



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

RODOLFO MESQUITA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR LEVEDURAS
ISOLADAS DO TRATO DIGESTÓRIO DE INSETOS
AQUÁTICOS**

Palmas/TO
2019

RODOLFO MESQUITA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR LEVEDURAS
ISOLADAS DO TRATO DIGESTÓRIO DE INSETOS
AQUÁTICOS**

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 Bacharel e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientadora: Prof^ª Doutora Solange Cristina Carreiro

Palmas/TO
2019

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

O48p Oliveira, Rodolfo Mesquita de Oliveira.

Produção de Hidrolases por leveduras isoladas do trato digestório de insetos aquáticos. / Rodolfo Mesquita de Oliveira Oliveira. – Palmas, TO, 2019.

39 f.

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

Orientadora : Solange Cristina Carreiro

1. Hidrolases . 2. Leveduras . 3. Enzimas . 4. Superfície de resposta. 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

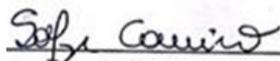
RODOLFO MESQUITA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HIDROLASES POR LEVEDURAS DO TRATO DIGESTÓRIO DE INSETOS AQUÁTICOS

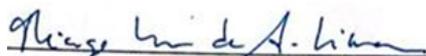
Trabalho de conclusão de curso foi avaliado e apresentado à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Palmas, Curso de Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Bacharel e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 08 / 08 / 2019

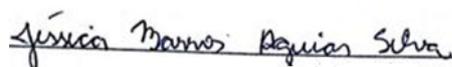
Banca Examinadora



Prof. Dr^a. Solange Cristina Carreiro, UFT



Prof. Dr. Thiago Lucas de Abreu-Lima, UFT



Dr^a. Jéssica Barros Aguiar Silva

Palmas-TO, 2019

*Dedico esse trabalho a toda a minha família
em especial minha avó Maria Tavares, e meus
irmãos Renan e Ranny Kelly, aos meus pais
Carlos Antônio e Marivalda Tavares e também
a minha Madrinha Aliny Queiroz.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guardado e guiado durante esta jornada e em todos os momentos da vida.

A minha família que é minha base e por sempre ter me dado total apoio, compreensão, e amor do mundo. Em especial minha avó Maria Tavares que é o meu bem mais sagrado e sempre fez o possível e o impossível para que eu pudesse terminar a graduação. Ao meu pai Carlos Antônio que nunca deixou faltar nada e é um símbolo de amor e acolhimento. A Minha madrinha Aliny Queiroz que sempre me ajudou tanto financeiramente quanto com palavras de sabedoria demonstrando amor e afeto.

A minha querida orientadora Professora Doutora Solange Carreiro, por sempre me orientar e por toda paciência e conhecimento passado. E também a UFT por me proporcionar tudo isso que vivi e aprendi.

Aos meus amigos de Infância Silas e Bruna, que mesmo com a distância a falta de tempo sempre estiveram presentes quando precisei. A minha confidente irmã Ariadna Ramos por sempre me escutar, me acolher e nunca me julgar, você foi e é essencial na minha vida.

As amizades conquistadas em Palmas, em especial ao grupo “Vai Toma”, por sempre proporcionar vários momentos de alegria e descontração e sempre estarem por perto nos momentos difíceis.

A Talia Soares, Bruna Raquel, Ana Laura e Suzana que são amigas que quero levar pra vida toda, que cuidaram de mim todo esse tempo vivido aqui em Palmas.

Ao meu squad da UFT, Eduardo Henrique (Dudu), Karolline Ribeiro (Karollzinha), Pedro Miranda (Pedim), Letícia Camargo (Let) e a Isabela Moreno (Isabelinha). Vocês são exemplos de pessoas, de força e garra. Obrigado por tudo!

RESUMO

A utilização das enzimas vem tomando cada vez mais espaço, sendo de extrema importância em vários setores industriais, como no ramo alimentício, têxtil, farmacêutico entre outros. O presente trabalho avaliou a produção de hidrolases (amilase, celulase, lipase e xilanase), em meios sólidos específicos, por 30 linhagens de leveduras isoladas do trato digestivo de insetos fragmentadores (*Phylloicus*, *Triplectides*, *Nectopsyches* e *Conotelus*). Obteve-se resultados positivos para amilase, lipase e xilanase. Apenas uma linhagem *Papiliotrema Laurentii* (PON28.6) apresentou halo de hidrólise tanto para amilase quanto para xilanase, apresentando um índice enzimático (IE) de 1,47 e 2,41 respectivamente. Para lipase as linhagens *Papiliotrema Laurentii* (PON28.6), *Rhodotorula mucilaginosa* (TRIP5), *Cryptococcus* sp. 1 (LAG12.1), *Rhodotorula mucilaginosa* (PH42), *Candida parazyza* (CO26) e *Lodderomyces elongisporus* (PON11.3), apresentaram halo de hidrólise com IE variando de 1,56 a 2,67. A linhagem PON28.6 foi selecionada para avaliação da produção de xilanase em fermentação submersa, avaliando-se o efeito de sete variáveis (pH, concentrações de xilana, extrato de levedura, peptona, KH_2PO_4 , MgSO_4 e NaNO_3) através de um delineamento de Plackett-Burman (PB12). Apenas as variáveis MgSO_4 e extrato de levedura foram significativas e foram utilizadas em um delineamento completo (DCCR). As duas variáveis foram significativas ($p < 5\%$) com atividades enzimáticas variando de 0,018 a 0,191 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, porém com o modelo obtido não foi possível se obter um ponto ótimo para a produção da xilanase no intervalo das variáveis testadas.

Palavras-chaves: Amilase. Celulase. Lipase. Xilanase. Superfície de resposta.

ABSTRACT

The use of enzymes has been taking more and more space, being of extreme importance in several industrial sectors, such as in the food, textile, pharmaceutical, among others. The present work evaluated the production of hydrolases (amylase, cellulase, lipase and xylanase) in specific solid media by 30 yeast strains isolated from the digestive tract of fragile insects (Phylloicus, Triplectides, Nectopsyches and Conotelus). Positive results were obtained for amylase, lipase and xylanase. Only one strain *Papiliotrema Laurentii* (PON28.6) presented halo hydrolysis for both amylase and xylanase, showing an enzymatic index (IE) of 1.47 and 2.41, respectively. For lipase the strains *Papiliotrema Laurentii* (PON28.6), *Rhodotorula mucilaginosa* (TRIP5), *Cryptococcus* sp. 1 (LAG12.1), *Rhodotorula mucilaginosa* (PH42), *Candida parazyza* (CO26) e *Lodderomyces elongisporus* (PON11.3), showed IE hydrolyzing halo ranging from 1.56 to 2.67. The *Papiliotrema Laurentii* (PON28.6) line was selected to evaluate xylanase production in submerged fermentation, evaluating the effect of seven variables (pH, concentrations of xylan, yeast extract, peptone, KH_2PO_4 , MgSO_4 and NaNO_3) through a Plackett-Burman (PB12). Only the variables MgSO_4 and yeast extract were significant and were used in a complete delineation (DCCR). The two variables were significant ($p < 5\%$) with enzymatic activities varying from 0.018 to 0.191 U.mL⁻¹, but with the obtained model it was not possible to obtain an optimal point for xylanase production in the range of the tested variables.

Key-words: Amylase. Lipase. Cellulase. Xylanase. Response surface.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Células de leveduras vistas ao microscópio óptico.....	15
Figura 2 – Atuação de uma enzima ilustrativa em um substrato.....	18
Figura 3 - Ação das amilases sobre a amilose e amilopécnia.....	20
Figura 4 - Ação das celulasas sobre a molécula de celulose	21
Figura 5 - Ação da Lipase nos triacilgliceróis	22
Figura 6 - Mecanismo catalítico das xilanases os mecanismos de retenção e inversão da configuração anomérica.....	23
Figura 7 - Gráfico de superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade xilanolítica em função da concentração de MgSO ₄ e extrato de levedura.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Classificação das Enzimas e seu mecanismo de quebra	18
Tabela 2– Resumo das principais enzimas utilizadas no mercado	19
Tabela 3- Celulases e suas subclassificações	21
Tabela 4– Linhagens e seus respectivos insetos as quais foram isoladas.....	24
Tabela 5- Níveis e valores das variáveis utilizadas no PB12	27
Tabela 6 - Níveis e valores das variáveis utilizadas no DCCR	27
Tabela 7– Valores dos Índices Enzimáticos obtidos pelas linhagens de leveduras.....	29
Tabela 8 – Valores de atividade xilanolítica e contagem de células obtidos no PB12.....	30
Tabela 9 - Regressão realizada no PB12	31
Tabela 10 – Valores de atividade xilanolítica e contagem de células obtidos no DCCR.....	32
Tabela 11 - Regressão realizada no DCCR	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Açúcar Redutor
CMC	Carboximetilcelulose
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
EEB	Extrato Bruto Enzimático
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Fermentação Submersa
IE	Índice enzimático
UFT	Universidade Federal do Tocantins
PB12	Delineamento fracionado de Plackett e Burman com 12 ensaios

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro
m	Mili
α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Celsius
g	Gramma
L	Litro
U	Quantidade de enzima capaz de produzir 1 μmol de açúcar redutor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	15
3.1	Leveduras.....	15
3.2	Uso de leveduras para produção de enzimas	16
3.3	Enzimas	17
3.3.1	Enzimas de interesse industrial.....	19
3.3.1.1	Amilases	19
3.3.1.2	Celulases.....	20
3.3.1.3	Lipases	20
3.3.1.4	Xilanases.....	21
4	METODOLOGIA.....	23
4.1	Linhagens de leveduras	23
4.2	Produção das hidrolases em meio sólido.....	24
4.2.1	Amilase.....	24
4.2.2	Celulase	25
4.2.3	Lipase	25
4.2.4	Xilanase	25
4.3	Avaliação da produção de xilanase em cultivo submerso	25
4.3.1	Delineamento experimental.....	25
4.3.2	Obtenção do inóculo e cultivo submerso.....	26
4.3.3	Determinação da atividade xilanolítica	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Produção das hidrolases em meio sólido.....	28
5.2	Cultivo submerso para a produção de xilanase	29
6	CONCLUSÃO.....	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são macromoléculas proteicas capazes de realizar catálise biológica de reações químicas, podendo ter sua atividade intra ou extracelular. Elas atuam diminuindo a energia de ativação das reações, fazendo assim com que aconteçam de forma mais rápida (ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010).

Esses compostos são classificadas seguindo alguns critérios, dentre eles o mais relevante é sua afinidade pelo substrato. As hidrolases são um grupo de enzimas que tem sua atividade ligada às ligações covalentes onde acontecem as quebras (OLIVEIRA, 2015; FRANZ, 2016).

A obtenção das enzimas pode ser dada a partir de tecidos animais ou vegetais e a partir de microrganismos. As enzimas de fontes microbianas são amplamente utilizadas, pois podem ser obtidas de forma independente, utilizando substratos de baixo custo como resíduos agrícolas e têm a possibilidade da otimização do processo fermentativo para um melhor rendimento na produção (SAID & PIETRO, 2002).

A utilização de enzimas como catalisadores biológicos é frequente e de muita importância em diversas áreas industriais, tais como têxtil, de detergentes, de papéis, farmacêutica e alimentícia. Além de serem mais hábeis e específicas que os catalisadores químicos as enzimas são biologicamente corretas pois não geram substâncias tóxicas ao ambiente nem nos produtos gerados (VAN & BEILEN, 2002; SILVA, 2011; FRANZ et al., 2016).

Os microrganismos produtores de enzimas englobam as bactérias e os fungos. Os fungos podem ser encontrados em duas formas, sendo elas a leveduriforme ou filamentosa (OLIVEIRA et al., 2015). As leveduras são capazes de degradar incontáveis compostos, orgânicos e inorgânicos, podendo assim retirar nutrientes e a energia necessária à sua sobrevivência, com isso, vem sendo largamente usadas como agente biológico na solução dos problemas gerados pelos resíduos despejados no meio ambiente. A capacidade de crescimento nesses substratos resultou na produção de enzimas capazes de decompor moléculas orgânicas variadas, dando assim vantagem ao seu uso por haver uma diversidade extensa no seu nicho ecológico e o uso de várias fontes energéticas (FUENTEFRÍA, 2004; SILVA, 2011).

Diante do apresentado, o objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de hidrolases por leveduras isoladas do trato digestivo de insetos fragmentadores, de forma a avaliar o potencial biotecnológico dessa microbiota.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a capacidade de produção de enzimas extracelulares por linhagens de leveduras isoladas do trato digestivo de insetos fragmentadores dos gêneros, *Phylloicus*, *Triplectides*, *Nectopsyches* e *Conotelus*.

2.2 Objetivos específicos

- Utilizar ensaios em meios sólidos para avaliar a capacidade das linhagens de leveduras para produção de amilases, celulasas, lipases e xilanases;
- Comparar a eficiência degradativa de cada linhagem através da avaliação dos valores de Índices Enzimáticos (IE) obtidos;
- Determinar a influência de 7 variáveis (pH, concentrações de xilana, extrato de levedura, peptona, KH_2PO_4 , MgSO_4 e NaNO_3) na produção de xilanase em cultivo submerso utilizando planejamentos fatoriais sequenciais e análise das superfícies de resposta.

3 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

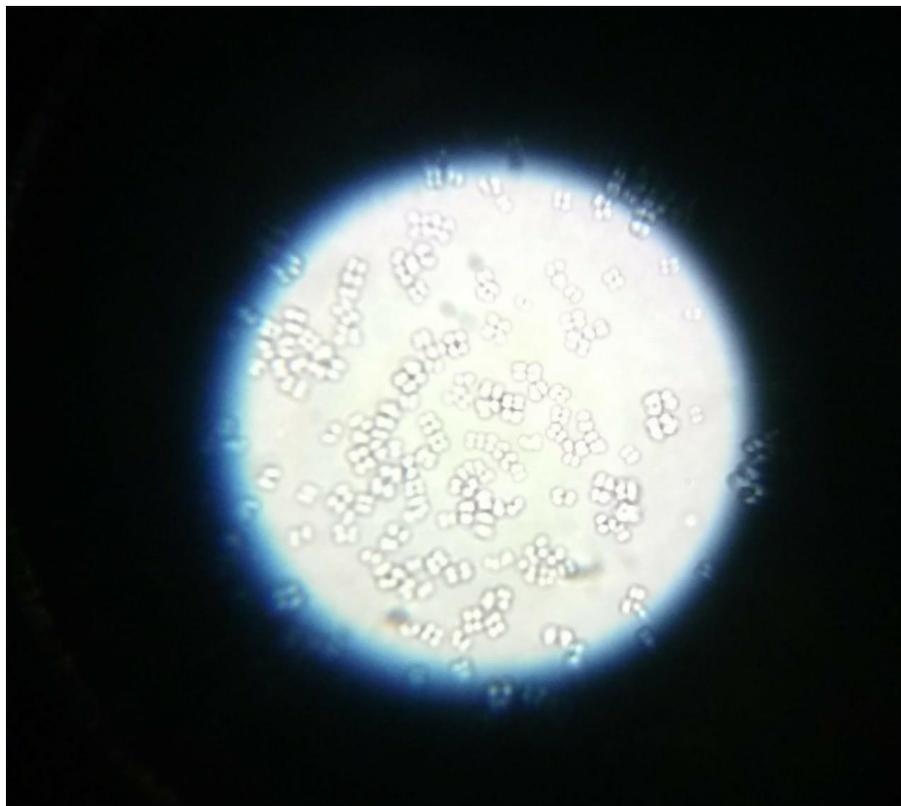
3.1 Leveduras

Leveduras são microrganismos unicelulares que estão classificados dentro do reino Fungi. Sua célula pode apresentar formato esférico, oval e cilíndrico e sua reprodução pode ser dada de forma assexuada por brotamento ou sexuada, quando ocorre a fusão de duas células (SILVA et al. 2011, MATOS, 2015).

Leveduras apresentam uma capacidade extremamente eficiente de degradação de substratos para obtenção de nutrientes, e com isso são vistas como um grande potencial biotecnológico. Na indústria as leveduras vêm sendo utilizadas em diversas etapas de processamento, seja nas indústrias alimentícia, têxtil, farmacêutica dentre outras (BUZZINI & MARTINI, 2002; FUENTEFRIA, 2004; FRANZ, 2016).

Na figura 1 podemos ver como são as células das leveduras vistas a partir do microscópio óptico.

Figura 1 - Células de leveduras vistas ao microscópio óptico



Fonte: Acervo pessoal

Leveduras com potencial biotecnológico, podem ser encontradas a em vários habitats, sendo eles solo, água de rios, lagos hipersalinas, insetos, vegetais e até em animais (GONZALEZ, 2014).

3.2 Uso de leveduras para produção de enzimas

As leveduras vêm cada vez mais sendo utilizadas em processos industriais e a produção de enzimas é uma área que vem sendo bastante estudada (BHADRA et al., 2008). Santos (2012) em seu estudo com linhagens isoladas de afloramentos rochosos, obteve resultados positivos para a produção de amilases e proteases, onde 58% das linhagens foram capazes de produzir a enzima amilase e 42% produziram protease.

A obtenção de leveduras com potencial biotecnológico pode ser dada de inúmeras formas, podendo partir do isolamento de componentes da natureza, compra de cepas, obtenção de mutantes naturais ou induzidos por metodologias convencionais, e até a obtenção de microrganismos recombinantes gerados por engenharia genética (VAZ, PRADO & CARVALHO, 2007; ÇELIK e ÇALIK, 2012).

Com a obtenção da levedura, a mesma é cultivada em meios indutores para a produção de quantidades elevadas do catalisador biológico. Nessa situação, é de total acuidade a otimização do meio de cultivo. Dentre os fatores a serem otimizados estão pH, temperatura, aeração, e concentração de variados nutrientes, como fontes de carbono e nitrogênio (MONTEIRO; DO NASCIMENTO SILVA, 2009).

A produção industrial de enzimas pode se dar através da fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação em substrato sólido (FSS). Na fermentação submersa (FS) os microrganismos estão suspensos em um meio líquido onde os nutrientes estão presentes de forma mais homogênea, fazendo com que haja uma maior difusão entre microrganismo e substrato. Ao contrário, a fermentação em estado sólido (FES), é caracterizada pelo crescimento do microrganismo em um meio com ausência de água livre, diante disso, é essencial que haja umidade suficiente fixada no substrato (MACIEL, 2006; MONTEIRO; DO NASCIMENTO SILVA, 2009; OLIVEIRA, 2015).

A fermentação em estado sólido (FES) apresenta diversas vantagens sendo elas: a possibilidade do uso de substratos de baixo custo, inserção de nutrientes para suplementar o substrato, trabalhar com um volume de meio menor, baixo custo em investimento em

biorreatores, utilizar esporos dos fungos para inoculação direta, sem a necessidade de pré-cultivo, o crescimento ocorre em condições parecidas ao seu habitat natural, a baixa atividade de água diminui os riscos de contaminação, aeração difundida por conta do maior espaço entre as partículas e pela difusão do oxigênio na água para umidificar o meio, altos rendimentos na formação de metabólitos e uma maior facilidade na purificação. Por outro lado, a FES contém algumas restrições quanto ao seu uso, onde restringe os microrganismos a serem utilizados, pois nem todos tem a capacidade de se desenvolver em ambientes de baixa umidade e condições como de altas temperaturas. Já a FS apresenta vantagens como a facilidade na manipulação, o uso de um maior volume meio, a massa celular fica submersa no meio de maneira uniforme (MONTEIRO; DO NASCIMENTO SILVA, 2009).

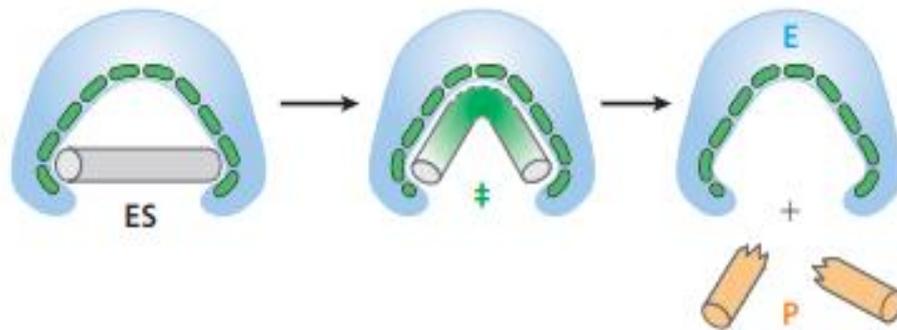
3.3 Enzimas

Enzimas são macromoléculas proteicas capazes de realizar catalise biológica em reações químicas, e são sintetizadas intracelular. Sua principal característica, é a sua especificidade para cada substrato, com isso, cada enzima tem atuação restrita referente à um determinado meio. Com essa característica, as enzimas são extremamente importantes em processos industriais, otimizando processos e transformando a matéria-prima (OLIVEIRA JÚNIOR, 2014).

Considerando seu mecanismo de ação, as enzimas partem do princípio “chave-fechadura” proposto por Emil Fischer em 1894, onde cada enzima é específica para cada substrato (MONTEIRO; DO NASCIMENTO SILVA, 2009). A molécula da enzima contém um bolsão delimitado por resíduos de aminoácidos com ramificações laterais, as mesmas que se ligam com o substrato isolando-o totalmente da solução, com isso, há um aumento da energia livre da reação fazendo com que o processo de quebra seja mais rápido. A enzima também sofre uma alteração na sua conformação quando o substrato se liga a ela, onde induz o acontecimento de múltiplas interações fracas com o substrato. Isso é chamado de ajuste induzido, mecanismo proposto por Daniel Koshland em 1958 (MONTEIRO; DO NASCIMENTO SILVA, 2009; NELSON & COX, 2014).

Na figura 2, podemos observar a ilustração de como ocorre esse processo de envolvimento da enzima ao substrato.

Figura 2 – Atuação de uma enzima ilustrativa em um substrato



ES: complexo enzima-substrato; **E:** Enzima; **P:** produto;

Fonte: Nelson & Cox (2014).

As enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam. A Tabela 1 apresenta sua classificação e seu mecanismo de quebra.

Tabela 1– Classificação das Enzimas e seu mecanismo de quebra.

Classificação	Mecanismo de quebra
Oxiredutases	Catalisam reações de óxido-redução (transferência de elétrons)
Transferases	Catalisam reações em que ocorre a transferência de grupos de uma molécula para outra
Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
Liases	Catalisam reações de quebra de ligações, adicionando grupos às duplas ligações ou formando duplas ligações pela remoção de grupos
Isomerases	Catalisam reações em que o substrato é transformado em um produto isômero
Ligases	Catalisam a ligação covalente de moléculas, que ocorrem após a quebra de uma ligação de alta energia

Fonte: Adaptado Nelson & Cox (2014).

3.3.1 Enzimas de interesse industrial

O mercado de enzimas está sendo um dos mais promissores nas últimas décadas, e o interesse nessa tecnologia está em crescimento constante, em especial nas áreas de engenharia de proteínas e na área de enzimologia com a utilização de meios não convencionais (OLIVEIRA, 2015; ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010).

A tabela 2 mostra algumas enzimas, os seus principais produtores e suas aplicações no ramo industrial.

Tabela 2– Resumo das principais enzimas utilizadas no mercado

Enzimas	Origem	Aplicação
Amilase	<i>Aspergillus niger, A. oryzae, Bacillus Subtilis</i>	Melhoramento de massas e produção de xaropes
Celulase	<i>Aspergillus niger, Trichoderma reesei</i>	Preparação de concentrados líquidos de café e clarificação de sucos
Glicose Oxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Eliminação da glicose dos sólidos do ovo
Invertase	<i>Sacharomyces cereviase</i>	Mel artificial
Lactase	<i>Sacharomyces fragilis</i>	Hidrolise da lactose
Lipase	<i>Aspergillus niger, Rhizophus spp, Penicillium</i>	Sabor ao queijo
Pectinase	<i>Aspergillus oryzae</i>	Clarificação de vinhos e suco de frutas
Protease	<i>Bacillus subtilis</i>	Clarificação de cerveja e amaciamento de carne

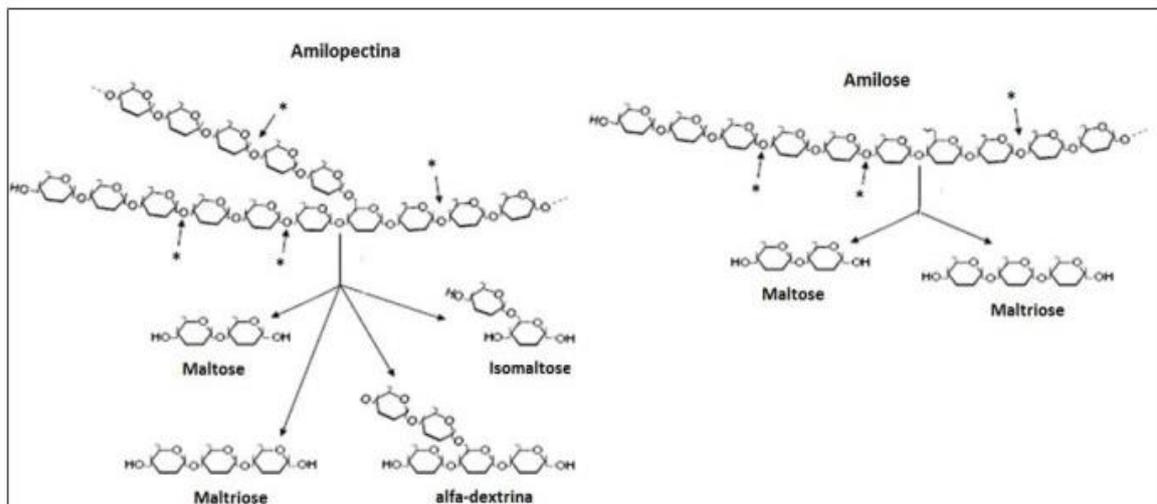
Fonte: Adaptado Monteiro, Do Nascimento Silva (2009)

3.3.1.1 Amilases

Amilases são enzimas cuja função é realizar a hidrólise do amido, sendo divididas em dois grupos: as endoamilases, que catalisam a hidrólise aleatoriamente dentro das moléculas de amido, e as exoamilases, que hidrolisam as extremidades não redutoras da molécula (LI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

O amido tem em sua composição dois polímeros, a amilose e a amilopectina. A amilose tem uma estrutura linear formada por moléculas de glicose ligadas por ligações glicosídicas α -1,4, e a amilopectina é composta por ramificações e também por cadeias de glicose com ligações α -1,4, e suas ramificações ligadas por ligações α -1,6 como podemos ver na figura 3 (FRANZ et al., 2016; RAVEN, EVERT & EICHHORN, 2014; SAHA et al., 2014).

Figura 3 - Ação das amilases sobre a amilose e amilopectina

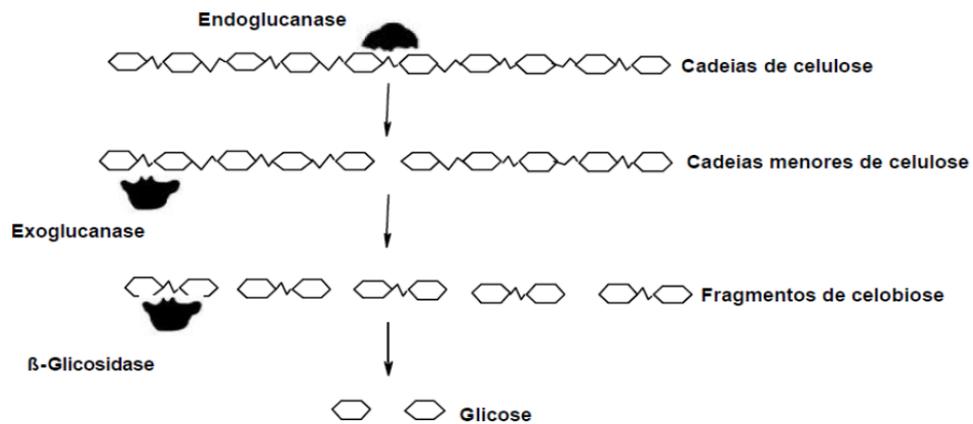


Fonte: Disponível em: < <https://abioquimicacomoeae.com.br/6-numeros-anteriores/numero-2/4-espaco-dos-convidados/a-bioquimica-da-producao-de-cerveja/> >

3.3.1.2 Celulases

Celulase são o conjunto de enzimas destinadas a realizar a hidrólise da celulose, que é um componente estrutural da parede celular de vegetais (Tabela 3). Para que aconteça sua hidrólise é necessário passar por três etapas, onde envolvem-se três enzimas: as endoglucanases, as celobiohidrolases e as β -glicosidades. As endoglucanases atuam de forma aleatória causando quebra nas regiões cristalinas da celulose, assim que os fins das cadeias são expostos; as celobiohidrolases rompem as ligações presentes nas extremidades redutoras e não redutoras, causando a liberação da celobiose. E por último as β -glicosidades rompem as ligações da celobiose liberando unidades de glicose (FRANZ et al., 2016). A figura 4 mostra a ação das celulases nas moléculas de celulose.

Figura 4 - Ação das celulases sobre a molécula de celulose



Fonte: Modificado de Wright et al. (1988).

Tabela 3- Celulases e suas subclassificações

Nomenclatura	Mecanismo de ação
Endo- β (1-4) glucanase ou β (1-4) D-glucano-4-glucanohidrolase ou Cxcelulase ou CMCase	Hidrolisam as ligações β (1-4) ao acaso dentro da cadeia de celulose liberando glicose, celobiose e celodextrinas
Exo- β (1-4) glucanase ou Avicelase ou exo glucana-4-glucanohidrolase ou C1 celulase	hidrolisam as ligações glicosídicas da celulose a partir da extremidade não redutora liberando celobiose
Celobiase ou β (1-4) glicosidase	hidrolisam as ligações do tipo β (1-4) (celobiose, trealose, gentiobiose) e liberam glicose
Exo- β (1-4) D-glucana-glicohidrolase	hidrolisam as ligações β (1-4) glicosídicas de celodextrinas e liberam moléculas de glicose. A sua atividade tem redução com a diminuição da cadeia do substrato

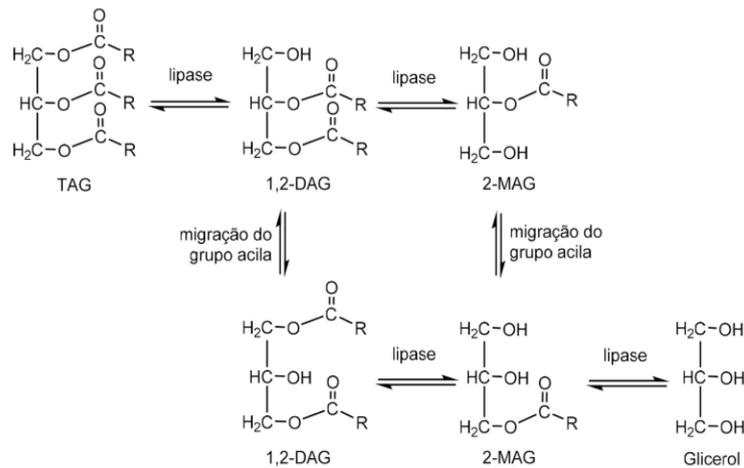
Fonte: adaptado de Peixoto (2006), Oliveira Júnior et al. (2014).

3.3.1.3 Lipases

Lipases são enzimas amplamente utilizadas nas indústrias, elas hidrolisam as ligações glicerídicas entre o glicerol e os ácidos graxos (Figura 5), podendo catalisar a hidrólise de triacilgliceróis que contêm ácidos graxos com dez ou mais átomos de carbono. Elas representam um grupo de enzimas importantes devido às suas propriedades únicas. As lipases apresentam níveis extraordinários de atividade e estabilidade tanto em meios aquosos e não

aquosos, e com isso permitem a catálise de várias reações. No entanto, o uso mais amplo de lipases é limitado pelo seu custo de produção. A fermentação em estado sólido (FES) representa uma alternativa interessante, onde permite a produção dessa enzima com um menor custo, devido à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais, como substrato (GUTARRA et al., 2009).

Figura 5 - Ação da Lipase nos triacilgliceróis



Fonte: Adaptado Li et al. (2010)

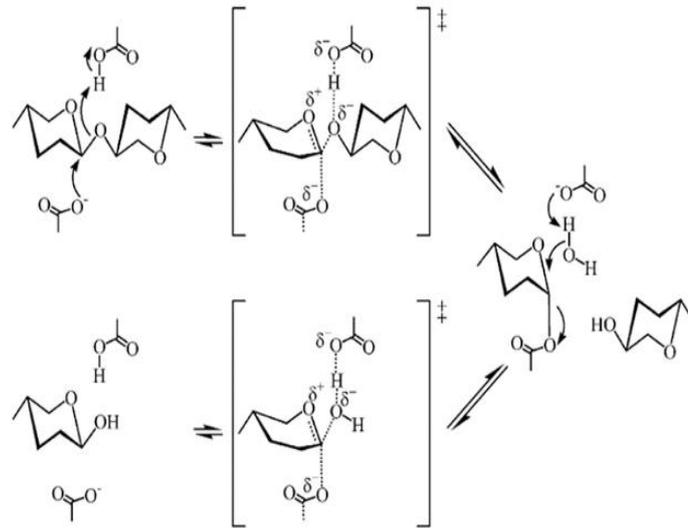
3.3.1.4 Xilanases

Xilanases ou β -glucanases, são capazes de acelerar a clivagem do xilano, que, decorrente da sua estrutura heterogênea, necessita de um complexo xilanolítico para que ocorra a sua total degradação, sendo assim insuficiente apenas a presença da enzima (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2014).

Xilana é um grupo de hemiceluloses que compõem o terceiro biopolímero mais abundante. As hemiceluloses são heteropolissacarídeos, compostos por vários componentes de açúcares como D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose, e alguns outros, e por seus ácidos urônicos. Estes açúcares estão ligados por ligações glicosídicas β -1,4, gerando uma estrutura principal a qual é mesclada por um tipo específico de resíduo, da qual formam ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares (PALMA, 2003).

A figura 6 mostra o mecanismo catalítico das xilanases com os mecanismos de retenção e inversão da configuração anomérica.

Figura 6 - Mecanismo catalítico das xilanases os mecanismos de retenção e inversão da configuração anomérica



Fonte: Adaptado de Collins et al. (2005).

4 METODOLOGIA

4.1 Linhagens de leveduras

Foram utilizadas 30 linhagens de leveduras isoladas do trato digestivo de insetos fragmentadores (*Phylloicus*, *Triplectides*, *Nectopsyche* e *Conotelus*). As linhagens fazem parte da coleção de culturas Carlos Rosa da UFT, onde estão preservadas em criogenia (-80 °C). As linhagens foram reativadas em meio sólido Sabouraud-glicose contendo, em g.L⁻¹: glicose (50), peptona (10), extrato de levedura (05), ágar (20) e cloranfenicol (0,3) e incubadas a 25 °C por 48 horas e, após seu crescimento, foram feitas lâminas para verificar a pureza das colônias utilizando o microscópio óptico.

A tabela 4 mostra as linhagens utilizadas e de quais insetos as mesmas foram isoladas.

Tabela 4– Linhagens e seus respectivos insetos as quais foram isoladas

<i>Espécie</i>	<i>Nome</i>	<i>Espécie de Isolamento</i>
<i>Issatchenkia siamensis</i>	PH41	<i>Phylloicus</i> spp.
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	PH42	<i>Phylloicus</i> spp.
<i>Issatchenkia siamensis</i>	PH38	<i>Phylloicus</i> spp.
<i>Pichia guilliermondii</i>	CO27	<i>Conotelus</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TRIP3	<i>Triplectides</i>
<i>Wickerhamomyces</i> sp.	TRIP6	<i>Triplectides</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TRIP7	<i>Triplectides</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TRIP8	<i>Triplectides</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TRIP9	<i>Triplectides</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TRIP10	<i>Triplectides</i>
<i>Pichia manshurica</i>	TRIP12	<i>Triplectides</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TRIP15	<i>Triplectides</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TRIP16	<i>Triplectides</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TRIP17	<i>Triplectides</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	NE19	<i>Nectopsyche</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TRIP13	<i>Triplectides</i>
<i>Candida oleophila</i>	TRIP19	<i>Triplectides</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TRIP21	<i>Triplectides</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TRIP5	<i>Triplectides</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	TRIP11	<i>Triplectides</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	PON8.1	<i>Phylloicus</i> spp.
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	PON11.3	<i>Phylloicus</i> spp.
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	PON6.8	<i>Phylloicus</i> spp.

(continua)

(continuação)

<i>Espécie</i>	<i>Nome</i>	<i>Espécie de Isolamento</i>
<i>Candida</i> sp. 2	PON21.1	<i>Phylloicus</i> spp.
<i>Papiliotrema laurentii</i>	PON28.6	<i>Phylloicus</i> spp.
<i>Candida parapsilosis</i>	PON25.5	<i>Phylloicus</i> spp.
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	PON43.3	<i>Phylloicus</i> spp.
<i>Cryptococcus</i> sp. 1	LAG12.1	<i>Phylloicus</i> spp.
<i>Candida quercitrusa</i>	CO12	<i>Conotelus</i>
<i>Candida parazyza</i>	CO26	<i>Conotelus</i>

4.2 Produção das hidrolases em meio sólido

Os ensaios para a avaliação do índice enzimático (IE) foram realizados em meios sólidos específicos alterando a composição de cada meio de acordo com a hidrolase de interesse.

Para todos os ensaios foram inoculadas 6 linhagens de leveduras em cada placa. Com o auxílio de palito de dente estéril foi retirada uma quantidade pequena de massa celular das colônias e repicada em pontos na superfície dos meios. Todos os ensaios foram realizados em três repetições.

As placas foram incubadas a 25° C, variando o tempo de 7 a 14 dias para cada hidrolase de interesse. Após incubação os halos de hidrólise e diâmetro da colônia foram aferidos com paquímetro e os resultados foram dados como Índice Enzimático (IE), que é a relação entre o halo de hidrólise pelo diâmetro da colônia.

4.2.1 Amilase

Para a produção de amilases foi utilizado meio contendo, em g.L⁻¹, amido solúvel (20), (NH₄)₂SO₄ (05), KH₂PO₄ (10) e ágar (20) (LOODER, 1970). A revelação dos halos de hidrólise foi feita após coloração do meio com vapor de iodo durante 30 minutos (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975). As linhagens amilolíticas foram identificadas pela formação de um halo translúcido ao redor das colônias.

4.2.2 Celulase

A produção de celulases foi avaliada em meio contendo, em g.L⁻¹, carboximetilcelulose (CMC) (10), extrato de levedura (05) e ágar (20) e os halos de hidrólise foram evidenciados após coloração das placas com solução de vermelho Congo (1 g.L⁻¹) em tampão TRIS-HCl, 0,1 M e pH 7,0 durante 30 minutos (MAIJALA et al., (1991). As linhagens celulolíticas foram identificadas pela formação de um halo mais claro ao redor das colônias.

4.2.3 Lipase

A produção de lipases foi realizada em meio contendo, em g.L⁻¹, óleo de oliva (10), extrato de levedura (10), NaCl (05), Tween 80 (10) e ágar (20). Para este meio não houve a necessidade de tratamento com corante específico, pois a revelação do halo se deu pela formação de cristais de sais de cálcio do ácido láurico (FREIRE, 1997).

4.2.4 Xilanase

A produção de xilanase foi avaliada em meio contendo, em g.L⁻¹, xilana comercial (Birchwood) (10), extrato de levedura (05) e ágar (20), sendo que os halos de hidrólise foram evidenciados com vapor de iodo formando um halo translúcido ao redor das colônias (KASANA, 2008).

4.3 Avaliação da produção de xilanase em cultivo submerso

4.3.1 Delineamento experimental

A produção de xilanase foi testada em cultivo submerso para uma linhagem xilanolítica selecionada conforme descrito no item 4.2.4, em meio contendo diferentes concentrações de xilana comercial (Birchwood), peptona, extrato de levedura, MgSO₄ .7H₂O, KH₂PO₄ e NaNO₃ em diferentes valores de pH, de acordo com planejamento experimental proposto. Foi utilizado um delineamento de Plackett & Burman com 12 ensaios (PB12), com 3 repetições nas condições do ponto central para se avaliar o efeito das variáveis na produção de xilanase (RODRIGUES e IEMMA, 2014). A tabela 5 mostra as variáveis e níveis estudados.

Tabela 5- Níveis e valores das variáveis utilizadas no PB12

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>		
	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>+1</i>
pH	4	5,5	7
Xilana (g.L ⁻¹)	5	12,5	20
Extrato de levedura (g.L ⁻¹)	1	3	5
Peptona (g.L ⁻¹)	2	6	10
MgSO ₄ .7H ₂ O (g.L ⁻¹)	0	1	2
KH ₂ PO ₄ (g.L ⁻¹)	0	2,5	5
NaNO ₃ (g.L ⁻¹)	0	1	2

Com os resultados obtidos no PB12 foram selecionadas as variáveis estatisticamente significativas (ANOVA, 1% de significância) para a realização de um planejamento experimental completo (DCCR) e análise das superfícies de resposta, com o objetivo de se obter um modelo empírico que represente a produção da enzima e que permita inferir a condição ótima para a produção da enzima (RODRIGUES e IEMMA, 2014). A tabela 6 apresenta os níveis e os valores das variáveis selecionadas no PB12 a serem utilizadas no DCCR.

Tabela 6 - Níveis e valores das variáveis utilizadas no DCCR

<i>Variáveis</i>	<i>Níveis</i>				
	<i>-α</i>	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>+α</i>
X₁ (g.L ⁻¹)	0	0,88	3	5,12	6
X₂ (g.L ⁻¹)	0	0,44	1,5	2,56	3

4.3.2 Obtenção do inóculo e cultivo submerso

A linhagem foi cultivada em ágar-Sabouraud a 30°C durante 48 horas. À partir desse cultivo foi feita uma suspensão de células (aproximadamente 10⁸ células.mL⁻¹) em solução salina estéril (0,85% NaCl). Uma alíquota dessa suspensão foi utilizada para inocular os meios para a produção de xilanase, de modo a se obter uma concentração inicial de 10⁷ células.mL⁻¹ de meio. A contagem de células foi feita com a utilização da câmara de Newbauer sob microscópio óptico comum.

Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio, e foram mantidos a 30° C sob agitação de 150 rpm por 48 horas. Após o período de incubação, foi retirada uma alíquota de cada meio para realizar a contagem celular e em seguida as

amostras foram centrifugadas (10.000 x g) durante 30 minutos e o sobrenadante (extrato enzimático bruto – EEB) foi armazenado sob refrigeração para posterior medida da atividade xilanolítica.

4.3.3 Determinação da atividade xilanolítica

A atividade xilanolítica foi determinada por espectrofotometria segundo Miller (1959). O meio reacional continha 500 µL do extrato bruto enzimático e 500 µL de solução de Xilana (10g.L⁻¹) em tampão acetato pH 6,0. Os tubos foram mantidos à 40 °C por 30 minutos, para que ocorresse a atividade enzimática. Após esse período, a atividade xilanolítica foi determinada quantificando-se os açúcares redutores (AR) liberados durante o tempo de reação, utilizando-se o método DNS (ácido dinitrosalicílico), segundo Miller (1959). Ao meio reacional (1mL) foi adicionado 1 mL de solução DNS, a mistura foi mantida em banho maria em ebulição durante 5 minutos, foi resfriada e a ela foram adicionados 5 ml de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm.

Os brancos enzimáticos foram preparados adicionando-se o EEB ao tampão acetato pH 6,0, sem adição de substrato e o branco do espectrofotômetro foi feito adicionando-se a solução de xilana ao tampão acetato pH 6,0.

Os valores de absorbância obtidos foram utilizados para se calcular a concentração de AR nas amostras, com auxílio de uma curva de calibração previamente construída. Uma unidade de atividade xilanolítica (U.mL⁻¹) foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 µmol de açúcar redutor por mL por minuto de reação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção das hidrolases em meio sólido

Das 30 linhagens de leveduras testadas em meio sólido, seis (20%) apresentaram perfil lipolítico, uma (3,5%) amilolítico e xilanolítico, enquanto que para a produção de celulase, não houve nenhuma linhagem positiva. A linhagem *Papiliotrema laurentii* (PON28.6) isolada de *Phylloicus* spp. apresentou resultado positivo para as 3 enzimas, com valores de IE de 1,47 para amilase, 2,67 para lipase e 2,41 para xilanase; as linhagens, *Rhodotorula mucilaginosa* (TRIP5), *Cryptococcus* sp. 1 (LAG12.1), *Rhodotorula mucilaginosa* (PH42), *Candida parazyima* (CO26) e *Lodderomyces elongisporus* (PON11.3), foram positivas para lipase com valores de IE, 1,91; 2,02; 1,56; 2,55; 2,26, respectivamente. A linhagem *Papiliotrema laurentii* (PON28.6) apresentou o maior valor de IE em comparação as outras linhagens, enquanto a linhagem *Rhodotorula mucilaginosa* (PH42) apresentou o menor IE, com valor de 1,56. As médias dos halos de hidrólise apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey a 5% de significância. A tabela 7 apresenta os valores de IE obtidos.

Tabela 7– Valores dos Índices Enzimáticos obtidos pelas linhagens de leveduras

<i>Linhagem</i>	<i>Amilase</i>	<i>Celulase</i>	<i>Lipase</i>	<i>Xilanase</i>
<i>Papiliotrema laurentii</i> (PON28.6)	1,47	-	2,67 ^b	2,41
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (TRIP5)	-	-	1,91 ^{ab}	-
<i>Cryptococcus</i> sp. 1 (LAG12.1)	-	-	2,02 ^{ab}	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (PH42)	-	-	1,56 ^a	-
<i>Candida parazyima</i> (CO26)	-	-	2,55 ^{ab}	-
<i>Lodderomyces elongisporus</i> (PON11.3)	-	-	2,26 ^{ab}	-

(-) Indica resultado negativo para o teste em questão

*Médias seguidas por uma mesma letra na coluna não diferem estatisticamente a nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Guedes e Lima (2016), obtiveram IE semelhantes para a atividade xilanolítica com leveduras isoladas de palmeiras, com valores de IE variando de 1,68 a 2,9. Um total de 6% (9

linhagens) das cepas apresentaram perfil xilanolítico, enquanto no presente trabalho houve um total de 3,5% (1 linhagem) apresentaram halo de hidrólise, com um índice enzimático de 2,41.

Santos (2012), em seu trabalho utilizando leveduras isoladas de afloramento rochoso, também não obteve resultados positivos para a produção de celulase, onde nenhuma das cepas testadas foram capazes de hidrolisar o substrato para que pudesse formar o halo de hidrólise.

Em seu trabalho Fuentesfria (2004), obteve resultados com cinco linhagens isoladas de *Hibiscus rosa-sinenses* para a produção de lipases, onde, uma dessas linhagens foi encaminhada para otimização do processo.

5.2 Cultivo submerso para a produção de xilanase

A produção de xilanase foi avaliada em cultivo submerso para a linhagem *Papiliotrema laurentii* (PON28.6) os valores de atividade obtidos nos 15 ensaios do PB12 estão apresentados na tabela 8. As atividades enzimáticas variaram de 0,187 a 0,665 U.mL⁻¹. Com os resultados obtidos e a análise dos dados, pode-se observar qual das sete variáveis avaliadas interferiam de forma significativa na produção de xilanase.

Tabela 8 – Valores de atividade xilanolítica e contagem de células obtidos no PB12

Ensaio	Variáveis (Nível/ g.L ⁻¹)							Atividade (U.mL ⁻¹)
	X ₁ *	X ₂ *	X ₃ *	X ₄ *	X ₅ *	X ₆ *	X ₇ *	
1	1(7)	-1(5)	1(5)	-1(2)	-1(0)	-1(0)	1(2)	0,665
2	1(7)	1(20)	-1(1)	1(10)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	0,547
3	-1(4)	1(20)	1(5)	-1(2)	1(2)	-1(0)	-1(0)	0,497
4	1(7)	-1(5)	1(5)	1(10)	-1(0)	1(5)	-1(0)	0,659
5	1(7)	1(20)	-1(1)	1(10)	1(2)	-1(0)	1(2)	0,278
6	1(7)	1(20)	1(5)	-1(2)	1(2)	1(5)	-1(0)	0,282

(continua)

(continuação)

<i>Ensaio</i>	<i>Variáveis (Nível/ g.L⁻¹)</i>							<i>Atividade (U.mL⁻¹)</i>
	<i>X₁[*]</i>	<i>X₂[*]</i>	<i>X₃[*]</i>	<i>X₄[*]</i>	<i>X₅[*]</i>	<i>X₆[*]</i>	<i>X₇[*]</i>	
7	-1(4)	1(20)	1(5)	1(10)	-1(0)	1(5)	1(2)	0,579
8	-1(4)	-1(5)	-1(1)	1(10)	1(2)	-1(0)	1(2)	0,200
9	-1(4)	-1(5)	-1(1)	1(10)	1(2)	1(5)	-1(0)	0,241
10	1(7)	-1(5)	-1(1)	-1(2)	1(2)	1(5)	1(2)	0,187
11	-1(4)	1(20)	-1(1)	-1(2)	-1(0)	1(5)	1(2)	0,401
12	-1(4)	-1(5)	-1(1)	-1(2)	-1(0)	-1(0)	-1(0)	0,559
0₁	0(5,5)	0(12,5)	0(3)	0(6)	0(1)	0(2,5)	0(1)	0,423
0₂	0(5,5)	0(12,5)	0(3)	0(6)	0(1)	0(2,5)	0(1)	0,513
0₃	0(5,5)	0(12,5)	0(3)	0(6)	0(1)	0(2,5)	0(1)	0,365

X₁^{*} - pH; **X₂^{*}** - Xilana; **X₃^{*}** - Ext. de Levedura; **X₄^{*}** - Peptona; **X₅^{*}** - MgSO₄-7H₂O; **X₆^{*}** - KH₂PO₄; **X₇^{*}** - NaNO₃;

Das sete variáveis estudadas apenas duas delas foram significativas, sendo o extrato de levedura e o sulfato de magnésio (MgSO₄-7H₂O). segundo análise de variância (Tabela 9).

Tabela 9 - Regressão realizada no PB12

<i>Nome</i>	<i>Efeito</i>	<i>Erro Padrão</i>	<i>t calculado</i>	<i>p-valor</i>
Média	0,42	0,03	16,22	0,0000
Curvatura	0,01	0,12	0,12	0,9120
pH (x ₁)	0,02	0,05	0,46	0,6610
Xilana (x ₂)	0,01	0,05	0,22	0,8336
Extrato de levedura (x ₃)	0,11	0,05	2,11	0,0789
Peptona (x ₄)	-0,01	0,05	-0,27	0,7960
MgSO ₄ -7H ₂ O (x ₅)	-0,29	0,05	-5,49	0,0015
KH ₂ PO ₄ (x ₆)	-0,07	0,05	-1,27	0,2515
NaNO ₃ (x ₇)	-0,08	0,05	-1,49	0,1864

Com os resultados do PB12 realizou-se um novo planejamento experimental completo (DCCR), com a intenção de se otimizar a produção da enzima. As variáveis que não foram significativas foram fixadas no valor de menor concentração. Os valores trabalhados foram: pH 4,0, xilana (4 g.L⁻¹), peptona (2 g.L⁻¹), e não se utilizou KH₂PO₄ e NaNO₃.

Os valores de atividade variaram de 0,018 a 0,191 U.mL⁻¹, e podem ser visualizados na tabela 10.

Tabela 10 – Valores de atividade xilanolítica e contagem de células obtidos no DCCR

<i>Ensaio</i>	<i>Variáveis (Nível/ g.L⁻¹)</i>		<i>Atividade (U.mL⁻¹)</i>	<i>Contagem (células.ml⁻¹)</i>
	<i>X₁[*]</i>	<i>X₂[*]</i>		
<i>1</i>	-1(0,88)	-1(0,44)	0,018	1,2x10 ⁷
<i>2</i>	1(5,12)	-1(0,44)	0,080	1,8x10 ⁷
<i>3</i>	-1(0,88)	1(2,56)	0,150	1,5x10 ⁷
<i>4</i>	1(5,12)	1(2,56)	0,191	1,5x10 ⁷
<i>5</i>	-1,41(0)	0(1,5)	0,082	6,7x10 ⁷
<i>6</i>	1,41(6)	0(1,5)	0,145	1,3x10 ⁷
<i>7</i>	0(3)	-1,41(0)	0,023	1,1x10 ⁸
<i>8</i>	0(3)	1,41(3)	0,127	8,7x10 ⁷
<i>9</i>	0(3)	0(1,5)	0,037	1,0x10 ⁸
<i>10</i>	0(3)	0(1,5)	0,105	1,0x10 ⁸
<i>11</i>	0(3)	0(1,5)	0,065	1,1x10 ⁸

X₁^{*} - Extrato de Levedura; X₂^{*} - MgSO₄-7H₂O;

A análise de variância mostrou que o fator linear e quadrático do extrato de levedura, e o fator quadrático do sulfato de magnésio (MgSO₄-7H₂O), foram significativos a 5% de significância com um R² = 86,17% (Tabela 11). A equação de regressão obtida para a atividade enzimática em função da concentração de extrato de levedura e sulfato de magnésio é determinada segundo a equação:

$$Y_1 = 0,08 + 0,02 x_1 + 0,02 x_1^2 + 0,05 x_2$$

onde: Y = Atividade enzimática, x₁ = Extrato de levedura, x₂ = MgSO₄-7H₂O.

Com a equação tentou-se obter o ponto ótimo para a produção da xilanase, o qual não foi possível obter, pois provavelmente o ponto ótimo se encontra fora do intervalo trabalhado (Figura 7).

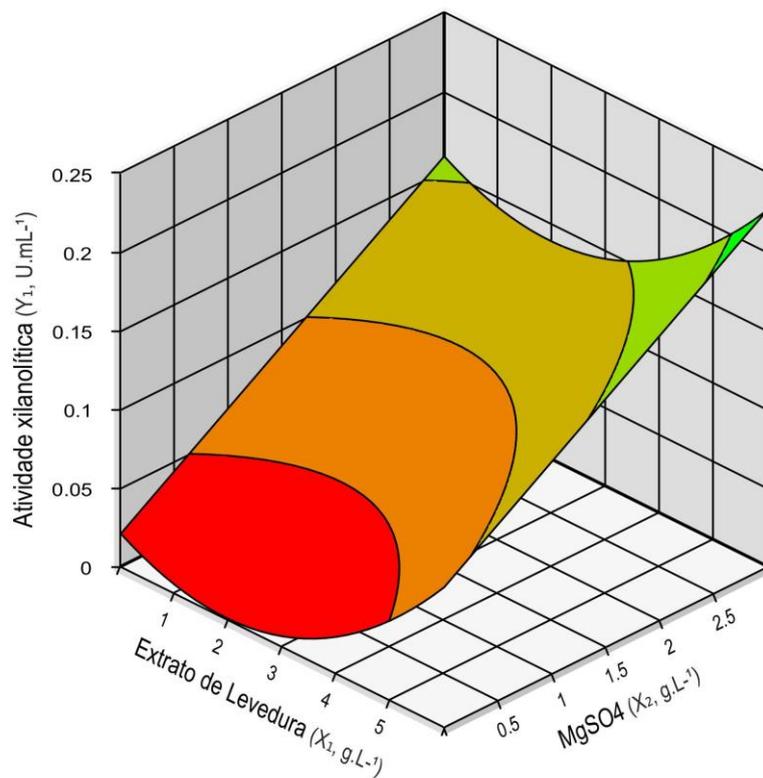
Na tabela 11, podemos observar a regressão realizada no DCCR para obter a equação matemática.

Tabela 11 - Regressão realizada no DCCR

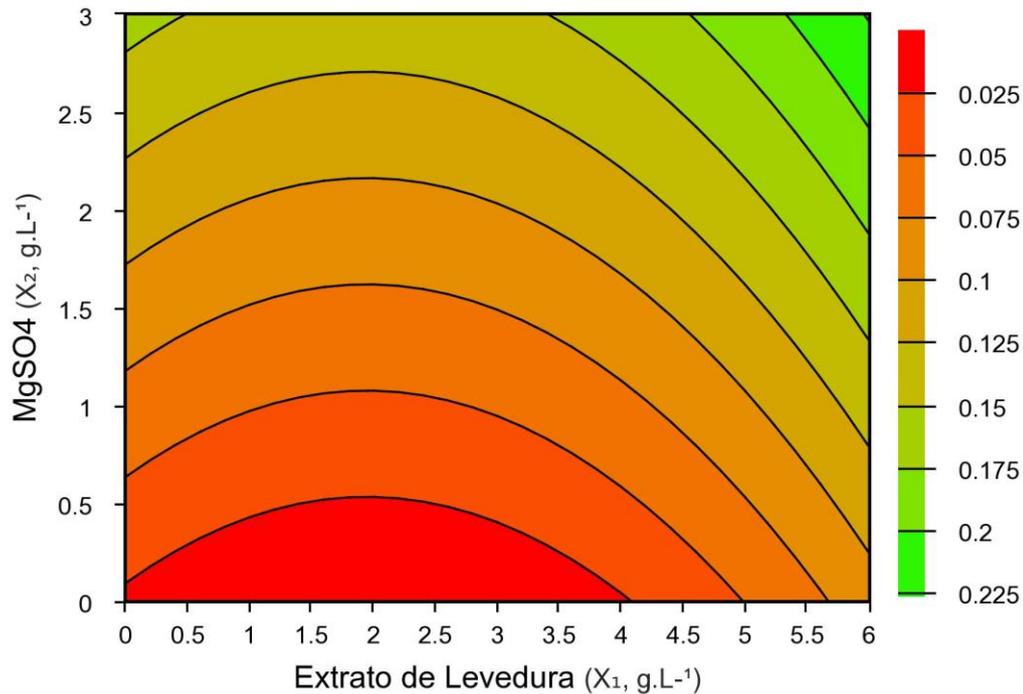
<i>Nome</i>	<i>Coefficiente</i>	<i>Erro Padrão</i>	<i>t calculado</i>	<i>p-valor</i>
<i>Média</i>	0,08	0,01	7,19	0,0002
<i>x₁</i>	0,02	0,01	2,72	0,0298
<i>x₁²</i>	0,02	0,01	2,40	0,0475
<i>x₂</i>	0,05	0,01	5,52	0,0009

Figura 7 - Gráfico de superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para atividade xilanolítica em função da concentração de MgSO₄ e extrato de levedura.

(a)



(b)



Através do gráfico foi possível visualizar que maiores valores da atividade enzimática poderiam ser obtidos quando as concentrações de MgSO_4 e extrato de levedura fossem mais altas. Porém no intervalo trabalhado do experimento não foi possível obter a otimização e encontrar o ponto ótimo para a atividade enzimática. Isso mostra que há a necessidade de um novo planejamento experimental trabalhando outras faixas de concentração para se chegar à otimização do processo.

Oliveira Júnior (2014), encontrou valores aproximados de atividade enzimática utilizando o fungo filamentoso *Penicillium Chrysogenum* e bagaço de coco e pêndulo de caju como substrato. Fungos filamentosos apresentam uma maior capacidade de produção de enzimas comparados com as leveduras e os valores de atividades próximos podem indicar que a linhagem estudada tem um bom potencial para a produção de Xilanase.

Mouro (2012), obteve vários padrões de fermentação de xilose e glicose pelas leveduras, sendo que linhagens *Spathaspora*, *S. passalidarum*, fermentam eficientemente a xilose, com atividades xilanolíticas que variaram de 0,1 a 0,8 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

A linhagem *Papiliotrema laurentii* (PON28.6) é uma espécie de levedura conhecida por sua prevalência em solos agrícolas (GOLUBTSOVA et al., 2007), e é classificada como um suposto patógeno oportunista. Até o momento, nenhum trabalho descrevendo a capacidade xilanolítica dessa espécie foi divulgado o que torna interessante o estudo do potencial enzimático dessa linhagem.

6 CONCLUSÃO

Com os dados obtidos foi possível concluir que apenas um reduzido percentual da microbiota associada a insetos fragmentadores apresentou perfil lipolítico, xilanolítico ou amilolítico.

Das sete variáveis estudadas para a produção de xilanase em cultivo submerso, apenas duas (extrato de levedura e $MgSO_4$) tiveram efeito significativo, porém não foi possível estabelecer a condição ótima para a produção da enzima.

A avaliação dessas variáveis em outras concentrações é necessária para que seja possível a determinação de um ponto ótimo de atividade enzimática.

REFERÊNCIAS

- BHADRA, B. et al. **Yeasts and yeast-like fungi associated with tree bark: Diversity and identification of yeasts producing extracellular endoxylanases.** *Current Microbiology*, v. 56, n. 5, p. 489–494, 2008.
- BUZZINI, P.; MARTINI, A. **Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments.** *Journal and Applied Microbiology Oxford*, v. 93, p. 1020-1025, 2002
- ÇELİK, E.; ÇALIK, P.; **Production of recombinant proteins by yeast cells.** *Biotechnology Advances* vol. 30, p. 1108–1118, 2012.
- COLLINS, T., GERDAY, C., FELLER, G. **Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases,** *FEMS Microbiol.* p. 3–23, 2005.
- COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. **Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses.** *Bioresource Technology*, vol. 101, p. 8308–8314, 2010.
- FRANZ, S. C.; **Produção de enzimas extracelulares por fungos filamentosos isolados de folhas em decomposição.** Monografia apresentada ao curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins, 2015.
- FREIRE, D.M., TELES, E.M.F., BON, E.P.S., SANT`ANNA JR., G.L.. **Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench scale fermenter: Media composition, agitation and aeration.** *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63, 429-421, 1997.
- FUENTEFRIA, A. M.; **Identificação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*.** Tese (Mestrado) Porto Alegre – RS, 2004.
- GOLUBTSOVA, Yu V.; GLUSHAKOVA, A. M.; CHERNOV, I. Yu.; **The seasonal dynamics of yeast communities in the rhizosphere of soddy-podzolic soils.** *Eurasian Soil Science*, v. 40, n. 8, p. 875-879, 2007.
- GONZALEZ, F. **Symbiosis between yeasts and insects.** Introductory paper at the Faculty of Landscape Architecture, Horticulture, and Crop Production Science, p. 1–52, 2014.
- GUEDES, E. H. S., LIMA, P. H. V.; **Produção de celulase e xilanase por leveduras isoladas de frutos de palmeiras.** *Ciência & Tecnologia: FATEC–JB, Jaboticabal*, v. 8, 2016.
- GUTARRA, M. L. E. et al.; **Lipase production and *Penicillium simplicissimum* morphology in solid-state and submerged fermentations.** *Biotechnology Journal*, v. 4, n. 10, p. 1450–1459, 2009.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. **The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi.** *Mycological Society of America*, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.
- KASANA, Ramesh Chand et al.; **A rapid and easy method for the detection of microbial**

cellulases on a garplates using Gram's iodine. Current microbiology, v. 57, n. 5, p. 503-507, 2008.

LI, Z. et al. **Cultivable bacterial diversity and amylase production in three typical Daqus of Chinese spirits.** International Journal of Food Science and Technology, v. 49, n. 3, p. 776–786, 2014.

Li, W.; Du, W.; Li, Q.; Li, R. W.; Liu, D.; **Bioresour. Technol.**, p. 101, 2010.

LOODER, J. **General classification of the yeast.** In: **The Yeast a taxonomic study**, 2.ed. Amsterdam: North-Holland Publishing Co., 1970.

MACIEL, G. M.; **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja.** UFPr – Curitiba 2006.

MATOS, Í. T. S. R.; **Diversidade de leveduras capazes de metabolizar hidrolisado hemicelulósico associadas ao intestino de besouros passalídeos (*insecta, coleóptera, passalidae*).** Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, p. 1-104, Manaus – AM. 2015.

MAIJALA, P.; FAGERSTEDT, K. V.; RAUDASKOSKI, M.; **Detection of extracellular cellulolytic and proteolytic activity in ectomycorrhizal fungi and Heterobasidion annosum (Fr.)** Bref. New Phytologist, v. 117, n. 4, p. 643–648, 1991.

MILLER, G. H. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry, Washington, v.31, p.426-429, 1959.

MONTEIRO, V. N.; DO NASCIMENTO SILVA, R. **Processos Químicos.** Revista científica da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, v. 3, n. 5, p. 9–23, 2009.

MOURO, A.; **Fermentação De Xilose E Celobiose Por Leveduras Isoladas Da Biodiversidade Brasileira.** p. 69, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; **Lehninger: Princípios de Bioquímica.** 6ª ed., Artmed, p. 189-242, 2014.

OLIVEIRA, T. D. S. **Seleção De Leveduras De Frutos Do Cerrado Tocantinense Para Produção De Hidrolases E Otimização De Suas Condições De Cultivo.** p. 79, 2015.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. DE. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju.** p. 121, 2014.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por Thermoascus aurantiacus em cultivo em estado sólido.** p. 1–169, 2003.

PEIXOTO, A.B. **Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil.** Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006. Dissertação (Mestrado). Disponível em:<http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=269>. Acesso em 02 julho. 2019.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Cárita Editora, 2014.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 8ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2014.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. **Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 1, p. 126–131, 2010.

SAID, S.; PIETRO, R.; **Enzimas de Interesse industrial e biotecnológico**, Ed Eventos: Rio de Janeiro, 2002.

SAHA, K.; MAITY, S.; ROY, S.; PAHAN, K.; PATHAK, R.; MAJUMDAR, S.; GUPTA, S. **Optimization of Amylase Production from *B. amyloliquefaciens* (MTCC 1270) Using Solid State Fermentation**. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Microbiology, vol. 2014, p. 1-7, 2014.

SILVA, M. S.; **Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau**. Dissertação Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, p. 83, 2011.

SANTOS, T. T.; **Identificação e análise do potencial enzimático de leveduras isoladas do afloramento rochoso do morro da pioneira – Bahia**. Cruz das almas – BA, 2012.

TRINDADE, V. M. T.; **A bioquímica da produção de cerveja**. Disponível em: <<https://abioquimicacomoeae.com.br/6-numeros-antiores/numero-2/4-espaco-dos-convidados/a-bioquimica-da-producao-de-cerveja/>>. Acesso em: 02, de julho de 2019.

VAN J.B.; BEILEN, L. I. Z.; **Enzyme technology: an overview**. Current Opin Biotechnological. v.13, p.338-344. 2002.

VAZ, R.S.; PRADO, M. R. M.; CARVALHO, F.; **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. p. 36-37, 2007.

WRIGHT, J. D.; WYMAN, C. E.; GROCHMANN, K. **Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: Process evaluation**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 17, p. 75-90, 1988.