

## ANÁLISE DAS ATIVIDADES CELULASE E XILANASE DE LEVEDURAS DA MICROBIOTA DA MATA DE ARAUCÁRIAS NO SUL DO BRASIL

MARIANA DA COSTA DINIZ<sup>1,2</sup>, ANDERSON GIEHL<sup>2,3</sup>, STÉFANY KELL BRESSAN<sup>1,2</sup>,  
LARISSA WERLANG<sup>1,2</sup>, CAMILA GIRARDI DE OLIVEIRA<sup>1,2</sup>, TRICIANI TORNAI  
PEREIRA<sup>2</sup>, ANGELA ALVES DOS SANTOS<sup>1</sup>, SÉRGIO LUIZ ALVES JR<sup>1,2,3,4</sup>

### 1 Introdução

A celobiose é um dissacarídeo obtido a partir da hidrólise incompleta de polissacarídeos como a celulose, que contêm moléculas de glicose ligadas entre si por meio de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. Este carboidrato é obtido durante o processo de sacarificação na produção de etanol de segunda geração (E2G), que possui como matéria-prima resíduos lignocelulósicos (compostos de lignina, celulose e xilana). Sendo assim, há necessidade do emprego da enzima  $\beta$ -glicosidase para tornar acessível as unidades monoméricas de glicose para os microrganismos fermentadores. Comercialmente, esta enzima compõe o *pool* enzimático responsável pela quebra da celulose e da xilana (Parisutham *et al.*, 2017).

A busca por leveduras selvagens é crucial no campo da biotecnologia, especialmente na produção de biocombustíveis como o E2G. Esse interesse surge da necessidade de identificar micro-organismos com capacidades enzimáticas específicas, como a habilidade de hidrolisar celobiose e outros componentes da biomassa lignocelulósica, que as leveduras convencionais, como a *Saccharomyces cerevisiae*, não possuem naturalmente. Leveduras selvagens portadoras de celobiasas podem ser encontradas em ambientes onde a decomposição da matéria vegetal ocorre, sendo fundamentais para a ciclagem de nutrientes (Alves *et al.*, 2019).

### 2 Objetivo

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade celobiasase de leveduras selvagens

<sup>1</sup> Graduanda Engenharia Ambiental e Sanitária, UFFS, *Campus* Chapecó, email mcdiniz2021@gmail.com

<sup>2</sup> Laboratório de Bioquímica de Leveduras (LabBioLev), Grupo de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (GPMA), *Campus* Chapecó, UFFS, Chapecó/SC.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Centro de Ciências Biológicas, UFSC.

<sup>4</sup> Doutor em Biotecnologia, USP, **Orientador**

com vistas a prospectar linhagens capazes de atuar em processos de hidrólise de biomassas residuais lignocelulósicas (ricas em celulose e xilana).

### 3 Metodologia

Vinte e nove cepas selvagens de leveduras, previamente isoladas de ambientes com biomassa lignocelulósica, foram inicialmente pré-cultivadas por 48 horas a 30°C em meio sólido YPD, que contém 10 g·L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20 g·L<sup>-1</sup> de peptona, 20 g·L<sup>-1</sup> de glicose e 20 g·L<sup>-1</sup> de ágar. Na sequência, uma alça calibrada de 1 µL de células foi utilizada para inocular frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de YPC, que possui 10 g·L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20 g·L<sup>-1</sup> de peptonas e 20 g·L<sup>-1</sup> de celobiose, com o pH ajustado para 5,0. As culturas foram mantidas em um agitador a 145 rpm e 30 °C. Os cultivos foram interrompidos quando as densidades ópticas (DO 570 nm) alcançaram aproximadamente o valor de 3,5. Posteriormente, as células foram centrifugadas, lavadas duas vezes com água a 4°C e ressuspensas de modo a atingirem a concentração de 20 g·L<sup>-1</sup>. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para o ensaio da atividade enzimática de celobiase localizada no periplasma das leveduras, utilizaram-se 100 µL da suspensão contendo 20 g·L<sup>-1</sup> de células e transferidos para cinco microtubos — os dois microtubos que serviram de controle negativo foram fervidos a 100°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 100 µL de Reagente 1 (0,15 M de fluoreto de sódio em tampão succinato-Tris 0,15 M, pH 5,0) a cada microtubo, com subsequente incubação a 30°C por 30 minutos. Depois disso, 100 µL de Reagente 2 (0,3 M de celobiose) foram adicionados aos tubos que, subsequentemente, foram incubados por 10 minutos a 30°C. Após a incubação, os tubos foram rapidamente fervidos por 5 minutos e, em seguida, resfriados em banho de gelo. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 9000 rpm e os sobrenadantes foram utilizados para quantificar a concentração de glicose formada, o que serviu para calcular a atividade de hidrólise. A glicose, obtida a partir da atividade celobiase periplasmática, foi determinada através de um kit enzimático comercial, conforme descrito abaixo.

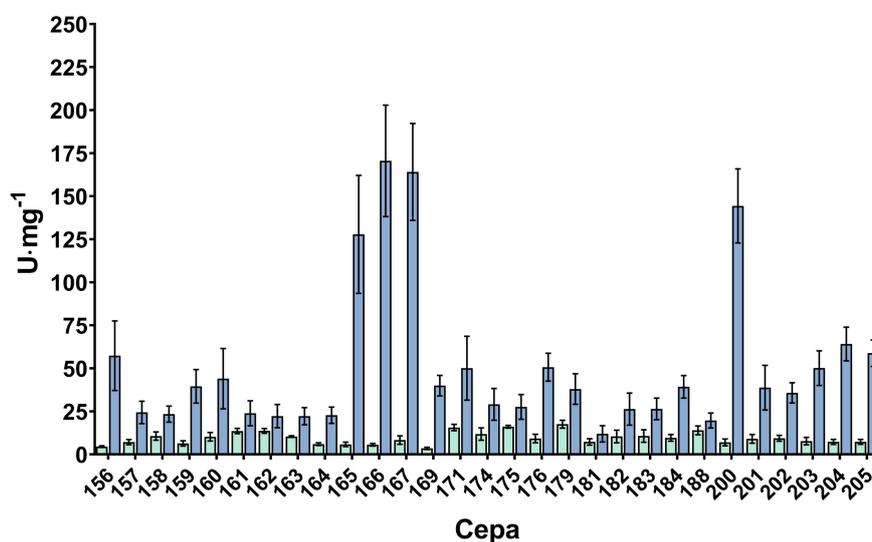
Para a determinação da atividade celobiase intracelular, utilizaram-se 100 µL da suspensão contendo 20 g·L<sup>-1</sup> de células que foram então permeabilizadas. Para isso, aproximadamente 2 mg de células (10 µL) foram lavadas em 0,5 mL de tampão MOPS-NaOH

0,1 M, pH 6,8 (tampão A), e posteriormente ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  do mesmo tampão contendo 200  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicerol, 1 mM de EDTA, e 1 mM DTT (tampão B). Em seguida, foram adicionados, a essa suspensão, 12  $\mu\text{L}$  de uma solução de tolueno/etanol/Triton X-100 10% (1:4:1; v/v) e as células foram vigorosamente agitadas durante 1 min. Após a permeabilização, as células foram lavadas com tampão B e ressuspensas em 1 mL do tampão A. Dessa suspensão de células permeabilizadas, 50  $\mu\text{L}$  foram transferidos para 5 microtubos (dois foram incubados a 100 °C para servir de controle negativo). Posteriormente, foram adicionados, em todos esses microtubos, 50,0  $\mu\text{L}$  de uma solução 0,2 M de celobiose em tampão A. Em seguida, cada uma dessas amostras foi incubada a 30° C durante 30 minutos, fervidas a 100° C por 5 minutos e posteriormente centrifugadas.

Para a dosagem de glicose liberada após hidrólise, utilizou-se o kit enzimático comercial Gold Analisa, que consistiu em adicionar, a cada tubo de reação, 1 mL do reagente de cor e 10  $\mu\text{L}$  de amostra dos ensaios de atividade periplasmática e intracelular. Posteriormente, os tubos foram incubados por 30 min a 37 °C em banho-maria, e, na sequência, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro sob um feixe de luz com comprimento de onda de 505 nm para a determinação da concentração de glicose em cada amostra. Uma unidade de atividade enzimática (U), foi definida como a quantidade de celobiose que foi hidrolisada gerando 1 nmol de glicose por min (Dário, 2012; Mouro, 2012).

#### 4 Resultados e Discussão

Dentre as 29 cepas avaliadas, a maioria consumiu mais de 50% dos 20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de celobiose disponíveis durante o cultivo, como mostrado em estudo anterior do grupo (GIEHL, 2022), indicando a presença de enzimas no periplasma ou no interior das células. Nesse sentido, com os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos exibidos na Figura 1, observa-se que, de fato as linhagens possuem atividade nesses ambientes, sendo predominantemente maior no espaço intracelular. As cepas CHAP-165, CHAP-166, CHAP-167 e CHAP-200 mostraram as maiores atividades intracelulares, sendo respectivamente de  $127,82 \pm 22,28 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ;  $170,54 \pm 16,94 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ,  $101,29 \pm 55,12 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  e  $144,36 \pm 22,49 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Resultados semelhantes foram previamente encontrados pelo nosso grupo de pesquisa em um trabalho que avaliou linhagens de *Candida pseudointermedia* isoladas de biomassa em decomposição, com atividades intracelulares de aproximadamente 200  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  (Barilli *et al.*, 2020).



**Figura 1** – Atividade enzimática de celobiasas periplasmáticas (barras verdes) e intracelulares (barras azuis). Dados de atividades expostos em relação a 1 mg de biomassa seca de célula. Onde, 1 U = 1 nmol de Glicose · min<sup>-1</sup>

Já as cepas CHAP-181 a CHAP-188 apresentaram baixa atividade, tanto intracelular quanto periplasmática, porém, como não foram avaliados os perfis de crescimento e consumo de carboidrato ao longo de um cultivo dessas linhagens, supõe-se que tais cepas possuem um tempo maior para o consumo da celobiose, por haver menor atividade enzimática e, conseqüentemente, também menor atividade de transporte desse dissacarídeo.

## 5 Conclusão

As linhagens avaliadas apresentam potencial na hidrólise de celobiose para a posterior fermentação da glicose a etanol. Além disso, os resultados sugerem que ambientes ricos em biomassa lignocelulósica são promissores para a prospecção de enzimas hidrolíticas para a aplicação em processos de sacarificação.

Por fim, a aplicação dessas cepas, seja para o fornecimento de genes ou para seu uso direto em ambientes industriais, pode, portanto, melhorar a eficiência geral da produção de biocombustíveis, contribuindo para o desenvolvimento de tecnologias mais sustentáveis e economicamente viáveis na indústria de energia renovável.

## Referências Bibliográficas

ALVES *et al.* Bioprospection of Enzymes and Microorganisms in Insects to Improve Second-Generation Ethanol Production. **Industrial Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 336–349, 2019.

BARRILLI *et al.* Biochemical analysis of cellobiose catabolism in *Candida pseudointermedia* strains isolated from rotten wood. **Arch Microbiol.** v. 202, pg. 1729–1739. 2020.

DARIO, M.G. Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - **Universidade de São Paulo**, Instituto Butantan, Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, São Paulo, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.87.2012.tde-04062012-114632>. Acesso em: 12 ago. 2024

GIEHL, A. Avaliação de atividades celulolíticas e B-glicosídicas de leveduras para o aproveitamento de resíduos vegetais e a produção de compostos orgânicos voláteis. **Universidade Federal da Fronteira Sul**. Chapecó, 10 pg. 2022.

MOURO, A. Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - **Universidade Federal de Santa Catarina**, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2012. Disponível em: <http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/100622>. Acesso em: 12 ago. 2024

PARISUTHAM *et al.* Intracellular cellobiose metabolism and its applications in lignocellulose-based biorefineries. **Bioresource Technology**. v. 239, pg. 496-506, 2017

**Palavras-chave:** Celobiose,  $\beta$ -glucosidase, *Spodoptera frugiperda*, ethanol 2G

**Nº de Registro no sistema Prisma:** PES 2023-0351

**Financiamento:** UFFS.