in several sectors of supply. In this sense, the search for alternatives that potentiate the production of cellulases is of paramount importance, given the variety of sources available. The objective of this work was to quantify the cellulases produced by two strains of yeast, besides evaluating the effect of the addition of monosaccharides and disaccharides in the culture means the production of the enzymes and to partially characterize the brute enzymatic extract. Cellulase production was done in culture submerged in five means containing 5 g.L⁻¹ of carboxymethylcellulose (CMC), arabinose, cellobiose, glucose and / or lactose. The tests were conducted at 40 ° C at 150 rpm for 96 hours. In the means with CMC the highest cellulase activity for the T194 lineage was 0.056 U. mL⁻¹ for CMCase, 0.063 U. mL⁻¹ for FPase and 0.096 U. mL⁻¹ for exoglucanase. With the increase of the inducers, the maximum activity values obtained were 0.632 U. mL⁻¹ for CMCase in the means with arabinose, 0.646 U. mL⁻¹ for FPase in the means with arabinose and 0.604 U. mL⁻¹ for exoglucanase, all in the means with arabinose. For the I1236 line in the CMC means the highest cellulase activity was 0.023 U. mL⁻¹ for CMCase, 0.010 U. mL⁻¹ for FPase and 0.003 U. mL⁻¹ for exoglucanase. For the I1236 line in the CMC medium the highest cellulase activity was 0.023 U. mL⁻¹ for CMCase, 0.010 U. mL⁻¹ for FPase and 0.003 U. mL⁻¹ for exoglucanase. With the addition of inducers, the maximum activity values obtained were 0.619 U. mL⁻¹ for CMCase, 0.514 U. mL⁻¹ for FPase and 0.427 U. mL⁻¹ exoglucanase, all in the medium with arabinose. The partial characterization of the brute enzyme produced by both strains showed significant influence of pH and temperature for FPase and Avicellase and for I1236 only the CMCase activity had no significant difference. The optimum pH range was 5 to 6 for the T194 line and 4 to 6 for the I1236 line and the optimum temperature range was 50 to 58°C for both lineages for the three enzymes studied. The cellulases produced by the T194 line presented stabilities higher than 70% in the pH range between 7 and 8 and above 80% in the temperature range between 45 and 58°C. For the cellulases produced by strain I1236 there was stability around 65% for Avicelase and 80% for CMCase and FPase at pH 6 and the thermal stability was higher than 80% between 55 and 65°C for the three enzymes studied.

Key words: enzymatic inducers, CMCase, Fpase, Avicelase.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

| | |
|--------------------------------|--|
| ANOVA | Análise de Varincia |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| CBH I | Celobiohidrolases I |
| CBH II | Celobiohidrolases II |
| C-C | Ligaoo carbono- carbono |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| CMC-A | Carboximetilcelulose- Arabinose |
| CMCase | Carboximetilcelulase |
| CMC-C | Carboximetilcelulose- Celbiose |
| CMC-G | Carboximetilcelulose- Glicose |
| CMC-L | Carboximetilcelulose- Lactose |
| C-N | Ligaoo carbono- nitrogênio |
| C-O | Ligaoo carbono- oxignio |
| C-S | Ligaoo carbono- enxofre |
| CU ²⁺ | Cobre |
| DCCR | Delineamento Composto Central Rotacional |
| DNS | (cido) Dinitrosalicílico |
| EEB | Extrato Bruto enzimático |
| FES | Fermentaoo em estado sólido |
| FPase | Papel filtro hidrolases |
| FS | Fermentaoo submersa |
| Hg ²⁺ | Mercúrio |
| K ₂ PO ₄ | Potassium hydrogen phosphate |
| NaNO ₃ | Nitrato de sódio |
| UFT | Universidade Federal do Tocantins |
| Zn ²⁺ | Zinco |

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores, ou seja, catalisadores biológicos com características e funções primordiais para a subsistência de qualquer célula viva, o que as torna fortemente requisitadas para aplicações em setores industriais. As enzimas são altamente específicas, capazes de agir como catalisadoras de apenas uma reação, podendo atuar nas reações de fragmentação, ligação e reestruturação de moléculas (LEHNINGER et al., 2014; KOBLITZ 2010; MARZZOCO e TORRES, 2007).

Enzimas estão envolvidas em processos naturais como produção de energia, processamento de nutrientes, além de regular diferentes funções metabólicas. A aplicabilidade das enzimas está nos mais variados setores industriais, incluindo na área alimentar para conservação dos alimentos; na área farmacêutica, na manipulação de medicamentos; na área agroindustrial na produção e manutenção do ambiente. Além de serem catalisadores biológicos mais eficientes e específicos que os catalisadores químicos, são ecologicamente corretas por não formarem resíduos tóxicos nem para o ambiente e nem para os produtos (NASCIMENTO et al, 2002).

O uso de microrganismos na produção de enzimas tem destaques positivos como a facilidade de manipulação dos microrganismos, o baixo custo de produção das enzimas, pela diversidade microbiana, pelas enzimas serem biodegradáveis e por atuarem em diversas condições de pH, temperatura e concentrações de indutores (PANDEY et al., 2000).

Um grupo de enzimas que apresenta inúmeras aplicações são as celulasas, que são enzimas hidrolíticas, que rompem as ligações glicosídicas β -1,4 da celulose, ocasionando a liberação de unidades de glicose e oligossacarídeos (BERLIN et al., 2007 e KOBLITZ, 2010).

A produção de celulasas está relacionada com fungos filamentosos e bactérias, porém estudos relatam a importância do uso das leveduras na produção das celulasas tendo algumas vantagens quando comparadas aos fungos filamentosos, como a possibilidade de manipulação desses microrganismos produtores de enzimas e o tempo de produção ser mais rápido (SILVA, 2011 e REED, 1997).

As pesquisas, tanto aplicada quanto básica, relacionadas à produção de celulasas microbianas revelam não somente o conhecimento científico como também a sua potencialidade na biotecnologia. A extensa aplicação das celulasas em diferentes segmentos na indústria e a

grande procura por essas enzimas tem sido o ponto central de pesquisas voltadas ao seu uso, principalmente na procura por microrganismos que são capazes de produzir celulasas.

Portanto, esse estudo se justifica pela possibilidade dessas leveduras pouco estudadas apresentarem potencial enzimático que possa representar possibilidades de aplicação futura visando à produção de enzimas de interesse.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de celulases por duas linhagens de leveduras isoladas de frutos dos cocos de tucum (*Bactris setosa*) e inajá (*Maximiliana maripa*) e caracterizar as enzimas brutas produzidas.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de endoglucanase, exoglucanase e celulase total pelas linhagens de leveduras usando cultivo submerso;
- Avaliar o efeito de monossacarídeos (glicose e arabinose) e dissacarídeos (lactose e celobiose) como indutores no meio de produção das celulases;
- Determinar pH e temperatura ótimos para a atividade das enzimas produzidas através da análise de superfície de resposta;
- Determinar a estabilidade térmica e ao pH das enzimas brutas produzidas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Enzimas

As enzimas são proteínas específicas que catalisam reações químicas em processos biológicos especiais. Segundo Koblitz (2010) as enzimas são catalisadores biológicos que operam em pequena quantidade e podem ser recuperadas, dependendo das condições dos tratamentos aplicados. Agem no sistema metabólico dos seres vivos, na decomposição de matéria orgânica e na deterioração dos alimentos. Ainda, as enzimas aceleram as reações tornando bastante viáveis alguns processos biotecnológicos (LEHNINGER et al., 2014).

Uma vez que são proteínas, a sua atividade catalítica necessita da integridade na conformação proteica nativa, pois quando uma enzima sofre desnaturação ou é quebrada em aminoácidos, sua atividade catalítica é inativada. Portanto, a estrutura tridimensional é essencial para a manutenção da atividade catalítica. Algumas enzimas necessitam a participação de moléculas menores e orgânicas (co-enzimas) ou íons (co-fatores) para a efetiva catálise enzimática. A catálise enzimática é essencial para os sistemas vivos, pois, quando não há a catálise enzimática, o sistema biológico funciona de forma lenta. Por isso, o complexo enzima-substrato é tão fundamental para a ação das enzimas (SANT'ANNA JR., 2011; LEHNINGER et al., 2014).

As enzimas estão envolvidas tanto em processos naturais, como a produção de energia, quanto em processos industriais, como em processamento de nutrientes, na manipulação de medicamentos e na preservação de alimentos. Das inúmeras enzimas conhecidas, a sua maioria tem aplicação industrial, sendo que 75% delas são hidrolases (COURI et al., 2008; SPANAMBERG et al., 2004).

De acordo, com suas funções e segundo as normas estabelecidas pela NC-IUBMB (*Nomenclature Committe of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), as enzimas podem ser subdivididas em 6 classes:

1. Oxidorredutases: são enzimas que catalisam reações de oxidação-redução com transferências de elétrons, sendo importantes para os alimentos, pois alteram cor, aroma, sabor e valor nutricional, não sendo uma vantagem desejada.
2. Transferases: são enzimas que transferem grupos funcionais como fosfato, amina, carboxil.
3. Hidrolases: são enzimas que catalisam a quebra de ligação covalente, como proteases, lipases, amilases, celulasas.
4. Liases: são enzimas que agem na formação de duplas ligações pela remoção de grupos.

5. Isomerases: são enzimas que catalisam reação de modificação por transferência de grupos dentro de uma molécula.
6. Ligases: são enzimas que catalisam reação na síntese de uma nova molécula por meio de formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N usando energia na condensação acoplada a clivagem de ATP.

3.2 Aplicação industrial das enzimas

O uso de enzimas na indústria indica vantagens em relação ao uso de catalisadores inorgânicos, como ácidos, bases, metais e óxidos metálicos. Além de serem biodegradáveis, apresentam alto grau de especificidade das reações que catalisam, efetuando conversões eficientes e econômicas, e podem atuar em concentrações baixas, sob condições brandas de pH e temperatura (SILVA, 2011; NASCIMENTO et al, 2002).

As enzimas podem ser aplicadas nas áreas alimentícia e de ração animal, agricultura, papel, têxtil e couro, detergentes, produtos químicos e produção de biocombustíveis. A enzima comercializada é aquela que assegura a aquisição do produto final que possua melhor qualidade que o produto inicial, e a melhoria na qualidade do novo produto pode reduzir seu custo de produção (CASTRO e PEREIRA JUNIOR, 2010).

Na área alimentícia, a utilização de enzimas envolve a seleção de enzimas que sejam apropriadas a converter o substrato em moléculas-alvo. As enzimas na indústria de alimentos são empregadas na produção de bebidas, na fabricação de laticínios, na panificação, na produção de xaropes, extração de óleo de oliva, clarificação de sucos e vinhos, maceração de polpas, separação de óleos e gorduras (McCARTHY et al, 2005; VITOLLO, 2001; COURI et al, 2008; KOBLITZ 2010; COELHO et al ,2001).

As amilases são utilizadas na produção de pães; as celulasas, β -glicanases, α -amilases, peptidases e amilases maltogênicas são empregadas na produção, clarificação, liquefação e suplementação da cerveja; a renina e protease são usadas na produção de queijos; as pectinases são usadas na clarificação de sucos e vinhos, fermentação do cacau, extração de óleos e na maceração de polpas (McCARTHY et al 2005; VITOLLO, 2001; COURI et al, 2008; KOBLITZ 2010; COELHO et al ,2001).

Na ração animal as enzimas estão envolvidas na remoção ou destruição de fatores antinutricionais, no potencial da ação das enzimas endógenas, e na diminuição da poluição

ambiental causada pelas fezes (McCARTHY et al 2005; VITOLO, 2001; COURI et al, 2008; KOBLITZ 2010; COELHO et al., 2001).

Na agricultura, são utilizados para aprimoramento em resíduos agrícolas, buscando a recuperação desses resíduos para minimizar os impactos ambientais causados por eles. Os principais resíduos vindos dos bioprocessos são de natureza lignocelulósica, cuja utilização destina-se a produção de biomassa microbiana e enzimática na produção de rações e biocombustíveis (BONILLA, 2013).

Na indústria de papel e celulose, são aplicadas diversas enzimas, como celulasas, amilases e proteases. A indústria de detergentes utiliza lipases, proteases e amilases, com a finalidade de remoção de resíduos de gorduras (AHELE, 2007; ORLANDELLI et al., 2012).

3.3 Celulasas

Celulasas são enzimas hidrolíticas que realizam a hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 da celulose, ocasionando a liberação de unidades de glicose e oligossacarídeos. Estas enzimas são catalisadores altamente específicos que operam em sinergia para a liberação de açúcares, geralmente determinada pela quantificação de açúcares redutores liberados durante a hidrólise da celulose pura ou de derivados de celulose, dos quais glicose é a que tem maior vantagem industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (DASHTBAN et al., 2010; VITOLO, 2011; KOBLITZ, 2010; OGEDA e PETRI, 2010).

As celulasas estão entre as enzimas hidrolíticas mais importantes para os processos biotecnológicos ocupando atualmente o terceiro lugar entre as enzimas industriais, sendo a que mais movimentam o mercado nacional e internacional, especialmente por atuarem de forma efetiva na liberação de açúcares redutores que estão presentes no material lignocelulósico. Atuam também na extração de óleos e clarificação de sucos, na produção de papel e tecidos, no processamento de algodão, como enzima detergente, e como aditivo para a alimentação animal e são amplamente estudadas na produção de etanol de segunda geração, onde elas atuam na hidrólise da biomassa lignocelulósica, quebrando moléculas grandes em moléculas menores para a produção de etanol (WILSON, 2009; SHAFIQUE et al., 2004; KUBICEK et al., 2009).

As celulasas são classificadas, de acordo com o sítio de atuação na celulose, em três grupos: endoglucanases, exoglucanase (celobio-hidrolases) e β - glicosidases.

As endoglucanases (1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase) são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose e pela rápida solubilização de polímeros celulósicos. Atuando nas ligações internas na fibra da celulose, rompem a celulose de forma aleatória liberando oligossacarídeos β - 1,4 de diversos graus de polimerização, tendo uma extremidade redutora e outra não redutora. A carboximetilcelulose (CMC) é o principal substrato de atividade dessas enzimas (CASTRO e PEREIRA JUNIOR, 2010; RANSOM e STICKLEN, 2009; BORTOLAZZO, 2011; OGEDA e PETRI, 2010).

As avicelases (exo-1,4- β -D-glucanases) agem nas ligações externas da celulose, rompendo a celulose na extremidade e liberando glicose e celobiose. As avicelases são divididas em dois grupos: tipo I (CBH I) que atuam na extremidade redutora, e as do tipo II (CBH II) que atuam na extremidade não redutora. As avicelases sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose (CASTRO e PEREIRA JUNIOR, 2010; RANSOM e STICKLEN, 2009; BORTOLAZZO, 2011; OGEDA e PETRI, 2010).

As β -glicosidases ou celobiasas (β - glicosídeo gluco-hidrolases) são enzimas que agem na hidrólise da celobiose e oligossacarídeos em glicose, e sofrem inibição pelo seu próprio produto de hidrólise, a glicose. As β -glicosidases podem ser utilizadas em processos industriais, como na produção de etanol de segunda geração e no melhoramento de alimentos já existentes no mercado (CASTRO e PEREIRA JUNIOR, 2010; RANSOM e STICKLEN, 2009; BORTOLAZZO, 2011; OGEDA e PETRI, 2010).

O complexo enzimático das celulasas quando atua em conjunto apresenta melhor rendimento do que atuando de forma individual, processo chamado de sinergia, onde a primeira hidrólise acontece na superfície dos substratos sólidos liberando os açúcares solúveis. A segunda hidrólise acontece com a quebra de oligossacarídeos em celobiose e a terceira hidrólise acontece com a ruptura da celobiose em glicose (KOBBLITZ, 2010; CASTRO e PEREIRA JR., 2010; MILAGRES e FERRAZ, 2011).

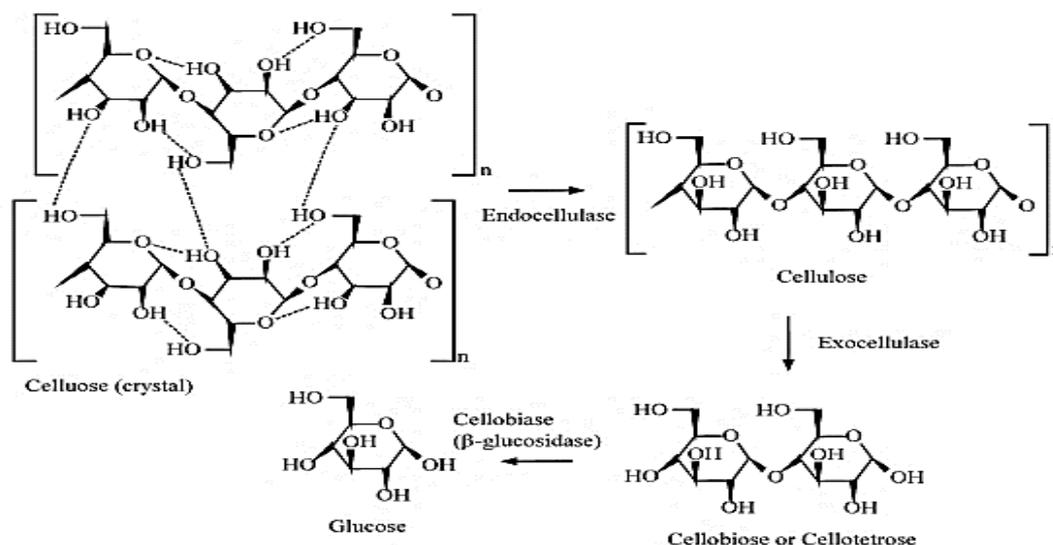


Figura 1. Ação do complexo das celulasas. Fonte: Karmakar & Ray (2011).

3.4 Microrganismos produtores de celulase

As enzimas podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana. Entre estas, as enzimas de origem microbiana vêm ganhando destaque, tendo em vista sua ampla aplicação na indústria têxtil, alimentícia, farmacêutica e na produção de etanol. As enzimas de origem microbiana possuem algumas vantagens, como menor tempo de produção, maior facilidade de manipulação genética dos microrganismos produtores, alto grau de purificação e maior especificidade e estabilidade nas aplicações industriais (SINGH, 2012).

A produção de celulasas por microrganismos está baseada em duas estratégias, que são a fermentação sólida (FES) e fermentação submersa (FS) sendo que o teor de água presente é o que diferencia um do outro. Na FES há ausência completa de água, já na FS a base é água. Algumas vantagens aponta maior uso da FS em relação à FES, como maior controle nos parâmetros físicos e químicos, maior absorção de nutrientes e excreção de metabólitos, menor risco de contaminação, menor tempo de produção e maiores rendimentos (SANT'ANNA JR. 2001; BON et al., 2008; CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

Para tornar a produção de enzimas mais competitiva, a utilização de substratos de baixo custo e de fácil acesso devem ser exploradas, além de avanços tecnológicos e da busca por novos microrganismos produtores (CARVALHO et al., 2013; POLIZELLI et al, 2005).

Apesar da produção de celulasas ser baseada principalmente em fungos filamentosos e bactérias, a utilização de leveduras para a produção de enzimas tem incentivado estudos sobre

a sua atividade. Alguns autores mostram o potencial de produção de celulases por leveduras (SPANAMBERG et al, 2004; LANDELL et al, 2006; BRIZZIO et al, 2007).

Silva et al (2011) estudou o potencial da atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau e apontou que de todas as enzimas estudadas, as celulases foram as que apresentaram o melhor resultado quantitativamente, sendo que das 70 leveduras analisadas 35 foram positivas para essa atividade.

Carvalho et al (2013) analisaram 307 linhagens de leveduras isoladas de diferentes solos em Minas Gerais e na região da Amazônia para a produção de celulases e xilanases, onde 18 (6%) foram positivas para a produção de celulases.

Peixoto (2006) estudou a produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil, analisou 390 linhagens de leveduras, 46% foram positivas para celulase.

Silva et al (2011) e Reed (1997) apontam algumas vantagens de se produzir celulases por leveduras quando comparadas aos fungos filamentosos, tais como a alcance de elevadas concentrações de enzima através da manipulação das linhagens, o ajuste nas condições de cultivo sendo de fácil e rápido acesso, a fermentação de ciclos curtos e de baixo custo, e a diversidade de enzimas que catalisam a mesma reação permitindo flexibilidade nas condições de uso. Outro fator interessante da utilização de leveduras nos processos de produção de enzimas é o fato as leveduras não demonstram propriedades patogênicas, o que facilita o seu ingresso na indústria (CRUZ et al., 2009).

As leveduras são importantes fontes de biomoléculas, como as enzimas, que são frequentemente utilizadas em aplicações industriais. As leveduras possuem grande capacidade de absorver compostos orgânicos, o que facilita a sua dissipação e invasão em diferentes nichos ecológicos (ROMO-SÁNCHEZ, 2010; CRUZ et al., 2009; TORTORA et al., 2012).

O surgimento de novas leveduras com maior potencial biotecnológico, bem como a sua correta classificação e caracterização são indispensáveis para que a diversidade desses microrganismos seja bem aplicada, tanto usada para a descoberta de novos métodos industriais não poluentes como no emprego da biorremediação, na produção de novos fármacos, ou ainda no uso da indústria alimentícia (ARAÚJO, 2015).

O estudo da biologia e da biodiversidade de leveduras é importante para a caracterização e a preservação de espécies, principalmente aquelas com potencial para aplicação biotecnológica (SCHWAN; CAMPOS; DIAS, 2008).

3.5 Fatores que afetam a produção de celulasas

As células dos microrganismos estão sujeitas a várias situações de estresse em relação ao meio de cultura, tanto sobre sua forma natural como em processamentos industriais. Nas leveduras, os impactos causados pelo estresse afetam sua estrutura celular, causando danos consideráveis na sua produção enzimática (SOUZA, 2009; MOREIRA et al., 2015; MARZZOCO e TORRES, 2007).

Fatores como pH, temperatura, concentração de indutores e presença de íons influenciam fortemente na produção enzimática, pois elas são altamente específicas sofrendo alterações na sua forma tridimensional. As enzimas possuem uma estrutura e um sítio ativo que podem ser afetadas por qualquer tipo de mudança na conformação da proteína, podendo desnaturar (MARZZOCO e TORRES, 2007).

A temperatura influencia diretamente na velocidade da reação enzimática e na ecologia e reações microbianas. A temperatura interfere em todos os aspectos de crescimento, de metabolismo, na viabilidade e na fermentação das leveduras. Em altas temperaturas a maioria das moléculas atinge seu estado de transição, podendo sofrer desnaturação, o que é um ponto negativo, pois as moléculas sofrem deformação na sua estrutura, ocasionando a perda da catálise (SOUZA, 2009; MOREIRA et al., 2015; MARZZOCO e TORRES, 2007).

O pH é um outro fator que está relacionando com a produção enzimática, pois atua não somente no crescimento celular como também no controle de contaminação bacteriana, na fermentação e na produção de subprodutos. As leveduras mantêm uma homeostase, o que as torna tolerantes em pHs ácidos, no entanto, valores baixos de pH deixam o meio agressivo, podendo afetar as proteínas do transporte extracelular (SOUZA, 2009; MOREIRA et al., 2015; MARZZOCO e TORRES, 2007).

Outro fator que pode influenciar positivamente ou negativamente, é a presença de íons que podem tanto inibir como estimular a produção de enzimas, entre os íons, estão o mercúrio (Hg^{+2}), cobre (Cu^{+2}), zinco (Zn^{+2}), que promovem a perda catalítica mesmo presente em concentrações baixas (CASTRO e PEREIRA JR., 2010).

Altas concentrações de indutores, ou seja, altas concentrações de açúcar induz um aumento na osmolaridade externa ocasionando a perda de crescimento e a taxa de viabilidade celular por sofrer alterações no gradiente osmótica da membrana plasmática, ocasionado à perda de volumes por diferentes pressões osmóticas extracelulares e intracelulares das células (SOUZA, 2009; MOREIRA et al., 2015; MARZZOCO e TORRES, 2007).

REFERÊNCIAS

- AHELE, W. *Enzymes in Industry: Production and Applications*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. 2007.
- ARAÚJO, M. A. M. *Isolamento e seleção de leveduras para a produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado*. (2015). Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, 2015, 68 p.
- BERLIN, A; MAXIMENKO, V; GILKES, N; SADDLER, J: Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, v.97, p. 287-296, 2007.
- BON, E. P. S.; GÍRIO F.; PEREIRA JR. N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: *Interciência*, 2008. p. 241-271.
- BONILLA, J, P. Importância biotecnológica de la microbiodiversidad. Los nuevos cazadores de micróbios. *Venezolana de Ciências y Tecnología de Alimentos*. p. 284-317. Diciembre, 2013.
- BORTOLAZZO, N. G., *Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola): Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. *Statistics for experimenters: design, innovation and discovery*. New Jersey: Wiley-Interscience, 2. ed. p. 633. 2005.
- BRIZZIO, S; TURCHETTI, B; GARCIA, V; LIBKIND, D; BUZZINI, P; VAN BROOCK, M. Extracelullar enzymatic activities of basidiomycetous yeast isolated from glacial and subglacial Waters of northwest Patagonia (Argentina). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 53, p.519-525, 2007.
- CARVALHO, F, P; SOUZA, A, C; GUEDES, K, T, M; DIAS, D; SILVA, C, F; SCHWAM, R, F. Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: study of the enzymatic activities. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7 (32), 4176e4190, 2013.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

- COELHO, M, A, Z.; LEITE, S, G.; FURTADO, M, F.; ROSA, A, A, L.; CEPPEA, B. Aproveitamento de Resíduos agroindustriais: Produção de enzimas a partir da casca de coco verde. Curitiba, *Revista Ciência e Tecnologia*. v.19, n. 1, p. 3342, 2001.
- COURI, S; PARK, Y; PASTORE, G; DOMINGOS, A. Enzimas na produção de alimentos e bebidas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 153-178.
- CRUZ, T.M.L.; COUTO F, M, M; FRANÇA, G, S; LARANJEIRA, D; NEVES, R, P. Atividade da celulase de leveduras isoladas de frutos de meloeiro. 2009. In: IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009, Recife. *IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão*, 2009.
- DASHTBAN, M.; MAKI, M.; LEUNG, K.T.; MAO, C.; QIN, W. Cellulase activities in biomass conversion: Measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 30, p. 302-309, 2010.
- KARMAKAR, M.; RAY, R.R. Current Trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology*, v 6, p 41-53, 2011.
- KOBLITZ, M, G, B. *Bioquímica dos alimentos: teoria e aplicações práticas*. (2010). Guanabara Koogan. ISBN 978-85-277-1384-9.
- KUBICEK C.P.; MIKUS, M.; SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M.; SEIBOTH, B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 2-19, p. 1-14, 2009.
- LANDELL, M, F; MAUTONE, J, N; VALENTE, P. Biodiversity of yeast associated with bromeliads in Itapuã Park, Viamão, RS. *Biociências*. Porto Alegre, v.14, p.144-149, 2006.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 2014.
- MARZZOCO, A; TORRES, B, B. *Bioquímica básica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- MCCARTHY, T, C; LALOR, E; HANNIFFY, O; SAVAGE, A, V; TUOHY, M, G. Comparison of wild type and UV- mutant β -glucanase – producing strains of *Talaromyces emersonii* with potential in brewing applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnonology*, Houndmills, v. 32, n.4, p.125-134, abr, 2005.

MILAGRES, A, M, F; CARVALHO, W; FERRAZ, A: Sugarcane breeding and selection for more eficiente biomass conversion in cellulosic etanol. In: BUCKERIDGE, M, S; GOLDMAN, G, H. eds., Routes to cellulosic etanol. *New York: Springer*, 2011.p. 53-72, 2011.

MOREIRA, S, C; SANTOS, M, S, M; BARROS, S, N; CARDOSO, L, A, C; BATISTOTE, M. Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol. *Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas- Ciência e Natura*. Santa Maria, v. 37 n. 4, p. 55-63, set-dez. 2015. ISSN impressa: 0100-8307 ISSN on-line: 2179-460X.

NASCIMENTO, M, G; ZANOTTO, S, P; MELEGARI, S, P; MORAN, P, J, S. Estudos de proteção da célula de *Saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico. *Química Nova*, v. 25, Nº. 4, 567-571, 2002.

OGEDA, L, T e PETRI, S, F, D. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química nova*. v. 33, Nº. 7, 1549-1558, 2010.

ORLANDELLI, R. C; SPECIAN, V; FELBER, C, A; PAMPHILE, A, J. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, v.7, n.3, p.97-109, set.-dez., 2012.

PANDEY, A; SOCOOL, C, R; RODREGUEZ-LEON, J, A; NIGAM, P. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. *Current Science*, v. 77, n. 1, p. 149–162, 2000.

PEIXOTO, ABRAÃO BRITO. *Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil*. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2006.

POLIZELI, M, L; RIZZATTI, A, C; MONTI, R; TERENCEZI, H, F; JORGE, J, A; AMORIM, D, S. Xylanases from fungi: propertatividade celulásicas and industrial applications. *Appl Microbiology Biotechnology*, v. 67, p. 577-591, 2005.

RANSOM, C.B.; STICKLEN, M. B.; Production of heterologous hydrolysis enzymes within crop biomass for biofuel ethanol. In: DOELLE, H. W.; ROKEM, J. S.; BEROVIC M. *Biotechnology: Industrial Biotechnology – Part II*. Vol. VI. EOLSS publications. p. 220-244. 2009.

REED, G. *Enzymes in Food Processing*. Academic Press, Londres. ISBN 0-12-584852-8, 1997.

ROMO- SANCHEZ, S., S; ALVES-BAFFI.M; ARÉVALO- VILLER.M; ÚBEDA-IRANZA, J; BRIONES-PÉREZ, A. Yeast biodiversity from oleic ecosystems: study of their biotechnological properties. *Food Microbiology* 27, 487-492, 2010.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L., Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A., AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001, p 351-362.

SCHWAN, R. F.; CAMPOS, C. R.; DIAS, D. R. Diversidade de leveduras em ecossistemas brasileiros. In: MOREIRA, F. M.S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras: Ed. UFLA, 2008. p. 585-620.

SPANAMBERG, A; HARTFELDER, C, C; FUENTEFRIA, A, M; VALENTE, P. Diversity and enzyme production by yeasts isolated from raw milk in Southern Brazil. *Acta Sci Vet* 2004; 32: 195-199.

SHAFIQUE, S.; ASGHER, M.; SHEIKH, A. Solid state fermentation of banana stalk for avicelases production. *International Journal of Agriculture & Biology*. v. 6, n. 3, p. 488-491, 2004.

SILVA, M, S. *Atividade Enzimática extracelular de leveduras isoladas da Fermentação do Cacau*. (2011). *Dissertação* (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana – BA, 83 p.

SINGH, A, K; MUKHOPADHYAY, M. Overatividade celulásica og fungal lipase: a revatividade celulásicaw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166 (2): 486-520,2012.

SOUZA, S, C. *Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae**. 2009. p, 139. Tese (Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan /IPT) USP – Universidade de São Paulo – São Paulo – SP, 2009.

TORTORA, GERARD J; BERDELL R. FUNKE; CHRISTINE L. *Microbiologia*. 10. Ed. - Porto Alegre: Artmed, 2012. ISBN 978-85-363-2698-6.

VITOLO, M. Aplicação de enzimas na tecnologia de alimentos. In: *Biotechnologia Industrial: Biotecnologia na produção de alimentos*. 1 ed, v 4, ed. Edgard Blucher Ltd 387-420, 2001.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, (2009). London, v. 20, p. 295-299.

1 **ARTIGO**

2
3 **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR DUAS LINHAGENS DE**
4 **LEVEDURAS ISOLADAS DE FRUTOS DE PALMEIRAS**
5 **EVOLUATION OF CELLULASE BY TWO YEAST STRAINS ISOLATED FROM**
6 **PAEM TREE FRUITS**

7
8 **LAISY DANIELLA ALVES SANTOS**

9 Universidade Federal do Tocantins

10 laisy.bio@gmail.com

11 **THIAGO LUCAS DE ABREU LIMA**

12 Universidade Federal do Tocantins

13 abreulimatl@uft.edu.br

14 **SOLANGE CRISTINA CARREIRO**

15 Universidade Federal do Tocantins

16 solange@mail.uft.edu.br

17 **RESUMO**

18 O presente trabalho teve como objetivo quantificar as celulases produzidas por duas
19 linhagens de leveduras, avaliando o efeito da adição de monossacarídeos e dissacarídeos como
20 indutores no meio de cultivo, além de caracterizar parcialmente o extrato bruto enzimático. Foi
21 avaliado a produção em meio contendo apenas carboximetilcelulose (CMC) como fonte de
22 carbono e em meio com CMC acrescido de 5 g.L⁻¹ de arabinose, celobiose, glicose ou lactose.
23 Em meio contendo CMC as atividades para a linhagem T194 e I1236 foram de respectivamente,
24 0,056 U. mL⁻¹ e 0,023 U. mL⁻¹ para CMCse, 0,063 U. mL⁻¹ e 0,010 U. mL⁻¹ para FPase e 0,096
25 U. mL⁻¹ e 0,003 U. mL⁻¹ para Avicelase, após 24 horas de incubação. O uso de arabinose e
26 lactose no meio incrementou a atividade celulásica em até 10 vezes para a linhagem T194 e
27 para a linhagem I1236, todos os meios incrementou a atividade celulásica especialmente a
28 arabinose que aumentou em 40 vezes a atividade da avicelase. O pH e temperatura ótimos para

1 as celulasas das duas linhagens ficou em torno de pH 5,0 e 50°C. As celulasas produzidas pelas
2 duas linhagens permaneceram estáveis em uma faixa de pH de 6-8 e entre de 55- 65°C.

3 **PALAVRAS-CHAVE:** Enzimas, celulasas, yeast, production, estabilidade, tucum, inajá.

4

5 **ABSTRACT**

6

7 **KEY WORDS:** Enzymes, cellulase, Yeasts e production.

8 **INTRODUÇÃO**

9 As enzimas são proteínas específicas que catalisam reações químicas em todos os
10 processos biológicos tornando-as mais rápidos e efetivos. As enzimas são muito utilizadas na
11 indústria devido ao alto grau de especificidade das reações que catalisam. Podem ser de origem
12 animal, vegetal e microbiana, sendo que o uso das enzimas microbianas prevalece. As enzimas
13 são amplamente utilizadas na produção de alimentos, manipulação de medicamentos, na
14 produção de biocombustíveis, indústria têxtil, de papel e celulose e de ração animal. (UENOJO
15 & PASTORE 2007; PAQUES et al., 2006).

16 Das várias enzimas conhecidas, a maioria tem aplicação industrial, sendo que 75%
17 delas são hidrolases. As principais hidrolases de uso industrial são as celulasas, lipases,
18 amilases, proteases e fitases (COURI et al., 2008).

19 As celulasas formam um complexo enzimático que rompe as ligações glicosídicas β -1,4
20 da celulose, ocasionando a liberação de unidades de glicose e oligossacarídeos. E são
21 catalisadores altamente específicos que operam em sinergia para a liberação de açúcares
22 (DASHTBAN et al., 2010; CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

23 As celulasas estão entre as enzimas hidrolíticas mais importantes para os processos
24 biotecnológicos, ocupando atualmente o terceiro lugar entre as enzimas industriais (WILSON,
25 2009 & SHAFIQUE et al., 2004).

26 Embora produzidas principalmente por fungos filamentosos e bactérias, a produção de
27 celulasas por leveduras tem sido investigada devido a suas peculiaridades como o fácil ajuste
28 nas condições de cultivo, fermentação em ciclos curtos e de baixo custo, e por não
29 demonstrarem propriedades patogênicas (CRUZ et al., 2009).

1 O presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de celulases por duas linhagens
2 de leveduras isoladas de frutos dos cocos tucum (*Bractis serosa*) e inajá (*Maximiliana maripa*)

3

4 **MATERIAL E MÉTODOS**

5 **Linhagens de leveduras e obtenção do inóculo**

6 As linhagens utilizadas no trabalho foram isoladas de frutos das palmeiras tucum
7 (*Bactris setosa*) e inajá (*Maximiliana maripa*), recebendo a codificação T194 e I1236,
8 respectivamente. Ambas fazem parte da coleção de culturas Carlos Rosa do Laboratório de
9 Microbiologia e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins (UFT) e estão
10 preservadas a -80°C .

11 As leveduras foram cultivadas em caldo Sabourad (100 g.L^{-1} de glicose, 10 g.L^{-1} de
12 peptona, 5 g.L^{-1} de extrato de levedura) a 30°C e agitação de 200 rpm, por 8 horas (T194) e 11
13 horas (I1236) para a obtenção do inóculo. Após o período de incubação as células foram
14 separadas por centrifugação a 5000 rpm por 60 minutos e ressuspensa no próprio meio de
15 cultura. Valores adequados dessa suspensão foram utilizados para inocular os meios para
16 produção de celulases de modo a se obter uma concentração inicial de 10^7 de células/mL.

17 **Produção de celulases**

18 Os ensaios para a produção de celulases foram conduzidos em frascos erlemeyer
19 contendo 150 mL de meio composto por 5 g.L^{-1} carboximetilcelulose (CMC); 2 g.L^{-1} de NaNO_3 ;
20 $0,5\text{ g.L}^{-1}$ de K_2PO_4 ; $0,2\text{ g.L}^{-1}$ de peptona. Adicionalmente foram utilizados outros quatro meios
21 contendo, além de CMC, 5 g.L^{-1} de glicose (CMC- G), arabinose (CMC-A), celobiose (CMC-
22 C) ou lactose (CMC-L).

23 Os frascos foram incubados a 40°C e 150 rpm por até 96 horas para o meio de CMC e
24 24 horas para os demais meios. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas, que foram
25 centrifugada a 5000 rpm por 60 minutos para a separação das células e obtenção do extrato
26 bruto enzimático (EEB), que foi armazenado a -10°C para posterior quantificação das
27 atividades celulásicas. O número de células foi estimado através de contagem direta em câmara
28 de Neubauer em microscópio ótico comum.

29 Os resultados foram dados como a média de três repetições e interpretados através da
30 análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Turkey a 5% de
31 significância.

1 **Quantificação da atividade celulásica**

2 As atividades de endoglucanase (CMCase), celulase total (FPase), e exoglucanase
3 (Avicelase) foram determinadas após 30 minutos de incubação de 1 mL do EEB com 1 mL de
4 cada substrato em tampão acetato de sódio 0,5 mol.L⁻¹ pH 5.0 a 40°C, segundo Ghose (1987).
5 Os substratos utilizados foram CMC, uma tira de papel filtro Whatman n° 1 com dimensões de
6 1x6 cm, e celulose microcristalina, para CMCase, FPase e avicelase respectivamente.

7 As atividades celulásicas, foram quantificadas através da dosagem do açúcar redutor
8 liberado utilizando o método do ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) (Miller, 1959). Para as três
9 enzimas, 1 unidade (U. mL⁻¹) de atividade celulásica foi considerada como a quantidade de
10 enzima capaz de liberar 1 µmol de glicose por mL por minuto de reação.

11 **Caracterização parcial da enzima bruta produzida**

12 **Determinação do pH e temperatura ótimos para a reação enzimática**

13 Para se avaliar o efeito da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática foi utilizado
14 um Delineamento Composto Central Rotacional (DCRR), composto de um fatorial completo
15 2², incluindo 4 pontos axiais e 4 repetições no ponto central, segundo Rodrigues e Iemma
16 (2014). As variáveis e níveis estudados estão apresentados na tabela 1. Os efeitos significativos
17 foram analisados e interpretados através da análise de variância (ANOVA) com 95% de
18 confiança usando o programa Statystical Analysis System® versão 9.0.

19 **Tabela 1.** Variáveis e níveis estudados no DCCR 2², determinação de temperatura e pH ótimos para as celulasas
20 produzidas pelas linhagens T194 e I1236.

| Variáveis | -1,41 | -1 | 0 | 1 | 1,41 |
|----------------|-------|-----|----|-----|------|
| pH | 4 | 4,3 | 5 | 5,8 | 6 |
| Temperatura °C | 40 | 43 | 50 | 58 | 60 |

21 **Estabilidade térmica e ao pH**

22 A estabilidade ao pH foi avaliada após 24h de incubação do EEB sob refrigeração
23 (10°C) em diferentes tampões, na proporção de 1:3 (v/v), nas faixas de pHs de 2 a 10. Foram
24 utilizados os tampões de acetato de sódio (pH 4, 5, 6, 7 e 8), McIlvaine (pH 2 e 3) e Tris (pH 9
25 e 10).

1 A estabilidade térmica foi avaliada incubando-se o EEB em diferentes temperaturas (40,
2 45, 50, 55, 60 e 65 °C) durante 60 minutos, na ausência de substrato.

3 Os resultados foram dados como percentual de atividade residual, sendo considerada
4 100% a atividade determinada imediatamente após a adição do EEB a cada tampão (no caso da
5 estabilidade ao pH) ou a atividade do EEB puro determinada antes da incubação nas diferentes
6 temperaturas (no caso da estabilidade térmica).

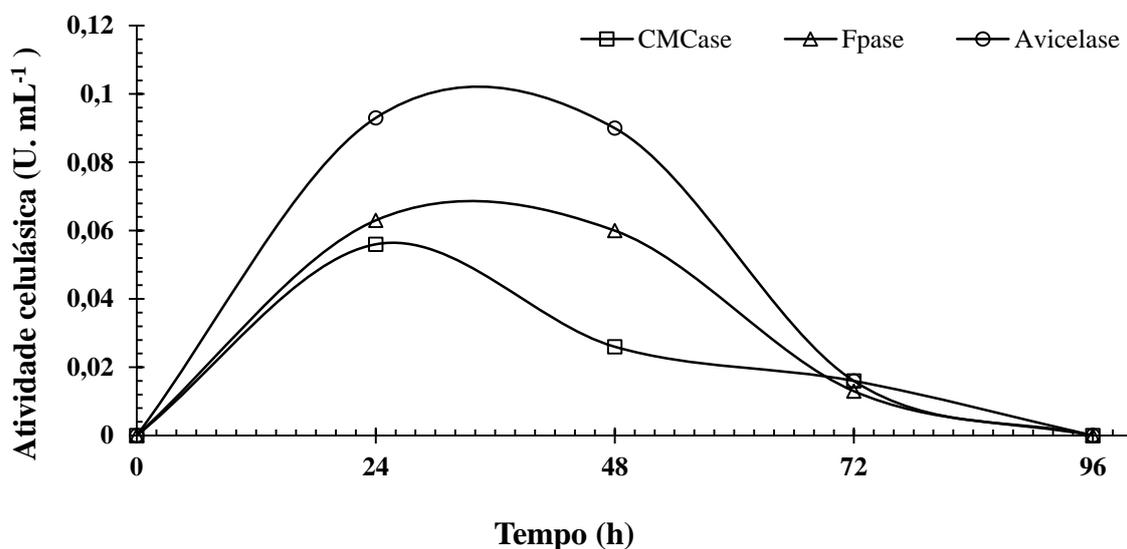
7

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9 Produção de celulases em cultivo submerso

10 A atividade celulásica das linhagens foi avaliada em cultivo submerso durante 96 horas.
11 A atividade de CMCase variou de 0,013 U. mL⁻¹ a 0,093 U. mL⁻¹ para a linhagem T194 e de
12 0,003 U. mL⁻¹ a 0,023 U. mL⁻¹ para a linhagem I1236. Para a FPase os valores obtidos variaram
13 de 0,013 U. mL⁻¹ a 0,063 U. mL⁻¹ para a linhagem T194 e de 0,010 para a linhagem I1236. A
14 atividade de avicelase variou de 0,016 U. mL⁻¹ a 0,093 U. mL⁻¹ para a linhagem T194 e 0,003
15 U. mL⁻¹ para a linhagem I1236.

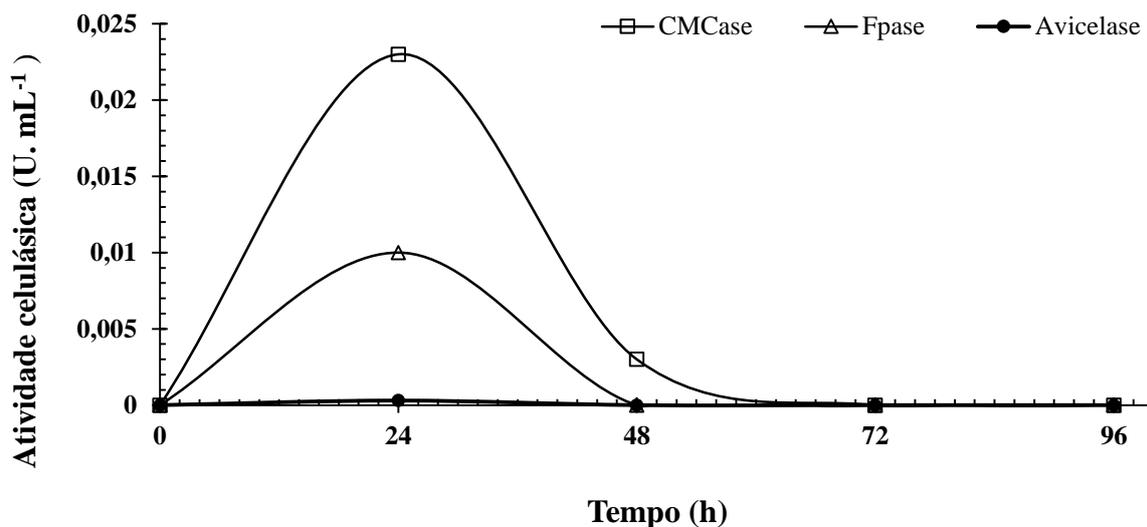
16 As figuras 1 e 2 mostram, respectivamente a produção das celulases ao longo do período
17 de incubação para as linhagens T194 e I1236.



18

19 **Figura 1.** Atividade celulásica da linhagem T194 ao longo do tempo em meio contendo CMC.

20



1

2 **Figura 2.** Atividade celulásica da linhagem I1236 ao longo do tempo em meio contendo CMC.

3 As linhagens apresentaram comportamentos similares em relação ao tempo de
 4 incubação necessário para a máxima atividade para as três enzimas analisadas. Para a linhagem
 5 T194 houve máxima atividade entre 24 e 48 horas para avicelase e Fpase, enquanto que a
 6 atividade de CMCase foi maior em 24 horas com queda após 48 horas. Para a linhagem I1236
 7 as máximas atividades foram atingidas após 24 horas de incubação com queda expressiva após
 8 48 horas.

9 Os dados mostram que a linhagem T194 apresentou atividades superiores para as três
 10 enzimas, sendo da ordem de 30 vezes maior para a avicelase em relação CMCase e FPase. Já
 11 para a linhagem I1236 apresentou atividades para as três enzimas, na qual, com uma ordem de
 12 20 vezes maior para a enzima CMCase em a avicelase e FPase. Comparando as duas linhagens
 13 a T194 teve uma melhor atividade celulásica sobre a linhagem I1236, em todas as enzimas
 14 estudadas.

15 Alguns, trabalhos relatam atividades encontradas somente CMCase e FPase, como
 16 Carvalho et al (2013) avaliaram a atividade celulásica em cultivo sólido e submerso, das 17
 17 linhagens de leveduras em meio contendo CMC em cultivo submerso, foi detectado atividade
 18 somente para β -glicosidase, não havendo atividade para CMCase e FPase. Silva et al (2014)
 19 avaliaram 70 linhagens de fungos filamentosos para a produção de celulases utilizando a casca
 20 de arroz e serragem de eucalipto como substrato, apresentando atividades somente para FPase
 21 e CMCase, que variou de 0,10 U. mL⁻¹ há 1,05 U. mL⁻¹, respectivamente.

22 A fim de se avaliar a influência da presença de monossacarídeos e dissacarídeos como
 23 indutores na produção das enzimas foram utilizados meios de CMC acrescidos de 5 g.L⁻¹ de

1 arabinose (CMC- A), glicose (CMC- G), celobiose (CMC- C) e lactose (CMC- L) com cultivo
 2 durante 24 horas em três repetição. Os valores obtidos para as atividades de CMCase, FPase e
 3 Avicelase estão apresentados na tabela 2.

4 **Tabela 2.** Atividade celulásica das linhagens T194 e I1236 em diferentes fontes de carbono, após 24 horas de
 5 incubação.

| Meio | T194 | | | I1236 | | |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | CMCase | FPase | Avicelase | CMCase | FPase | Avicelase |
| CMC | 0,056 ^b | 0,063 ^b | 0,096 ^b | 0,023 ^c | 0,010 ^c | 0,003 ^c |
| CMC – A | 0,632 ^a | 0,646 ^a | 0,604 ^a | 0,619 ^a | 0,514 ^a | 0,427 ^a |
| CMC – G | 0,074 ^b | 0,097 ^b | 0,087 ^b | 0,219 ^b | 0,203 ^b | 0,212 ^b |
| CMC – C | 0,073 ^b | 0,172 ^b | 0,104 ^b | 0,348 ^b | 0,336 ^b | 0,301 ^b |
| CMC - L | 0,554 ^a | 0,573 ^a | 0,512 ^a | 0,414 ^b | 0,374 ^b | 0,218 ^b |

6 *Médias seguidas por uma mesma letra não se diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

7 *CMC (carboximetilcelulose), A (arabinose), G (glicose), C (celobiose) e L (lactose).

8 Os resultados mostram que para todas as enzimas houve aumento expressivo das
 9 atividades em todos os meios, exceto para a linhagem T194 em meio contendo glicose e
 10 celobiose, cuja atividade foi muito próxima ou igual a apresentada no meio contendo só CMC.

11 A análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre as atividades
 12 celulásicas, para ambas as linhagens. Para a linhagem T194 os meios com arabinose e lactose
 13 favoreceram as atividades das três enzimas, com aumento de atividades da ordem de 10 vezes
 14 em relação ao meio de CMC. Para a linhagem I1236 todos os indutores favoreceram as
 15 atividades celulásicas, com um aumento de 10 a 50 vezes nos valores de atividades em relação
 16 ao meio com CMC, ressaltando que a adição de arabinose obteve melhores atividades
 17 celulásicas.

18 Segundo Bon et al., (2008), apesar da glicose de induzir o crescimento de
 19 microrganismos, pode ser repressora na produção de diversas enzimas. Isso, não pode ser
 20 observado nos resultados desse trabalho, uma vez que não foi observado a diminuição das
 21 atividades quando a glicose foi adicionada ao meio.

22 A arabinose, foi o indutor que obteve maior atividade celulásica para as duas linhagens
 23 de leveduras, para as atividades de CMCase, FPase e avicelase, respectivamente, diferenciando

1 de todos os outros indutores. A celobiose, na linhagem T194 não diferenciou estatisticamente da
 2 glicose, e na linhagem I1236 só houve diferença estatística com a arabinose,

3 A lactose, é conhecida como uma boa indutora para a produção de celulase usando em

| | | | | | |
|----|-------------|------------|-------|-------|-------|
| 1 | 4,3 (-1) | 43 (-1) | 0,024 | 0,014 | 0,028 |
| 2 | 4,3 (-1) | 58 (1) | 0,016 | 0,018 | 0,028 |
| 3 | 5,8 (1) | 43 (-1) | 0,018 | 0,019 | 0,030 |
| 4 | 5,8 (1) | 58 (1) | 0,051 | 0,034 | 0,099 |
| 5 | 4,0 (-1,41) | 50 (0) | 0,022 | 0,014 | 0,013 |
| 6 | 6,0 (1,41) | 50 (0) | 0,027 | 0,037 | 0,088 |
| 7 | 5,0 (0) | 40 (-1,41) | 0,019 | 0,014 | 0,096 |
| 8 | 5,0 (0) | 60 (1,41) | 0,021 | 0,021 | 0,020 |
| 9 | 5,0 (0) | 50 (0) | 0,027 | 0,039 | 0,096 |
| 10 | 5,0 (0) | 50 (0) | 0,022 | 0,037 | 0,101 |
| 11 | 5,0 (0) | 50 (0) | 0,019 | 0,036 | 0,100 |
| 12 | 5,0 (0) | 50 (0) | 0,023 | 0,037 | 0,096 |

4 fungos filamentosos, e podemos observar que foi o segundo melhor indutor para a linhagem
 5 T194, já para a linhagem I1236 não houve diferença significativa em comparação a celobiose
 6 e glicose.

7 As otimizações dos meios bem como dos parâmetros de cultivo são fundamentais para
 8 se buscar as melhores condições que possam maximizar a produção dessas enzimas.

9 **Determinação do pH e da temperatura ótimos**

10 O efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado através
 11 (DCCR 2²) de um plano fatorial completo. As tabelas 3 e 4 mostram os resultados das atividades
 12 celulásicas obtidas para as linhagens T194 e I1236 respectivamente.

| Ensaio | pH | Temperatura °C | CMCase | FPase | Avicelase |
|--------|----|----------------|--------|-------|-----------|
|--------|----|----------------|--------|-------|-----------|

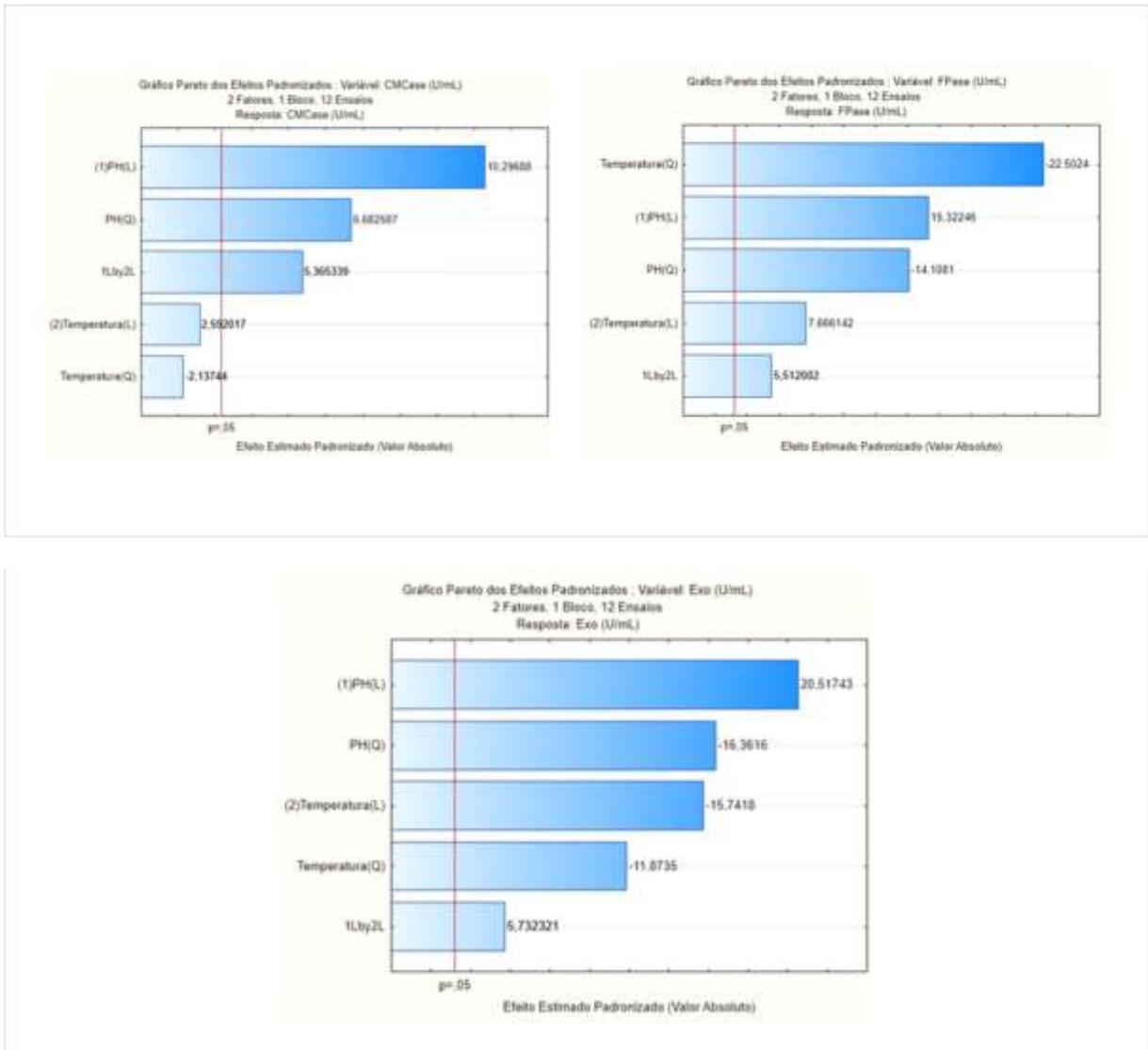
1 **Tabela 3.** Valores reais e codificados para as atividades celulásicas (U. mL⁻¹) obtidos para a linhagem T194.

| Ensaio | pH | Temperatura °C | CMCase | FPase | Avicelase |
|--------|-------------|----------------|--------|-------|-----------|
| 1 | 4,3 (-1) | 43 (-1) | 0,033 | 0,021 | 0,015 |
| 2 | 4,3 (-1) | 58 (1) | 0,036 | 0,026 | 0,016 |
| 3 | 5,8 (1) | 43 (-1) | 0,020 | 0,019 | 0,020 |
| 4 | 5,8 (1) | 58 (1) | 0,036 | 0,042 | 0,042 |
| 5 | 4,0 (-1,41) | 50 (0) | 0,019 | 0,044 | 0,041 |
| 6 | 6,0 (1,41) | 50 (0) | 0,019 | 0,037 | 0,021 |
| 7 | 5,0 (0) | 40 (-1,41) | 0,020 | 0,014 | 0,017 |
| 8 | 5,0 (0) | 60 (1,41) | 0,017 | 0,018 | 0,023 |
| 9 | 5,0 (0) | 50 (0) | 0,038 | 0,040 | 0,048 |
| 10 | 5,0 (0) | 50 (0) | 0,024 | 0,038 | 0,046 |
| 11 | 5,0 (0) | 50 (0) | 0,025 | 0,037 | 0,039 |
| 12 | 5,0 (0) | 50 (0) | 0,021 | 0,044 | 0,042 |

1 **Tabela 4:** Valores reais e codificados para as atividades celulásicas (U. mL⁻¹) obtidos para a linhagem I1236.

2 Para a linhagem T194 os termos linear e quadrático do pH e da temperatura e a interação
3 entre as variáveis foram significativas ($p < 0,05$) para todas as enzimas.

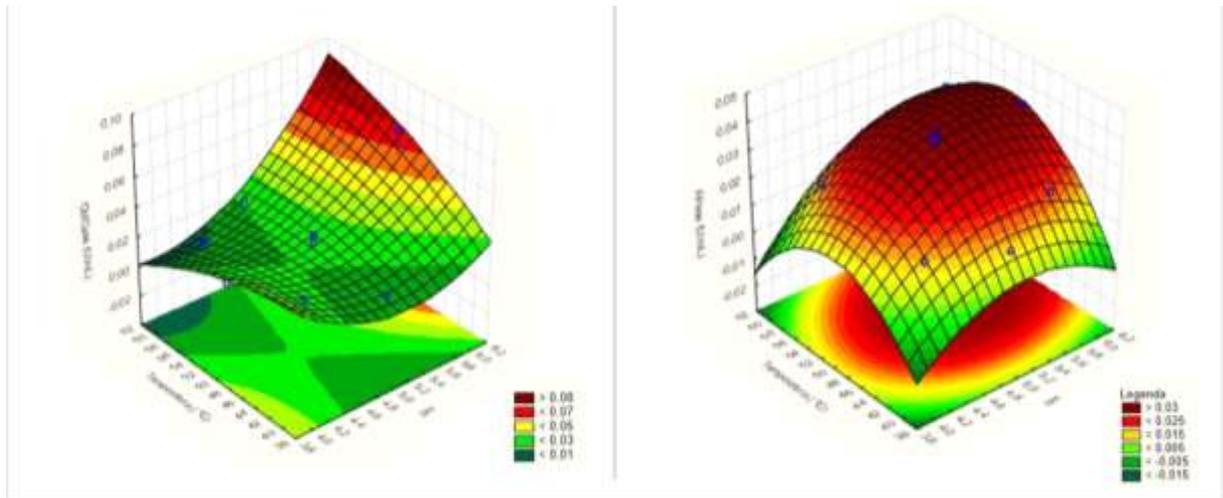
4 A figura 3 mostra as variáveis em ordem de importância para o modelo de regressão
5 para CMCase, FPase e avicelase, respectivamente. A linha vertical mostra os coeficientes que
6 foram significativos ($p < 0,05$).



9 **Figura 3.** Diagrama de pareto mostrando os efeitos estimados do pH e temperatura na produção de CMCase (a),
10 FPase (b) e Avicelase (c) para a linhagem T194.

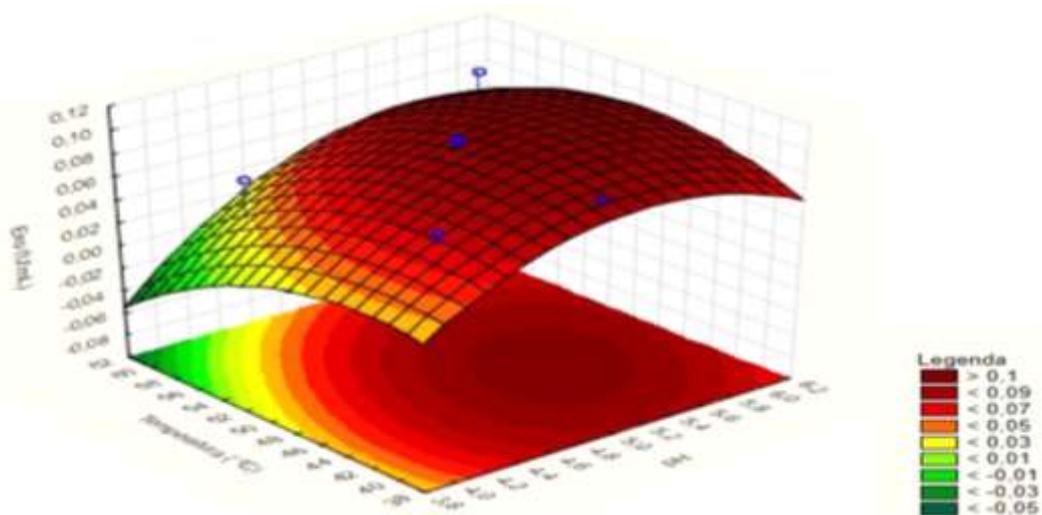
11 A análise de variância (ANOVA) mostrou valores de R^2 de 82% (CMCase), 97%
12 (FPase), e 72% (avicelase), mostrando que os dados foram bem representados pela regressão.
13 A regressão foi significativa, podendo ser usada para gerar as superfícies de resposta, para todas
14 as atividades celulásicas (figuras 4 e 5) (BOX et al., 2005).

1 Os efeitos das variáveis na atividade enzimática apontam faixas de pH entre 5 a 6 e as
 2 temperaturas entre 50 a 58°C como ideais para a atividade enzimática, destacando os valores
 3 de pH 5,4, e 52°C para todas as enzimas analisadas, com atividades de 0,020 U. mL⁻¹ para
 4 CMCase, de 0,040 U. mL⁻¹ para FPase e de 0,101 U. mL⁻¹ para avicelase.



5

6 **Figura 4.** Superfície de resposta para a atividade de CMCase e FPase em função do pH e temperatura para a
 7 linhagem T194.



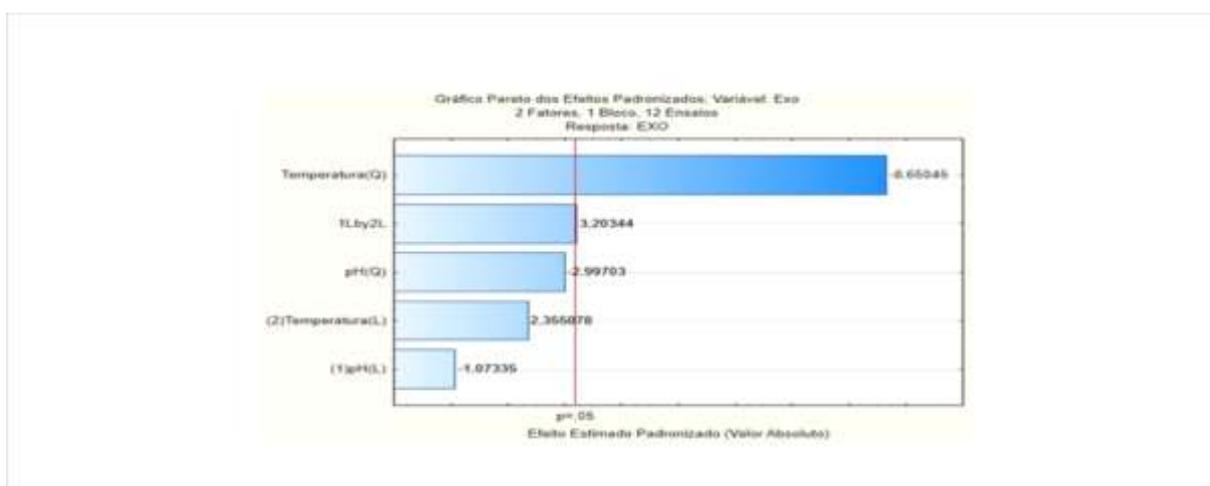
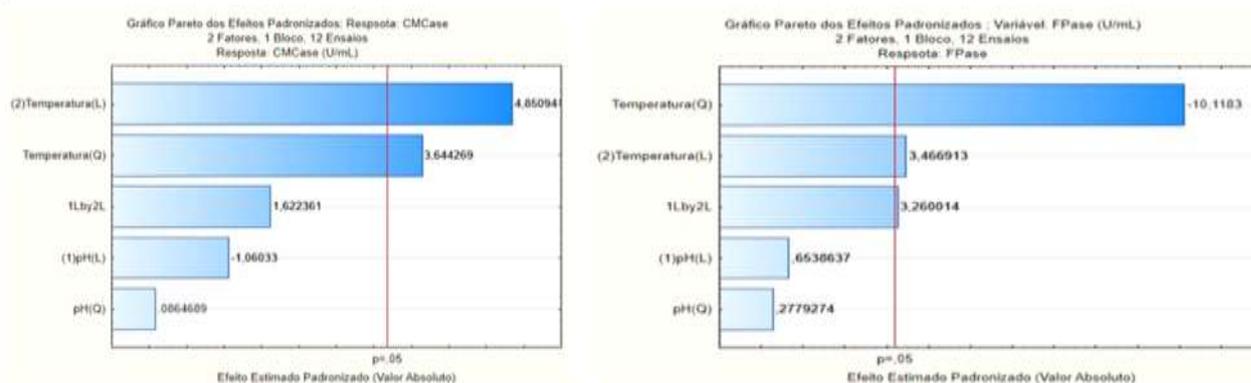
8

9 **Figura 5.** Superfície de resposta para a atividade de Avicelase em função do pH e temperatura para a linhagem
 10 T194.

11 Para a linhagem I1236, os termos lineares e quadráticos da temperatura foram
 12 significativos para a atividade de CMCase, e a interação entre pH e temperatura foi significativa
 13 para FPase e avicelase.

1 A figura 6 mostra as variáveis em ordem de importância para o modelo de regressão,
 2 para CMCase, FPase e avicelase, respectivamente. A linha vertical mostra os coeficientes que
 3 foram significativos ($p < 0,05$).

4

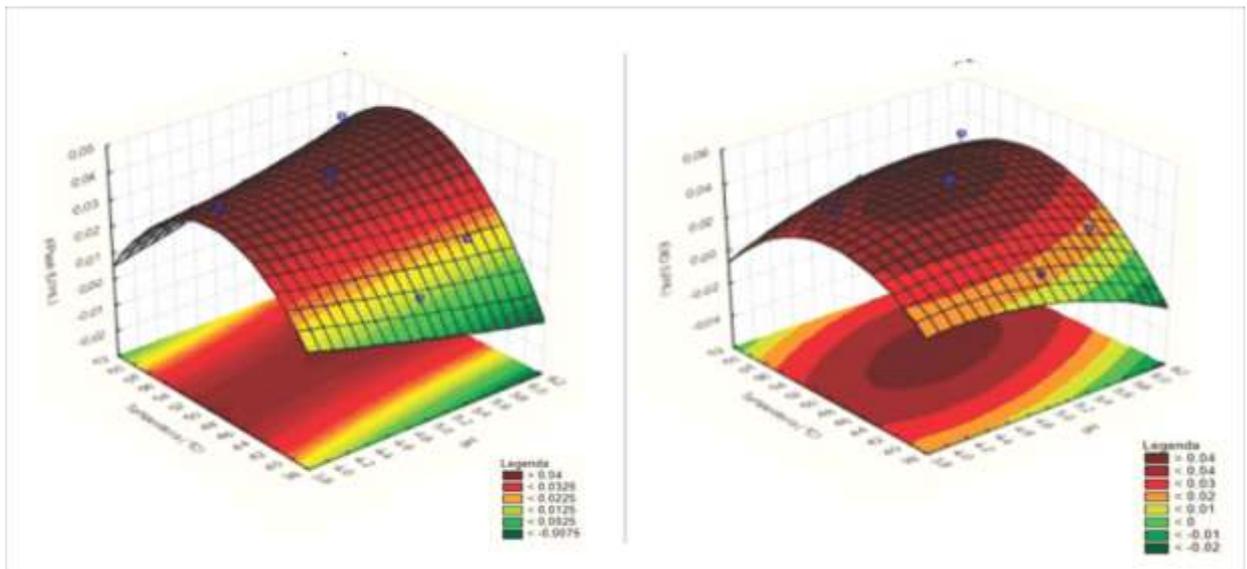


5

6 **Figura 6.** Diagrama de pareto mostrando os efeitos estimados do pH e temperatura na produção de CMCase (a),
 7 FPase (b) e Avicelase (c) para a linhagem I1236.

8 A análise de variância (ANOVA) mostrou valores de R^2 de 66,65% (CMCase), de
 9 85,88% (FPase), e de 70,15% (avicelase), mostrando que os dados foram bem representados
 10 pela regressão. A regressão foi significativa, podendo ser usada para gerar as superfícies de
 11 resposta das atividades celulásicas (figura 7), exceto para a CMCase para a qual a interação não
 12 foi significativa (BOX et al., 2005).

13 Os efeitos das variáveis na atividade enzimática, apontam como ideias as faixas de pH
 14 entre 4 e 6 e temperatura entre 50 e 58°C, destacando os valores de pH 5,0 e temperatura de
 15 50°C, com atividade de 0,044 U. mL⁻¹ e 0,048 U. mL⁻¹, para as atividades de FPase e avicelase
 16 respectivamente.



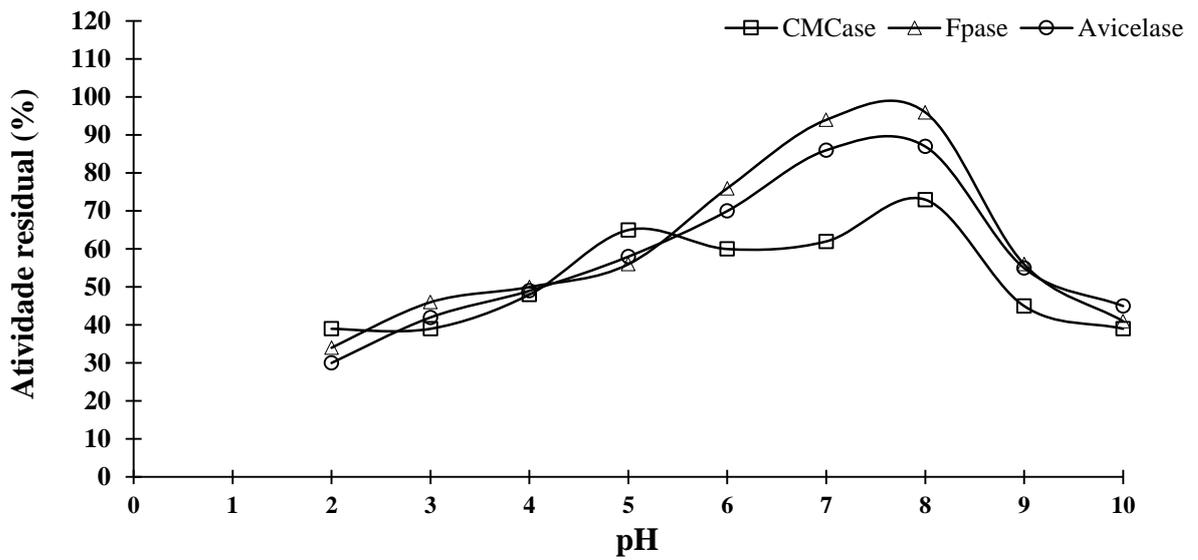
1

2 **Figura 7.** Superfície de resposta para a atividade de FPase e Avicelase em função do pH e temperatura para a
3 linhagem I1236.

4 Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores para fungos filamentosos.
5 Rabelo (2010) obteve atividade para FPase em pH 4,8 e 50°C. Fernandes et al (2015) estudando
6 faixas de pH e temperatura para a enzima avicelase, obtiveram pH 5,0 e 60°C. Rai et al., (2012),
7 investigaram a produção de celulases por leveduras termotolerantes, encontrada atividade
8 máxima para CMCCase de 44 U. mL⁻¹ e Avicelase de 46 U. mL⁻¹ foi no pH 5,5 e 50°C.

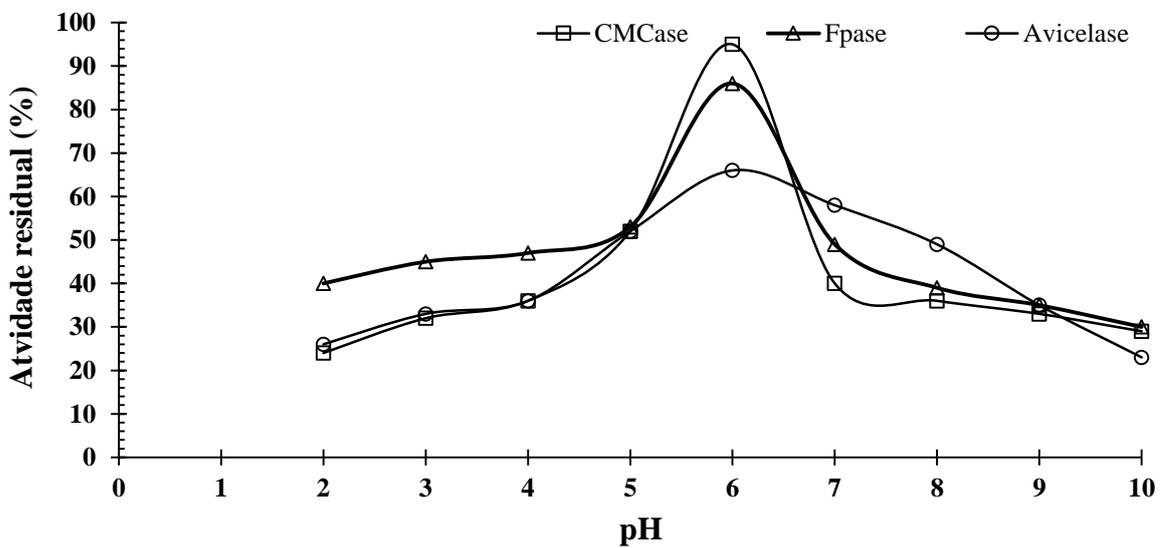
9 **Estabilidade ao pH**

10 Para a linhagem T194 em pH 8 a enzima FPase manteve 96% de atividade residual e as
11 enzimas avicelase e CMCCase 87% e 73% de atividade residual, respectivamente, valores de pH
12 mais ácidos 2 e 4 provocaram queda na atividade residual, ficando abaixo de 50% (figura 8).



1
2 **Figura 8.** Estabilidade ao pH das celulasas produzidas pela linhagem T194 após 24h a 10°C.

3
4 As enzimas produzidas pela linhagem I1236 apresentaram atividade residual acima de
5 50% apenas em pH 6,0, sendo a atividade residual de 95% para CMCase, 86 % para FPase e
6 66% para avicelase (Figura 9).



8
9 **Figura 9.** Estabilidade ao pH das celulasas produzidas pela linhagem I1236 após 24h a 10°C.

10

11

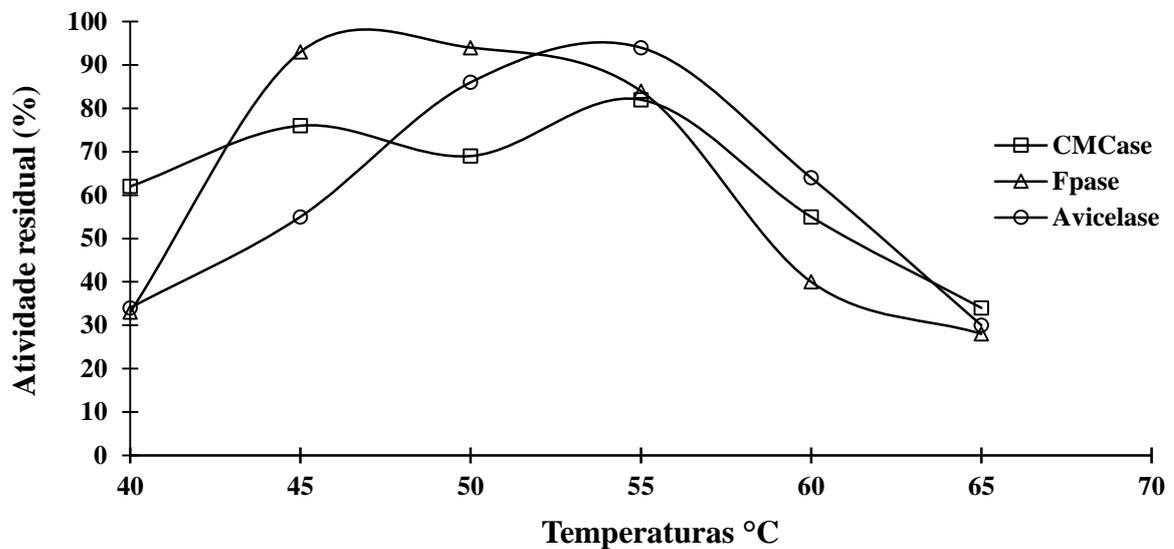
12

1 Estabilidade térmica

2 As enzimas produzidas por ambas as linhagens mostraram estabilidade na faixa de
3 temperatura entre 45°C e 65°C após 60 minutos, mantendo atividade residual igual ou superior
4 a 50%, exceto para FPase da linhagem T194 e CMCCase da linhagem I1236 que apresentou
5 atividade residual em torno de 40% nessa faixa de temperatura (figura 10 e 11).

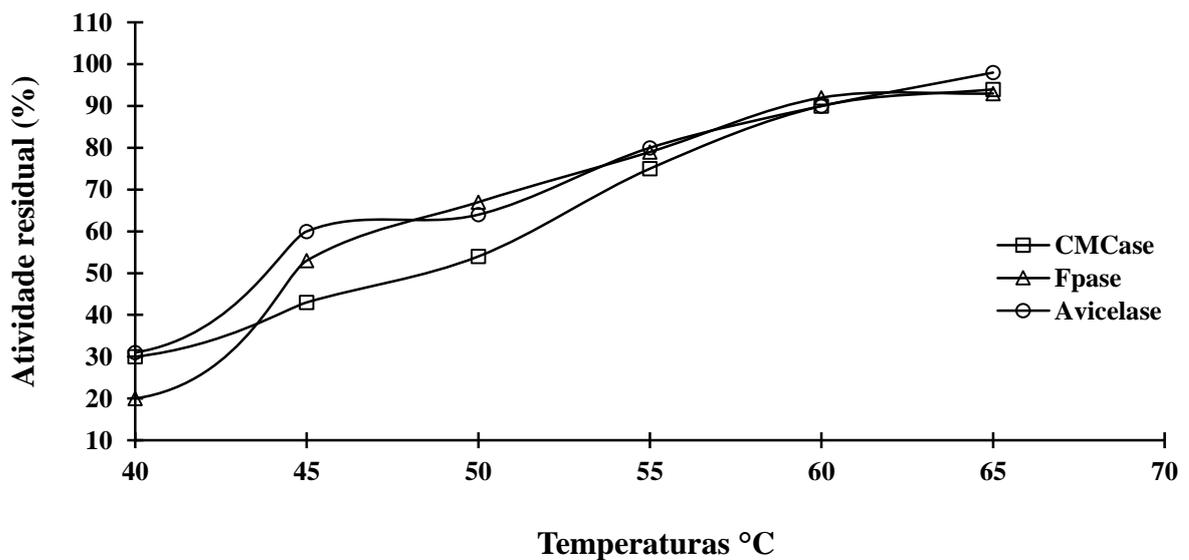
6

7



8

9 **Figura 10.** Termostabilidade das celulasas produzidas pela linhagem T194 após 60 minutos.



10

11 **Figura 11.** Termostabilidade das celulasas produzidas pela linhagem I1236 após 60 minutos.

1 Para a linhagem T194 a maior atividade residual foi obtida a 55°C, sendo de 82% para
2 CMCCase, 85% para FPase e 94% para Avicelase. Já na linhagem I1236 o maior percentual de
3 atividade residual foi obtido a 65°C, com os valores de 98%, 93% e 94% para CMCCase, FPase
4 e avicelase, respectivamente.

5 Os dados mostram que essas enzimas são termoestáveis, o que pode ser interessante
6 para o seu uso em industriais de alimentos e na produção de Bioetanol, como Casciotori et al
7 (2014), estudaram a estabilidade de CMCCase do fungo termofílico *Myceliophthora sp*, a sua
8 melhor estabilidade foi no pH 4,5 e na temperatura de 55°C, afirmando que para essa linhagem
9 a enzima é estável em pH ácidos e temperaturas acima de 50°C. Sancho et al (2016), analisaram
10 a estabilidade da FPase pelo fungo filamentososo *Mucor circinelloides*, a melhor estabilidade
11 celulásica foi pH 6,0 e temperatura de 60°C, sendo importante para o seu uso em industrial,
12 devido suas características de atua em pH básicos e temperaturas elevadas.

13 Abo- State et al (2013) estudaram a estabilidade das celulases e xilanases em linhagens
14 de *Bacillus* (MAM-29 e MAM-38), mostrando que CMCCase, FPase e avicelase foram estáveis
15 na faixa de entre pH de 5 a 8,5 tendo 83% de sua atividade, e estáveis nas temperaturas 60-
16 80°C retendo quase 100% de sua atividade, para ambas as linhagens. Yassien et al (2013)
17 analisaram a produção de celulase por *Streptomyces sp*, onde, sua máxima estabilidade foi
18 obtida em pH 6,5 com um percentual de 85% e temperatura de 55°C com 98% de sua atividade
19 residual.

20 A termoestabilidade apresentada pelas enzimas produzidas pelas duas linhagens pode
21 ser uma característica importante para a aplicação dessas enzimas em diversos processos
22 industriais, como na produção de Bioetanol e diversas aplicações em industriais segundo
23 Casciotori et al (2014) e Sancho et al (2016).

24 CONCLUSÃO

25 As linhagens estudadas apresentaram atividades celulásicas em cultivo submerso,
26 especialmente para as enzimas CMCCase e avicelase em meio com CMC.

27 O uso de indutores no meio de produção, principalmente arabinose e lactose,
28 incrementou a produção das enzimas em até 50 vezes.

29 O uso do planejamento experimental como ferramenta foi adequado para se determinar
30 o pH e temperatura ótimos de atividades das enzimas para ambas as linhagens.

31

1 REFERÊNCIAS

- 2 ABO-STATE, M, M, A; FADEL, M; ABDELLAH, M, E; GHALY, M, F. Studying the
3 Stability of Celulases and Xylanase Produced by Thermophilic and Alkaliphilic Bacterial
4 Strains Isolated from Agricultural Wastes. *American – Eurasian J. Agric. & Environ.* v. 13
5 (11): 1568- 1575, 2013.
- 6 BON, E. P. S.; GÍRIO F.; PEREIRA JR. N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.;
7 FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e
8 mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 241-271.
- 9 BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. Statistics for experimenters: design,
10 innovation and discovery. 2. ed. New Jersey: Wiley-Interscience, 2005. 633
11 p.
- 12 CARVALHO, F, P; SOUZA, A, C; GUEDES, K, T, M; DIAS, D; SILVA, C, F; SCHWAM,
13 R, F. Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: study of the enzymatic activities. *African*
14 *Journal of Microbiology Research.* v. 7, no 32, págs. 4176-4190, 2013.
- 15 CASCIATORI, F, P; CASCIATORI, P, A; SILVA, R; THOMEÓ, J, C. Estabilidade ao pH e à
16 temperatura e efeito de íons sobre a atividade de endoglucanase produzida por fungo termofílico
17 em cultivo sólido. *XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química.* Florianópolis, SC, 2014.
- 18 CASTRO, M, A; JUNIOR, P, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise
19 de resíduos agroindustriais. *Química nova* - V. 33, Nº. 1, 181-188, 2010.
- 20 COURI, S; PARK, Y; PASTORE, G; DOMINGOS, A. Enzimas na produção de alimentos e
21 bebidas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. A.; CORVO, M. L. (Eds.). *Enzimas em*
22 *Biotecnologia: produção, aplicações e mercado.* Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 153-
23 178.
- 24 CRUZ, T.M.L.; COUTO F.M.M.; FRANÇA, G.S.; LARANJEIRA, D.; NEVES, R.P.
25 Atividade da celulase de leveduras isoladas de frutos de meloeiro. 2009. In: IX Jornada de
26 Ensino, Pesquisa e Extensão Recife. IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009.
- 27 FERNANDES, T. G; MEDEIROS, E, F; CARVALHO, I, F; LOCATELLI, F, L. Avaliação do
28 efeito do pH, temperatura ótima, termoestabilidade e parâmetros cinéticos da enzima avicelase
29 obtida de uma linhagem de fungo filamentoso crescida em bagaço de cana de açúcar. *Anais da*
30 *Jornada Científica – Integração: Educação, Sociedade e Tecnologia.* Tangará da serra: 2015.

- 1 GHOSE, T, K. Measurement of cellulose actividade celulásicas. In: Pure and *Applatividade*
2 *celulásica Chemistry*, v. 59, p 257-268, 1987.
- 3 MILLER, G, L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar.
4 *Analytical Chemistry*. Vol. 31, no.3, march 1959.
- 5 RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço
6 de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração / Sarita Cândida Rabelo. --
7 Campinas, SP: [s.n.], 2010.
- 8 RAI, P., TIWARI, S. AND GAUR, R. Optimization of Process Parameters for Cellulase
9 Production by Novel Thermotolerant Yeast. *BioResources*, 7, 5401-5414, 2012.
- 10 REED, G. Enzymes in Food Processing. *Academic Press*, Londres. 1997.
- 11 RODRIGUES, M; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos:
12 uma estratégia seqüencial de planejamentos, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.
- 13 SAHA, B. C. Hemicellulose Bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology &*
14 *Biotechnology*, v. 30, p. 279-291, 2003.
- 15 SANCHO, O, S; MACIEL, T, C; PAIXÃO, L, M, N; OLIVEIRA, S, L, R; RODRIGUES, S.
16 Influência da temperatura e do pH na atividade de celulases produzidas por mucor circinelloides
17 em palha de cana-de-açúcar. *XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Fortaleza- CE,
18 2016.
- 19 SHAFIQUE, S.; ASGHER, M.; SHEIKH, A. Solid state fermentation of banana stalk for
20 avicelases production. *International Journal of Agriculture & Biology*. v. 6, n. 3, p. 488-491,
21 2004.
- 22 SILVA, D. B; CHAGAS, S, A, F; Scheidt, G, N; BARILLI, J; GIONGO, M. Estudo
23 comparativo da atividade de celulases fúngicas induzidas por substratos de serragem de
24 eucalipto e palha de arroz. *Evidência*, v.14, n.1, pág 155- 170, 2014.
- 25 WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, (2009). London,
26 v. 20, p. 295-299, 2009.
- 27 UENOJO, M; PASTORE, M, G. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química*
28 *nova*. V. 30, n° 2, São Paulo. Mar, 2007.

- 1 YASSIEN, M, A, M; FATANI, J, M, A, A; ASFOUR, Z, H. Production, purification and
- 2 characterization of cellulase from *Streptomyces sp.* *African Journal of Microbiology Research.*
- 3 v 8 (4), p. 348-354, 22 January, 2014.