



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS DE PALMAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

KAIQUE AGUIAR SILVA

**Influência do magnésio e da arabinose na produção de celulases
por *Yarrowia divulgata***

Palmas/TO
2019

KAIQUE AGUIAR SILVA

**Influência do magnésio e da arabinose na produção de celulases
por *Yarrowia divulgata***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Palmas, Curso de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Engenheiro de Alimentos e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientadora: Dr^a Solange Cristina Carreiro

Palmas/TO
2019

<https://sistemas.uft.edu.br/ficha/>

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

A282i Aguiar Silva, Kaique.

Influência do magnésio e da arabinose na produção de celulasas por *Yarrowia divulgata*. / Kaique Aguiar Silva. – Palmas, TO, 2019.

27 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Engenharia de Alimentos, 2019.

Orientador: Solange Cristina Carreiro

1. Levedura. 2. Complexo celulolítico. 3. Fermentação. 4. DCCR. I. Título

CDD 664

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).

FOLHA DE APROVAÇÃO

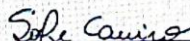
KAIQUE AGUIAR SILVA

**INFLUÊNCIA DO MAGNÉSIO E DA ARABINOSE NA
PRODUÇÃO DE CELULASES POR *YARROWIA***

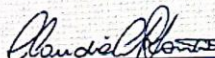
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à UFT –
Universidade Federal do Tocantins – Campus
Universitário de Palmas, Curso de Engenharia de
Alimentos para obtenção do título de Engenheiro de
Alimentos e aprovada em sua forma final pelo
Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 13 / 12 / 2019

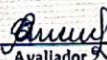
Banca Examinadora



Professor(a) Orientador(a)
Profª Drª Solange Cristina Carreiro - UFT



Avaliador 1
Profª Drª Claudia Cristina Auler do Amaral Santos - UFT



Avaliador 2
Drª Anielli Souza Pereira - UFT

PALMAS, 2019

RESUMO

A atual demanda por fontes energéticas renováveis tem influência na busca por novas alternativas para produção de energia. Neste contexto a produção de celulases para conversão de biomassas lignocelulósicas é de grande importância. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do magnésio e da arabinose na produção de celulases por *Yarrowia divulgata* utilizando um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR). A produção das celulases foi feita por cultivo submerso em meio composto por 5g/L de carboximetilcelulose, 20 g/L de NaNO₃, 1 g/L de K₂HPO₄, 0,5 g/L de KCl e 0,2 g/L de peptona, e concentrações variáveis de MgSO₄ e arabinose, com incubação a 30°C e 150 rpm por 24 horas. Foi feita a determinação das atividades de endoglucanase (CMCase), celulase total (FPase), exoglucanase (Avicelase) e β-glicosidase. As atividades variaram de 0 a 1,67 U/mL para endoglucanase, de 0 a 2,22 U/mL para celulase total, de 0 a 1,45 U/mL para exoglucanase e 0 a 11,67 U/mL para β-glicosidase. Os dados de análise de variância (ANOVA) mostraram que apenas a variável MgSO₄ foi significativa para a produção de exoglucanase e β-glicosidase ao nível de 5% de significância. Baseado nos dados obtidos, foram realizados ensaios, com 7 repetições, utilizando 3 g/L de MgSO₄ e sem adição de arabinose. Nesses ensaios não foi observada atividade para nenhuma das enzimas. Observou-se que a levedura não se reproduziu como esperado, uma vez que as contagens celulares ficaram abaixo daquelas observadas nos meios contendo arabinose, indicando que, provavelmente, a ausência de arabinose inibiu de alguma forma a multiplicação celular e conseqüentemente, não houve produção das celulases.

Palavras-chaves: Leveduras, celulose, complexo celulolítico, tucum, DCCR.

ABSTRACT

The current demand for renewable energy sources leads the search for new alternatives for energy production. In this way, the cellulases production for lignocellulosic biomass conversion is very important. The aim of this study was to evaluate the magnesium and arabinose influence in the cellulases production by *Yarrowia divulgata* using a Central Composite Rotational Design (CCRD). The cellulase production was carried out in submerged conditions in a medium with 5g/L of carboxymethylcellulose, 20 g/L of NaNO₃, 1 g/L of K₂HPO₄, 0,5 g/L of KCl e 0,2 g/L of peptone, and variable concentration of MgSO₄ and arabinose, incubated at 30°C and 150 rpm for 24 hours. It was evaluated the endoglucanase (CMCase), total cellulase (FPase), exoglucanase (Avicelase) and β-glucosidase activities. The cellulases activities ranged from 0 to 1.67 U/mL to endoglucanase, 0 to 2.22 U/mL to total cellulase, 0 to 1.45 U/mL to exoglucanase and 0 to 11.67 U/mL to β-glucosidase. The analysis of variance (ANOVA) showed that only the MgSO₄ was a significant parameter to exoglucanase and β-glucosidase production with 5% of significance. Based on these results, it was performed 7 assays using 3 g/L of MgSO₄ without arabinose. In these assays no activity was observed for any of the enzymes. It was observed that the yeast did not reproduce as expected, since the cell counts were below those observed in the media containing arabinose, showing that, probably, the absence of arabinose somehow inhibited cell multiplication and consequently no cellulase production was observed.

Key-words: yeasts, cellulose, cellulolytic complex, tucum, CCRD.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	OBJETIVO	8
1.1.1	Objetivo geral	8
1.1.2	Objetivos específicos	8
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
2.1	Enzimas	9
2.2	Complexo celulolítico	9
2.3	Microrganismos produtores de celulases	11
2.4	A levedura <i>Yarrowia divulgata</i>	13
2.5	Fatores que influenciam na produção de celulases	14
3	METODOLOGIA	16
3.1	Linhagem de leveduras e obtenção do inóculo	16
3.2	Produção de celulases por cultivo submerso	16
3.3	Determinação da atividade enzimática	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	18
4.1	Produção de celulases em cultivo submerso	18
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
	REFERÊNCIAS.....	23

1 INTRODUÇÃO

Com a intenção de minimizar adversidades ambientais, aumenta-se o interesse por encontrar diferentes formas de se produzir combustíveis à partir de fontes renováveis, tornando assim, a biomassa como um recurso grandemente visível para produzir bioetanol (SOUSA et al., 2013; HAA et al, 2013). A biomassa proveniente de materiais lignocelulósicos é constituída por macromoléculas chamadas de polímeros. Esses polímeros são compostos de celulose e hemicelulose, podendo ser hidrolizados em açúcares fermentáveis para futuramente produzir etanol. A biomassa é um recurso mais barato que os usados convencionalmente, além de que, não disputam espaço com as grandes culturas alimentares (MUÑOZ, MATTA e GUARIN, 2014; SHAFIEI et al, 2014).

O biopolímero de maior ocorrência no mundo é a celulose, formada por microfibrilas e uma rígida estrutura composta por unidades de hemicelulose e pectina. A hemicelulose, grupo heterogêneo de polissacarídeos, é composta por várias unidades de pentoses, hexoses e ácidos urônicos, que estão ligados com celulose e lignina, e assim formam uma complexa estrutura (COELHO et al, 2018). A celulose é um biopolímero formado por uma longa cadeia de monômeros de glicose que são unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4.

A reação de hidrólise da celulose é uma opção de biodegradação que pode ser usada nesses materiais, sendo assim um eficiente método para liberação de açúcares fermentáveis. São utilizadas enzimas celulolíticas (celulases), sendo que existem várias espécies de bactérias e fungos que são capazes de produzir essas enzimas (SOUZA et al, 2013).

Objetivando estabelecer condições para melhor produzir essas enzimas, a ação microbiana para produção de celulases tem sido estudada frequentemente. Fungos e bactérias são utilizados em pesquisas como células que metabolizam fontes de carbono que estão presentes nos substratos, para produção de enzimas (RUEGGER e TAU-K-TORNISIELO et al, 2004).

É muito importante escolher corretamente, tanto o microrganismo quanto o meio de cultura para que a produção de enzima ocorra com sucesso. O meio de cultura nem sempre promove a melhor multiplicação para as células e conseqüentemente para as enzimas, sendo assim inevitável estudo e otimização de parâmetros que promovem a produção enzimática, pois ótimas condições variam para cada microrganismo e enzima (ROCHA, 2010).

Enzimas são macromoléculas com estruturas complexas e específicas, podendo assim sofrer algumas alterações em sua forma tridimensional por influência de alguns fatores como temperatura, pH, indutores e presença de íons, sendo assim afetadas por qualquer tipo de

mudança ambiental onde estão sendo produzidas (MARZZOCO e TORRES, 2007; BETTELHEIM et al, 2017). Portanto é fundamental estudar a produção enzimática com a influência desses fatores, e assim encontrar melhores condições para o cultivo e melhoramento de métodos de produção.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do magnésio e da arabinose na produção de celulasas por uma linhagem de *Yarrowia divulgata*.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a influência de diferentes concentrações de magnésio e arabinose para produção de celulasas utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).
2. Definir a concentração ótima de magnésio e arabinose para se otimizar a produção das celulasas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Enzimas

As enzimas são proteínas que possuem um sítio ativo, o qual é capaz de reconhecer regiões de uma molécula, e assim, a hidrolisam em partes menores. Possuem grande relevância para a biotecnologia e a maior parte delas são produzidas por microrganismos, que inicialmente foram selecionados pela própria natureza ou geneticamente modificados para uma produção mais eficaz (SERAFINI et al, 2001; MUSSATTO, FERNANDES e MILAGRES, 2007). As enzimas são classificadas por suas propriedades catalíticas segundo o NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union Of Biochemistry and Molecular Biology*), de acordo com o quadro 1:

Quadro 1. Classificação das enzimas e suas propriedades.

Enzimas	Propriedades
Oxidoredutases	Atuam em reações de oxi-redução.
Transferases	Catalisam as reações de transferência de grupos funcionais.
Hidrolases	Catalisam as reações de hidrólise de ligações covalentes.
Liases	Atuam nas adições de grupos a ligações duplas ou formação de dupla ligação.
Ligases	Catalisam as reações de síntese de novas moléculas através das ligações C-C, C-S, C-O e C-N.
Isomerases	Atuam na transferência de grupos dentro da molécula.

As hidrólises são realizadas por enzimas hidrolíticas, ou hidrolases, que reagem de acordo com o substrato. As hidrolases com principais aplicações industriais são as amilases, celulases, fitases, lipases, proteases e xilanases. (SERAFINI et al, 2001; MUSSATTO, FERNANDES e MILAGRES, 2007). Na indústria, as enzimas são utilizadas para produzir alimentos, papel, tecidos, detergentes, produtos químicos e biocombustíveis (SANTOS, 2017).

2.2 Complexo celulolítico

Considerada como uma boa alternativa para a produção de biocombustíveis e produtos químicos, a celulose é uma biomassa orgânica, abundante e renovável. A parede celular das plantas é constituída principalmente por celulose, que é uma cadeia linear com muitas

unidades de glicose que são ligadas por ligações β -(1,4) glicosídicas, representada na figura 1 (ligações β -1,4 glicosídicas destacadas em vermelho) (LEE, HAMID e ZAIN, 2014; RUNGRATTANAKASIN et al, 2018).

Este polímero pode ser transformado em açúcar fermentável (glicose) pela ação de enzimas chamadas celulases, ou complexo celulolítico. Este complexo é formado por endoglucanase (Carboximetilcelulase – CMCase), exoglucanase (Avicelulase) e β -glicosidase (RUNGRATTANAKASIN et al, 2018).

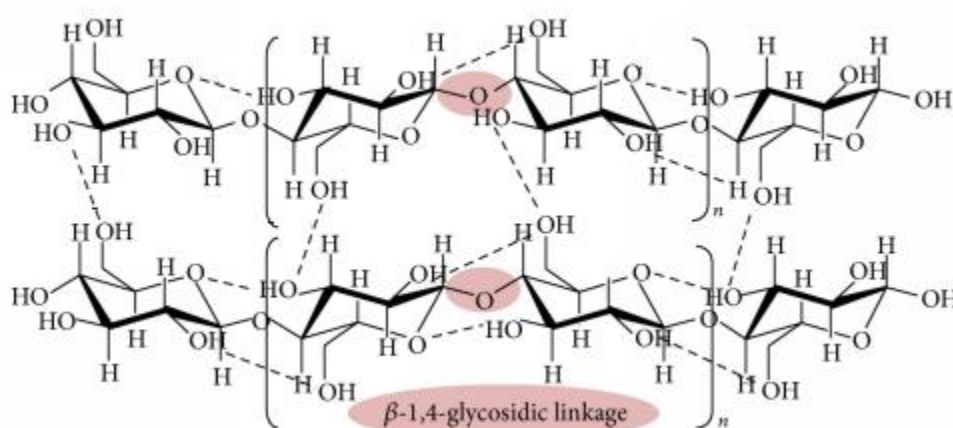


Figura 1. Estrutura química da celuloses.

Fonte: LEE, HAMID e ZAIN, 2014.

As endoglucanases operam na cisão de localidades aleatórias dentro da celulose, gerando assim uma cadeia menor e formando terminais redutores e não redutores. As exoglucanases, atuam nos terminais de cadeias formadas por endoglucanases, liberando glicose e/ou celobiose. Por fim as reações são finalizadas com a hidrólise da celobiose, que é realizada pelas enzimas β -glicosidase (JUNIOR et al, 2013). 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.

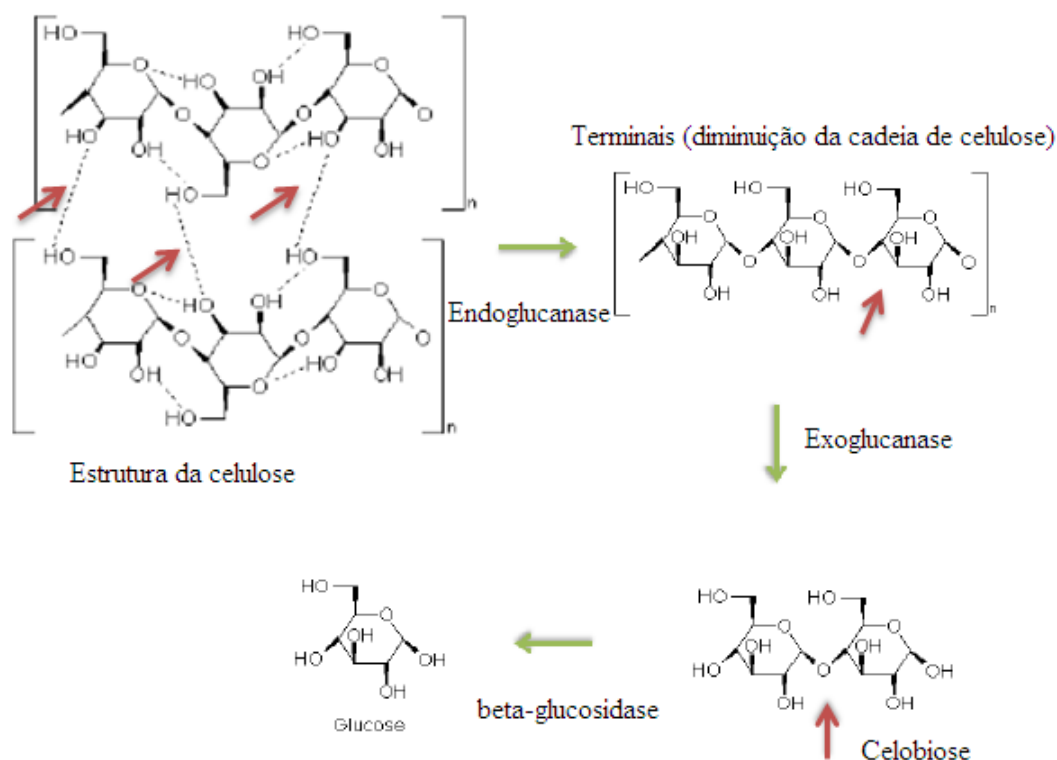


Figura 2. Representação da reação de hidrólise da celulose. As setas verdes demonstram a enzima que está atuando e as setas vermelhas indicam a região de atuação da enzima na molécula.

Fonte: Adaptado, BORTOLAZZO, 2011.

2.3 Microrganismos produtores de celulase

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

Para tornar a produção de enzimas mais prática e acessível, 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).

A produção de celulasas por microrganismos se baseia 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 apontam 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).

Apesar da produção de celulases 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) estudaram o potencial da atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau e apontaram 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.

Silva et al (2011) aponta algumas vantagens de se produzir celulases por leveduras quando comparadas aos fungos filamentosos, como o 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 muito utilizadas em aplicações industriais. As leveduras possuem grande capacidade de absorver compostos orgânicos, o que torna mais fácil 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).

2.4 A levedura *Yarrowia divulgata*

Inovações no mercado biotecnológico inspiram novas buscas por linhagens de microrganismos a fim de produzir valiosos potenciais metabólitos, sendo feita em sua grande maioria pela engenharia genética, que se baseia no deslocamento de novos genes entre as células estudadas. Todavia existem preocupações quando se trata do uso de microrganismos modificados geneticamente na indústria, o que levanta a necessidade de se estudar linhagens de tipo selvagem como características de atuação biotecnológica. Entre os gêneros estudados e pesquisados que possuem propriedades naturais de gerar elementos químicos destaca-se a *Yarrowia* (TOMASZEWSKA et al, 2014; RAKICKA et al, 2016; HANKO et al, 2018), bem conhecida por sua grande capacidade de realizar proteólise e lipólise. Atividade celulolítica e lipolítica também foi descrita para uma linhagem de *Yarrowia divulgata* isolada de coco tucum (LOPES, 2019, GUEDES et al, 2018, SANTOS, 2017).

O nome do gênero *Yarrowia* foi proposto por van der Walt e von Arx (1980) em reconhecimento de um novo gênero identificado por David Yarrow do Laboratório de Microbiologia de Delft (NICAUD, 2012).

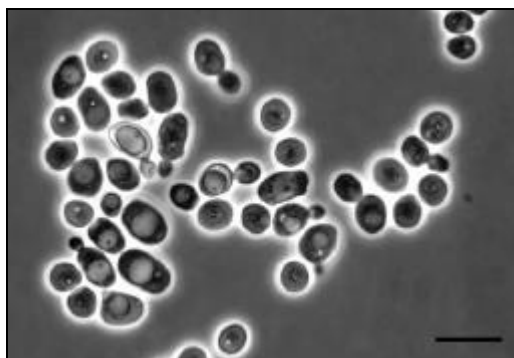


Figura 3. *Yarrowia divulgata* em meio de 5% de extrato de malte por 7 dias a 25°C.

Fonte: NAGY et al, 2013.

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 esféricas, sub-esféricas ou elipsoides, eles se apresentam isoladas, em pares, cadeias curtas e em pequenos aglomerados (figura 1).

2.5 Fatores que influenciam na produção de celulases

As características do ambiente como pH, temperatura, nível de oxigênio, concentração de nutrientes, atividade de água, afetam consideravelmente o crescimento celular e a formação de metabólitos.

Entre os fatores de natureza físico-química, o pH e a temperatura podem influenciar tanto no número de células como na atividade enzimática dos microrganismos (SUDHARHSAN et al. 2007).

Estudos feitos por Sanomia e Nahas (2003) verificaram que as atividades das enzimas amilolítica, celulolítica, proteolítica e ureolítica foram afetadas pela variação do pH. Maccheroni Jr., Araújo e Azevedo (2004) destacam que a síntese enzimática também obedeceu a um padrão dependente do pH do ambiente.

Segundo Rai, Tiwari e Gaur (2012) a temperatura é um dos fatores críticos que influenciam profundamente a produção do produto final. Em seus trabalhos a elevação da temperatura resultou em uma diminuição na produção de celulases. Da mesma forma, Shariq et al. (2018), relataram o ponto ótimo de temperatura para a produção de celulases foi de 30°C, tendo perda de produção com a variação da mesma.

Entretanto, alguns microrganismos produzem uma quantidade limitada de enzimas, dificultando uma possível utilização industrial. Porém, em alguns casos, adotam-se métodos simples de variação nutricional (fontes de carbono, nitrogênio e íons) como indutores para aumentar significativamente o rendimento enzimático (CARVALHO et al, 2008).

No estudo de Rai, Tiwari e Gaur (2012) diferentes fontes de carbono e nitrogênio influenciaram na produção de celulases. Os autores identificaram que os valores de 0,5% de glicose e 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentaram uma melhor eficácia na produção enzimática para uma linhagem do gênero *Candida*.

Outro fator que costuma afetar a atividade e estabilidade enzimática é a presença de alguns íons, como Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , entre outros. CORDEIRO & MARTINS (2009) estudaram a atividade da poligalacturonase em diferentes meios nutricionais e indentificaram que a produção enzimática foi estimulada pelos íons Mg^{2+} e Zn^{2+} . Os autores observaram um aumento de 160% na atividade da enzima.

Segundo Castro e Pereira Jr. (2009) metais podem causar um efeito inibitório ou indutor na produção de celulase. Dentre os inibidores das funções catalíticas da celulase se destacam Hg^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+} e Zn^{2+} , podendo causar perda total na função catalítica mesmo em baixas concentrações.

Diante do exposto destaca-se a importância de se estudar a influência da composição do meio de cultura, os fatores que influenciam na reprodução do microrganismo tal como os fatores que influenciam na produção de celulase.

3 METODOLOGIA

3.1 Linhagem de leveduras e obtenção do inóculo

A linhagem de *Yarrowia divulgata* utilizada na pesquisa pertence a coleção de culturas Carlos Rosa da Universidade Federal do Tocantins (UFT) e encontra-se preservada a -80°C em caldo GYMP/Glicerol. A linhagem foi isolada pelo Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMBIO) da UFT a partir de frutos da palmeira tucum (*Bactris setosa*), e foi identificada através do 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, em g/L: glicose (20), peptona (10), extrato de levedura (5) e ágar (18). As placas foram incubadas por um período de 48 horas a 30°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 produção de celulases de modo a se obter uma concentração inicial de células 5×10^7 células/mL de meio. As contagens de células foram feitas em câmara de Neubauer sob microscopia óptica comum.

3.2 Produção de celulases por cultivo submerso

Os ensaios para a produção das celulases foram conduzidos em 11 frascos de Erlenmeyer contendo 50mL de meio composto por 5g/L de carboximetilcelulose, 20g/L de NaNO_3 , 1g/L de K_2HPO_4 , 0,5g/L de KCl e 0,2g/L de peptona. As concentrações de magnésio e arabinose variaram de acordo com o planejamento experimental proposto.

Os frascos foram colocados na incubadora por 24 horas, com agitação de 150rpm. Após esse período foi retirada uma alíquota para a contagem de células em câmara de Neubauer em cada ensaio. Após a contagem as amostras foram centrifugadas a 3000rpm por 60 minutos para separar as células do extrato enzimático bruto (EEB).

Para a determinação da influência das variáveis na produção de endoglucanase, exoglucanase, β -glicosidase e celulase total foi realizado um planejamento fatorial completo (Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR 2²) com 4 ensaios, mais 4 ensaios nas condições dos pontos axiais e 3 repetições do ponto central, segundo a metodologia descrita por Rodrigues e Iemma (2014). duas variáveis independentes foram concentração de MgSO_4 e arabinose (X_1 e X_2 respectivamente). A Tabela 1 mostra o delineamento adotado.

Tabela 1. Variáveis e níveis utilizadas no DCCR.

	-1,41	-1	0	1	1,41
X1 – MgSO₄ (g/L)	0	0,44	1,5	2,56	3
X2 – Arabinose (g/L)	0	1,45	5	8,55	10

Os dados obtidos foram analisados através de análise de variância (ANOVA) a 5% de significância utilizando o *Software Protimiza Experimental Design*.

Com base nos resultados obtidos foram realizados ensaios (7 repetições) com as variáveis significativas nas concentrações que proporcionam as maiores atividades enzimáticas, utilizando o mesmo meio e as concentrações descritas acima.

3.3 Determinação da atividade enzimática

As atividades de endoglucanase (CMCase), celulase total (FPase), exoglucanase (Avicelase) e β -glicosidase foram avaliadas após 30 minutos de incubação de 500 μ L de EEB e 500 μ L de cada substrato em tampão de acetato de sódio 0,05M pH 5 a 40°C.

Os substratos utilizados foram 20g/L de carboximetilcelulase, uma tira de papel filtro Whatman n°1 com dimensões de 1x6cm, 20g/L de celulose microcristalina e 20g/L de celobiose para CMCase, FPase, Avicelase e β -glicosidase, respectivamente.

As atividades celulásicas foram quantificadas através da dosagem de açúcares redutores liberados utilizando o método de Miller (1959), empregando o ácido 3,5-dinitrosalisílico.

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 os tubos em água fria e foram adicionadas 5mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a absorvância de 540 nm.

As concentrações, em g/L de glicose, foram calculadas com base na equação da reta gerada a partir da curva de calibração (curva padrão).

Uma unidade de atividade celulásica (U/mL) foi considerada como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por mL por minuto de reação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de celulases em cultivo submerso

Os valores de atividade enzimática obtidos nos 11 ensaios estão representados na tabela 2. As atividades de endoglucanase (Y1), celulase total (Y2), exoglucanase (Y3) e β -glicosidase (Y4) variaram de 0 a 1,67U/mL, 0 a 2,22U/mL, 0 a 1,45U/mL e 0 a 11,67U/mL respectivamente.

Tabela 2. Resultados das atividades celulásicas (U/mL) obtidas no DCCR.

Ensaio	X1	X2	Y1	Y2	Y3	Y4
1	0,44	1,45	0,09	0,78	0,48	9,04
2	2,56	1,45	0	1,29	0,06	9,0
3	0,44	6,09	0	1,98	1,25	1,58
4	2,56	6,09	0,52	0	1,16	1,71
5	0	5	0	0	0,20	2,50
6	3	5	1,15	1,0	0	2,44
7	1,5	0	0,02	0,26	0,99	11,67
8	1,5	10	0	1,40	1,45	0
9	1,5	5	0	2,22	0,28	2,76
10	1,5	5	1,68	0,23	0,48	4,04
11	1,5	5	0,97	1,87	0,66	2,78

(X1=MgSO₄ (g/L), X2=arabinose (g/L), Y1=Endoglucanase, Y2=Celulase Total, Y3=Exoglucanase, Y4= β -glicosidase)

A análise de variância mostrou que apenas a variável sulfato de magnésio foi significativa para a produção de exoglucanase (tabela 3) e β -glicosidase (tabela 4) ao nível de 5% de significância.

Tabela 3. Análise de variância no estudo do efeito do MgSO₄ na produção de exoglucanase.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	F calc	p valor
Regressão	19936,47	2,0	9968,24	14,60	0,00214
Resíduos	5462,62	8,0	682,83		
Falta de Ajuste	4734,96	6,0	789,16	2,17	0,348751
Erro Puro	727,66	2,0	363,83		
Total	25399,08	10,0			

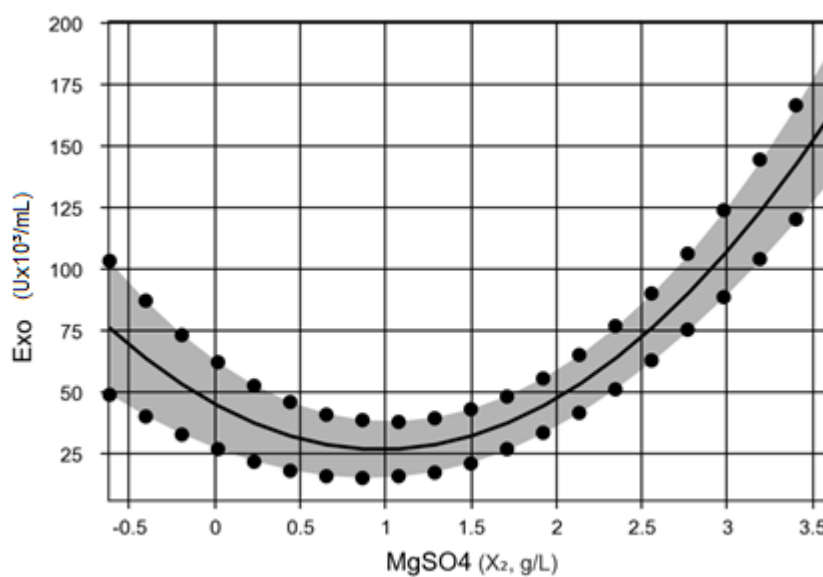
Coefficiente de determinação: R²= 78,49%

Tabela 4. Análise de variância no estudo do efeito do MgSO₄ na produção de β-glicosidase.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	F calc	p valor
Regressão	1386595	2,0	693297,40	128,8676	8,21x10 ⁻⁷
Resíduos	43039,35	8,0	5379,92		
Falta de Ajuste	32193,63	6,0	5365,60	0,989441	0,581484
Erro Puro	10845,72	2,0	5422,86		
Total	1429634	10,0			

Coeficiente de determinação: R²= 96,99%

Com os valores obtidos foi possível gerar as curvas que representam a atividade enzimática em função da concentração de MgSO₄ para exoglucanase (figura 4) e β-glicosidase (figura 5).

**Figura 4.** Curva de atividade enzimática para exoglucanase

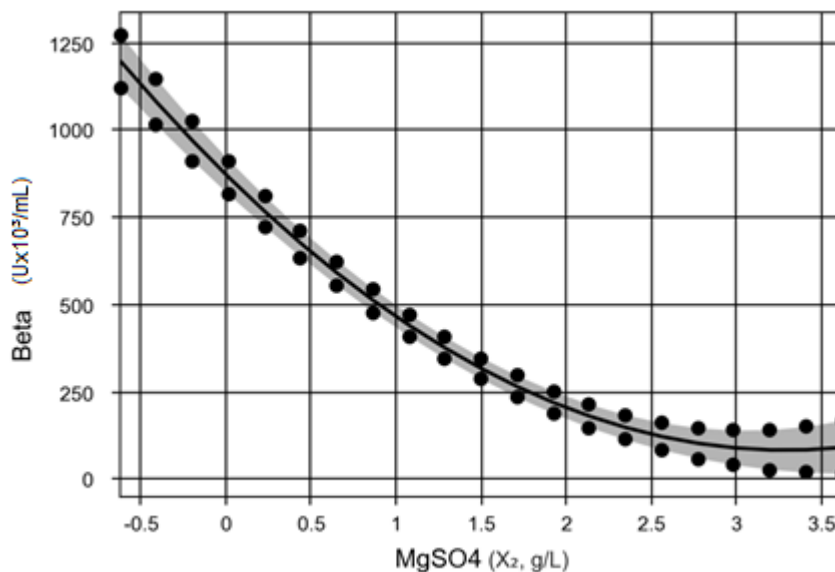


Figura 5. Curva de atividade enzimática para β -glicosidase

Os gráficos mostram que a faixa de concentração de magnésio que melhor é indicada para a produção de exoglucanase é de 2,5 a 3 g/L, em contrapartida, é a faixa onde houve menor atividade para a β -glicosidase, que teve sua melhor faixa de produção entre 0 e 0,5 g/L. Os dados mostram que a atividade da β -glicosidase diminui quando se aumenta a concentração de magnésio.

Baseado dos dados obtidos, foram realizados ensaios, com 7 repetições, utilizando o mesmo meio descrito no item 3.2, com concentração de 3 g/L de MgSO₄ e sem adição de arabinose. Nesses ensaios não foi observada atividade para nenhuma das enzimas (exoglucanase, endoglucanase, celulase total e β -glicosidase). Observou-se que a levedura não se reproduziu como esperado, uma vez que as contagens celulares ficaram abaixo do que foi observado nos meios contendo arabinose, onde foi observado uma média de $3,67 \times 10^7$ células/mL após 24 horas de incubação (tabela 5).

Tabela 5. Contagem de células.

Média contagem	Nº de células
11 ensaios	$3,67 \times 10^7$
7 ensaios	$9,9 \times 10^6$

Pode-se perceber que a falta da arabinose no meio fez com que a levedura não pudesse se reproduzir, apresentando baixas contagens de células, sendo que o esperado seria valores até 4 vezes maiores. Diante desses resultados, é possível inferir que a ausência de arabinose

inibiu de alguma forma a multiplicação celular e, conseqüentemente, não houve produção de celulases.

Algumas enzimas necessitam da 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 importante para a ação das enzimas (LEHNINGER et al., 2014).

O magnésio é um elemento fundamental, que desempenha papel essencial nas atividades enzimáticas. Atua como cofator em mais de 300 reações metabólicas, como no metabolismo energético e proteico, glicólise e síntese de adenosina trifosfato (BUENO, L. 2008; WILDBORN, C.D. 2004).

Segundo SANTOS (2017), a arabinose foi um grande influenciador de atividade celulásica para essa mesma linhagem de *Yarrowia divulgata*, aumentando em até 50 vezes a atividade celulásica, sendo o melhor indutor com maior desempenho em sua pesquisa quando comparado a os outros indutores testados.

Outros ensaios com adição de arabinose devem ser conduzidos para se confirmar o efeito da arabinose como indutor do crescimento e da produção de celulases por essa linhagem de *Yarrowia divulgata*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da concentração de magnésio ter sido significativa para a produção de exoglucanase e β -glicosidase, no meio de cultivo sem arabinose, a levedura não apresentou reprodução significativa e conseqüentemente, não produziu celulases. Isso indica que a arabinose é um monossacarídeo que influencia positivamente no crescimento e na produção de celulases por *Yarrowia divulgata*.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOODAL, G. S. Microbial xylanases and industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 56, n. 3/4 p. 326-338, junho 2001.
- BETTELHEIM, F. A.; BROWN, W. H.; CAMPBELL, M. K.; FARREL, S. O. **Introdução à bioquímica**. 9º ed. São Paulo: Cengage Learning, 2017.
- 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.
- BORTOLAZZO, N. G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. 2011, 77 f. Dissertação (Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BRIZZIO, S; TURCHETTI, B; GARCIA, V; LIBKIND, D; BUZZINI, P; VAN BROOCK, M. Extracellular 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.
- BUENO L. Effect of medium-chain triglycerides, fiber and calcium on the availability of magnesium and zinc by an in vitro method and response surface methodology. *Quim Nova* 2008; 31:306-11.
- 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. **African Journal of Microbiology Research**. v. 7, no 32, págs. 4176-4190, 2013.
- CARVALHO, R. V. de; CORRÊA, T. L. R.; SILVA, J. C. M.; VIANA, A. P.; MARTINS, M. L.L. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28(2), p. 380-386, 2008.
- 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, G. D. 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. **Revista Saúde e Ciência online**, v. 7, p. 323-338, 2018.

- CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L. Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus* sp. e algumas de suas propriedades. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29(1), p. 135-141, 2009.
- DODO, C. M., MAMPHWELI, S. e OKOH, O. Bioethanol production from lignocellulosic sugarcane leaves and tops. **Journal of Energy in Southern Africa**, v. 28(3), p. 1-11, 2017.
- DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. Solid substrate cultivation. **Elsevier Science Publishers LTD**. 1992
- 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.
- FABISZEWSKA, A. U.; KOTYRBA, D.; NOWAK D. Assortment of carbon sources in medium for *Yarrowia lipolytica* lipase production: A statistical approach. **Ann Microbiol**, v. 65, p. 1495–1503, 2015.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GUO, Z. et al. Developing cellulolytic *Yarrowia lipolytica* as a platform for the production of valuable products in consolidated bioprocessing of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, 2018.
- HAA, R. D., ROUKAMP, H., ZYL, J.H.D.V., ZYL, W.H.V. Cellobiohydrolase secretion by yeast: Current state and prospects for Improvement. **Process Biochemistry**, V. 48, P. 1-12, 2013.
- HANKO, E. K.R. et al. Engineering β -oxidation in *Yarrowia lipolytica* for methyl ketone production. **Metabolic Engineering**, v. 48, p. 52-62, 2018.
- JUNIOR, F.L.S. et al. Endo- and exoglucanase activities in bacteria from mangrove sediment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44(3), p. 969-976, 2013.
- 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.
- LAZAR, Z. et al. Characterization of hexose transporters in *Yarrowia lipolytica* reveals new groups of Sugar Porters involved in yeast growth. **Fungal Genetics and Biology**, v. 100, p. 1-12, 2017.
- LEDESMA-AMARO, R.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 61, p. 40-50, 2016.
- LEE, H. V., HAMID, S. B. A., e ZAIN, S. K. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 20 pgs, 2014.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. São Paulo: Sarvier, 2014.

- MACCHERONI Jr., W.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Ambient pH regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 61 p. 298-302, 2004.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- MENDES, A. A., PEREIRA, E. B., JUNIOR, A. F. e CASTRO, H. F. de. Anaerobic Biodegradability of Dairy Wastewater Pretreated with Porcine Pancreas Lipase. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.53(6), p. 1279-1284, 2010.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MUÑOZ, D., MATTA, A. J. P., GUARIN, M. F. C. Aprovechamiento de residuos agroindustriales como biocombustible y biorefinería. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial** v. 12 (2), p. 10-19, 2014.
- MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. *Ciência Hoje*, São Paulo, v. 42, p. 28-33, 2007.
- NAGY, E. et al. *Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov., a yeast species from animal-related and marine sources. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 4818–4823, 2013.
- NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica*. **Yeast**, v. 29, p. 409–418, 2012.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Quim. Nova**, v. 33, p. 1549-1558, 2010.
- OLAJUYIGBE, F. M.; NLEKEREM, C. M.; OGUNYEWU, O. A. Production and Characterization of Highly Thermostable β -Glucosidase during the Biodegradation of Methyl Cellulose by *Fusarium oxysporum*. **Biochemistry Research International**, v. 2016, 2016.
- 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.
- RAI, P., TIWARI, S. e GAUR, R. Optimization of process parameters for cellulase production by novel thermotolerant yeast. **BioResources** v. 7(4), p. 5401-5414, 2012.
- RAKICKA, M.; KIERON, A.; HAPETA, P.; NEUVÉGLISE, C.; LAZAR, Z. Sweet and sour potential of yeast from the *Yarrowia* clade. **Biomass and Bioenergy**, v. 92, p. 48-54, 2016.
- RAMANATHAN, G.; BANUPRIYA, S. and ABIRAMI, D. Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation. **Journal of Scientific and Industrial Research**, vol. 69, no. 6, p. 454–459, 2010.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2014.

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.

RUEGGER, M. J.S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v.27(2), p.205-211, 2004.

RUNGRATTANAKASIN, B., PREMJET, S., THANONKEO, S., KLANRIT, P. e THANONKEO, P. Cloning and expression of an endoglucanase gene from the thermotolerant fungus *Aspergillus fumigatus* DBiNU-1 in *Kluyveromyces lactis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 647–655, 2018.

SANOMIYA, L.T.; NAHAS, E. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ci. Rural**, Santa Maria, v.33, p. 835-842, 2003.

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

SANTOS, L. D. A. Avaliação da produção de celulases por duas linhagens de leveduras isoladas de frutos de palmeiras. 2017, 48 f. Dissertação (Agroenergia) – Universidade Federal do Tocantins, Palmas.

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.

SERAFINI, R.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária. 463 p., 2001.

SHARIQ, M., MUHAMMAD, F., AHMAD, A., KHAN, S. A., MOIN, S. F. e SOHAIL, M. Production and characterization of endoglucanase from an indigenous yeast strain. **Pak. J. Bot.**, v. 50(6), p. 2413-2421, 2018.

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 celulásica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 166 (2): 486-520,2012.

SOUZA, A. C. de, CARVALHO, F. P., BATISTA, C. F. S. e, SCHWAN, R. F. e DIAS, D. R. Sugarcane Bagasse Hydrolysis Using Yeast Cellulolytic Enzymes. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 23(10), p. 1403–1412, 2013.

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

SUDHARHSAN, S.; SENTHILKUMAR, S.; RANJITH, K. Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled food waste. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 6, p. 430-435, 2007.

TABATABAEI, M., KARIMI, K., KUMAR, R. e HORVÁTH, I. S. Renewable Energy and Alternative Fuel Technologies. **BioMed Research International**, v. 2015, 2 pgs, 2015.

TOMASZEWSKA E. 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**, v. 58, p. 479-486, 2014.

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

WILBORN CD, KERKSICK CM, CAMPBELL BI, TAYLOR LW, MARCELLO BM, RASMUSSEN CJ et al. Effects of zinc magnesium aspartate (ZMA) supplementation on training adaptations and markers of anabolism and catabolism. *J Int Soc Sports Nutr* 2004;1:12-20