

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

Josenilda Guimarães Lopes¹, Thiago Lucas de Abreu-Lima², Solange Cristina Carreiro³

RESUMO:

A celulose é a biomassa orgânica e renovável mais abundante, considerada uma boa alternativa para produção de produtos químicos e biocombustíveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das variáveis pH, temperatura, MgSO₄, MnSO₄, 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). Com base nos resultados obtidos no PB, foi realizado um delineamento completo DCCR (2²) utilizando as variáveis MgSO₄ e arabinose, cujos resultados mostraram a atividade de endoglucanase variou 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. A análise estatística indicou que a 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 a produção de 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. 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. A linhagem *Y. divulgata* apresentou potencial para produzir enzimas celulolíticas. O modelo matemático utilizado nesta pesquisa conseguiu explicar a variação em 70,83% para exoglucanase e 89,3% para β-glicosidase indicando que arabinose é importante para potencializar a produção dessas enzimas.

Palavras-chave: Enzimas celulolíticas; frutos; delineamento Plackett-Burman; palmeiras.

OPTIMIZATION OF CELLULASE PRODUCTION BY *Yarrowia divulgata* ISOLATED FROM THE TUCUM FRUIT

ABSTRACT

Cellulose is the most abundant organic and renewable biomass, considered a good alternative for the production of chemical products and biofuel. This study aimed to evaluate the influence of the variables pH, temperature, MgSO₄, MnSO₄, glucose, lactose, cellobiose and arabinose in the production of cellulases in submersed cultivation of a lineage of *Yarrowia divulgata*, using a Plackett-Burman (PB) design. Based on the results of the PB design, a complete RCCD (Rotable Central Composite Design) (2²) outline was performed using MgSO₄ and arabinose variables. The 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 β-glucosidase from 0 to 1,184 U/mL. The statistical analysis showed that arabinose presented a significant influence for exoglucanase and β-glucosidase. Based on the generated models, the concentration of arabinose that would induce the most activity was 1 g for exoglucanase and of 10 g for β-

¹Mestre em Agroenergia pela Universidade Federal do Tocantins - UFT, Palmas-TO; lguimaraes@uft.edu.br, <https://orcid.org/0000-0002-1407-9413>. ²Professor Adjunto na Universidade Federal do Tocantins; abreulimatl@uft.edu.br, <https://orcid.org/0000-0003-4222-4128>. ³Professora Adjunta na Universidade Federal do Tocantins. Palmas-TO; solange@mail.uft.edu.br; <https://orcid.org/0000-0003-4651-072X>

glucosidase. The validation trials using these arabinose concentrations showed that a significant increase of activity occurred, varying from 0,141 to 0,355 U/mL for exoglucanase and from 0,954 to 0,964 U/mL for β -glucosidase. Two independent RCCDs were performed to evaluate the enzymatic extracts. The optimal pH and temperature for the enzymatic reaction obtained for β -glucosidase were 5 and 35°C (crude extract derived from cultivation with 1 g of arabinose) and 5.71 and 47.1°C (crude extract derived from cultivation with 10 g of arabinose). For the exoglucanase enzyme, the optimal pH was pH 6.0 (crude extract derived from cultivation with 1 g of arabinose) and there was not a significant influence of temperature. The *Y. divulgata* lineage showed potential to produce cellulolytic enzymes.

Keywords: Cellulolytic enzymes; fruits; Plackett-Burman design; palm trees.

INTRODUÇÃO

Com o intuito de diminuir impactos ambientais e atenuar mudanças climáticas, tornou-se crescente o interesse em se encontrar alternativas para a produção de combustíveis renováveis em substituição ao petróleo, fazendo 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 e beterraba) (Florencio et al., 2017). 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 elevado valor das enzimas, podendo chegar a 48% do preço total do produto final, dificultando maiores produções desse tipo de biocombustível (Florencio et al., 2017).

A conversão desse 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 β -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 (Florencio et al., 2017). As exoglucanases, também conhecidas como

celodextrinases, agem nos terminais de cadeias geradas pelas endoglucanases, liberando assim glicose e/ou celobiose. Consequentemente, a reação é finalizada com a hidrólise da celobiose realizada pelas enzimas β -glicosidases (Florencio et al., 2017). A Figura 1 representa a reação de hidrólise da celulose para obtenção de glicose. Nela, as setas indicam a região de atuação de cada grupo enzimático.

Estudos voltados para desenvolvimento e otimização de produção de enzimas proporcionam uma alternativa promissora para a produção de etanol celulósico em larga escala (Florencio 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 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, 2025; 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, este artigo tem como propósito analisar e discutir a produção de enzimas celulolíticas por uma linhagem de *Yarrowia divulgata*, considerando sua performance em diferentes meios de cultivo.

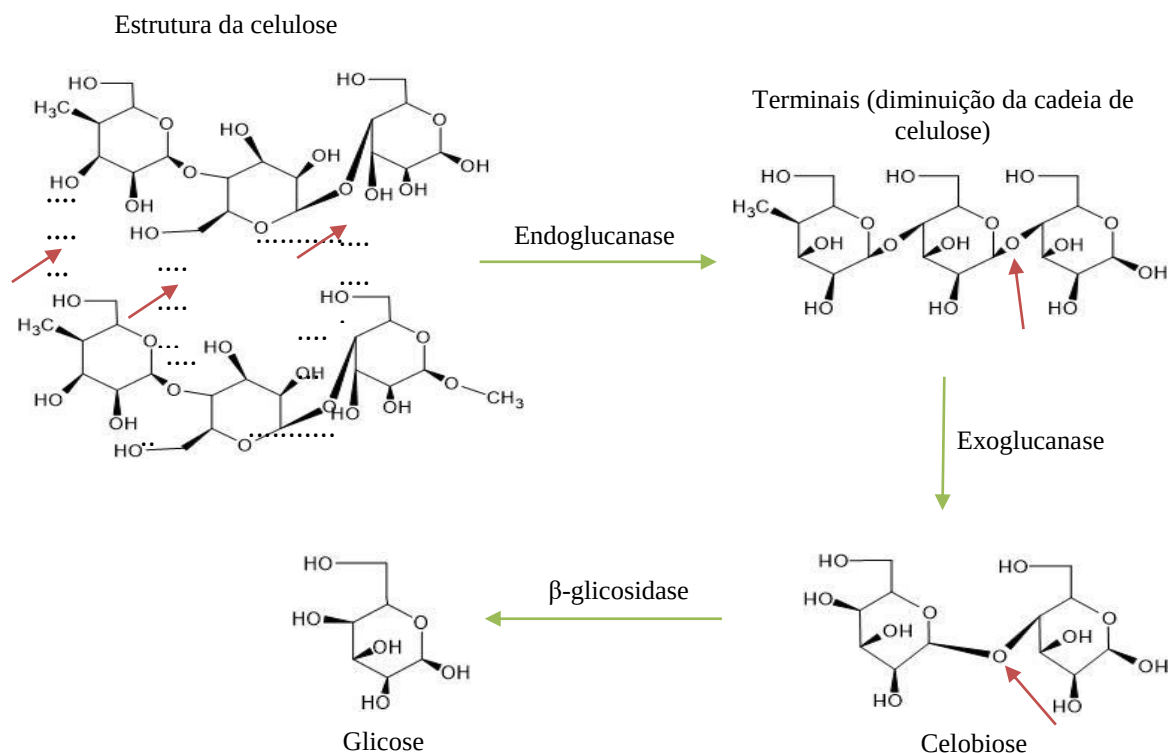


Figura 1. Representação da reação de hidrólise da celulose

MATERIAL E MÉTODOS

A linhagem de levedura utilizada na pesquisa foi isolada a partir de frutos da palmeira tucum (*Bactrissetosa*) e pertence à coleção de culturas microbianas Carlos Rosa da UFT e encontra-se preservada a -80°C em caldo GYMP/glicerol, código T194. 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°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 107 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.

Os ensaios para a produção das celulases foram conduzidos em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio composto por 5 g/L de carboximetilcelulose (CMC), 2 g/L de NaNO_3 , 1 g/L de K_2PO_4 e 0,2 g/L de peptona. Para a variação de pH foi utilizada 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 0,38g. Após esse período, foram feitas contagens de células em câmara de Neubauer e as amostras foram centrifugadas a 2400g por 60 minutos para separar as células. O sobrenadante obtido (extrato enzimático bruto – EEB) foi armazenado sob refrigeração (10°C) para posterior medida das atividades enzimáticas.

O planejamento utilizado foi o Plackett-Burman, que consiste em um método de delineamento experimental amplamente empregado na química analítica com o objetivo de otimizar procedimentos, como os utilizados na espectrometria

de massas. Essa abordagem permite identificar quais variáveis exercem maior influência nos resultados e de que maneira impactam a análise (Damasceno, 2024).

Nesse tipo de planejamento, são conduzidos diversos experimentos, nos quais cada ensaio promove a variação de um fator específico. A quantidade de experimentos realizados depende do número de variáveis a serem investigadas, e os dados obtidos são posteriormente avaliados por meio de análises estatísticas, a fim de determinar quais fatores

apresentam maior relevância no processo analítico (Damasceno, 2024).

Para se avaliar a influência das variáveis pH, temperatura, concentrações de MgSO_4 , MnSO_4 , glicose, lactose, celobiose e arabinose na produção das celulasas foi realizado um delineamento de Plackett-Burman, com 15 ensaios, com as variáveis independentes em três níveis e três repetições no ponto central, segundo Rodrigues e Iemma (2014) (Tabela 1). Os resultados obtidos foram analisados através da análise de variância a 10% de significância usando o *software Protimiza Experimental Design*.

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

Variáveis		-1*	0*	1*
X ₁	pH	4	5	6
X ₂	Temperatura (°C)	30	40	50
X ₃	MgSO_4 (g/L)	0	1,5	3
X ₄	MnSO_4 (g/L)	0	0,5	1
X ₅	Glicose (g/L)	0	5	10
X ₆	Lactose (g/L)	0	5	10
X ₇	Celobiose (g/L)	0	5	10
X ₈	Arabinose (g/L)	0	5	10

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

Com base nos resultados obtidos nesse planejamento, as variáveis significativas foram avaliadas em um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2²) com 11 ensaios, sendo 3 repetições do ponto central (Rodrigues e Iemma, 2014). As variáveis não significativas e as condições dos ensaios foram mantidas conforme descrito anteriormente. Os resultados obtidos foram analisados através de análise de variância a 5% de significância usando o *software Protimiza Experimental Design*. As concentrações ótimas das variáveis significativas foram utilizadas para validar os modelos obtidos para as enzimas, com cinco repetições.

As atividades de endoglucanase (CMCase), celulase total (Fpase), exoglucanase (Avicelase) e β -glicosidase foram avaliadas após 30 minutos de incubação de 500 μL de EEB e 500 μL de solução de cada substrato em tampão acetato de sódio 0,05 M 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, GehakaUv 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 CMCase, 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). Uma unidade de atividade celulásica (U/mL) foi considerada como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de glicose por mL por minuto de reação.

Para avaliar o efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR

2²), incluindo 3 repetições no ponto central (Rodrigues e Iemma, 2014). Os efeitos significativos foram analisados através de análise de variância (ANOVA) a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de atividade observados no planejamento Plackett-Burman 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. Segundo a análise de variância, as variáveis que afetaram significativamente a produção de celulases ($p < 0,1$) foram $MgSO_4$ (para endoglucanase), $MnSO_4$ e pH (para atividade celulásica total) e arabinose (para exoglucanase).

Nenhuma das variáveis avaliadas afetou significativamente a produção de β -glicosidase ($p < 0,1$). O que pode estar relacionado ao fato de que as condições avaliadas se encontram dentro de uma faixa não limitante para a produção enzimática ou, ainda, ao metabolismo específico da linhagem *Y. divulgata*, no qual determinados fatores ambientais não atuam diretamente na regulação da síntese enzimática, mas sim na atividade catalítica posterior (Damasceno, 2024).

A influência da arabinose pode ser atribuída ao seu papel como indutor metabólico da síntese de enzimas celulolíticas, uma vez que pentoses podem ativar vias relacionadas à degradação de polissacarídeos estruturais. Esse comportamento está de acordo com estudos que demonstram aumento da atividade enzimática na presença de arabinose, indicando que a fonte de carbono exerce papel regulatório na expressão enzimática (Damasceno, 2024).

Fatores como pH e a presença de íons metálicos, como o Mg^{+2} e Mn^{+2} , afetam diretamente o metabolismo microbiano. O pH afeta a estabilidade das proteínas e os sistemas de secreção, a taxa de crescimento e o rendimento da produção de enzimas. Além de afetar a biossíntese enzimática, o pH atua também na estabilidade e eficiência catalítica das enzimas após sua secreção (Damasceno, 2024). Os íons metálicos atuam como importantes cofatores enzimáticos otimizando a eficiência metabólica, além de atuarem como moduladores nas respostas a estresses ambientais (Walker, 2004).

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 atividade celulásica total (FPase) (0,0436 e 0,102 U/mL).

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

Qadir et al. (2018), que estudaram a atividade 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 $MgSO_4$ (X_1) e arabinose (X_2) foram selecionadas para realização de um DCCR.

Os valores de atividade de endoglucanase observados no DCCR variaram de 0 a 0,295 U/mL, para exoglucanase a atividade variou de 0 a 0,234 U/mL, para atividade celulásica total (FPase) 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 a variável $MgSO_4$ 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.

A influência significativa dos termos linear e quadrático da arabinose indica que existe uma faixa ótima de concentração desse substrato capaz de maximizar a produção enzimática, reforçando seu papel como indutor específico do metabolismo celulolítico e demonstrando que concentrações muito

elevadas podem causar efeito inibitório ou saturação metabólica.

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

$$Y_1 = 41,69 + 52,81 X_2 + 51,74 X_2^2 \text{ (Equação 1)}$$

$$Y_2 = 334,67 - 344,70 X_2 + 179,84 X_2^2 \text{ (Equação 2)}$$

Onde:

Y_1 = atividade de exoglucanase;

Y_2 = atividade de β -glicosidase.

X_2 = coeficiente linear de arabinose;

X_2^2 = coeficiente quadrático de arabinose.

Determinadas as concentrações ótimas de arabinose com base nos modelos obtidos, 1 g para exoglucanase e 10 g para β -glicosidase, foram realizados ensaios de validação com 5 repetições para cada concentração (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de atividade celulásica (U/mL) obtidos para a linhagem *Y. divulgata* em meio contendo arabinose.

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

A concordância entre os valores experimentais e os previstos pelos modelos matemáticos confirma a adequação do planejamento experimental adotado, evidenciando que a metodologia empregada é eficiente para a otimização da produção enzimática, conforme descrito na literatura de planejamento experimental (Damasceno, 2024).

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.

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 celulasas 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.

Os valores de atividade obtidos neste estudo são comparáveis aos relatados na literatura para leveduras produtoras de celulasas, evidenciando que a linhagem *Y. divulgata* apresenta desempenho promissor dentro do contexto de produção enzimática. Diferenças observadas entre os estudos podem estar associadas às condições de cultivo, composição do meio e características genéticas das linhagens analisadas (Guedes et al, 2019; Kanti; Sudiana, 2002; RAI; Tiwari; Gaur, 2012; QADIR et al, 2018).

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 de 1 g (EB-1) e 10 g de arabinose (EB-10). Os valores de atividade obtidos no DCCR para (EB-1) 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 β -glicosidase variaram de 1,035 a 1,102 U/mL (Tabela 3)

Tabela 3. Resultados das atividades celulásicas (U/mL) obtidas no DCCR para a linhagem *Yarrowia divulgata* nos ensaios com (EB-1).

Ensaio	Y ₁ *	Y ₂ *	Y ₃ *	Y ₄ *	Ensaio	Y ₁ *	Y ₂ *	Y ₃ *	Y ₄ *
1	0,079	0,217	0,102	1,073	7	0,026	0,169	0,087	1,102
2	0,085	0,295	0,078	1,037	8	0,159	0,156	0,061	1,064
3	0,083	0,160	0,108	1,035	9	0,115	0,141	0,087	1,052
4	0,120	0,188	0,083	1,072	10	0,060	0,177	0,025	1,072
5	0,196	0,246	0,089	1,058	11	0,082	0,222	0,0322	1,06
6	0,128	0,355	0,076	1,052					

*Y₁-Endoglucanase; *Y₂- Exoglucanase; *Y₃- Celulase Total; *Y₄-β- glicosidase.

Os valores de atividade obtidos no DCCR para (EB-10) 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 β-glicosidase variaram de 0,954 a 0,964 U/mL (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados das atividades celulásicas (U/mL) obtidas no DCCR para a linhagem *Yarrowia divulgata* nos ensaios com 10 g de arabinose.

Ensaio	Y ₁ *	Y ₂ *	Y ₃ *	Y ₄ *	Ensaio	Y ₁ *	Y ₂ *	Y ₃ *	Y ₄ *
1	0,000	0,040	0,000	0,959	7	0,011	0,046	0,051	0,959
2	0,051	0,079	0,000	0,960	8	0,000	0,034	0,000	0,954
3	0,000	0,000	0,041	0,957	9	0,000	0,000	0,000	0,963
4	0,000	0,040	0,013	0,964	10	0,000	0,046	0,011	0,957
5	0,000	0,000	0,001	0,955	11	0,000	0,017	0,000	0,962
6	0,000	0,009	0,079	0,959					

*Y₁-Endoglucanase; *Y₂- Exoglucanase; *Y₃- Celulase Total; *Y₄-β- glicosidase.

Para (EB-1) 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, para β-glicosidase houve influência do coeficiente quadrático de pH, coeficiente linear de temperatura e a interação entre pH e temperatura e houve influência significativa para o coeficiente linear de pH, coeficiente quadrático de temperatura e interação entre pH e temperatura. A porcentagem de variação

explicada (R^2) pelo modelo foi de 70,83% para exoglucanase e 65,76% para β-glicosidase, indicando que o modelo está adequado para explicar o comportamento da variável resposta.

Para EB-10 houve influência significativa para o coeficiente linear de pH, coeficiente quadrático de temperatura e interação entre pH e temperatura, porém o R^2 de 42,35% indicou que o modelo não foi adequado (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância para o efeito das variáveis na atividade de exoglucanase por *Y. divulgata* para EB-1 (1 g de arabinose) e β -glicosidase por *Y. divulgata* para EB-1 (1 g de arabinose).

Análise de variância	Atividade de exoglucanase por <i>Y. divulgata</i> para EB-1				Atividade de β -glicosidase por <i>Y. divulgata</i> para EB-1			
	SQ*	GL**	QM***	Fcalc	SQ*	GL**	QM***	Fcalc
Regressão	305,403	2	152,701	9,7	22,742	3	7,580	4,4
Resíduos	125,759	8	15,719		11,843	7	1,691	
Falta de Ajuste	92,940	6	15,490	0,9	9,822	5	1,964	1,9
Erro Puro	32,819	2	16,409		2,020	2	1,010	
Total	431,163	10			34,585	10		

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 2 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 de *Trichosporon laibachii*, isolado de folha em decomposição, madeira e ninho de formiga.

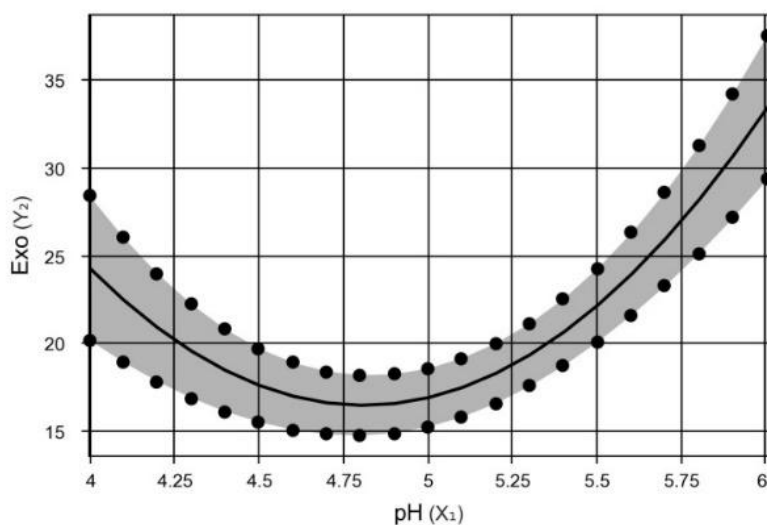


Figura 2. Efeito da variação de pH sobre a atividade de exoglucanase da linhagem *Y. divulgata* em meio contendo 1 g de arabinose.

Para ilustrar os efeitos das variáveis significativas do DCCR com EB-1 na atividade de β -glicosidase, são apresentados os gráficos de superfície de resposta e as curvas de contorno na figura 3 (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 de β -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* 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. A diminuição da atividade em pH mais alto provavelmente está relacionada à inativação proteica das enzimas (Adelabu et al., 2019; Bettelheim et al., 2017).

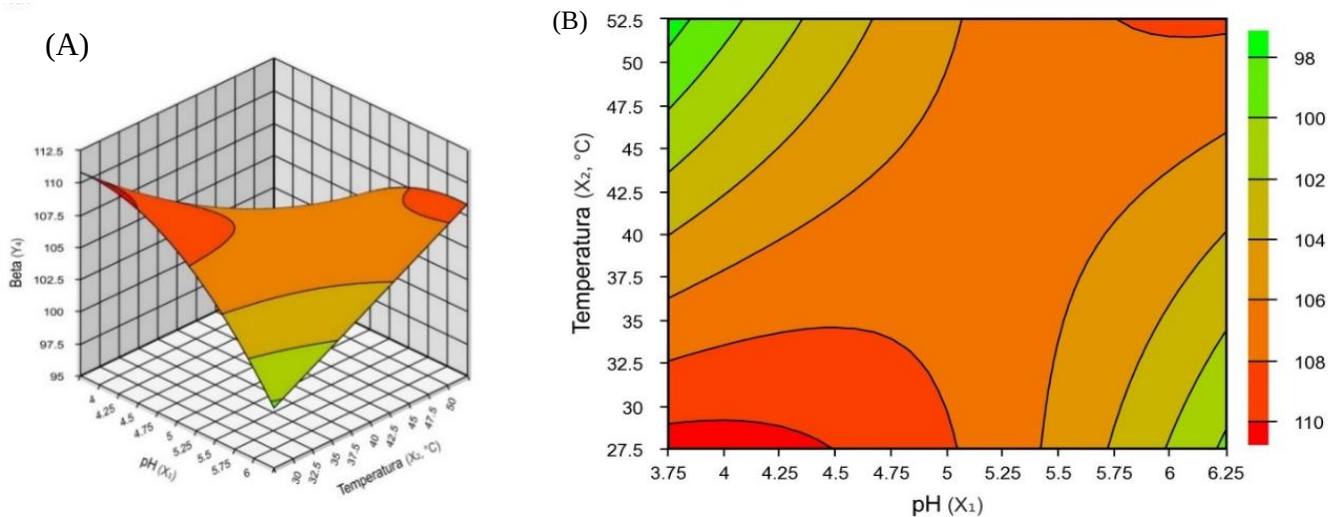


Figura 3. Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) que representam o efeito das variáveis pH e temperatura na atividade de β -glicosidase, em meio contendo 1 g de arabinose.

Embora haja poucos estudos sobre as 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, encontrando máxima atividade em pH 5 para β -glicosidase, o que está em concordância com os dados obtidos em nosso trabalho.

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

Adelabu et al. (2019) e Techaparin et al. (2017), relataram que, devido às composições genéticas, as leveduras são boas em respostas a altas temperaturas e baixos valores de pH, sendo capazes de produzir enzimas termotolerantes, podendo 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 a

55 °C. As celulases termotolerantes apresentam potencial para uso industrial, pois possuem atividade específica mais alta e melhor estabilidade, 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 (Ajeje et al, 2021).

Os resultados obtidos evidenciam o potencial biotecnológico da linhagem *Yarrowia divulgata* na produção de enzimas celulolíticas, especialmente para aplicações industriais como a produção de bioetanol de segunda geração. A utilização de um microrganismo capaz de produzir enzimas em condições relativamente brandas de pH e temperatura pode contribuir significativamente para a redução de custos em processos industriais, uma vez que as enzimas representam uma parcela expressiva do custo total da produção de biocombustíveis (Damasceno, 2024).

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a linhagem *Yarrowia divulgata* isolada de coco tucum apresenta potencial para a produção de enzimas celulolíticas, indicando que frutos de *Bactrissetosa* podem constituir importantes fontes de leveduras com aplicações biotecnológicas.

O modelo matemático empregado demonstrou adequada capacidade preditiva, explicando 70,83% da variação da atividade de exoglucanase e 89,3% da β -glicosidase, evidenciando o papel relevante da arabinose na indução dessas enzimas.

Adicionalmente, as celulasas produzidas pela linhagem apresentaram características ácido-ótimas e termotolerantes, propriedades desejáveis para aplicações industriais, uma vez que contribuem para maior eficiência e flexibilidade nos processos de hidrólise enzimática.

AGRADECIMENTO

À Professora Dr^a Paula Benevides de Moraes do Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia - LAMBIO da UFT-Palmas, pela linhagem de levedura utilizada no trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adelabu, B.; Olowe, O.M.; Akinyele, B.J. et al. (2019). Optimization of cellulase enzyme from sorghum straw by yeasts isolated from plant-feeding termite *Zonocerus variegatus*. **Food and Applied Bioscience Journal** 7(3): 81-99.
- Ajeje, S.B. et al. (2021). Thermostable cellulases/xylanases from thermophilic and hyperthermophilic microorganisms: Current perspective. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology** 9: 1-19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.794304>
- Bettelheim, F.A.; Brown, W.H.; Campbell, M.K. & Farrell, S.O. (2017). **Introdução à química geral, orgânica e bioquímica**. São Paulo: Cengage Learning.
- Campos, B.B.; Silva, C.F.; Dias, D.R. et al. (2019). Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schumach.) is a promising feedstock for ethanol production by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** 36(1): 43-49. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190361s20170263>
- Carvalho, F.P. (2013). **Enzimas celulolíticas e xilanolíticas de leveduras isoladas do cerrado** (Tese de doutorado). Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, Brasil. 119p.
- Damasceno, F.A. (2024). **Planejamento do tipo Plackett-Burman no preparo de amostras de líquido cefalorraquidiano para estudo lipidômico** (Dissertação de mestrado). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, SP, Brasil. 136p.
- Florenco, C.; Badino, A.C. & Farinas, C.S. (2017). Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Química Nova** 40(9): 1082-1093. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170104>
- Giese, E.C.; Dussán, K.J.; Covizzi, L.G. et al. (2017). Cellulase production by *Trichosporon laibachii*. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry** 9(4): 271-278. <https://doi.org/10.17807/orbital.v9i4.1024>
- Guedes, E.H.S.; Santos, L.D.A.; Menezes, F.S.R. et al. (2019). Atividade celulolítica de leveduras isoladas de frutos de palmeiras. **B.CEPPA** 36(1): 1-7. <https://doi.org/10.5380/bceppa.v36i1.57644>
- Kanti, A. & Sudiana, I.M. (2002). Cellulolytic yeast isolated from soil Gunung Halimun National Park. **Berita Biologi** 6(1): 85-90.
- Marzzoco, A. & Torres, B.B. (2025). **Bioquímica básica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Menezes, F.S.R.; Guedes, E.H.S.; Santos, L.D.A. et al. (2019). Evaluation of endoglucanase and β -glucosidase production by bacteria and yeasts isolated from a Eucalyptus plantation in the cerrado of Minas Gerais. **Nativa: An Interdisciplinary Journal of Applied Science** 7(4): 1-9.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry** 31(3): 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

- Qadir, F.; Iqbal, H.M.N.; Rashid, U. et al. (2018). Evaluation of a yeast co-culture for cellulase and xylanase production under solid-state fermentation of sugarcane bagasse using multivariate approach. **Industrial Crops and Products** 123: 407-415. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.021>
- Rai, P.; Tiwari, S. & Gaur, R. (2012). Optimization of process parameters for cellulase production by novel thermotolerant yeast. **BioResources** 7(4): 5401-5414.
- Rodrigues, M.I. & Iemma, A.F. (2014). **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Pão Editora.
- Rungrattanakasin, B.; Thanonkeo, P.; Klanrit, P. et al. (2018). Cloning and cellulase of an endoglucanase gene from the thermotolerant fungus *Aspergillus fumigatus* DBiNU-1 in *Kluyveromyceslactis*. **Brazilian Journal of Microbiology** 49(3): 647-655. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.10.001>
- Santos, L.D.A. (2017). **Avaliação da produção de celulasas por duas linhagens de leveduras isoladas de frutos de palmeiras** (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Tocantins. Palmas, TO, Brasil. 48p.
- Shariq, M. & Sohail, M. (2019). Production of cellulase and xylanase from *Candida tropicalis* (MK-118) on purified and crude substrates. **Pakistan Journal of Botany** 52(1): 1-6.
- Techaparin, A.; Thanonkeo, P. & Klanrit, P. (2017). High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. **Brazilian Journal of Microbiology** 48(3): 461-475. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.006>
- Touijer, H.; Farih, A.; Laglaoui, A. et al. (2019). Thermostable cellulases from the yeast *Trichosporon* sp. **Enzyme Research** 2019: 1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/2790414>
- Walker, G.M. (2004). Metals in yeast fermentation processes. **Advances in Applied Microbiology** 54: 197-229. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(04\)54008-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)54008-X).