

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**JOSENILDA GUIMARÃES LOPES**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Yarrowia divulgata* ISOLADA  
DE COCO TUCUM**

**PALMAS (TO)  
2020**

JOSENILDA GUIMARÃES LOPES

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Yarrowia divulgata* ISOLADA DE  
COCO TUCUM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Agroenergia como requisito parcial à obtenção do  
grau de Mestre.

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Solange Cristina Carreiro

Co-Orientador: Dr. Thiago Lucas de Abreu-Lima

**PALMAS (TO)**  
**2020**

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

---

L864o Lopes, Josenilda Guimarães.

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Yarrowia*  
divulgata ISOLADA DE COCO TUCUM. / Josenilda Guimarães Lopes. –  
Palmas, TO, 2020.

53 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins  
– Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em  
Agroenergia, 2020.

Orientadora : Solange Cristina Carreiro

Coorientador: Thiago Lucas de Abreu-Lima

1. Enzimas celulolíticas. 2. Frutos. 3. Delineamento experimental. 4.  
Palmeiras. 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).**

JOSENILDA GUTMARÃES LOPES

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Yarrowia divulgata*  
ISOLADA DE COCO TUCUM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroenergia, foi avaliada para obtenção do título de Mestre em Agroenergia, e aprovada em sua forma final pela Orientadora e pela Banca examinadora.

Data da aprovação 10 / 08 / 2020

Banca examinadora:



Prof. Dr<sup>a</sup> Solange Cristina Carreiro, UFT.



Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda



Prof. Dr. Danylo Bezerra Mendes

“Deixe algum sinal de alegria onde passe.”

Chico Xavier

Dedico à minha família,  
Que me ensinou primeiros passos e primeiras  
palavras...  
Lutou, sorriu e chorou.  
Deu-me o exemplo de ser forte.  
Conscientizou-me do quanto é importante  
buscar conhecimento.  
Demonstrou que incondicionalmente sempre  
me amará.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me abençoar e transmitir força e paz a cada dia;

À minha mãe e meu pai, Jesilda e José, pelo carinho e principalmente por representarem minha principal fonte de apoio

Aos meus irmãos, Ana Paula e Joseildo, pelo grande carinho, incentivo, convivência, pela ajuda em diversos momentos dessa formação;

Ao Átila Ferreira Curcino, meu companheiro, forte estímulo, que durante toda essa caminhada esteve ao meu lado, me dando força e motivando com suas palavras;

À Prof<sup>o</sup>. Dra. Solange Cristina Carreiro pela orientação, por todo o ensinamento e pela oportunidade de realização deste trabalho;

A Prof<sup>o</sup>. Dra. Paula Benevides de Moraes pela concessão da linhagem de levedura;

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Thiago Lucas de Abreu Lima pela coorientação no desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Emerson Adriano Guarda por fornecer o espectrofotômetro e ensinamento na área química;

Aos técnicos do laboratório LAPEQ, Larissa e Fabrício, pela ajuda com análise das amostras no espectrofotômetro e pelas conversas divertidas nas horas vagas;

À técnica do laboratório LAMA, Ariadna, pelo auxílio e companhia durante todo o desenvolvimento da pesquisa;

Aos colegas de mestrado por todos esses anos de convivência, amizade e união nessa caminhada.

Ao Kaique Aguiar Silva, graduando, pela ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao programa de Pós-Graduação em Agroenergia, por proporcionando aprendizado;

À Prof<sup>o</sup>. Dra. Flavia Lucila Tonani Siqueira, coordenadora do programa de Pós-Graduação em Agroenergia, pela dedicação;

A todos,

Obrigada!

## RESUMO

A celulose é a biomassa orgânica e renovável mais abundante, considerada uma boa alternativa para produção de produtos químicos e biocombustíveis. A conversão deste polímero em açúcar fermentável requer a ação sinérgica de enzimas do complexo celulolítico. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência das variáveis pH, temperatura, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, glicose, lactose, celobiose e arabinose na produção de celulases em cultivo submerso por uma linhagem de *Yarrowia divulgata*, utilizando um delineamento de Plackett-Burman (PB). Os valores de atividade enzimática variaram de 0 a 0,105 U/mL para endoglucanase, de 0,096 a 0,291 U/mL para exoglucanase, de 0 a 0,125 U/mL para celulase total e 0 a 0,308 U/mL para β-glicosidase. Os resultados mostraram que as variáveis significativas foram MgSO<sub>4</sub> (endoglucanase), arabinose (exoglucanase) e MnSO<sub>4</sub> e pH (celulase total), não havendo influência significativa das variáveis para a produção de β-glicosidase. Com base nos resultados obtidos no PB, foi feito delineamento completo DCCR (2<sup>2</sup>) utilizando as variáveis MgSO<sub>4</sub> e arabinose, cujos resultados mostraram que os valores de atividade de endoglucanase variaram de 0 a 0,295 U/mL, para exoglucanase a atividade variou de 0 a 0,234 U/mL, para celulase total de 0 a 0,337 U/mL e para β-glicosidase de 0 a 1,184 U/mL e a análise estatística mostrou que arabinose apresentou influência significativa para exoglucanase e β-glicosidase. Com base nos modelos gerados a concentração de arabinose que induziria maior atividade foi de 1 g para exoglucanase e de 10 g para β-glicosidase. Os ensaios de validação utilizando essas concentrações de arabinose mostraram que ocorreu um aumento das atividades variando de 0,141 a 0,355 U/mL para exoglucanase e de 0,954 a 0,964 U/mL para β-glicosidase. Dois DCCR independentes foram realizados para se avaliar o efeito do pH e da temperatura na reação enzimática, utilizando-se os extratos enzimáticos provenientes dos cultivos com 1 g e 10 g de arabinose. O pH e temperatura ótimos para a reação enzimática obtidos para a enzima β-glicosidase foram de 5 e 35 °C (extrato bruto proveniente do cultivo com 1 g de arabinose) e de 5,71 e 47,1 °C (extrato bruto proveniente do cultivo com 10 g de arabinose). Para a enzima exoglucanase o pH ótimo encontrado foi pH 6,0 (extrato bruto proveniente do cultivo com 1 g de arabinose) e não houve influência significativa da temperatura (para 1 g e 10 g de arabinose). Para endoglucanase e celulase total não houve influência significativa do pH ou temperatura na reação enzimática. A linhagem *Y. divulgata* apresentou potencial para produzir enzimas celulolíticas.

**Palavras-chave:** Enzimas celulolíticas, frutos, delineamento experimental, palmeiras.



## ABSTRACT

Cellulose is the most abundant organic and renewable biomass, considered a good alternative for the production of chemical products and biofuel. The conversion of this polymer into fermentable sugar requires synergetic action from enzymes inside the cellulolytic complex. This study aims to evaluate the influence of the variables pH, temperature, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, glucose, lactose, cellobiose and arabinose in the production of cellulases in submerged cultivation of a lineage of *Yarrowia divulgata*, using a Plackett-Burman (PB) delimitation design. The amount of enzymatic activity varied from 0 to 0,105 U/mL for endoglucanase, from 0,096 to 0,291 U/mL for exoglucanase, from 0 to 0,125 U/mL for total cellulase and from 0 to 0,308 U/mL for  $\beta$ -glucosidase. The results show that the significant variables were MgSO<sub>4</sub> (endoglucanase), arabinose (exoglucanase), MnSO<sub>4</sub> and pH (total cellulase), there was no significant influence of the variables for the production of  $\beta$ -glucosidase. Based on the results from the PB design, a complete RCCD (Rotable Central Composite Design) (2<sup>2</sup>) outline was done using MgSO<sub>4</sub> and arabinose variables, which results showed that the amount of endoglucanase activity varied from 0 to 0,295 U/mL, for exoglucanase the activity varied from 0 to 0,234 U/mL, for total cellulase from 0 to 0,337 U/mL, for  $\beta$ -glucosidase from 0 to 1,184 U/mL and the statistical analysis showed that arabinose presented significant influence for exoglucanase and  $\beta$ -glucosidase. Based on the generated models, the concentration of arabinose that would induce the most activity was 1g for exoglucanase and of 10g for  $\beta$ -glucosidase. The validation trials using these arabinose concentrations showed that a significant RAISE of activity occurred varying from 0,141 to 0,355 U/mL for exoglucanase and from 0,954 to 0,964 U/mL for  $\beta$ -glucosidase. Two independent RCCDs were performed to evaluate the enzymatic extracts provenient from cultivations with 1g and 10g of arabinoses. The optimal pH and temperature for the enzymatic reaction obtained for  $\beta$ -glucosidase were 5 and 35°C (crude extract derived from cultivation with 1g of arabinose) and of 5.71 and 47.1°C (crude extract derived from cultivation with 10g of arabinose). For the exoglucanase enzyme, the optimal pH was pH 6.0 (crude extract derived from cultivation with 1g of arabinose) and there was not a significant influence of temperature (for both 1g and 10g of arabinose). For endoglucanase and total cellulase, there was not a significant influence of pH or temperature in the enzymatic reaction. The *Y. divulgata* lineage showed potential to produce cellulolytic enzymes.

**Keywords:** Cellulolytic enzymes, fruits, experimental outline, palm trees.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química de cadeias de celuloses.....	22
Figura 2	Representação da reação de hidrólise da celulose.....	23
Figura 3	Processo de obtenção do etanol de segunda geração (2G).....	25
Figura 4	<i>Yarrowia divulgata</i> em meio de 5% de extrato de malte por 7 dias a 25°C	26
Figura 5	Cultivo em meio CMA (corn meal agar) por 7 dias a 25°C.....	27
Figura 6	<i>Yarrowia divulgata</i> em meio CMC com 24h de cultivo.....	28

## LISTA DE GRÁFICOS

Figura 7	Gráfico do efeito da variação de pH sobre a atividade de exoglucanase da linhagem <i>Y. divulgata</i> em meio contendo 1g de arabinose.....	41
Figura 8	Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) que representam o efeito das variáveis pH e temperatura na atividade de $\beta$ -glicosidase, em meio contendo 1g de arabinose.....	42

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Classificação das enzimas e suas propriedades catalíticas.....	18
Tabela 1	Variáveis independentes e níveis utilizados no delineamento de Plackett-Burman.....	31
Tabela 2	Matriz do delineamento Plackett-Burman.....	31
Tabela 3	Matriz do delineamento central rotacional.....	32
Tabela 4	Variáveis independentes e níveis utilizados no delineamento central rotacional.....	32
Tabela 5	Níveis de pH e temperatura utilizados no DCCR para determinação pH e temperatura ótimos.....	33
Tabela 6	Resultados das atividades celulásicas (U/mL) obtidas no planejamento de Plackett-Burman para a linhagem <i>Yarrowia divulgata</i> .....	34
Tabela 7	Valores de <i>p</i> para análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes na produção de celulases.....	35
Tabela 8	Resultados das atividades celulásicas (U/mL) obtidas no DCCR para a linhagem <i>Yarrowia divulgata</i> .....	36
Tabela 9	ANOVA para atividade de resposta de exoglucanase de <i>Y. divulgata</i> .....	36
Tabela 10	ANOVA para atividade de resposta de $\beta$ -glicosidase de <i>Y. divulgata</i> .....	37
Tabela 11	Valores de atividade celulásica (U/mL) obtidos para a linhagem <i>Y. divulgata</i> . Em meio contendo arabinose. Média de 5 repetições	37
Tabela 12	Resultados das atividades celulásicas (U/mL) obtidas no DCCR para a linhagem <i>Yarrowia divulgata</i> nos ensaios com 1g de arabinose.....	38
Tabela 13	Resultados das atividades celulásicas (U/mL) obtidas no DCCR para a linhagem <i>Yarrowia divulgata</i> . Nos ensaios com 10g de arabinose.....	39
Tabela 14	Análise de variância para o efeito das variáveis na produção de exoglucanase por <i>Y. divulgata</i> .....	39

Tabela 15	Análise de variância para o efeito das variáveis na produção de $\beta$ -glicosidase por <i>Y. divulgata</i> .....	40
Tabela 16	Análise de variância para o efeito das variáveis na produção de $\beta$ -glicosidase por <i>Y. divulgata</i> contendo 10g de arabinose.....	40

## LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

°C	Grau celsius
ANOVA	Análise de variância
CMCase	Enduglucanase
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DNS	cido 3,5-dinitrosalislico
EEB	Extrato Enzimático Bruto
ER	Estrutura de reproduo
Fpase	Celulase Total
GL	Grau de liberdade
NC-IUBMB	<i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistr and Molecular Biology</i>
PB	Plackett-Burman
pH	potencial Hidrogeninico
QM	Quadrático médio
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinao
rpm	Rotaes por minuto
SQ	Soma dos quadrados
U/mL	Atividade enzimática por mililitros
UFT	Universidade Federal do Tocantins

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE GRÁFICOS.....	11
LISTA DE QUADROS E TABELAS .....	12
LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS .....	14
1 INTRODUÇÃO .....	15
2 OBJETIVOS .....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos .....	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1 Enzimas.....	18
3.2 Produção de enzimas .....	19
3.3 Fatores que influenciam a produção enzimática.....	20
3.4 Celulases.....	21
3.5 Etanol de segunda geração.....	24
3.6 A levedura <i>Yarrowia divulgata</i> .....	26
3.7 Delineamento Composto Central Rotacional .....	28
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 Linhagens de leveduras e obtenção do inóculo.....	30
4.2 Produção de celulases em cultivo submerso .....	30
4.3 Quantificação da atividade celulásica .....	32
4.4 Determinação do pH e temperatura ótimos para a reação enzimática.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Produção de celulases em cultivo submerso .....	34
5.2 Determinação do pH e temperatura ótimos para a reação enzimática.....	38
6 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
APÊNDICE A – FIGURA CONTENDO CURVA DE CALIBRAÇÃO COM GLICOSE EM ESPECTROFOTÔMETRO.....	51
APÊNDICE B – TABELAS CONTENDO ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS PRODUÇÕES ENZIMÁTICAS .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

Com o intuito de diminuir problemas ambientais e atenuar mudanças climáticas, tornou-se maior o interesse em se encontrar alternativas para a produção de combustíveis renováveis em substituição ao de petróleo, fazendo assim com que a biomassa vegetal seja vista como potencial recurso para a produção de bioetanol (CAMPOS et al., 2019). A biomassa formada por material lignocelulósico é abundante e constituída, basicamente, por polímeros de celulose e hemicelulose, podendo ser fragmentada em açúcares para posterior produção de etanol. Além de não competirem com culturas alimentares, esses resíduos são mais baratos que as matérias-primas convencionais para produção de álcool (cana-de-açúcar, batata doce, beterraba) (FLORENCIO et al., 2017).

A celulose é o biopolímero de maior ocorrência no mundo. É formada por uma estrutura rígida, microfibrilas, que contribui para a resistência da parede celular. A hemicelulose é um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados, composta de várias unidades monoméricas de açúcar, os quais estão ligados com a celulose e também com a lignina, formando assim uma estrutura altamente complexa (COELHO et al., 2018). A biodegradação desses resíduos pode ser feita por meio de reação de hidrólise, sendo este um método eficiente na liberação de açúcares fermentáveis, onde são utilizadas enzimas celulolíticas. A conversão da biomassa lignocelulósica em etanol tem como principal obstáculo o custo das enzimas, podendo chegar a 48% do preço total do produto final, dificultando assim maiores produções desse tipo de biocombustível (FLORENCIO et al., 2017).

Estudos voltados para desenvolvimento e otimização de produção de enzimas proporciona uma alternativa promissora para a produção de etanol celulósico em larga escala (FLORENCIO et al., 2017). A produção de celulasas por ação microbiana tem sido foco de muitos estudos com o objetivo de estabelecer melhores condições para a produção dessas enzimas (MAKHUVELE et al., 2017). A escolha do meio de cultura é tão importante para o sucesso do processo de fermentação quanto a escolha do microrganismo. Nem sempre o meio que proporciona a melhor multiplicação celular favorece a produção de enzimas, tendo assim a necessidade de se investigar a otimização dos parâmetros que afetam a síntese enzimática, pois as condições ótimas podem variar para cada tipo de microrganismo e/ou enzimas (MENEZES et al., 2019).

As enzimas são proteínas com estruturas complexas e específicas, que podem sofrer alterações na sua forma tridimensional pela interferência de fatores como pH, temperatura, presença de íons e indutores, entre outros, podendo ser afetadas por qualquer tipo de mudança



no ambiente no qual estão sendo produzidas (MARZZOCO e TORRES, 2015; BETTELHEIM et al., 2017). Portanto, o estudo da influência desses fatores na produção enzimática é fundamental para o desenvolvimento de condições de cultivo adequadas para potencializar a síntese das enzimas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de enzimas celulolíticas por uma linhagem de *Yarrowia divulgata*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de endoglucanase, exoglucanase, celulase total e  $\beta$ -glicosidase pela levedura *Yarrowia divulgata* em cultivo submerso;
- Avaliar a influência de 8 variáveis (pH, temperatura,  $MgSO_4$ ,  $MnSO_4$ , glicose, lactose, celobiose e arabinose) na produção das celulases utilizando planejamento experimental e análise de superfície de resposta;
- Determinar pH e temperatura ótimos para a reação enzimática utilizando planejamento experimental e análise de superfície de resposta.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Enzimas

As reações enzimáticas foram reconhecidas e descritas em pesquisas a partir da digestão da carne por secreções do estômago, nos finais dos anos 1700 e continuaram, nos anos seguintes, com a análise da degradação do amido e açúcares menores, feita por extratos de plantas e saliva (NELSON e COX, 2019).

No século XIX, Pasteur descreveu que extratos de leveduras seriam capazes de fermentar açúcar em álcool através de catalise feita por “fermentos”, concluindo que esses fermentos eram inseparáveis das células de leveduras. Porém, em 1897, Eduard Buchner postulou que extratos de leveduras poderiam fermentar açúcar em álcool com moléculas que continuavam ativas mesmo sem a presença de células. Posteriormente, essas moléculas ativas foram denominadas como enzimas (NELSON e COX, 2019).

A partir de então, os estudos foram evoluindo e milhares de enzimas foram purificadas, as suas estruturas e mecanismos explicados. As enzimas são moléculas orgânicas de natureza proteica capazes de aumentar a velocidade das reações químicas sem alterá-las. Possuem uma estrutura quaternária que determina sua função e em qual substrato atuarão, sendo assim, extremamente eficientes e específicas (BETTELHEIM et al., 2017).

O NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) classifica as enzimas por meio de suas propriedades catalíticas de acordo com o quadro 1:

**Quadro 1.** Classificação das enzimas e suas propriedades catalíticas.

Classe	Tipo de reação catalisada
Oxidoredutases	atuam em reações de oxidação-redução transferência de elétrons.
Transferases	catalisam reações de transferência de grupos funcionais (como grupos amina, carboxil, fosfato, acil).
Hidrolases	catalisam reações de hidrólise de ligação covalente.
Liasas	atuam na adição de grupos a ligações duplas ou formação de duplas ligações.
Isomerases	transferência de grupos dentro da molécula.
Ligases	catalisam reações de síntese de novas moléculas através da formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N.

As hidrolases são as enzimas mais utilizadas industrialmente devido não precisarem de cofatores, tendo aplicação nas indústrias de alimentos (produção de queijo, cerveja, vinhos e

pães), fármacos e energia, na fabricação de biodiesel e etanol (YUSOF et al., 2016; LITTLECHILD, 2017).

As reações de hidrólise são realizadas por enzimas chamadas hidrolíticas, ou hidrolases, as quais são altamente específicas em relação ao substrato. São proteínas capazes de reconhecer determinadas regiões de uma molécula e, as quebram (clivam) em moléculas menores. São de extrema importância para a biotecnologia e a maioria delas provém de microrganismos, que foram selecionados na natureza ou modificados geneticamente para uma produção mais eficiente. As principais hidrolases de aplicação industrial são proteases, amilases, lipases, celulases, xilanases e fitases (BASSO e SERBAN, 2019).

### **3.2 Produção de enzimas**

As enzimas como catalisadores biológicos, são produzidas por todos os organismos. Industrialmente há as enzimas de origem animal, vegetal e aquelas produzidas por microrganismos (ROCHA FILHO e VITOLLO, 2018).

Nos microrganismos as enzimas podem ser intracelulares, havendo necessidade de rompimento da célula para sua extração, ou extracelulares, quando são secretadas pela célula. O processo de rompimento da célula para extração de subprodutos possui um risco grande para a produção industrial, pois qualquer dano causado na fase inicial pode comprometer ou invalidar todo o processo, fazendo com que produções de subprodutos extracelulares (tais como enzimas) sejam mais utilizados na indústria (ROCHA FILHO e VITOLLO, 2018; VITOLLO, 2015).

As enzimas vêm sendo produzidos, na sua maioria, por meio de fermentação microbiológica (bactérias, fungos filamentosos e leveduras), pois o processo fermentativo possui facilidade no controle operacional, tais como o monitoramento de temperatura, umidade, fontes de carbono, entre outros parâmetros (BONOMINI et al., 2017).

Dentre os microrganismos com destaque para a produção enzimática encontram-se os fungos filamentosos. Entretanto, as pesquisas com leveduras vêm demonstrando resultados satisfatórios, pois, a produção destes componentes químicos produzidos por fungos leveduriformes possui vantagens em comparação com aqueles produzidos por fungos filamentosos, devido os meios de cultivos e produção enzimática serem relativamente mais simples e econômicos. Outro fator importante para a utilização de leveduras é fato de serem unicelulares apresentam ciclo de vida curto, com alta replicação de células em um menor espaço de tempo (MAIDANA et al., 2019; ARAÚJO, 2015).

Na atualidade, existem pesquisas buscando por leveduras sintetizadoras de enzimas com o objetivo de diminuir tempo e custos na produção dessas moléculas em escala industrial. Elahi e Rehman (2018), isolaram e estudaram a produção de xilanase por *Pichia kudriavzevii*, analisando o efeito de resíduos agroindustriais no crescimento da levedura e na produção de etanol, concluindo que, a linhagem foi promissora para a bioconversão de materiais hemicelulósicos em bioetanol, sendo capazes de produzir enzimas necessárias para a conversão.

Carrasco et al. (2016), analisaram a capacidade de leveduras isoladas na região antártica em produzir celulase e amilase. Para celulase, a atividade enzimática mais alta foi encontrada utilizando-se do potencial Hidrogeniônico (pH) e temperatura. Neste trabalho os autores concluíram que a melhor produção enzimática ocorria em pH 6,2 a 30 °C, porém a linhagem *Mrakia blollopis* apresentou alta produção celulolítica em temperatura de 22 °C.

Vyas e Chhabra (2016), isolaram e identificaram a levedura *Cystobasidium oligophagum* que apresentou potencial para a produção de lipase e celulase. Quando o meio de cultivo foi em carboximetilcelulose, a maior atividade enzimática de endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase foi  $0,072 \pm 0,013$ ,  $0,040 \pm 0,006$ ,  $0,031 \pm 0,011$  UI / mL, respectivamente.

### 3.3 Fatores que influenciam a produção enzimática

Todos os microrganismos possuem um meio ideal de crescimento, biossíntese e secreção de enzimas. No entanto, fatores como substrato disponível, pH, temperatura, agitação, e tempo de cultivo tendem a interferir no metabolismo microbiano. Esses fatores podem ser físicos, como por exemplo, temperatura, pH e pressão osmótica, e, também poder ser químicos (água, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, minerais e oxigênio) (SALVATIERRE, 2014).

A temperatura é um dos fatores primordiais para o crescimento e metabolismo dos microrganismos, variando a exigência de diferentes temperaturas de acordo com a espécie a ser trabalhada. De fato, a taxa de reações e biossínteses torna-se minimizada em temperaturas mais baixas, em contraste com a degradação das enzimas que pode ocorrer em temperaturas mais elevadas, sendo que o aumento da fluidez da membrana plasmática resulta na morte celular (KHURSADE, 2019).

Saithi et al. (2016), estudaram o efeito da temperatura na produção microbiana de amilases, proteases e fitases. Constatando que quando a temperatura estava entre 28 e 34° à produção enzimática alcançava seus maiores valores. Porém, à medida que a temperatura

aumentava, as produções das enzimas diminuía, chegando ao seu valor mínimo de biossíntese em 50°C.

Atualmente, resultados apresentados por alguns estudos explicam tanto o efeito da temperatura como do potencial Hidrogeniônico (pH) para a atividade microbiana. Touijer et al. (2019), otimizaram a produção de celulases para linhagem de levedura *Trichosporon sp.* e, comprovaram que o pH consegue influenciar na reação de síntese destas enzimas, pois, a concentração Hidrogeniônica promove modificações nos grupos iônicos das cadeias dos aminoácidos que constituem a estrutura formadora da enzima, alterando assim, a interação entre as moléculas. Estes resultados, também estão de acordo com aqueles encontrados por Saithi et al. (2016), que utilizaram a temperatura como influenciador para a produção de algumas enzimas sintetizadas pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger*.

Adelabu et al. (2019), otimizaram a produção para *Wickerhamomyces chambardii* e *Saccharomyces diastasticus*, concluindo que, o pH representou um parâmetro importante para a produção enzimática. Apesar de algumas espécies possuírem uma ampla faixa de tolerância ao pH, a espécie *W. chambardii* teve um ponto ótimo de produção em pH entre 4 e 7, tendo declínio conforme os valores saíam dessa faixa. Os autores também observaram que a composição do meio utilizado para a produção também interferiu na síntese das enzimas.

Vários substratos são utilizados como fonte de carbono na produção de enzimas. Em várias pesquisas fontes de minerais, vitaminas carbono e nitrogênio são suficientes para impulsionar a biossíntese. Resíduos lignocelulósicos podem servir como fonte de nutrientes para leveduras, fungos e bactérias (AGUIAR e MENEZES, 2000).

A composição do meio de cultivo pode influenciar tanto o crescimento celular quanto a produção de enzimas, posto que o meio pode conter substâncias que afetam os fenômenos de indução e inibição catabólica (FERREIRA et al., 2018). Nesta perspectiva, Rai, Tiwari e Gaur (2012), estudaram a influência do pH, temperatura, diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de celulases pela linhagem *Candida sp.* Isolada de solo e relataram que a produção enzimática alcançou rendimentos máximos em pH 5 e temperatura de 50°C em meio de cultura enriquecido com glicose.

### 3.4 Celulases

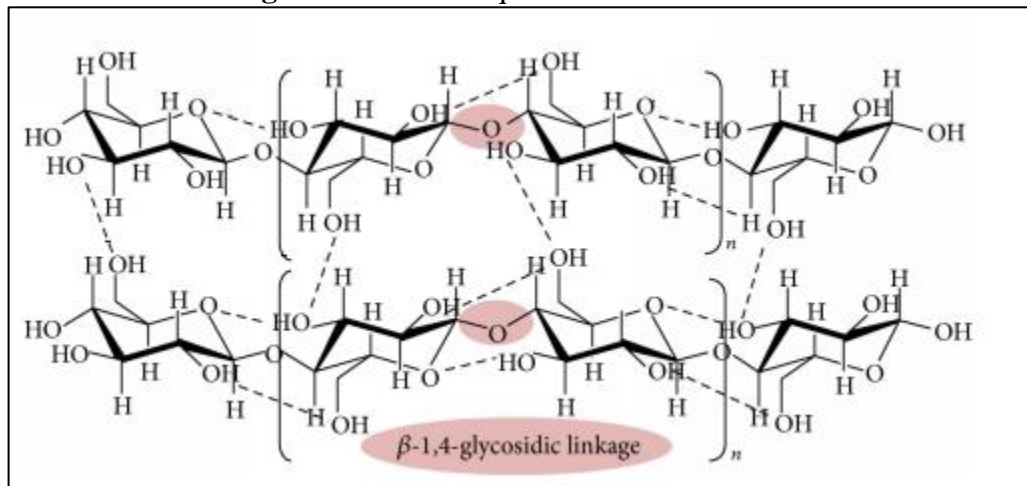
As celulases começaram a ser estudadas no Pacífico Sul, devido à degradação de tecidos produzidos de algodão e objetos utilizados por soldados que atuavam na Segunda Guerra Mundial. As forças armadas norte-americanas e algumas organizações montaram laboratórios

para descobrirem e solucionarem o motivo da deterioração rápida dos produtos à base de algodão (CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

Os pesquisadores, liderados por Elwun T. Reese encontraram uma espécie de microrganismo que secretava enzimas capazes de degradar a celulose. Em 1953, os pesquisadores já tinham concluído que as enzimas naturais, denominadas celulasas, eram constituídas por um complexo de diversas moléculas com distintas habilidades na degradação do substrato. Desde então, o foco dos estudos passou a ser a otimização da produção das enzimas responsável por estas reações (CASTRO e PEREIRA JÚNIOR, 2010).

A celulose é o principal constituinte estrutural da parede celular das plantas. Trata-se de uma cadeia linear de várias unidades de glicose que são ligadas entre si por ligações  $\beta$ -(1, 4) glicosídicas, representada na figura 1 (LEE, HAMID e ZAIN, 2014; RUNGRATTANAKASIN et al., 2018).

**Figura 1.** Estrutura química de cadeias de celuloses.



**Fonte:** Lee, Hamid e Zain (2014) pg 6.

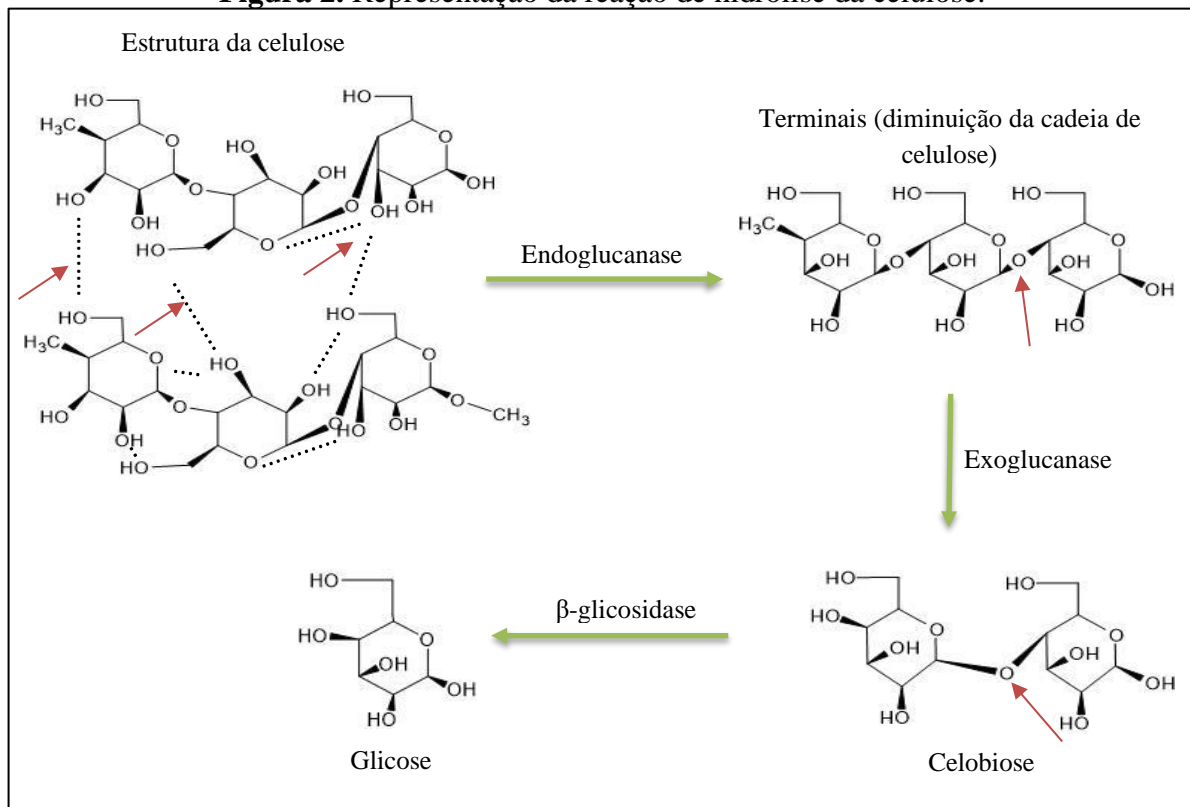
A celulose é a biomassa orgânica renovável de maior abundância no planeta, considerada uma boa alternativa para produção de produtos químicos e biocombustíveis. A conversão deste polímero em açúcar fermentável, ou seja, glicose, requer a ação sinérgica do complexo celulolítico. Esse termo refere-se ao complexo composto por endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase (RUNGRATTANAKASIN et al., 2018).

As endoglucanases atuam na clivagem de regiões aleatórias dentro da celulose, resultando na diminuição da cadeia e gerando terminais redutores e não redutores. As exoglucanases, também conhecidas como celodextrinases, agem nos terminais de cadeias geradas pelas endoglucanases, liberando assim glicose e/ou celobiose. Conseqüentemente, a

reação é finalizada com a hidrólise da celobiose realizada pelas enzimas  $\beta$ -glicosidases (FLORENCIO et al., 2017).

A figura 2 representa a reação de hidrólise da celulose para obtenção de glicose, as setas indicam a região de atuação de cada grupo enzimático.

**Figura 2.** Representação da reação de hidrólise da celulose.



Fonte: autor, utilizando o programa *ChemSketch*.

O resíduo lignocelulósico representa uma fonte de energia renovável bastante promissora, sendo utilizado para produção de bioetanol de segunda geração. Esse álcool é produzido através da reação de hidrólise da celulose, resultante da fermentação da glicose. Sendo a hidrólise enzimática o método mais eficaz na conversão da lignocelulose em açúcares (MENEZES et al., 2019).

Apesar de eficiente, a hidrólise enzimática apresenta alto custo de operação, sendo responsável por 48% do valor total de toda a cadeia de produção de etanol, portanto os gastos para a obtenção de enzimas, ainda limitam sua utilização em vários processos industriais. Por este motivo, o objetivo de diversos estudos vem sendo a busca em maximizar a produção das celulases através da seleção de microrganismos capazes de secretar de maneira eficiente altas quantidades de enzimas, além da otimização desses processos (FLORENCIO et al., 2017).



Na última década vem se destacando a produção de etanol de 2<sup>o</sup> geração, oriundo de biomassa lignocelulósica e de algas. Portanto, pode-se afirmar de uma forma simples que o processo para a obtenção desta matéria prima é constituído de duas etapas: a primeira consiste na hidrólise dos polissacarídeos, gerando mono e dissacarídeos. A segunda etapa envolve a fermentação dos açúcares liberados (TABATABAEI et al., 2015). Desta forma, as celulases desempenham um papel fundamental na produção de etanol de segunda geração, no entanto, a viabilidade econômica é um dos fatores de restrições para esta utilização. A produção e a eficiência da enzima tornaram-se um dos principais pontos de atenção a ser considerado em escala industrial (SRIVASTAVA et al., 2018).

Embora os estudos de exploração de celulases para a produção de enzimas tenham crescido significativamente no decorrer da última década, estes biocatalizadores continuam sendo um fator de alto custo no processo de produção do etanol. As enzimas podem apresentar um fator limitado em algumas áreas ricas em biomassa, porém não possuem indústria que produzam celulases e infraestrutura de transporte, limitando assim a sua produção (ELLILA et al., 2017).

### **3.5 Etanol de segunda geração**

No Brasil, em 1927 iniciou-se o uso em maior escala do etanol, chegando no ponto máximo de consumo por volta de 1975 com a criação do Programa Brasileiro de Álcool – PRÓALCOOL (Decreto nº 76.593 de 14 de novembro de 1975), que tinha como objetivo ampliar a produção de álcool anidro e hidratado, estabelecendo uma porcentagem obrigatória de adição de etanol na gasolina. Desde então, o álcool vem colaborando de forma significativa para a matriz energética nacional (LOPES, SANTOS e COSTA, 2017).

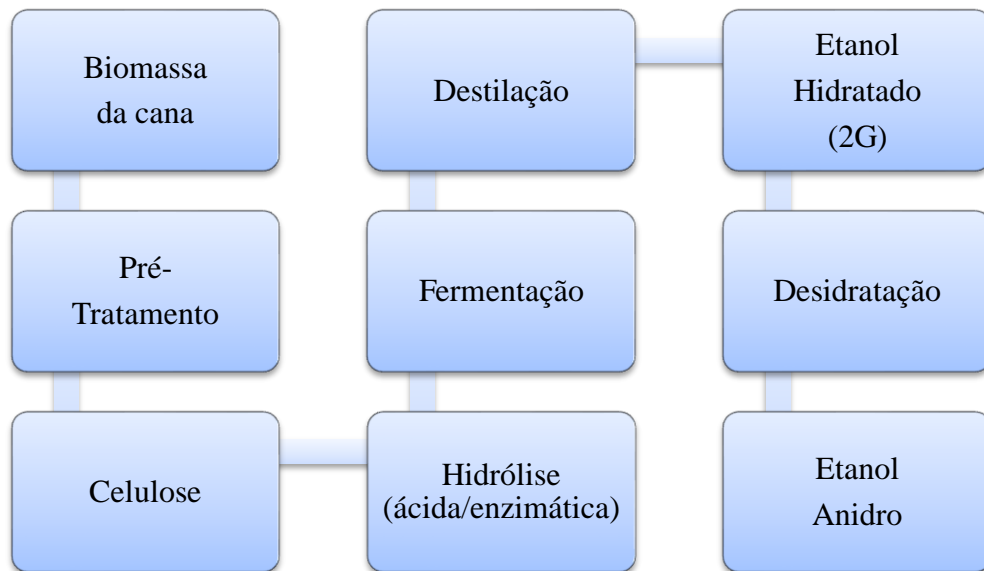
Com o aumento do consumo de etanol obtido a partir do extrato líquido da cana-de-açúcar ocorreu o aumento da quantidade de resíduos sólidos (bagaço), sendo queimados nas caldeiras para obtenção de energia térmica, porém a queima deste bagaço passou a gerar poluição, sendo prejudicial ao ambiente e às pessoas. Tornou-se necessário, portanto, estudar formas de reutilização dos resíduos, chegando assim aos testes de utilização para produção de etanol de segunda geração (MARTINS et al, 2014).

O etanol de primeira geração (1G) é produzido a partir da fermentação de açúcares presentes no caldo de cana-de-açúcar, já o etanol de segunda geração (2G) tem como matéria-prima os materiais lignocelulósicos, que contém açúcares de cadeias longas e complexas,

necessitando assim reduzir esses açúcares em sua forma mais simples, através de processos de hidrólise. Ambos, 1G e 2G, terão as mesmas especificações no processo final de produção, o que os diferencia é o processo de obtenção (LOPES, SANTOS e COSTA, 2017).

Ao chegar na usina a biomassa passa pelo processo de pré-tratamento, que pode ser feito por ácido diluído, explosão a vapor ou hidrogênio alcalino (a escolha do método depende de fatores econômicos e físico-químico), obtendo assim a biomassa pré-tratada formada por celulose e lignina, liberando um líquido chamado de licor pré-tratamento, composto pela hemicelulose, que contém principalmente pentoses como a xilose e arabinose. A celulose é então encaminhada para a reação de hidrólise, normalmente através do uso de coquetéis enzimáticos (ANSANELLI et al, 2017). A figura 3 demonstra o fluxograma da produção do etanol de segunda geração a partir do bagaço da cana-de-açúcar.

**Figura 3.** Processo de obtenção do etanol de segunda geração (2G).



Com a hidrólise da celulose é obtido um produto chamado de mosto que é encaminhado para o processo de fermentação alcoólica, utilizando de levedura *Saccharomyces cerevisiae*; após a fermentação obtém-se o vinho que possui etanol na sua composição, o qual é separado da mistura do vinho através de destilação, sendo liberado portanto o etanol hidratado; para chegar ao produto final anidro é necessário fazer o processo de desidratação, que consiste em separar as moléculas de água do álcool, feito através de destilação fracionada (ANSANELLI et al, 2017).

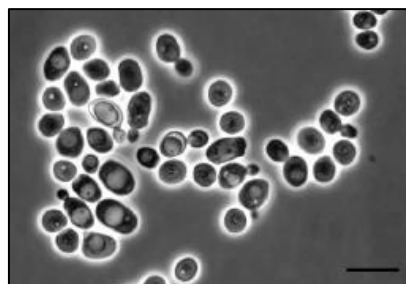
### 3.6 A levedura *Yarrowia divulgata*

As leveduras são organismos eucarióticos pertencentes ao Reino Fungi, e distinguem-se dos fungos filamentosos por serem unicelulares. O termo levedura é derivado das palavras alemã e holandesa (levedo + ura) que significa fermentação e são consideradas fáceis de trabalhar. Apresentam diferentes morfologias celulares que podem variar de: ovais, arredondadas ou cilíndricas, sendo consideradas organismos que podem estar associadas a plantas, pele e intestino de animais e insetos (RAJ et al., 2016).

As tendências do mercado biotecnológico inspiram a busca de novas linhagens de leveduras com potencial para produção de metabólitos valiosos, com base na engenharia genética, que consiste na transferência de novos genes entre as células estudadas. Entretanto, existem algumas preocupações quanto ao uso industrial de organismos modificados geneticamente, que impulsionam a necessidade de se pesquisar linhagens de tipo selvagem com propriedade de atuação biotecnológica. Entre os gêneros estudados que possuem capacidade natural de produzir elementos químicos importantes destaca-se o gênero *Yarrowia* (TOMASZEWSKA et al., 2014; RAKICKA et al., 2016; HANKO et al., 2018), sendo extensivamente conhecido pela sua alta capacidade lipolítica e proteolítica. Entretanto, nos últimos anos algumas espécies novas pertencentes ao gênero *Yarrowia* foram descritas com capacidade de produzir outros compostos, tais como ácido cítrico, polióis e eritritol (NAGY et al., 2013; RAKICKA et al., 2016).

O nome do gênero *Yarrowia* foi proposto por Van Der Alt e Von Arx (1980), em reconhecimento de um novo gênero identificado por David Yarrow do Laboratório de Microbiologia de Delft (NICAUD, 2012). Aos poucos os estudos vêm descrevendo as características e capacidades deste gênero, como dito por Sekova et al. (2019), que destacam sua tolerância a variações de pH e temperatura.

**Figura 4.** *Yarrowia divulgata* em meio de 5% de extrato de malte por 7 dias a 25°C.

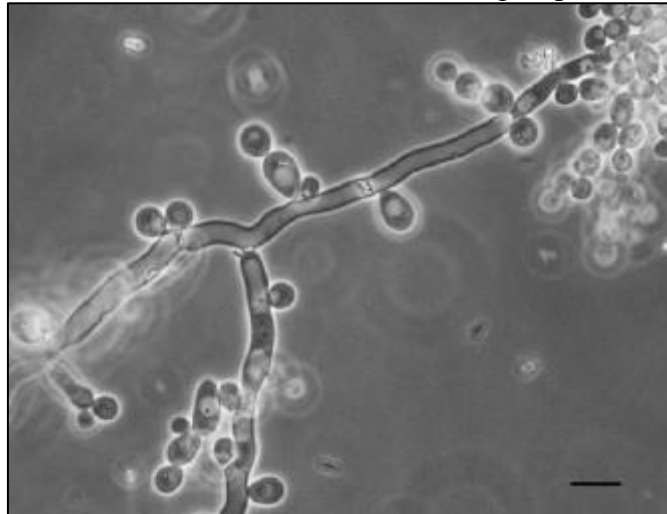


Fonte: Nagy et al. (2013) pg 4821.

Nagy et al. (2013), isolaram cinco linhagens de leveduras do gênero *Yarrowia* de diferentes amostras de animais. Os autores descreveram a espécie *Y. divulgata*, em meio de 5% de extrato de malte após 3 dias a 25°C, como células esferóides, sub-esféricas ou elipsoides que se apresentam isoladas, em pares, cadeias curtas e em pequenos aglomerados (figura 3), pertencente à classe *Saccharomycetes* e da família dos *Dipodascaceae*.

A nomenclatura *Y. divulgata* refere-se a geografia da espécie, onde relaciona o termo *divulgata* ao fato de encontrar esses microrganismos em vários habitats. Porém a morfologia desta levedura pode variar conforme a limitações de nutrientes no meio de cultura, meios com baixas concentrações de malte pode, por exemplo, possibilitar formas mais alongadas das células formando pseudo-hifas (figura 4) (EGERMEIER et al., 2017; NAGY et al., 2013). A conformação colonial da levedura é do tipo cremosa, com bordas lisas, de coloração branca e estrutura côncava, que apresenta crescimento rápido e acima do meio de cultura (NAGY et al., 2013; BRUNO et al., 2017).

**Figura 5.** Cultivo em meio CMA (corn meal agar) por 7 dias a 25°C.



Fonte: Nagy et al (2013), pg 4822.

À medida que mais estudos são realizados e mais linhagens são identificadas novas aplicações são atribuídas a espécie *Y. divulgata*. De acordo com Lopes (2019), *Y. divulgata* isolada de tucum (*Bactris setosa*) apresentou produção de lipases e Santos (2017) avaliou a produção de celulases por esta levedura.

**Figura 6.** *Yarrowia divulgata* em meio CMC com 24h de cultivo.



\*ER=estrutura de reprodução da levedura.  
Fonte: autor.

### 3.7 Delineamento Composto Central Rotacional

Para análises laboratoriais o desempenho dos sistemas é de grande relevância, melhorar o rendimento dos processos e diminuir custos é o objetivo da otimização das metodologias. O método tradicional “*one-at-a-time*” que pesquisa muitas variáveis em diversos níveis individualmente não consegue identificar com precisão a interação entre as variáveis e não abrange completamente o espaço amostral, traz também a desvantagem de ser onerosa, tendo em vista que necessita de grandes números de ensaios para observar adequadamente o espaço amostral (BAS e BOYACI, 2007; SOUZA, AZERÊDO e SILVA, 2018).

O delineamento composto central rotacional (DCCR) e superfície de resposta são ferramentas de otimização dos resultados experimentais que reduz o número de ensaios necessários para uma análise em dados amostrais mais amplo (SOUZA, AZERÊDO e SILVA, 2018).

“Assim, o DCCR apresenta uma varredura cruzada dos principais pontos de interesse do espaço amostral, captando pontos dos vértices (referenciados por níveis -1 e 1), pontos centrais (referenciados por nível 0) e pontos extremos fora do espaço amostral inicial (referenciados por  $-\alpha$  e  $+\alpha$ ), mas que permitem obter relações quadráticas para todas as variáveis estudadas. Ainda, a formatação da equação de ajuste quadrática das variáveis envolvidas fornece superfícies de resposta que constituem ferramenta útil na análise e interpretação dos resultados obtidos.” (SOUZA, AZERÊDO e SILVA, 2018, p. 330).

A utilização do DCCR visa encontrar modelos empíricos que representa a região estudada, buscando avaliar quais efeitos são significativos sobre a resposta, e se o modelo obtido é adequado para os resultados obtidos (RODRIGUES e IEMMA, 2014).

A superfície de resposta é uma técnica matemática de otimização onde uma resposta de interesse é influenciada por inúmeras variáveis, a estratégia define o efeito das variáveis em forma independente, sozinhas e combinadas, encontrando o ponto com melhor resposta para a produção (BAS e BOYACI, 2007).

O estudo de otimização utilizando superfície de resposta é dividido em três estágios. A primeira etapa é a análise preliminar em que se realiza a determinação das variáveis independentes e os níveis. A segunda consiste na seleção do desenho experimental e na verificação da equação do modelo matemático. E por último é gerado o gráfico da superfície de resposta e o gráfico de contorno da resposta em função dos parâmetros independentes, determinando os pontos ótimos (BAS e BOYACI, 2007).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Linhagens de leveduras e obtenção do inóculo

A linhagem de levedura utilizada na pesquisa foi isolada a partir de frutos da palmeira tucum (*Bactris setosa*) e pertence à coleção de culturas microbianas Carlos Rosa da UFT e encontra-se preservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  em caldo GYMP/glicerol. A linhagem foi previamente identificada como *Yarrowia divulgata* através do método de sequenciamento dos domínios D1/D2 do rRNA (ID = 99%; *GenBank accession number*: EU194451.1).

A levedura foi reativada pela técnica de esgotamento por estrias em Ágar Sabouraud contendo 20 g/L de glicose, 10 g/L de peptona 5 g/L de extrato de levedura e 18 g/L de ágar. As placas foram incubadas por um período de 48 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ .

Para a preparação do inóculo, foram retiradas alçadas de massa celular e transferidas para uma solução salina estéril (0,85% de NaCl). Uma alíquota dessa suspensão foi utilizada para inocular os meios, de modo a se obter uma concentração inicial de  $10^7$  células/mL no meio para a produção de celulases. A contagem de células foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer em microscópio óptico a 100 vezes.

### 4.2 Produção de celulases em cultivo submerso

Os ensaios para a produção das celulases foram conduzidos em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio composto por 5g/L de carboximetilcelulose (CMC), 2g/L de  $\text{NaNO}_3$ , 1g/L de  $\text{K}_2\text{PO}_4$  e 0,2g/L de peptona. Para a variação de pH foi utilizado solução tampão de acetato de sódio 0,1 M, o pH dos meios, bem como a temperatura de incubação e as concentrações de sulfato de magnésio, sulfato de manganês, glicose, lactose, celobiose e arabinose, variaram de acordo com o planejamento experimental proposto.

Os frascos foram incubados por 24 horas, com agitação de 150 rpm. Após esse período, foram feitas contagens de células em câmara de Neubauer e as amostras foram centrifugadas a 3800 rpm por 60 minutos para separar as células. O sobrenadante obtido (extrato enzimático bruto – EEB) foi armazenado sob refrigeração ( $10^{\circ}\text{C}$ ) para posterior medida das atividades enzimáticas.

Para se avaliar a influência das variáveis pH, temperatura, concentrações de  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ , glicose, lactose, celobiose e arabinose na produção das celulases foi realizado um

delineamento de Plackett-Burman (tabela 1), com 15 ensaios, com as variáveis independentes em três níveis e três repetições no ponto central (tabela 2), segundo Rodrigues e Iemma (2014).

Os resultados obtidos foram analisados através da estatística de variância a 10% de significância usando o *software Protimiza Experimental Design*.

**Tabela 1.** Variáveis independentes e níveis utilizados no delineamento de Plackett-Burman.

	<b>Variáveis</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>X<sub>1</sub></b>	pH	4	5	6
<b>X<sub>2</sub></b>	Temperatura (°C)	30	40	50
<b>X<sub>3</sub></b>	MgSO <sub>4</sub> (g/L)	0	1,5	3
<b>X<sub>4</sub></b>	MnSO <sub>4</sub> (g/L)	0	0,5	1
<b>X<sub>5</sub></b>	Glicose (g/L)	0	5	10
<b>X<sub>6</sub></b>	Lactose (g/L)	0	5	10
<b>X<sub>7</sub></b>	Celobiose (g/L)	0	5	10
<b>X<sub>8</sub></b>	Arabinose (g/L)	0	5	10

**Tabela 2.** Matriz do delineamento Plackett-Burman.

<b>Ensaio</b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>X<sub>4</sub></b>	<b>X<sub>5</sub></b>	<b>X<sub>6</sub></b>	<b>X<sub>7</sub></b>	<b>X<sub>8</sub></b>
<b>1</b>	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
<b>2</b>	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
<b>3</b>	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
<b>4</b>	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
<b>5</b>	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
<b>6</b>	1	1	1	-1	1	1	-1	1
<b>7</b>	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
<b>8</b>	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
<b>9</b>	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
<b>10</b>	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
<b>11</b>	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
<b>12</b>	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
<b>13</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>14</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>15</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

Com base nos resultados obtidos nesse planejamento, as variáveis significativas foram avaliadas em um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2<sup>2</sup>) com 11 ensaios, sendo 3 repetições do ponto central (RODRIGUES e IEMMA, 2014), conforme a tabela 3. As variáveis não significativas e as condições dos ensaios foram mantidas conforme descrito



anteriormente, item 4.2. A tabela 4 apresenta os níveis utilizados no delineamento Central Rotacional.

**Tabela 3.** Matriz do delineamento central rotacional.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

**Tabela 4.** Variáveis independentes e níveis utilizados no delineamento central rotacional.

Variáveis	-1,41	-1	0	1	1,41
X <sub>1</sub> MgSO <sub>4</sub> (g/L)	0	0,44	1,5	2,56	3
X <sub>2</sub> Arabinose (g/L)	0	1,45	5	8,55	10

Os resultados obtidos foram analisados através de análise de variância a 5% de significância usando o *software Protimiza Experimental Design*.

Com base nos resultados obtidos no DCCR, as concentrações ótimas das variáveis significativas foram utilizadas para validar os modelos obtidos para as enzimas, com cinco repetições.

### 4.3 Quantificação da atividade celulásica

As atividades de endoglucanase (CMCase), celulase total (Fpase), exoglucanase (Avicelase) e  $\beta$ -glicosidase foram avaliadas após 30 minutos de incubação de 500 $\mu$ L de EEB e 500 $\mu$ L de solução de cada substrato em tampão acetato de sódio 0,05M pH 5 a 40°C, segundo metodologia proposta por Ghose (1987).

As atividades celulásicas foram quantificadas através da dosagem dos açúcares redutores produzidos utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) (MILLER, 1959).

Após o período de reação foi adicionado 1 mL de DNS, as amostras foram fervidas em banho-maria a 100 °C por 5 minutos para a produção de cor e posteriormente a reação foi interrompida colocando-se os tubos em água fria e foram adicionados 5 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, Gehaka Uv 380 G, em comprimento de onda de 540 nm.

Os substratos utilizados foram 20 g/L de carboximetilcelulose, uma tira de papel filtro Whatman n°1 com dimensões de 1x6 cm, 20 g/L de celulose microcristalina e 20 g/L de celobiose para CMC<sub>Case</sub>, celulase total (Fpase), avicelase e β-glicosidase, respectivamente.

As concentrações, em g/L de glicose, foram calculadas com base na equação da reta gerada a partir da curva de calibração (curva padrão) (Apêndice A). Uma unidade de atividade celulásica (U/mL) foi considerada como a quantidade de enzima capaz de liberar 1μmol de glicose por mL por minuto de reação.

#### 4.4 Determinação do pH e temperatura ótimos para a reação enzimática

Para avaliar o efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2<sup>2</sup>), incluindo 3 repetições no ponto central, de acordo com a tabela 5 (RODRIGUES e IEMMA, 2014).

**Tabela 5.** Níveis de pH e temperatura utilizados no DCCR para determinação pH e temperatura ótimos.

	Variáveis	-1,41	-1	0	1	1,41
X1	pH	4	4,3	5	5,71	6
X2	Temperatura (°C)	30	32,9	40	47,1	50

Os efeitos significativos foram analisados através de estatística de variância (ANOVA) a 5% de significância.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Produção de celulases em cultivo submerso

O delineamento experimental utilizado foi baseado na matriz para 8 variáveis de Plackett-Burman (PB) que forneceu a base para a formulação dos 15 ensaios realizados, sendo 3 repetições no ponto central. Na tabela 6 encontram-se os resultados das atividades celulásicas obtidas nos ensaios com as variáveis pH ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ),  $MgSO_4$  ( $X_3$ ),  $MnSO_4$  ( $X_4$ ), glicose ( $X_5$ ), lactose ( $X_6$ ), celobiose ( $X_7$ ) e arabinose ( $X_8$ ).

**Tabela 6.** Resultados das atividades celulásicas (U/mL) obtidas no planejamento de Plackett-Burman para a linhagem *Yarrowia divulgata*.

Ensaios	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	$Y_1^*$	$Y_2^*$	$Y_3^*$	$Y_4^*$
1	6	30	3	0	0	0	10	10	0,064	0,105	0,070	0,053
2	6	50	0	1	0	0	0	10	0,00	0,123	0,040	0,087
3	4	50	3	0	10	0	0	0	0,105	0,238	0,00	0,264
4	6	30	3	1	0	10	0	0	0,041	0,259	0,125	0,308
5	6	50	0	1	10	0	10	0	0,042	0,201	0,041	0,130
6	6	50	3	0	10	10	0	10	0,016	0,181	0,00	0,00
7	4	50	3	1	0	10	10	0	0,051	0,231	0,029	0,044
8	4	30	3	1	10	0	10	10	0,016	0,098	0,060	0,046
9	4	30	0	1	10	10	0	10	0,018	0,096	0,033	0,038
10	6	30	0	0	10	10	10	0	0,00	0,155	0,019	0,016
11	4	50	0	0	0	10	10	10	0,017	0,161	0,018	0,034
12	4	30	0	0	0	0	0	0	0,002	0,217	0,00	0,00
13	5	40	1,5	0,5	5	5	5	5	0,035	0,178	0,014	0,042
14	5	40	1,5	0,5	5	5	5	5	0,039	0,291	0,040	0,042
15	5	40	1,5	0,5	5	5	5	5	0,013	0,112	0,003	0,040

\* $Y_1$ -Endoglucanase;  $Y_2$ - Exoglucanase;  $Y_3$ - Celulase Total;  $Y_4$ - $\beta$ - glicosidase.

Os valores de atividade observados variaram de 0 a 0,105 U/mL para englucanase, de 0,096 a 0,291 U/mL para exoglucanase, de 0 a 0,125 U/mL para celulase total e 0 a 0,308 U/mL para  $\beta$ -glicosidase.

Segundo a análise de variância, as variáveis significativas ( $p < 0,1$ ) foram  $MgSO_4$  (para endoglucanase),  $MnSO_4$  e pH (para celulase total) e arabinose (para exoglucanase). Para  $\beta$ -glicosidase nenhuma das variáveis foi significativa a 10% de significância. O  $p$  valor pode ser observado na tabela 7, os resultados da ANOVA para endoglucanase, exoglucanase, celulase total e  $\beta$ -glicosidase estão descritos no apêndice B.

**Tabela 7.** Valores de  $p$  para análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes na produção de celulases.

Nome	$p$ valor			
	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>
<b>Média</b>	0,05	0,00019	0,67	0,27
<b>Curvatura</b>	0,9	0,61	0,76	0,88
<b>pH (X<sub>1</sub>)</b>	0,44	0,94	0,06*	0,48
<b>Temperatura (X<sub>2</sub>)</b>	0,77	0,38	0,97	0,55
<b>MgSO<sub>4</sub> (X<sub>3</sub>)</b>	0,08*	0,48	0,19	0,29
<b>MnSO<sub>4</sub> (X<sub>4</sub>)</b>	0,52	0,83	0,04*	0,34
<b>Glicose (X<sub>5</sub>)</b>	0,59	0,57	0,84	0,70
<b>Lactose (X<sub>6</sub>)</b>	0,79	0,65	0,14	0,83
<b>Celobiose (X<sub>7</sub>)</b>	0,66	0,47	0,11	0,92
<b>Arabinose (X<sub>8</sub>)</b>	0,26	0,05*	0,14	0,70

\*Y<sub>1</sub>-Endoglucanase; Y<sub>2</sub>- Exoglucanase; Y<sub>3</sub>- Celulase Total; Y<sub>4</sub>-β- glicosidase.

\* variáveis significativas a 10% de significância.

Embora haja relatos da eficiência da degradação da celulose por fungos filamentosos, poucas pesquisas têm sido realizadas na identificação de leveduras produtoras de celulases. Atividade celulolítica foi observada por Guedes et al. (2019) em duas linhagens de leveduras isoladas de frutos de inajá e tucum, com produção de endoglucanase (0,380 e 0,454 U/mL) e celulose total (0,0436 e 0,102 U/mL).

Touijer et al. (2019) pesquisaram celulases termoestáveis da levedura *Trichosporon sp.* encontrando atividade de endoglucanase e celulase total (0,4 e 0,1 U/mL, respectivamente) após a otimização da concentração de CMC, Carvalho (2013) obteve 0,164 U/mL de atividade de endoglucanase pela levedura *Cryptococcus laurentii* em meio suplementado com 2% de farelo trigo. Já Kanti e Suidiana (2002) obtiveram 12U/mL de atividade de endoglucanase por leveduras do gênero *Debaryomyces* S-6 isoladas do solo, em meio contendo CMC como única fonte de carbono.

Embora fatores como pH e temperatura sejam importantes para a produção de enzimas, essas variáveis não apresentaram influência na produção de enzimas celulolíticas produzidas por *Y. divulgata*.

Qadir et al. (2018), que estudaram a atividade enzimática de endoglucanase e β-glicosidase pelas espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis* isoladas de solo, observaram efeito significativo da temperatura, sendo a temperatura ótima considerada de 35,5 °C para a enzima endoglucanase com atividade de 9,6 U/mL

Com base nos resultados obtidos no PB, as variáveis MgSO<sub>4</sub> (X<sub>1</sub>) e arabinose (X<sub>2</sub>) foram selecionadas para realização de um DCCR. Os resultados das atividades enzimáticas estão apresentados na tabela 8.

**Tabela 8.** Resultados das atividades celulásicas (U/mL) obtidas no DCCR para a linhagem *Yarrowia divulgata*.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub> *	Y <sub>2</sub> *	Y <sub>3</sub> *	Y <sub>4</sub> *
1	0,44 (-1)	1,45 (-1)	0,009	0,048	0,078	0,918
2	2,56 (1)	1,45 (-1)	0,000	0,005	0,130	0,913
3	0,44 (-1)	8,55 (1)	0,208	<b>0,234</b>	<b>0,337</b>	0,366
4	2,56 (1)	8,55 (1)	<b>0,295</b>	0,184	0,305	0,341
5	0 (-1,41)	5 (0)	0,000	0,020	0,000	0,254
6	3 (1,41)	5 (0)	0,117	0,000	0,101	0,247
7	1,5 (0)	0 (-1,41)	0,003	0,101	0,027	<b>1,184</b>
8	1,5 (0)	10 (1,41)	0,000	0,146	0,141	0,000
9	1,5 (0)	5 (0)	0,000	0,028	0,225	0,279
10	1,5 (0)	5 (0)	0,170	0,049	0,023	0,410
11	1,5 (0)	5 (0)	0,098	0,066	0,189	0,281

\*Y<sub>1</sub>-Endoglucanase; Y<sub>2</sub>- Exoglucanase; Y<sub>3</sub>- Celulase Total; Y<sub>4</sub>-β- glicosidase.

Os valores de atividade de endoglucanase variaram de 0 a 0,295 U/mL. Para exoglucanase a atividade variou de 0 a 0,234 U/mL, para celulase total de 0 a 0,337 U/mL e para β-glicosidase de 0 a 1,184 U/mL.

Os resultados da análise de variância mostraram que houve influência significativa ( $p < 0,05$ ) apenas do coeficiente linear e quadrático da arabinose para a produção de exoglucanase e β-glicosidase enquanto que a variável MgSO<sub>4</sub> não apresentou influência significativa. A porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo foi de 67% para exoglucanase e 89,3% para β-glicosidase, indicando que o modelo é adequado para explicar o comportamento da variável resposta (tabelas 9 e 10).

**Tabela 9.** ANOVA para atividade de exoglucanase de *Y. divulgata*.

	SQ*	GL**	QM***	Fcalc
<b>Regressão</b>	38862,93	2	19431,46	8,1
<b>Resíduos</b>	19177,98	8	2397,248	
<b>Falta de Ajuste</b>	18450,33	6	3075,054	8,4
<b>Erro Puro</b>	727,655	2	363,827	
<b>Total</b>	58040,91	10		

\*Soma dos quadrados; \*\*Grau de liberdade; \*\*\*Quadrado médio.

**Tabela 10.** ANOVA para atividade de resposta de  $\beta$ -glicosidase de *Y. divulgata*.

	SQ*	GL**	QM***	Fcalc
<b>Regressão</b>	1150466	2	575233,2	33,3
<b>Resíduos</b>	138014,4	8	17251,8	
<b>Falta de Ajuste</b>	127168,7	6	21194,78	3,9
<b>Erro Puro</b>	10845,72	2	5422,862	
<b>Total</b>	1288481	10		

\*Soma dos quadrados; \*\*Grau de liberdade; \*\*\*Quadrado médio.

Observa-se que o modelo ajustado para exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase ficam caracterizados pelas equações 1 e 2, respectivamente, elaborados com os coeficientes significativos para as duas enzimas.

$$Y_1 = 41,69 + 52,81 X_2 + 51,74 X_2^2 \quad (1)$$

$$Y_4 = 334,67 - 344,70 X_2 + 179,84 X_2^2 \quad (2)$$

Onde:

$Y_1$  = atividade de exoglucanase;

$Y_4$  = atividade de  $\beta$ -glicosidase.

$X_2$  = coeficiente linear de arabinose;

$X_2^2$  = coeficiente quadrático de arabinose.

Baseado nas equações 1 e 2 foram determinadas as concentrações ótimas de arabinose, que foi de 1 g para exoglucanase e 10 g para  $\beta$ -glicosidase, posteriormente, foi realizado ensaio de validação com 5 repetições para estas concentrações.

A tabela 11 apresenta os valores médios de atividade celulásica das 5 repetições.

**Tabela 11.** Valores de atividade celulásica (U/mL) obtidos para a linhagem *Y. divulgata* em meio contendo arabinose. Média de 5 repetições.

	Endoglucanase	Exoglucanase	Celulase Total	$\beta$ -glicosidase
<b>1 g de arabinose</b>	0,000 $\pm$ 0,0	0,133 $\pm$ 0,060	0,000 $\pm$ 0,0	0,692 $\pm$ 0,010
<b>10 g de arabinose</b>	0,180 $\pm$ 0,013	0,145 $\pm$ 0,008	0,014 $\pm$ 0,003	0,04 $\pm$ 0,013

\*média de atividade celulásica  $\pm$  desvio padrão

Santos (2017), avaliou a produção de celulasas por duas linhagens de leveduras isoladas de frutos de palmeiras e constatou a influência da arabinose induzindo a produção enzimática. Os dados mostraram que houve uma diferença significativa nas atividades celulásicas, com incremento de até 10 vezes, com a utilização de arabinose e lactose, sendo que a arabinose induziu a maior atividade do complexo celulolítico.

Rai, Tiwari e Gaur (2012) utilizaram diferentes parâmetros nutricionais para otimizar a produção de celulases produzidas por leveduras do gênero *Candida*, isoladas do solo. O meio de crescimento foi suplementado com monossacarídeos e dissacarídeos, demonstrando que ocorreu uma influência significativa nas atividades de exoglucanase e endoglucanase na concentração de 0,5% (p/v) de glicose.

## 5.2 Determinação do pH e temperatura ótimos para a reação enzimática

Para a determinação dos valores ótimos de pH e temperatura para reação enzimática foram realizados dois DCCR independentes, utilizando os extratos brutos provenientes dos ensaios de validação com concentrações 1 e 10 g de arabinose. Os valores de atividade obtidos no DCCR para 1 g de arabinose variaram de 0,026 a 0,196 U/mL para endoglucanase, para exoglucanase variaram de 0,141 a 0,355 U/mL, para celulase total variaram de 0,025 a 0,108 U/mL e para  $\beta$ -glicosidase variaram de 1,035 a 1,102 U/mL (tabela 12).

**Tabela 12.** Resultados das atividades celulásicas (U/mL) obtidas no DCCR para a linhagem *Yarrowia divulgata* nos ensaios com 1g de arabinose.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub> *	Y <sub>2</sub> *	Y <sub>3</sub> *	Y <sub>4</sub> *
1	4,3 (-1)	32,9 (-1)	0,079	0,217	0,102	1,073
2	5,71 (1)	32,9 (-1)	0,085	0,295	0,078	1,037
3	4,3 (-1)	47,1 (1)	0,083	0,160	<b>0,108</b>	1,035
4	5,71 (1)	47,1 (1)	0,120	0,188	0,083	1,072
5	4 (-1,41)	40 (0)	<b>0,196</b>	0,246	0,089	1,058
6	6 (1,41)	40 (0)	0,128	<b>0,355</b>	0,076	1,052
7	5 (0)	30 (-1,41)	0,026	0,169	0,087	<b>1,102</b>
8	5 (0)	50 (1,41)	0,159	0,156	0,061	1,064
9	5 (0)	40 (0)	0,115	0,141	0,087	1,052
10	5 (0)	40 (0)	0,060	0,177	0,025	1,072
11	5 (0)	40 (0)	0,082	0,222	0,0322	1,06

\*Y1-Endoglucanase; Y2- Exoglucanase; Y3- Celulase Total; Y4- $\beta$ - glicosidase.

Os valores de atividade obtidos no DCCR para 10g de arabinose variaram de 0 a 0,051 U/mL para endoglucanase, para exoglucanase variaram de 0 a 0,079 U/mL, para celulase total variaram de 0 a 0,079 U/mL e para  $\beta$ -glicosidase variaram de 0,954 a 0,964 U/mL (tabela 13).

**Tabela 13.** Resultados das atividades celulásicas (U/mL) obtidas no DCCR para a linhagem *Yarrowia divulgata* nos ensaios com 10g de arabinose.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub> *	Y <sub>2</sub> *	Y <sub>3</sub> *	Y <sub>4</sub> *
1	4,3 (-1)	32,9 (-1)	0,000	0,040	0,000	0,959
2	5,71 (1)	32,9 (-1)	<b>0,051</b>	<b>0,079</b>	0,000	0,960
3	4,3 (-1)	47,1 (1)	0,000	0,000	0,041	0,957
4	5,71 (1)	47,1 (1)	0,000	0,040	0,013	<b>0,964</b>
5	4 (-1,41)	40 (0)	0,000	0,000	0,001	0,955
6	6 (1,41)	40 (0)	0,000	0,009	<b>0,079</b>	0,959
7	5 (0)	30 (-1,41)	0,011	0,046	0,051	0,959
8	5 (0)	50 (1,41)	0,000	0,034	0,000	0,954
9	5 (0)	40 (0)	0,000	0,000	0,000	0,963
10	5 (0)	40 (0)	0,000	0,046	0,011	0,957
11	5 (0)	40 (0)	0,000	0,017	0,000	0,962

\*Y<sub>1</sub>-Endoglucanase; Y<sub>2</sub>- Exoglucanase; Y<sub>3</sub>- Celulase Total; Y<sub>4</sub>-β- glicosidase.

Os resultados da análise de variância mostraram que houve influência significativa ( $p < 0,05$ ) apenas dos coeficientes linear e quadrático de pH para a produção de exoglucanase do extrato bruto (EB) contendo 1 g de arabinose. Para β-glicosidase ocorreu influência do coeficiente quadrático de pH, coeficiente linear de temperatura e a interação entre pH e temperatura para o EB contendo 1 g de arabinose e houve influência significativa para o coeficiente linear de pH, coeficiente quadrático de temperatura e interação entre pH e temperatura do EB contendo 10 g de arabinose. A porcentagem de variação explicada ( $R^2$ ) pelo modelo foi de 70,83% para exoglucanase e 65,76% para β-glicosidase com EB com 1 g, indicando que o modelo está adequado para explicar o comportamento da variável resposta. Porém o  $R^2$  42,35% com EB com 10 g de arabinose, indicando que o modelo não é adequado. (tabelas 14, 15 e 16).

**Tabela 14.** Análise de variância para o efeito das variáveis na atividade de exoglucanase por *Y. divulgata*.

	SQ*	GL**	QM***	Fcalc
<b>Regressão</b>	305,403	2	152,701	9,7
<b>Resíduos</b>	125,759	8	15,719	
<b>Falta de Ajuste</b>	92,940	6	15,490	0,9
<b>Erro Puro</b>	32,819	2	16,409	
<b>Total</b>	431,163	10		



**Tabela 15.** Análise de variância para o efeito das variáveis na atividade de  $\beta$ -glicosidase por *Y. divulgata* do EB contendo 1 g de arabinose.

	SQ*	GL**	QM***	Fcalc
<b>Regressão</b>	22,742	3	7,580	4,4
<b>Resíduos</b>	11,843	7	1,691	
<b>Falta de Ajuste</b>	9,822	5	1,964	1,9
<b>Erro Puro</b>	2,020	2	1,010	
<b>Total</b>	34,585	10		

**Tabela 16.** Análise de variância para o efeito das variáveis na produção de  $\beta$ -glicosidase por *Y. divulgata* do EB contendo 10 g de arabinose.

	SQ*	GL**	QM***	Fcalc
<b>Regressão</b>	0,432	3	0,144	1,713
<b>Resíduos</b>	0,588	7	0,084	
<b>Falta de Ajuste</b>	0,396	5	0,079	0,826
<b>Erro Puro</b>	0,192	2	0,0960	
<b>Total</b>	1,020	10		

Observa-se que o modelo ajustado para exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase ficam caracterizados pelas equações 3 e 4 (equação 3 para exoglucanase, equação 4 para  $\beta$ -glicosidase com EB com 1 g), elaborados com os coeficientes significativos para as duas enzimas.

$$Y_2 = 16,84 + 3,24 X_1 + 5,98 X_1^2 \quad (3)$$

$$Y_4 = 106,97 - 0,97 X_1^2 - 0,71 X_2 + 1,80 X_1 X_2 \quad (4)$$

Onde:

$Y_2$  = atividade de exoglucanase;

$Y_4$  = atividade de  $\beta$ -glicosidase;

$X_1$  = coeficiente linear de pH;

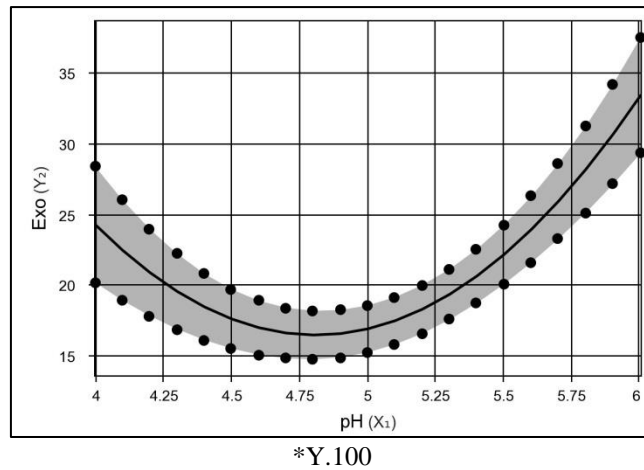
$X_1^2$  = coeficiente quadrático de pH;

$X_2$  = coeficiente linear de temperatura; e

$X_1.X_2$  = interação de pH e temperatura.

O maior valor de atividade de exoglucanase foi obtido no ensaio realizado na faixa de pH 6, apresentando o valor máximo de 0,355 U/mL. Na figura 6 observa-se que a faixa com maiores atividades está entre o pH 5,75 e 6. O valor de pH ótimo equivale ao valor encontrado por Giese et al. (2017), que estudaram a produção de celulases produzidas por *Trichosporon laibachii*, isolado de folha em decomposição, madeira e ninho de formiga.

**Figura 7.** Gráfico do efeito da variação de pH sobre a atividade de exoglucanase da linhagem *Y. divulgata* em meio contendo 1g de arabinose.



Para ilustrar os efeitos das variáveis significativas do DCCR com 1 g de arabinose na atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidase, são apresentados os gráficos de superfície de resposta e as curvas de contorno na figura 7 (A e B), onde pode ser observado que as faixas com maiores atividades estão entre pH 4 e 4,5 e entre as temperaturas 47,1 e 50 °C. A atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidase alcançou o valor máximo experimental de 1,102 U/mL na região de pH 5 e temperatura de 30°C.

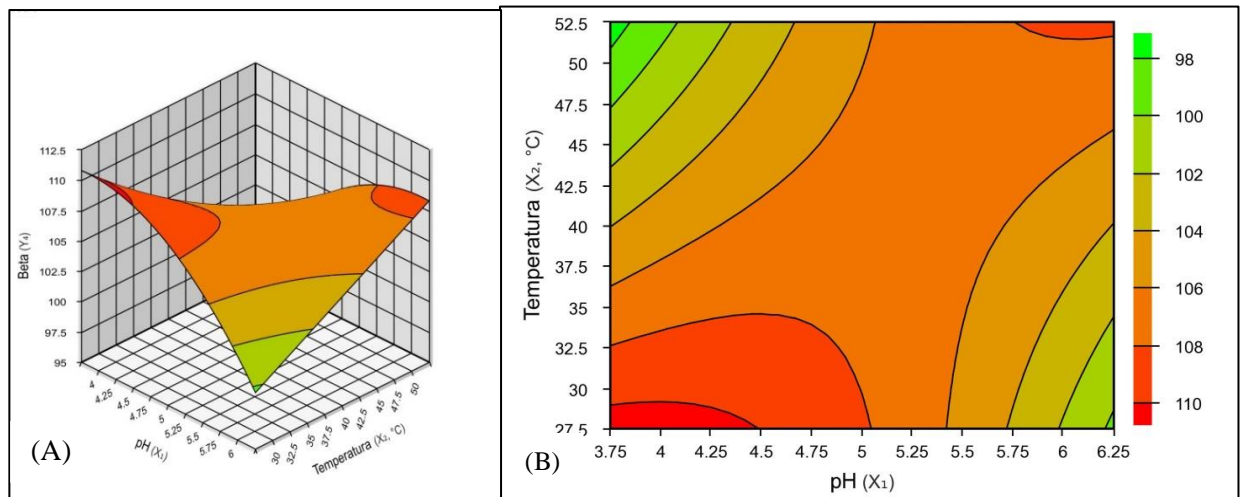
Adelabu et al. (2019), isolaram leveduras do intestino de gafanhotos e estudaram a otimização da produção de celulases. Os autores testaram o efeito do pH e temperatura na atividade enzimática e constataram que a máxima liberação de glicose foi encontrada em pH 4,5 para as enzimas produzidas por *Wickerhamomyces chamberdi* e pH 5 para enzimas produzidas por *Saccharomyces diastaticus*. Pode-se observar que a atividade enzimática de *Y. divulgata* é reduzida gradativamente com o aumento do pH, o que concorda com os dados obtidos por esses autores. O motivo da diminuição da atividade em pH mais alto provavelmente ocorre devido à inativação proteica das enzimas (ADELABU et al., 2019; BETTELHEIM et al., 2017).

Embora haja poucos estudos sobre a enzimas produzidas por leveduras, recentes pesquisas indicaram o potencial destes microrganismos para a síntese de celulases (SHARIQ e SOHAIL, 2019). Esses autores descreveram a co-produção de celulase por *Candida tropicalis* e fizeram a caracterização das enzimas, onde encontraram um pico de atividade em pH 5 para  $\beta$ -glicosidase, o que vai em concordância com os dados obtidos em nosso trabalho.

Ribeiro et al (2019) analisaram atividade de  $\beta$ -glicosidase por leveduras *Candida* sp. isoladas do intestino de larvas de *Hypsipyla* spp. e identificaram que as linhagens isoladas tinham melhor atividade entre o pH 4 e 5,5, tendo a melhor atividade de 0,35 U/mL em pH 4.

Adelabu et al. (2019) e Techaparin et al. (2017), relataram que devido a composições genéticas, leveduras são boas em respostas a altas temperaturas e baixos valores de pH, sendo capazes de produzir enzimas termotolerantes, podendo assim explicar os pontos ótimos de atividade enzimática em temperaturas mais elevadas. Adelabu et al. (2019), observaram que algumas celulases apresentaram atividade ótima a 45°C e Touijer et al. (2019), encontraram ponto ótimo de atividade enzimática em uma temperatura de 55 °C. As celulases termotolerantes apresentam potencial para uso industrial, pois possuem atividade específica mais alta e estabilidade aprimorada, permitindo melhor desempenho (com menor concentração de enzimas) e flexibilidade em relação às configurações no processo de hidrólise, gerando assim uma economia no processo em geral (VIKARI et al, 2007).

**Figura 8.** Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) que representam o efeito das variáveis pH e temperatura na atividade de  $\beta$ -glicosidase, em meio contendo 1g de arabinose.



\*Y.100

Giese et al. (2017), avaliaram produção de enzimas celulolíticas por várias linhagens de leveduras isoladas de animais e plantas em decomposição, foram realizados testes de otimização de pH, fontes de C e N para atividade enzimática. Os autores demonstraram bons resultados de otimização para produção endoglucanase, em que as leveduras mostraram atividade aumentada de 0,010 para 0,752 U/mL, em meio contendo diferente fonte de carbono, que se compara em partes neste estudo.

## 6 CONCLUSÃO

No decorrer do trabalho foi possível observar que a linhagem *Y. divulgata* isolada de coco tucum apresenta potencial para produzir enzimas celulolíticas, o que pode indicar que os frutos de palmeiras tucum (*Bactris setosa*) sejam importantes fontes de leveduras com potencial aplicações biotecnológicas.

O modelo matemático conseguiu explicar a variação em 70,83% para exoglucanase e 89,3% para  $\beta$ -glicosidase indicando que a arabinose é importante para a produção e atividades celulolíticas.

As celulases produzidas pela linhagem *Y. divulgata* possuem características ácidas e termotolerantes, apresentando um potencial importante para o uso industrial pois permitem melhor desempenho e flexibilidade, gerando uma economia no processo de hidrólise.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELABU, Blessing et al. Optimization of celulase enzyme from sorghum straw by yeasts isolated from plant feeding-termite *Zonocerus variegatus*. **Food And Applied Bioscience Journal**, Chiang Mai, v. 7, n. 3, p.81-99, dez. 2019.
- AGUIAR, Claudio Lima; MENEZES, Tobias J. B. Produção de celulases e xilanase por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **B.ceppa**, Curitiba, v. 18, n. 1, p.57-70, jun. 2000.
- ANSANELLI, Stela et al. Sistemas de Inovação Ambiental em Países em Desenvolvimento: uma discussão a partir do desenvolvimento do Etanol de Segunda Geração no Brasil. **Revista Pesquisa & Debate**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 121-139, 2017.
- ARAÚJO, Miguel Augusto Machado de. **Isolamento e seleção de leveduras para produção de enzimas de interesse industrial a partir de frutos do cerrado**. 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2015.
- BAS, Deniz; BOYACI, Ismail H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 836-845, nov. 2007
- BASSO, Alessandra; SERBAN, Simona. Industrial applications of immobilized enzymes – A review. **Molecular Catalysis**, [s.l.], v. 479, p.110607-110627, dez. 2019.
- BASTOS, Crislane Maria da Silva et al. Efeito das condições de cultivo na produção de amilase por duas linhagens de leveduras. **Brazilian Journal Of Biosciences**, Porto Alegre, v. 13, n. 3, p. 123-129, jul. 2015.
- BETTELHEIM, Frederick A. et al. **Introdução à química geral, orgânica e bioquímica**. São Paulo: Cengage Learning, 2017.
- BONOMINI, F. M.; WISBECK, E.; GERN, R. M. M. Produção de enzimas por *Pleurotus Sajor-caju* e *Pleurotus djamor*. **Nbc – Periódico Científico do Núcleo de Biosciência**, Belo Horizonte, v. 7, n. 14, p.109-126, nov. 2017.
- BRUNO, Alessandra Nejar et al. **Biotecnologia II: aplicações e tecnologias**. 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 372 p.

CAMPOS, Breno B. et al. Elephant grass (*Pennisetum purpureum schumach*) is a promising feedstock for 45elula production by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus CCT 7735*. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.43-49, mar. 2019.

CARRASCO, Mario et al. Screening and characterization of amylase and 45elulase activities in psychrotolerant yeasts. **Bmc Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 16-21, 19 fev. 2016.

CARVALHO, Fernanda Paula. Enzimas celulolíticas e xilanolíticas de leveduras isoladas do cerrado. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Lavras: p. 119, Lavras, 2013.

CARVALHO, Raquel Vieira de et al. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.380-386, jun. 2008.

CASSA-BARBOSA, L.a. et al. Isolation and characterization of yeasts capable of Yeasts of eficiente utilization of hemicellulosic hydrolyzate as the celulas source. **Genetics And Molecular Research**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.11605-11612, 2015.

CASTRO, Aline Machado de; PEREIRA JÚNIOR, Nei. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p.181-188, nov. 2010.

COELHO, Glauciane Danusa et al. Produção e caracterização da celulase (CMCase) por fungo isolado da fase termofílica de um processo de compostagem em fermentação em estado sólido tendo bagaço de coco verde como substrato. **Saúde e Ciência**, Sumé, v. 7, n. 2, p.323-338, ago. 2018.

CRESPO, Irving Sosa et al. Efecto inhibitorio de fracciones peptídicas derivadas de la hidrólisis de semillas de chía (*Salvia 45elulase45*) sobre las enzimas -amilasa y glucosidasa. **Nutrición Hospitalaria**, [s.l.], v. 35, n. 4, p.928-935, 2 ago. 2018.

DODO, C. M.; MAMPHWELI, S.; OKOH, O.. Bioethanol production from lignocellulosic sugarcane leaves and tops. **Journal Of Energy In Southern Africa**, Cidade do Cabo, v. 28, n. 3, p.1-11, nov. 2017.

EGERMEIER, Michael et al. Metabolic Flexibility of *Yarrowia lipolytica* Growing on Glycerol. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 8, p.408-419, 24 jan. 2017.

ELAHI, Amina; REHMAN, Abdul. Bioconversion of hemicellulosic 46elulase4646.4646o 46elula by yeast, *Pichia kudriavzevii* 2-KLP1, isolated from industrial waste. **Revista Argentina de Microbiología**, [s.l.], v. 50, n. 4, p. 417-425, out. 2018.

FERREIRA, Flaviane Lopes et al. **Sugarcane bagasse as a source of 46elulas for enzyme production by filamentous fungi**. **Hoehnea**, São Paulo, v. 45, n. 1, p.134-142, jan. 2018.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Current challenges on the production and use of cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Química Nova**, [s.l.], p.1082-1093, 4 ago. 2017. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Biochemical Engineering Research**, New Delhi, v. 59, n. 2, p.257-268, nov. 1987.

GIESE, Ellen Cristine et al. Cellulase Production by *Trichosporon laibachii*. **Orbital – The Electronic Journal Of Chemistry**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.271-278, 2 out. 2017.

GUEDES, Eduardo Henrique Santos et al. Atividade celulolítica de leveduras isoladas de frutos de palmeiras. **B.ceppa**, Curitiba, v. 36, n. 1, p.1-7, jul. 2019.

HANKO, Ekr et al. Engineering  $\alpha$ -oxidation in *Yarrowia lipolytica* for methyl ketone production. **Metabolic Engineering**, Nova York, v. 48, n. 1, p. 52-62, jul. 2018.

KANTI, Atit; SUDIANA, I. Made. Cellulolytic yeast isolated from soil Gunung Halimun National Park. **B'erita Biologi**, v.6, n. 1, April, 2002.

KHURSADE, Parag S. et al. *Stenotrophomonas maltophilia* Gd2: A potential and novel isolate for fibrinolytic enzyme production. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [s.l.], v. 26, n. 7, p.1567-1575, nov. 2019.

LAGRANGE, Daniël Coenrad. Isolation of fungi from dung of wild herbivores for application in bioethanol production. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 4, p. 648-655, out. 2017.

LEE, H. V; HAMID, S.B.A.; ZAIN, S.K. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. **The Scientific World Journal**, v.2014, p. 1-20, 2014.

LIMA, Laisy Garcia Ribeiro et al. Lipase Production by *Aspergillus niger* C by Submerged Fermentation. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [s.l.], v. 62, p.1-14, 2019.

LITTLECHILD, J. A. Improving the ‘tool box’ for robust industrial enzymes. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 44, n. 4-5, p. 711-720, 11 abr. 2017.

LOPES, Dallecyo Cerqueira. **Otimização das condições de cultivo e caracterização parcial da lipase produzida por *Yarrowia divulgata***. 2019. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Programa de Pós-graduação em Agroenergia, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2019. Cap. 3.

LOPES, J.G.; SANTOS, K.C. dos; COSTA, A.A. Prospecção tecnológica do uso do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 10, n. 3, p. 590-599, 2017.

MAIDANA, Silvana A. et al. Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de na Poligalacturonasa Microbiana. **Ciencia y Tecnología**, Félix de Azara, v. 21, n. 32, p.22-32, dez. 2019.

MAKHUVELE, R. et al. Isolation of fungi from dung of wild herbivores for application in bioethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 648-655, 2017.

MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo B. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

MARTINS, Fernanda de Araújo et al. A produção do etanol de segunda geração a partir do bagaço da cana-de-açúcar. **Revista Latino-Americana de Inovação e Engenharia de Produção**, v. 2, n. 3, p. 5-16, 2014.

MENEZES, Farley Souza Ribeiro et al. Evaluation of endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase production by bacteria and yeasts isolated from a Eucalyptus plantation in the cerrado of Minas Gerais. **Na Interdisciplinary Journal Of Applied Science**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.1-9, nov. 2019.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 31, n. 3, p.426-428, mar. 1959.

NAGY, Edina et al. *Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov., a yeast species from animal-related and marine sources. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 63, n. 12, p.4818-4823, 24 out. 2013.



NAGY, E Sz. Isolation and diversity of food spoilage Yarrowia yeast strains from meat. **Acta Alimentaria**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.101-106, nov. 2014.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2019.

NICAUD, Jean-marc. Yarrowia lipolytica. **Yeast**, [s.l.], v. 29, n. 10, p.409-418, out. 2012.

OLIVEIRA, Anne Caroline Defranceschi et al. Utilização de resíduos da agroindústria para a produção de enzimas lipolíticas por fermentação submersa. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 15, n. 1, p.19-26, mar. 2013.

QADIR, Faizan et al. Evaluation of a yeast co-culture for 48elulase and xylanase production under solid state fermentation of sugarcane bagasse using multivariate approach. **Industrial Crops & Products**, [s.l.], v. 123, p. 407-415, nov. 2018.

RAI, P.; TIWARI, S.; GAUR, R.. Optimization of process parameters for 48elulase production by novel thermotolerant yeast. **Bioresources**, Raleigh, v. 7, n. 4, p.5401-5414, abr. 2012.

RAJ, Aswathy et al. Isolation, characterization and 48elulase activity of lipase enzyme producing yeasts isolated from spoiled sweet sample. **Scholars Research Library**, Londres, v. 10, n. 8, p.129-135, 2016.

RAKICKA, Magdalena et al. Sweet and sour potential of yeast from the Yarrowia clade. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 92, p.48-54, set. 2016.

ROCHA FILHO, José Alves; VITOLO, Michele. **Guia Para Aulas Práticas de Biotecnologia de Enzimas e Fermentação**. São Paulo: Blucher, 2018.

RODRIGUES, Juliana Gisele Corrêa et al. Produção de celulasas por actinobactérias cultivadas em diferentes substratos. **Brazilian Journal Of Development**, [s.l.], v. 5, n. 7, p.10636-10646, ago. 2019.

RODRIGUES, Maria Isabel; IEMMA, Antônio Francisco. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2014.

RUNGRATTANAKASIN, Budsayachat et al. Cloning and 49elulase4949. of na endoglucanase gene from the thermotolerant fungus *Aspergillus fumigatus* DbiNU-1 in *Kluyveromyces lactis*. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 49, n. 3, p.647-655, jul. 2018.

SAITHI, Sukanya et al. Mathematical Modeling of Biomass and Enzyme Production Kinetics by *Aspergillus niger* in Solid-State. **Journal Of Microbial & Biochemical Technology**, [s.l.], v. 08, n. 02, p.123-130, nov. 2016.

SALVATIERRE, Clabijo Mérida. **Microbiologia – Aspectos morfológicos, bioquímicos e metodológicos**. São Paulo: Érica, 2014.

SANTOS, Laisy Daniella Alves. **Avaliação da produção de celulases por duas linhagens de leveduras isoladas de frutos de palmeiras**. 2017. 48 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Agroenergia, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2017.

SEKOVA, Varvara Yu et al. Soluble Sugar and Lipid Readjustments in the *Yarrowia lipolytica* Yeast at Various Temperatures and pH. **Metabolites**, [s.l.], v. 9, n. 12, p. 307-330, 17 dez. 2019.

SHARIQ, Maria; SOHAIL, Muhammad. Production of celulase and xylanase from *Candida tropicalis* (MK-118) on purified and crude substrates. **Pakistan Journal Of Botany**, [s.l.], v. 52, n. 1, p.1-6, 27 ago. 2019.

SOUZA, L.D.P.; AZERÊDO, G.A. de.; SILVA, F. de A. Comportamento do concreto sob altas temperaturas via planejamento experimental fatorial com configuração estrela. **Ambiente Construído**, Porto Alegre, v. 18, n. 1, p. 327-344, 2018.

SRIVASTAVA, Neha et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 82, p.2379-2386, fev. 2018.

TABATABAEI, Meisam et al. Renewable Energy and Alternative Fuel Technologies. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2015, p.1-2, 2015.

TECHAPARIN, A.; THANONKEO, P.; KLANRIT, P. High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 3, p.461-475, jul. 2017.

TOMASZEWSKA, Ewa et al. Alterations of Liver Histomorphology in Relation to Copper Supplementation in Inorganic and Organic Form in Growing Rats. **Bulletin Of The Veterinary Institute In Pulawy**, [s.l.], v. 58, n. 3, p.479-486, 1 out. 2014.

TOUIJER, Hanane et al. Thermostable Cellulases from the Yeast *Trichosporon* sp. **Enzyme Research**. Londres, p. 1-7. 7 abr. 2019.

VIIKARI, Liisa et al. Thermostable Enzymes in Lignocellulose Hydrolysis. **Adv Biochem Engin/Biotechnol**, v. 108, p. 121-145, 2007.

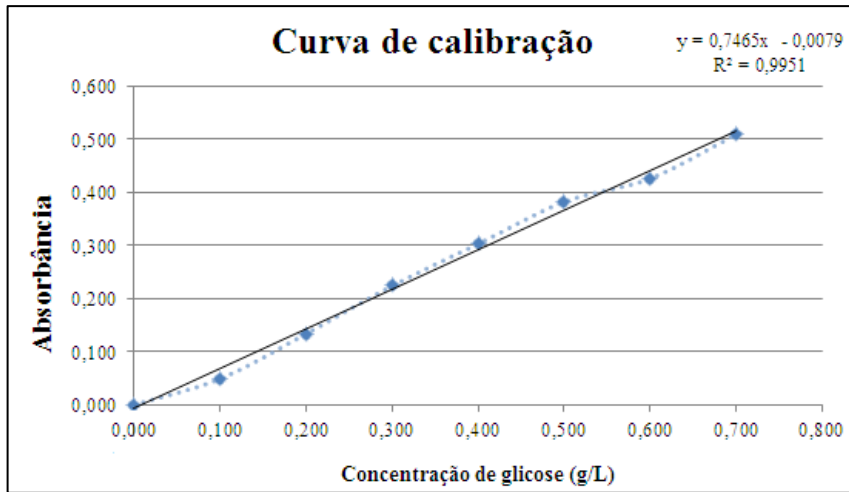
VITOLLO, Michele. **Biotecnologia farmacêutica: aspectos sobre aplicação industrial**. São Paulo: Blucher, 2015. 419 p.

VYAS, Sachin; CHHABRA, Meenu. Isolation, identification and characterization of *Cystic Basidium oligophagum* JRC1: a cellulase and lipase producing oleaginous yeast. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 250–258, 2017.

YUSOF, Faridah et al. Cocoa pod husk, a new source of hydrolase enzymes for preparation of cross-linked enzyme aggregate. **Springer Plus**, Nova York, v. 57, n. 5, p. 1-18, jan. 2016.

**APÊNDICE A – FIGURA CONTENDO CURVA DE CALIBRAÇÃO COM GLICOSE EM ESPECTROFOTÔMETRO.**

**Figura 1.** Curva de calibração com glicose e leitura individual em espectrofotômetro.



## APÊNDICE B – TABELAS CONTENDO ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS PRODUÇÕES ENZIMÁTICAS

**Tabela 1.** Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes na produção de endoglucanase.

Nome	Efeito	Erro padrão	t calculado	p-valor
<b>Média</b>	2,65	1,06	2,5	0,05
<b>Curvatura</b>	0,61	4,74	0,12	0,9
<b>pH (x<sub>1</sub>)</b>	-1,75	2,12	-0,82	0,44
<b>Temperatura (x<sub>2</sub>)</b>	0,64	2,12	0,3	0,77
<b>MgSO<sub>4</sub> (x<sub>3</sub>)</b>	4,58	2,12	2,16	0,08
<b>MnSO<sub>4</sub> (x<sub>4</sub>)</b>	-1,45	2,12	-0,68	0,52
<b>Glicose (x<sub>5</sub>)</b>	1,19	2,12	0,56	0,59
<b>Lactose (x<sub>6</sub>)</b>	-0,59	2,12	-0,28	0,79
<b>Celobiose (x<sub>7</sub>)</b>	0,97	2,12	0,46	0,66
<b>Arabinose (x<sub>8</sub>)</b>	-2,67	2,12	-1,26	0,26

**Tabela 2.** Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes na produção de exoglucanase.

Nome	Efeito	Erro padrão	t calculado	p-valor
<b>Média</b>	17,25	1,78	9,68	0,00019
<b>Curvatura</b>	4,31	7,96	0,54	0,61
<b>pH (x<sub>1</sub>)</b>	-0,26	3,56	-0,07	0,94
<b>Temperatura (x<sub>2</sub>)</b>	3,4	3,56	0,95	0,38
<b>MgSO<sub>4</sub> (x<sub>3</sub>)</b>	2,66	3,56	0,74	0,48
<b>MnSO<sub>4</sub> (x<sub>4</sub>)</b>	-0,79	3,56	-0,22	0,83
<b>Glicose (x<sub>5</sub>)</b>	-2,13	3,56	-0,59	0,57
<b>Lactose (x<sub>6</sub>)</b>	1,7	3,56	0,47	0,65
<b>Celobiose (x<sub>7</sub>)</b>	-2,72	3,56	-0,76	0,47
<b>Arabinose (x<sub>8</sub>)</b>	-8,94	3,56	-2,51	0,05

**Tabela 3.** Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes na produção de celulase total.

Nome	Efeito	Erro padrão	t calculado	p-valor
<b>Média</b>	0,74	1,67	0,44	0,67
<b>Curvatura</b>	2,44	7,48	0,33	0,76
<b>pH (x<sub>1</sub>)</b>	8,31	3,35	2,49	0,06
<b>Temperatura (x<sub>2</sub>)</b>	-0,11	3,35	-0,03	0,97
<b>MgSO<sub>4</sub> (x<sub>3</sub>)</b>	5,09	3,35	1,52	0,19

<b>MnSO4 (x<sub>4</sub>)</b>	9,55	3,35	2,86	0,04
<b>Glicose (x<sub>5</sub>)</b>	0,72	3,35	0,22	0,84
<b>Lactose (x<sub>6</sub>)</b>	5,92	3,35	1,77	0,14
<b>Celobiose (x<sub>7</sub>)</b>	6,51	3,35	1,95	0,11
<b>Arabinose (x<sub>8</sub>)</b>	5,85	3,35	1,75	0,14

**Tabela 4.** Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes na produção de  $\beta$ -glicosidase.

<b>Nome</b>	<b>Efeito</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>t calculado</b>	<b>p-valor</b>
<b>Média</b>	5,93	4,77	1,24	0,27
<b>Curvatura</b>	-3,52	21,34	-0,17	0,88
<b>pH (x<sub>1</sub>)</b>	7,28	9,54	0,76	0,48
<b>Temperatura (x<sub>2</sub>)</b>	6,12	9,54	0,64	0,55
<b>MgSO4 (x<sub>3</sub>)</b>	11,30	9,54	1,18	0,29
<b>MnSO4 (x<sub>4</sub>)</b>	9,99	9,54	1,05	0,34
<b>Glicose (x<sub>5</sub>)</b>	3,94	9,54	0,41	0,70
<b>Lactose (x<sub>6</sub>)</b>	2,12	9,54	0,22	0,83
<b>Celobiose (x<sub>7</sub>)</b>	-0,99	9,54	-0,10	0,92
<b>Arabinose (x<sub>8</sub>)</b>	-3,95	9,54	-0,41	0,70