XII JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA
EVENTO ON-LINE
18 A 21 DE OUTUBRO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES CELULOLÍTICAS DE LEVEDURAS PARA O APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS VEGETAIS

ANDERSON GIEHL [1,2]*, VIVIANI TADIOTO[2,3], MARIANA DINIZ[2,4], SÉRGIO LUIZ ALVES JR.[2,5]

1 Introdução

Por o Brasil ser um grande produtor agrícola, estima-se que cerca de 712 milhões de toneladas de resíduo vegetal decorrentes do cultivo do milho e da cana-de açúcar sejam gerados (CONAB, 2022b, 2022a; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; GRAHAM *et al.*, 2007). Diante disso, o aproveitamento dessa biomassa gerada, em biorrefinarias de segunda geração, se torna interessante para a produção de etanol, xilitol e outros bioprodutos de valor agregado. Porém, para que haja tal aproveitamento, essa biomassa precisa passar por um pré-tratamento a fim de tornar viável os açúcares fermentescíveis presentes nas ligações lignocelulósicas desse resíduo (JÖNSSON; MARTÍN, 2016; QUEIROZ *et al.*, 2022). Havendo assim, a necessidade do emprego de enzimas que realizam a hidrólise ou participem no processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF). Dentro dessas enzimas necessárias, a celulase, que se trata de um complexo de enzimas que englobam a endoglucanase, exoglucanase e a β-glicosidase, atua na hidrólise da celulose, reduzindo a estrutura molecular à celo-oligosacarídeos e a glicose(SRIVASTAVA *et al.*, 2019).

Sendo assim, a busca por micro-organismos fornecedores de enzimas necessária, tanto para a melhoria da eficiência das enzimas purificadas, quanto para o possível aproveitamento em processos SSF, de modo a reduzir o custo de purificação(SONG *et al.*, 2016). Nesse sentido, isolar leveduras do trato digestivo de insetos como a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), pode auxiliar nesse processo, pois naturalmente estão expostas a presença de biomassa lignocelulósica nesses ambientes(ALVES *et al.*, 2019).

Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar a atividade

1 Estudante do curso de graduação em Eng. Ambiental e Sanitária, *Campus* Chapecó, UFFS. Bolsista
* Email de contato: andergiehl@gmail.com
2 Grupo de Pesquisa: Laboratório de Bioquímica e Genética, *Campus* Chapecó, UFFS.
3 Estudante do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, *Campus* Universitário, UFSC
4 Estudante do curso de graduação em Eng. Ambiental e Sanitária, *Campus* Chapecó, UFFS
5 Orientador. Professor doutor.

enzimática de celulase e β-glicosidase provenientes dessa lagarta, a fim de se aproveitar resíduos lignocelulósicos gerados em cultivos agrícolas e florestais.

3 Metodologia

As 46 linhagens de leveduras utilizadas foram previamente isoladas do trato digestivo de *Spodoptera frugiperda* em fase larval, alimentadas com folhas de milho.

Para a avaliação da atividade celulolítica, as linhagens foram cultivadas em frascos tipo Erlenmeyer contendo meios de cultivo YP (10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona) possuindo 10 g/L de carboximetilcelulose (CMC). Os frascos tipo Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL do meio descrito foram mantidos a 30 °C sob agitação de 145 rpm. Após o período de incubação de 96h, transferiu-se 1 mL do meio de cada cultivo para microtubos que foram centrifugados por 5 min a 5000 rpm. Posteriormente, para a reação enzimática das enzimas contidas no sobrenadante coletado após a centrifugação, utilizou-se uma adaptação de KIM et al. (2014). Em que, desses sobrenadantes, pipetou-se 10 µL, em triplicata, em poços de uma microplaca de 96 poços. Adicionou-se em seguida 15 µL de Tampão 0,15 M Succinato-Tris contendo 10 g/L de CMC (pH 5,0), selou-se a placa e incubou-a por 1h em banho-maria em 30° e 50°C. Após, a dosagem da glicose, provenientes da hidrólise do CMC foi feita seguindo o protocolo descrito por SANTOS et al. (2017). Uma unidade de atividade enzimática, tanto para a celulase quanto para a β-glicosidase, ficou definida como o quanto de CMC foi hidrolisado a 1 nmol de glicose por minuto.

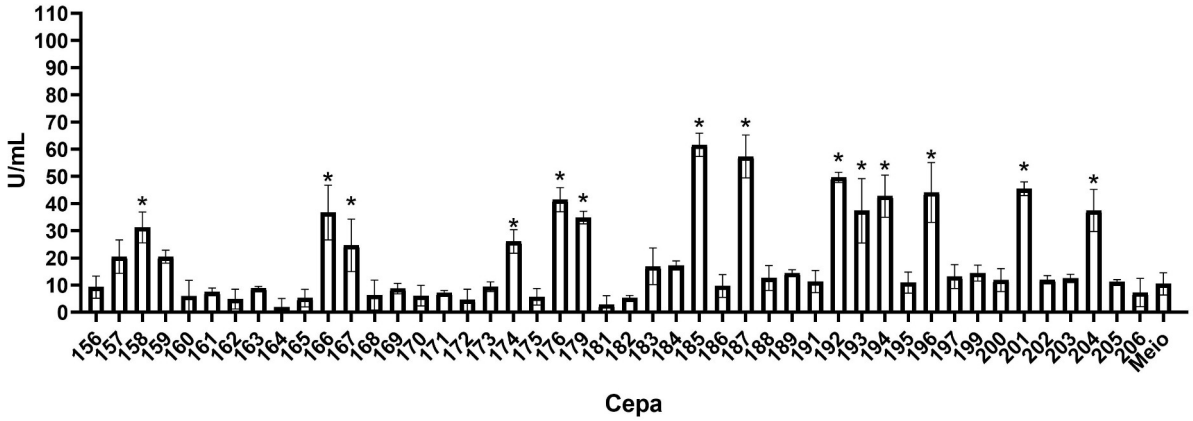
A análise estatística foi feita utilizando o software Graphpad Prism 8, em que os resultados das análises de atividade enzimática foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e a um teste de Tuckey, com aceitação de 95% ($p<0,05$), a fim de se avaliar a diferença estatística em relação a atividade enzimática referente a absorbância do meio de cultura (grupo controle). Os dados foram expostos indicando-se em asterisco (*) a diferença estatística em relação ao controle, bem como, as médias e o desvio padrão (1 σ).

4 Resultados e Discussão

Os resultados obtidos da atividade celulolítica, em 50°C, demonstram que das 46 linhagens apenas 14 apresentam diferença significativa com o grupo controle (meio de cultura) sendo as cepas CHAP-185 e CHAP-187 as que mais se destacaram, apresentando valores de 61,61 ± 4,28 U/mL e 57,35 ± 7.91 U/mL, respectivamente. Semelhantes esses a

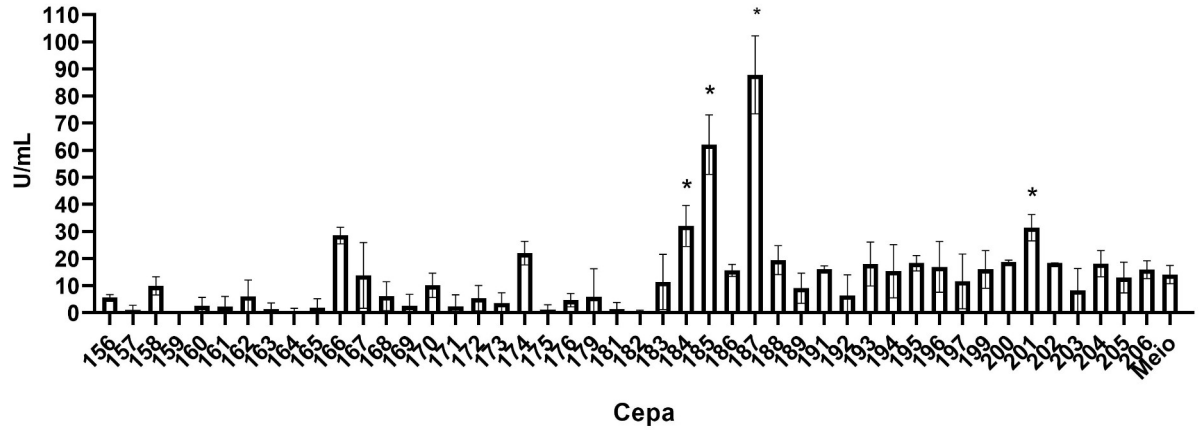
valores de leveduras oleaginosas da espécie *Cystobasidium oligophagum* JRC1 que demonstraram atividades para endoglucanase de 72 ± 13 U/mL e exoglucanase de 40 ± 6 U/mL (VYAS; CHHABRA, 2017).

Figura 1 - Análise da atividade celulolítica em 50 °C. Asterisco (*) indicam diferenças significativas entre cepas testadas quanto à atividade celulase referente ao controle (meio). 1 U = 1 nmol de glicose/mL.



Enquanto, para 30°C apenas 4 linhagens demonstraram diferença estatística significativa com o controle, sendo as cepas que mais se destacaram, também, a CHAP-185 e CHAP-187, com valores de 62,07 ± 10,97 U/mL e 87,88 ± 14,40 U/mL respectivamente. (Figura 2). Nesse sentido, se mostrando ideais para processos de SSF, cuja temperatura deve atender à faixa ideal do microrganismo fermentador.

Figura 2 - Análise da atividade celulolítica em 30 °C. Asterisco (*) indicam diferenças significativas entre cepas testadas quanto à atividade celulase referente ao controle (meio). 1 U = 1 nmol de glicose/mL.



A temperatura teve efeito significativo, mostrando que para as 46 linhagens, majoritariamente tiveram a atividade reduzida em 30°C. Porém, as linhagens CHAP-184 e CHAP-187 apresentaram diferença significativa em relação a 50°C ($p<0.05$), enquanto que a CHAP-185 não apresentou diferença estatística significativa entre seus valores para as duas temperaturas. Corroborando com o que já se encontra em estudos que avaliaram o efeito da temperatura sob a atividade celulolítica, que demonstram que a faixa ótima de atuação varia de 35°C a 60°C, estando geralmente mais efetiva em torno dos 50°C (FARINAS *et al.*, 2010; SINGH *et al.*, 2009).

5 Conclusão

Das 46 linhagens de leveduras isoladas do trato digestivo da lagarta Spodptera frugiperda, observou-se que dessas, apenas 15 cepas são capazes de produzir celulase, sendo a maior atividade observada na temperatura de 30 °C pela cepa CHAP-187 (87,88 ± 14,40 U/mL). Majoritariamente, porém, das 14 cepas que apresentaram atividade em 50 °C, tiveram sua atividade reduzida pela redução da temperatura. Indicando-se assim, as linhagens CHAP-185 e CHAP-187 para processos SSF, pois tiveram maior atividade em 30°C, sendo essa temperatura a faixa de atuação do micro-organismo fermentador em biorrefinarias que utilizam resíduos lignocelulósicos para a produção de bioprodutos.

Referências Bibliográficas

ALVES, Sérgio L. *et al.* Bioprospection of Enzymes and Microorganisms in Insects to Improve Second-Generation Ethanol Production. **Industrial Biotechnology**, [*s. l.*], v. 15, n. 6, p. 336–349, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1089/ind.2019.0019

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira. **Boletim da Safra 2021**, [*s. l.*], v. 9, n. Terceiro levantamento, p. 60, 2022a. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/

CONAB. **Conab - Safra Brasileira de Cana-de-açúcar**. [*S. l.*], 2022b. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana. Acesso em: 27 jul. 2022.

DE OLIVEIRA, Raul Alves *et al.* Energy supply design for the integrated production of 1G + 2G ethanol from sugarcane. **Renewable Energy Focus**, [*s. l.*], v. 35, n. December, p. 171–177, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ref.2020.10.005

FARINAS, Cristiane S *et al.* Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. **New Biotechnology**, [*s. l.*], v. 27, n. 6, p. 810–815, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.10.001

GRAHAM, R. L. *et al.* Current and potential U.S. corn stover supplies. **Agronomy Journal**, [*s. l.*], v. 99, n. 1, p. 1–11, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.2134/agronj2005.0222

JÖNSSON, Leif J.; MARTÍN, Carlos. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 199, p. 103–112, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009

KIM, Jennifer Jooyoun *et al.* Effective Microwell Plate-Based Screening Method for Microbes Producing Cellulase and Xylanase and Its Application. **J. Microbiol. Biotechnol.**, [*s. l.*], v. 24, n. 11, p. 1559–1565, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.4014/JMB.1405.05052. Acesso em: 17 ago. 2022.

QUEIROZ, Sarah S. *et al.* Scaling up xylitol bioproduction: Challenges to achieve a profitable bioprocess. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [*s. l.*], v. 154, p. 111789, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/J.RSER.2021.111789

SANTOS, Angela Alves Dos *et al.* Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. **Brazilian Journal of Food Technology**, [*s. l.*], v. 20, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1981-6723.11315

SINGH, Rajesh *et al.* Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of Aspergillus heteromorphus using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, [*s. l.*], v. 48, n. 1, p. 28–35, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2009.08.001

SONG, Hui Ting *et al.* Simultaneous saccharification and fermentation of corncobs with genetically modified Saccharomyces cerevisiae and characterization of their microstructure during hydrolysis. **Bioengineered**, [*s. l.*], v. 7, n. 3, p. 198–204, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1178424

SRIVASTAVA, Neha *et al.* **Microbial beta glucosidase enzymes: Recent advances in biomass conversation for biofuels application**. [*S. l.*]: MDPI AG, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.3390/biom9060220

VYAS, Sachin; CHHABRA, Meenu. Isolation, identification and characterization of Cystobasidium oligophagum JRC1: A cellulase and lipase producing oleaginous yeast. **Bioresource Technology**, [*s. l.*], v. 223, p. 250–258, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.10.039

Palavras-chave: biorrefinaria, leveduras associadas a insetos, celulase

Nº de Registro no sistema Prisma: PES-2021-0389

Financiamento: CNPq