

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA
CAMPUS CHAPECÓ

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PROSPECÇÃO DE CELULASES E XILANASES EM LEVEDURAS ISOLADAS
DO INTESTINO DE LAGARTAS *Spodoptera frugiperda***

VIVIANI TADIOTO

ORIENTADOR Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior

Março – 2022

VIVIANI TADIOTO

**PROSPECÇÃO DE CELULASES E XILANASES EM LEVEDURAS
ISOLADAS DO INTESTINO DE LAGARTAS *Spodoptera frugiperda***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: **Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior**

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e
aprovado pela banca em 08/04/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior – UFSC



Documento assinado digitalmente

Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk

Data: 12/04/2022 15:12:47-0300

CPF: 057.643.048-06

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Boris Ugarte Stambuk – UFSC

Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli – UFSC

PROSPECÇÃO DE CELULASES E XILANASES EM LEVEDURAS ISOLADAS DO INTESTINO DE LAGARTAS *Spodoptera frugiperda*

Tadioto, V.*¹, Alves, S. L. Jr.¹

¹Engenharia Ambiental e Sanitária, UFFS – Campus Chapecó – Santa Catarina

*vivotadioto@gmail.com

RESUMO

A utilização de material lignocelulósico para a produção de bicomcombustíveis requer a viabilização econômica dos processos de pré-tratamento e hidrólise da biomassa. Essa viabilização depende, dentre outros fatores, da seleção de enzimas hidrolíticas (hidrolases) que apresentem elevada eficiência catalítica e baixo custo de produção, e dentre essas enzimas estão as celulases e xilanases. Este estudo se propôs a identificar e caracterizar essas hidrolases expressas por linhagens de leveduras isoladas do intestino da lagarta *Spodoptera frugiperda* em sua fase larval alimentada por folhas de milho. A partir da microbiota intestinal da lagarta, foram isoladas 46 cepas de leveduras em meios de cultura contendo xilose. Para a atividade celulase, as leveduras foram submetidas a crescimento celular durante 5 dias em meios sólidos contendo carboximetilcelulose (CMC) a 30°C. Ao fim deste período, o corante vermelho de Congo foi adicionado às placas para detecção da atividade celulolítica através da manifestação de halos sem coloração na superfície do meio. Das 46 linhagens testadas, 30 apresentaram halo, e em 6 delas seu diâmetro variou de 2,0 a 2,7 cm. Como a principal fonte nutritiva disponibilizada foi CMC, as colônias de leveduras apresentaram adequação morfológica, observada através de pseudo-hifas crescidas sobre o meio sólido em placas de Petri. Já a atividade xilanase foi avaliada em microplacas de 96 poços. Os sobrenadantes das células previamente crescidas em xilana foram adicionados a microplacas contendo 1% deste polissacarídeo como substrato da reação. Após 1 h a 50°C, o reagente DNS foi utilizado para a detecção de açúcares redutores formados com a hidrólise da xilana. Das 46 cepas ensaiadas, quatro apresentaram atividade xilanolítica, se destacando a CHAP-158 com 0,18 U mL⁻¹ (μmol de xilose min⁻¹). Quatro das leveduras apresentaram tanto celulases quanto xilanases, sendo que a CHAP-158 apresentou o maior valor combinando das duas atividades, demonstrando potencial biotecnológico diante dos polissacarídeos presentes em resíduos lignocelulósicos.

Palavras-chave: carboximetilcelulose, xilana, enzimas, xilanase, celulase.

1. INTRODUÇÃO

No fim de 1973, surgiram fatores adversos ao mercado internacional petrolífero. Nesse cenário com altas de preços e pouco petróleo disponível, o Brasil, que dependia majoritariamente desse produto, passou por uma crise. Nos anos seguintes começam a surgir incentivos a fontes alternativas de combustível, como o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), visando aperfeiçoar os métodos já utilizados para a produção de etanol e consequentemente suprir a necessidade interna, tornando o Brasil o maior exportador do produto no mundo. O país apresenta características propícias para cultivar a cana-de-açúcar, assim como técnicas de produção de etanol bem desenvolvidas, porém as influências de fatores externos do mercado petrolífero e a incompatibilidade da política nacional energética não propiciaram um pleno desfecho do Proálcool (ANDRADE et al., 2010; GOLDEMBERG, 2006). Atualmente o etanol é utilizado na forma de combustível em pequena porcentagem e também está presente na forma de aditivo na gasolina; cerca de 25 a 27% de etanol anidro deve ser adicionado à gasolina (MAPA, 2015), reduzindo assim as emissões de monóxido de carbono geradas na queima incompleta do combustível fóssil. Além disso, cabe destacar que a adição de álcool não reduz apenas o gás de efeito de estufa mas também mantém a parte interna do motor mais limpa.

Em decorrência da massiva utilização dos automóveis movidos a combustíveis fósseis, os passivos ambientais gerados de forma crescente têm preocupado a sociedade. Sendo assim, é necessário analisar e aperfeiçoar fontes de bicomcombustível renovável que promovam impactos cada vez menores no ambiente em que vivemos. A agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU) tem como um de seus Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) a energia limpa e acessível. Desta forma, o bioetanol é alternativa a ser analisada pelo seu elevado potencial de atender os objetivos de desenvolvimento sustentável.

No contexto mundial, o Brasil tem uma posição de destaque na produção de etanol de primeira geração (1G) pelo processo de fermentação. Sendo atualmente o segundo maior produtor, o país ainda é detentor dos maiores rendimentos e produtividade, visto que boa parte dessa tecnologia é determinada pela cepa aplicada no processo fermentativo. Contemporaneamente, a maior parte do etanol que é produzido no Brasil é proveniente do caldo de cana-de-açúcar e fermentada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (LOPES et al., 2016). A média de produção anual de etanol de primeira geração no país foi de 29,8 bilhões de litros na safra 2020/21 segundo a Companhia Nacional de Abastecimento – Conab (CONAB, 2021).

Em 2009, o Brasil sancionou o Decreto nº 6.961, que aprestou um diferencial nas exportações do etanol brasileiro, pois visava proteger a vegetação nativa sensibilizada pelo desmatamento. O Zoneamento Agroecológico da Cana-de-Açúcar proibia o cultivo de cana-de-açúcar em biomas, como a Amazônia e o Pantanal. Entretanto, em 2019, o referido decreto foi revogado pelo de nº 10.084 (Brasil, 2019), voltando assim, após 10 anos, à ocorrência da expansão do desmatamento dos biomas — ainda que existam alternativas tecnológicas e economicamente viáveis, que demonstrem os aspectos sustentáveis do etanol brasileiro ao mercado internacional.

Essa ampla produção de etanol 1G deixa como subproduto residual de sua fermentação o bagaço lignocelulósico. Aproximadamente 150 milhões de toneladas desse material são gerados por ano no Brasil (SILVA et al., 2014). Este material rico em lignocelulose, assim como a palha e a cana-de-açúcar, possui açúcares fermentescíveis que ainda podem ser reutilizados na produção do etanol de segunda geração (2G), não sendo necessário aumentar a produção da gramínea e promovendo um avanço ambiental na direção da sustentabilidade. Quantitativamente, o bioetanol lignocelulósico pode vir a aumentar em até 50% a produção brasileira apenas utilizando o resíduo e sem disputar recursos alimentares e áreas produtivas (STAMBUK et al., 2008; SILVA et al., 2014).

A celulose e a hemicelulose são os principais constituintes da biomassa que necessitam ser hidrolisados de forma eficiente. Dentre as enzimas responsáveis pelo processo de degradação hidrolítica da celulose e da hemicelulose estão as celulasas e as xilanases. Os complexos enzimáticos de celulasas apresentam três atividades: exoglucanase, que atua na extremidade das fibras da celulose liberando celobiose e glicose; endoglucanase, que age no interior das fibras de celulose liberando oligossacarídeos de diferentes tamanhos; e, β -glicosidase, que promove a quebra da celobiose e libera moléculas de glicose que podem ser fermentadas a etanol (LYND et al., 2002). Outro constituinte importante na biomassa lignocelulósica é a hemicelulose, sendo esse, na sua maior parte, representado pela xilana. Quando completamente hidrolisado, esse polissacarídeo libera majoritariamente a pentose xilose. A hidrólise da xilana é garantida também por um complexo, neste caso com duas atividades xilanolíticas: endo- β -xilanase, responsável pela quebra do polímero em oligômeros de xilose, e β -xilosidase, que finaliza o processo com a hidrólise dos xilooligossacarídeos, gerando moléculas de xilose livres. Assim, a xilose pode passar para o meio intracelular da levedura para subsequente fermentação (DASHTBAN et al., 2009).

Um dos maiores gargalos da produção de etanol 2G é o custo elevado dessas enzimas

utilizadas na degradação da celulose e da hemicelulose nesse processo, o que torna a produção pouco acessível para as usinas sucroalcooleiras (ADITIYA et al., 2016; MUPONDWA et al., 2017). Nesse sentido, espécies de animais que têm sua alimentação baseada em folhas (substratos ricos em celulose e hemicelulose) tornam-se potenciais alvos para uma prospecção de leveduras celulolíticas e xilanolíticas em sua microbiota. De fato, insetos herbívoros têm elevada capacidade de degradação da celulose e da hemicelulose, tendo uma função importante na cadeia trófica de ciclagem de carbono. Vários insetos herbívoros ao decorrer da evolução desenvolveram tanto capacidade de produção de enzimas endógenas quanto simbioses complexas com microrganismos para garantir a hidrólise da biomassa lignocelulósica (WATANABE; TOKUDA, 2010; WILLIS; OPPERT; JURAT-FUENTES, 2010; ALVES et al., 2019).

A espécie de lagarta do cartucho (lagarta militar) *Spodoptera frugiperda*, inseto da ordem dos lepidópteros que em sua fase larval alimenta-se exclusivamente de folhas, é uma praga agrícola altamente adepta a uma série de cultivos e a uma gama variada de espécies vegetais (GALLO, 2002), possuindo um promissor potencial enzimático de degradação lignocelulósica em seu intestino. Assim sendo, sua microbiota intestinal deve conter espécies microbianas capazes de contribuir com a digestão do material vegetal. Consequentemente é razoável considerar que as leveduras presentes no intestino da lagarta forneçam enzimas hidrolíticas capazes de promover a hidrólise dos polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica. Como já foi dito, essas enzimas promovem a decomposição da celulose e da hemicelulose presentes na parede vegetal, gerando assim os açúcares necessários ao processo de fermentação conduzido pelas próprias leveduras. A produção de etanol 2G depende, inicialmente, da hidrólise completa da celulose e da xilana. Atualmente, as celulases e xilanases empregadas no processo são obtidas de fungos filamentosos (ALVES et al., 2019).

No entanto, existe uma gama de espécies de leveduras que habitam outros seres vivos e seus ecossistemas, e que são desconhecidas ou pouco caracterizadas. Uma característica desses fungos unicelulares (não filamentosos) que podem ser isolados de insetos é a sua excelente capacidade fermentativa, da qual podem ser gerados produtos como o etanol e o xilitol (BARRETTO et al., 2018; CADETE et al., 2017).

Além dos produtos gerados na fermentação, porém, as leveduras também podem contribuir para o processo com suas hidrolases; autores como XIA et al., (2013), LEE et al. (2014), FENG et al. (2015), HATEFI et al. (2017), LI et al. (2017) e LIU et al., (2018)

mencionam que essas enzimas foram encontradas em leveduras isoladas do intestino de insetos, sendo que a atividade delas foi elevada, apresentando superioridade quando comparadas a enzimas comerciais e em condições de pH e temperatura ótima.

A humanidade integrou as leveduras em seu cotidiano uma vez que algumas linhagens são envolvidas na produção de bebidas, alimentos e produtos químicos (ÁLVAREZ-PÉREZ, 2022). A levedura modelo *Saccharomyces cerevisiae* é a mais aplicada nesses processos, pois cumpre de forma excepcional muitas das funções em que é aplicada (BASSO et al., 2022). Na produção de etanol de primeira geração, a *S. cerevisiae* é o microorganismo mais empregado, pois tolera altas concentrações de açúcares contidos no substrato, o pH caracteristicamente ácido do meio, altas concentrações de etanol alcançadas no fim da fermentação e alta pressão hidrostática provocada pela coluna de líquido nas dornas de fermentação (LAGUNAS, 1986; LANDRY et al., 2006). Essa habilidade na fermentação funciona muito bem para muitos açúcares, como a glicose; entretanto, para o etanol lignocelulósico é necessária a hidrólise dos polissacarídeos já mencionados. A levedura *S. cerevisiae* é a mais utilizada e adaptada aos processos fermentativos industriais de etanol, porém não possui as enzimas necessárias para a degradação hidrolítica do material lignocelulósico (CADETE & ROSA, 2018).

Nesse contexto, são necessárias investigações para otimizar a produção do etanol 2G, e isso pode passar pela seleção de leveduras provenientes do intestino de insetos, que possam portar essas enzimas necessárias para degradação, com intuito de tornar viável economicamente a utilização desses resíduos lignocelulósicos. Com isso, este estudo se propôs a identificar e caracterizar enzimas hidrolíticas expressas por linhagens de leveduras isoladas do intestino da lagarta da espécie *Spodoptera frugiperda* em sua fase larval alimentada por folhas de milho.

2. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Isolamento de leveduras utilizadas

As linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho foram isoladas a partir do intestino de lagartas *Spodoptera frugiperda*, que foram cedidas pelo Grupo de Pesquisa em Resistência de Insetos (G-PRI) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). As lagartas foram criadas em condições ambientais ótimas, com a temperatura aproximada de 26 °C e umidade relativa de aproximada de 65% (BARRETTO et al., 2018). A alimentação das lagartas foi realizada com folhas de milho não BT (milho sem a tecnologia de *Bacillus thuringiensis*), e, ao atingirem o 5° ou 6° instar (no fim da fase larval), foram submetidas ao processo de dissecação, conforme CADETE et al. (2017). As lagartas foram submersas em etanol 70% durante 1 a 2 minutos. Posteriormente, foi realizada a lavagem deste material com solução salina com concentração de 0,85% para evitar contaminações por microrganismos externos no momento da retirada do intestino da lagarta. Após a esterilização realizada, foi feita uma incisão no dorso do animal para a retirada efetiva do intestino, sendo que este foi inserido inteiro em meio de cultura em Erlenmeyer. O meio de cultura utilizado foi o sintético com 0,67% de base nitrogenada, 0,02% de cloranfenicol e 1% de xilose. Os frascos foram incubados a 30°C por 3–10 dias, sob agitação periódica de 145 rpm. Quando se detectou crescimento celular por turbidez, uma alçada de células foi estriada por esgotamento em placas de Petri contendo os meios sintéticos citados anteriormente, além da adição de 2% de ágar. As placas foram incubadas a uma temperatura de 30°C, e as leveduras foram isoladas pela morfologia da colônia conforme descrito por TADIOTO et al. (2022). As cepas foram nomeadas conforme código pré-estabelecido pela coleção do grupo de pesquisa e permanecem armazenadas a -80°C com 30% de glicerol no Laboratório de Bioquímica e Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Chapecó.

Triagem de leveduras hidrolíticas com vermelho de Congo

A triagem (*screening*) foi realizada com as 46 (quarenta e seis) cepas que foram isoladas do intestino de lagartas *S. frugiperda*. O *screening* de leveduras celulíticas foi adaptado de TEATHER & WOOD (1982), RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO (2004), SARSAIYA et al. (2018) e CARVALHO et al. (2021).

As leveduras foram pré-cultivadas por 72 h a 30°C em meios ricos (1% extrato de levedura, 2% de peptona) acrescidos, alternadamente, com 2% (v/v) de glicose, 2% de glicerol, 2% de celobiose, 1% de carboximetilcelulose (CMC) ou 1% de xilana.

Considerando os açúcares utilizados em cada pré-cultivo, as células foram transferidas para placas de Petri com meios sólidos contendo 6,7 g/L de base nitrogenada, 2% de ágar e 1% de carboximetilcelulose (CMC) ou xilana, acrescidos ainda, alternadamente, de 0,5% de glicose, 0,5% (v/v) de glicerol ou 0,5% de celobiose. Foram feitas também placas com meios sólidos contendo apenas 1% de carboximetilcelulose (CMC) ou xilana. Para verificação da morfologia das colônias, placas contendo apenas glicose (2%) como fonte de carbono também foram utilizadas.

Com o auxílio de agulhas de inoculação foi realizada uma pequena incisão superficialmente no meio sólido no centro de quadrantes desenhados nas placas. Em cada placa de Petri, foi pipetado também 1 µL de celulase comercial Cellic CTec2 da Novozymes (diluída 100x) no centro de um dos quadrantes, para controle positivo do método.

As placas foram incubadas por 120 h (5 dias) a 30°C. Com as colônias formadas, foi despejado na placa 10 mL de solução de vermelho de Congo (2,5 g/L) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, e incubado por 30 min a 30°C. A solução corante foi descartada, realizaram-se duas lavagens despejando nas placas uma solução de NaCl 0,5 M em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, e as placas foram incubadas adicionalmente por 20 min a 30°C. Os halos formados em volta das colônias foram medidos com o paquímetro e registrados com imagens.

Triagem de leveduras xilanolíticas em microplacas de 96 poços

As cepas de leveduras que foram isoladas do intestino de lagartas *S. frugiperda* foram testadas quanto à atividade xilanase em microplacas de 96 poços com fundo chato a partir de uma adaptação do protocolo desenvolvido por KIM et al. (2014).

As cepas foram previamente cultivadas por 72 h em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio líquido rico (1% extrato de levedura, 2 % peptona) contendo 2% de xilose. Na sequência, foram inoculados 50 µL do pré-cultivo em 5 mL de novo meio líquido (0,1% extrato levedura, 0,2% peptona) contendo 1% de xilana, onde as células foram incubadas por mais 72 h sob agitação de 145 ± 10 rpm e 30°C.

Posteriormente, 1 mL de cada cultura foi transferido para um microtubo e centrifugado por 3 min a 5.000 rpm. O sobrenadante foi reservado em microtubos no gelo até o fim do

experimento. Foram transferidos 10 μL de sobrenadante para três poços da microplaca mantida em gelo. Foi adicionado 10 μL de meio estéril (0,1% extrato de levedura + 0,2% peptona + 1% de xilana) não inoculado em três poços da microplaca, servindo como o controle negativo.

Com o auxílio de uma pipeta multicanal, foram repassados para cada poço da microplaca 15 μL de substrato (1% de xilana em tampão succinato-tris 0,15 M pH 5,0). Para a reação de hidrólise, a placa foi então selada com filme plástico e incubada em banho-maria precisamente por 1 hora a 50°C. Após essa incubação, foram adicionados, em cada poço da microplaca, 25 μL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para a preparação do DNS foi realizada duas soluções, uma de ácido 3,5-dinitrosalicílico em NaOH 2 M e a outra com tartarato duplo de sódio e potássio em água destilada. A mistura das soluções resultou em uma concentração de 10 g/L ácido 3,5-dinitrosalicílico e 300 g/L de tartarato duplo de sódio e potássio. Para a curva de calibração foram adicionados concentrações crescentes de xilose variando de 0 a 2 g/L. Em seguida, a microplaca foi fervida por 5 minutos e, por fim, foram adicionados 330 μL de água para realizar a leitura da microplaca com comprimento de onda de 490 nm (DOS SANTOS et al., 2017). Com base em uma curva padrão de xilose, os valores de absorbância foram utilizados para calcular os açúcares redutores presentes em cada poço e, subsequentemente, a atividade enzimática. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições do ensaio.

Análise estatística

Os resultados das atividades xilanases são apresentadas em média \pm erro padrão de três repetições. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do Excel. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente para determinar o grau de significância por meio do teste t em nível de probabilidade $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

Isolamento de leveduras utilizadas

A hidrólise da celulose e da hemicelulose assim como a fermentação dos açúcares disponíveis às leveduras são fatores que limitam a produção de etanol lignocelulósico. Buscando encontrar espécies de leveduras capazes de fornecer hidrolases (celulases e xilanases) que possam contribuir com o processo, foram isoladas 46 linhagens de leveduras do intestino da lagarta *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de milho. Essas cepas então, como parte da coleção do Grupo de Pesquisa em Processos Enzimáticos e Microbiológicos da UFFS, receberam um código de identificação com o prefixo CHAP seguido de um número que acompanha a ordem da coleção. Na sequência, as quarenta e seis linhagens isoladas foram submetidas a triagens que testaram a capacidade de produção de enzimas celulases e xilanases, imprescindíveis para a liberação de açúcares fermentescíveis necessários à produção de etanol 2G.

Triagem de leveduras celulolíticas com vermelho de congo

Após os isolamentos, as cepas foram submetidas à verificação da capacidade celulolítica a 30°C em meios sólidos contendo a carboximetilcelulose (CMC). Essa etapa mostrou que 30 das quarenta e seis linhagens analisadas possuem capacidades distintas de degradação da celulose, o que se observa pelo diâmetro dos halos formados após a adição do vermelho de Congo (Figura 1). Em caráter representativo, foram escolhidas algumas imagens deste ensaio e apresentadas na Figura 2.

A atividade celulase foi, portanto, analisada com base no tamanho que o halo de degradação apresentou; elevadas atividades celulolíticas são associadas proporcionalmente com os maiores halos (CARVALHO et al., 2021), pois as cepas foram submetidas às mesmas condições pelo mesmo intervalo de tempo. As linhagens que se destacaram com as maiores medidas de halos foram a CHAP-201, que apresentou o maior diâmetro de halo (2,7 cm); a CHAP-184, com halo de 2,3 cm de diâmetro; seguida das cepas CHAP-194 e CHAP-204, com 2,2 cm; CHAP-189, 2,1 cm; e, CHAP-181, 2,0 cm. Além dessas, as cepas CHAP-158, CHAP-160, CHAP-168, CHAP-171, CHAP-176, CHAP-200 e CHAP-206 também apresentaram halos maiores que a média, com diâmetros variando de 1,7 a 1,95 cm (Figura 1). Cabe destacar que os diâmetros dos halos gerados por essas linhagens foram semelhantes

àqueles observados por ADELABU et al. (2019) a partir da análise de leveduras selvagens isoladas de um herbário em Abeokuta (Ogun, Nigéria). Em contrapartida, as cepas CHAP supramencionadas apresentarem halos três a quatro vezes maiores do que os reportados por CARVALHO et al. (2021) para leveduras selvagens isoladas de amostras de água coletadas no Rio Toledo (Toledo/PR, Brasil).

Figura 1 – Diâmetro do halo de cada linhagem de levedura testada em placas de Petri com carboximetilcelulose e vermelho de Congo.

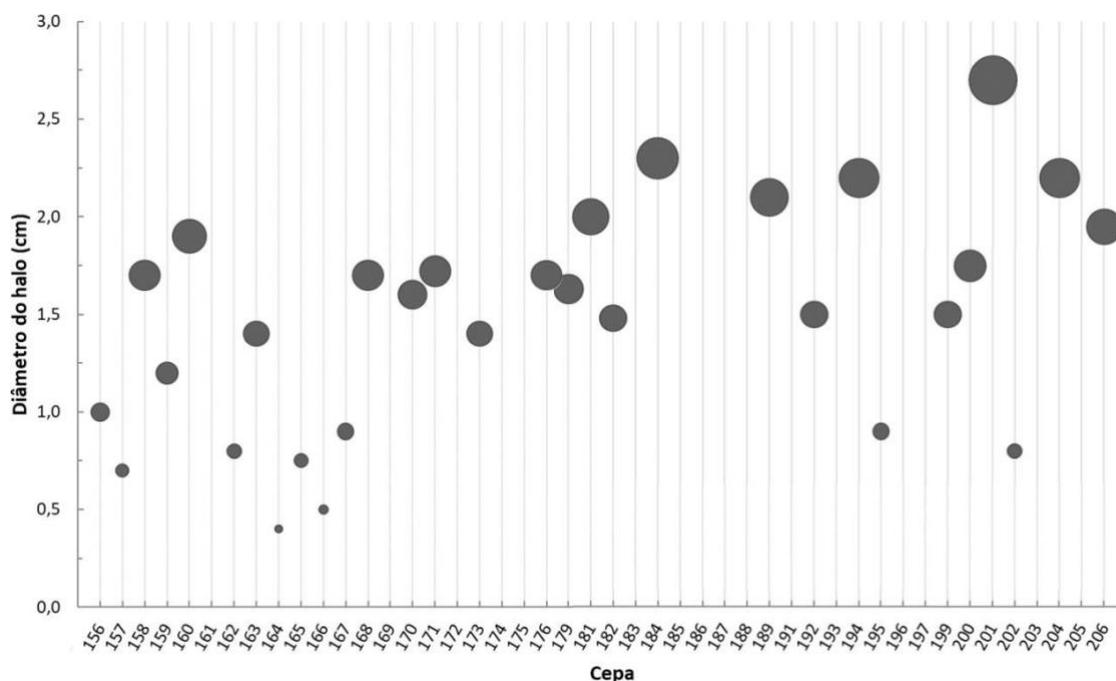
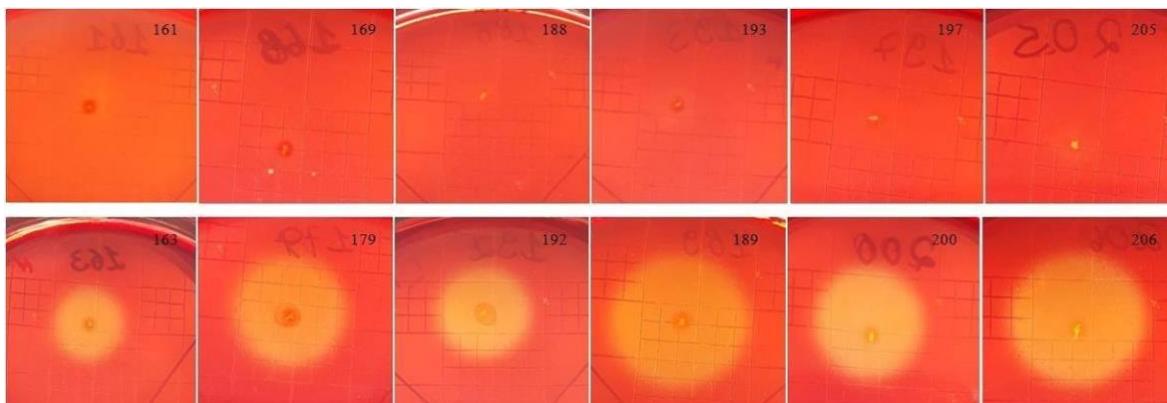


Figura 2 – Imagens representativas do ensaio com carboximetilcelulose e vermelho de Congo. Na primeira linha, linhagens que não apresentaram halos e, portanto, não têm atividade celulolítica. Na segunda linha, linhagens que apresentaram halos e, portanto, demonstraram capacidade de hidrolisar celulose.



Durante o *screening* das leveduras em placas de Petri contendo carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono, foi observado um crescimento atípico das leveduras. Comparado àquele observado em placas controle, contendo glicose como fonte de carbono, as colônias apresentaram crescimento invasivo no meio sólido com CMC, gerando hifas ou pseudo-hifas que se dispersaram em torno do ponto de inoculação, conforme as imagens representativas apresentadas na Figura 3. Importa salientar que os inóculos realizados tanto em CMC quanto em glicose são provenientes de um mesmo pré-inóculo, e essa diferença foi observada em todas as linhagens. Além disso, a biomassa celular em forma de pseudo-hifas ocupou sempre uma área bem menor que a do halo de degradação da CMC, sugerindo que os alongamentos das hifas ou pseudo-hifas eram muito maiores do que o observado a olho nu.

Figura 3 – Comparação entre as morfologias das colônias da CHAP-179 crescidas em carboximetilcelulose (foto à esquerda) ou glicose (foto à direita).



As leveduras são organismos com estruturas unicelulares durante a maior parte da sua vida, com sua divisão celular ocorrendo através de brotamento ou fissão. Entretanto, em condições ambientais específicas como a limitação de nutrientes, pH, disponibilidade oxigênio ou concentrações de etanol, é possível que algumas leveduras apresentem crescimento multicelular invasivo por meio de hifas ou, especialmente, pseudo-hifas (CULLEN & SPRAGUE, 2000; GAGIANO et al., 2002; GANCEDO, 2001; GRANERK & MAGWENE, 2010). As pseudo-hifas são uma série de leveduras alongadas unidas entre si, com constrições nos sítios septais — ou seja, após o brotamento, as leveduras não se separam, alongando-se com o aspecto semelhante a hifas (MOTLHALAMME et al., 2022).

Assim sendo, diante da ausência de uma fonte de carbono que pudesse ser rapidamente consumida pelas células, as leveduras aqui analisadas, quando submetidas a CMC, se expandiram por meio de pseudomicélios — estruturas que permitem a liberação de enzimas essenciais para a degradação de moléculas orgânicas onde estão inseridas. Em substratos complexos, a multicelularidade das leveduras melhora o acesso aos substratos, permitindo a metabolização dos nutrientes necessários. No entanto, assim que nutrientes melhor assimilados são disponibilizados, a unicelularidade volta ser a morfologia desse microrganismo (MOTLHALAMME et al., 2022).

Com o intuito de avaliar a influência de outras fontes de carbono na expressão das celulases das leveduras, o ensaio com vermelho de Congo em placas de Petri também foi realizado com meios de CMC acrescidos, alternadamente, de xilose, glicose, glicerol ou celobiose. Nestes casos, as células foram previamente cultivadas em meios líquidos com as mesmas combinações de fontes de carbono. Contudo, não foram observados halos em nenhuma das condições em que CMC foi combinada a outro carboidrato ou ao glicerol. Hipotizamos, assim, que as leveduras optaram preferencialmente pela utilização das outras fontes de carbono (formas mais simples de assimilação metabólica) em detrimento da degradação do polissacarídeo. Ademais, como não ocorreu a escassez de nutrientes durante o período, não foram observadas adequações à CMC, nem na forma de pseudo-hifas tampouco na geração de halos.

O ensaio com vermelho de Congo também foi realizado com as 46 linhagens em placas de Petri com xilana no lugar da CMC. Contudo, neste caso, não foi detectada atividade xilanase através da manifestação de halos para nenhuma das cepas testadas, embora tenha sido observada biomassa celular por crescimento invasivo das colônias (como se havia verificado em CMC). Assim sendo, como as condições em placas de Petri não foram propícias para detectar a expressão de xilanases pelas cepas, analisamos a atividade xilanolítica das 46 linhagens em microplacas de 96 poços, conforme apresentado a seguir.

Triagem de leveduras xilanolíticas em microplacas

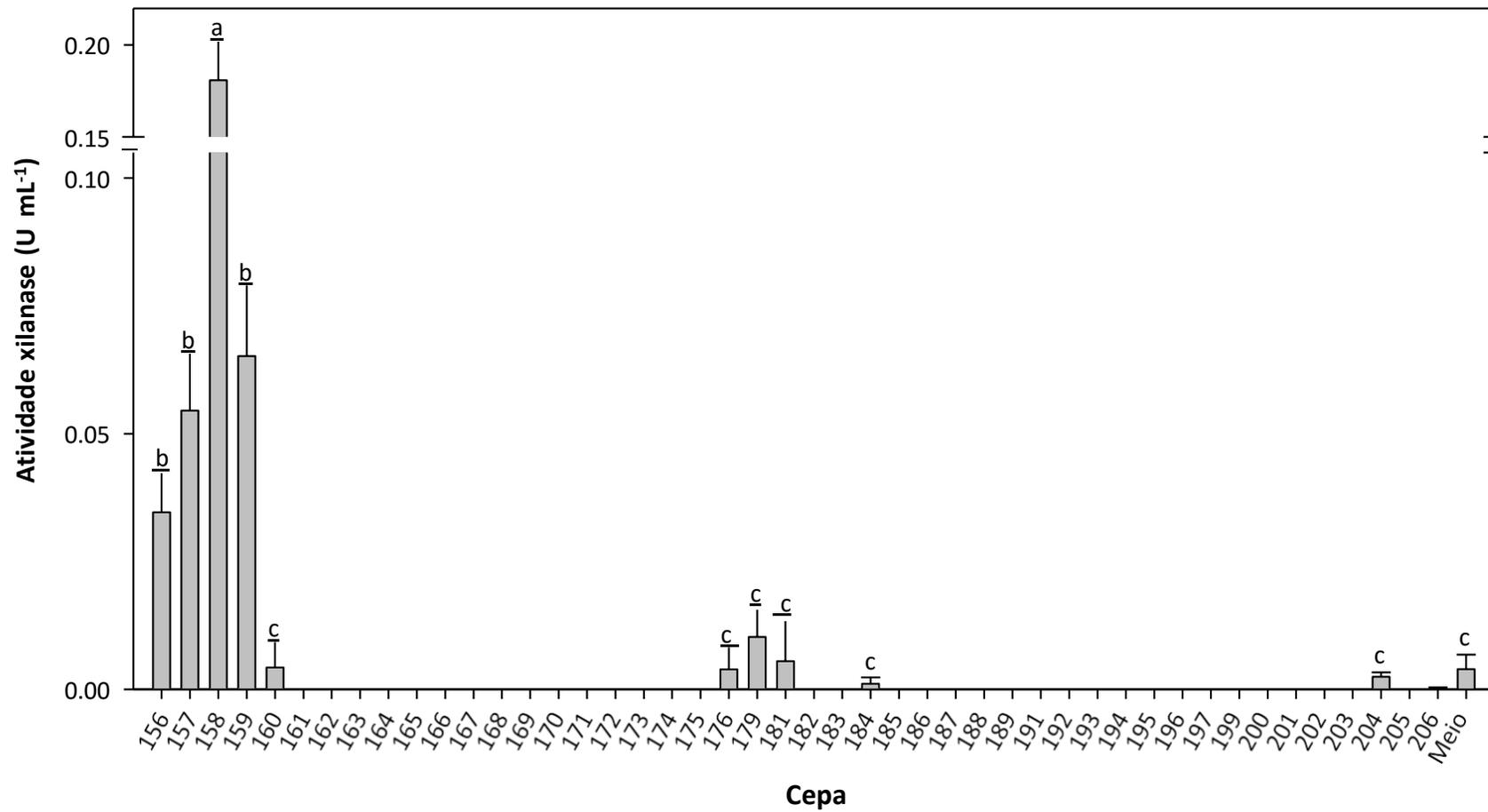
A fim de testar a capacidade xilanolítica das linhagens isoladas, sobrenadantes de cultivos realizados em meio líquido reagiram com 1% de xilana em microplacas de 96 poços. Das 46 cepas testadas, apenas quatro apresentaram atividade xilanase: CHAP-156, CHAP-157, CHAP-158 e CHAP-159 (Figura 4). A linhagem CHAP-158 se destacou, apresentando

atividade três a seis vezes superior em relação às outras três, que não apresentaram diferença significativa entre si. O meio de cultura não inoculado foi utilizado como controle negativo do ensaio, e não houve diferença significativa entre os valores observados para o meio e para as 42 cepas restantes.

Os resultados encontrados estão em consonância com o relatado por outros autores que prospectaram leveduras xilanolíticas em amostras ambientais. KIM et al. (2014) isolaram 116 linhagens de biomassa vegetal em decomposição e insetos herbívoros e detectaram, entre elas, 31 capazes de degradar xilana. Apesar de um maior percentual de leveduras com fenótipo positivo para xilana, esses autores utilizaram apenas água como controle negativo e não compararam estatisticamente os valores mais baixos com o que poderia ser observado no próprio meio de cultura não inoculado. Ademais, apenas ~10% das linhagens avaliadas por KIM et al. (2014) apresentaram atividades superiores às que detectamos.

Mais recentemente, MORAIS et al. (2020) encontraram atividade xilanase em 13% dos seus isolados, o que corresponde a 44 linhagens. Dessas, entretanto, apenas três apresentaram atividade xilanase ligeiramente superior (0,21–0,26 U mL⁻¹) a que observamos para a CHAP-158 (0,18 U mL⁻¹). De modo semelhante, SENA et al. (2017) encontraram sete novas espécies xilanolíticas do gênero *Sugiyamaella* em bagaço de cana-de-açúcar e a maior atividade observada foi de 0,14 U mL⁻¹ para *S. valenteae* sp. nov.. No entanto, outros autores já reportaram atividades xilanases expressivamente superiores, como LARA et al. (2014), que observaram ~1,4 U mL⁻¹ em uma linhagem de *Cryptococcus laurentii*. De fato, esta espécie é reconhecida pela sua expressiva atividade xilulolítica; OTERO et al. (2021) reportaram até 12,5 U mL⁻¹ com uma cepa desta espécie, porém esse valor elevado foi observado apenas após três séries consecutivas de otimização de experimentos, o que elevou a atividade enzimática inicialmente observada em 131%. Ademais, esses autores demonstraram que a fonte de nitrogênio empregada nos meios de cultura influencia significativamente a atividade enzimática. Em nossos ensaios, foram empregados apenas 0,1% de extrato de levedura e 0,2% de peptona, enquanto OTERO et al. (2021) empregaram concentrações até dez vezes superiores desses compostos. Assim sendo, trabalhos futuros poderiam submeter as cepas que isolamos a planejamentos experimentais com concentrações superiores de fontes de nitrogênio para verificar o desempenho delas em novas condições de cultivo.

Figura 4 – Atividade xilanase das 46 linhagens de leveduras analisadas. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre cepas testadas quanto à atividade xilanase. Letras iguais indicam médias que não diferiram entre si (Teste-t, $p \leq 0,05$). $1 \text{ U mL}^{-1} = 1 \mu\text{mol de xilose min}^{-1}$.



Diferentemente do que foi reportado por YU et al. (2019), a hidrólise da xilana não pode ser detectada com vermelho de Congo em meio sólido, haja vista que as quatro cepas xilanolíticas detectadas pelo ensaio em microplaca de 96 poços não geraram halo em placas de Petri com xilana e o referido corante. De fato, esses nossos dados estão em consonância com o verificado por GHIO et al. (2012), que embora tenham utilizado vermelho de Congo para detecção de atividade celulase, avaliaram a capacidade de hidrólise de xilana apenas pela verificação de crescimento celular nesta fonte de carbono. Assim sendo, nossos dados indicam inviabilidade do método de vermelho de Congo para a triagem de leveduras xilanolíticas.

Por fim, vale ressaltar que as quatro leveduras xilanolíticas também foram capazes de hidrolisar CMC (vide Figura 1). A linhagem de maior atividade xilanase (CHAP-158) também esteve entre as que apresentaram maior diâmetro de halo (1,7 cm) no ensaio em placas de Petri com CMC e vermelho de Congo, indicando elevado potencial de aplicação em processos de sacarificação e fermentação simultâneas com consórcios microbianos (SAMIR ALI et al., 2019). As cepas CHAP-156, CHAP-157 e CHAP-159, por sua vez, apresentaram, respectivamente, atividade xilanase de $0,03 \text{ U mL}^{-1}$, $0,05 \text{ U mL}^{-1}$ e $0,06 \text{ U mL}^{-1}$ e halos de 1,0 cm, 0,7 cm e 1,2 cm.

4. CONCLUSÃO

A maioria das leveduras isoladas do intestino de larvas de *Spodoptera frugiperda* apresentou capacidade de produção da enzima celulase; das 46 linhagens testadas, 15 apresentaram halos de grandes diâmetros, outras 15 cepas demonstraram halos com menores medidas de diâmetro e as 16 restantes não apresentaram atividade enzimática para celulose. Por outro lado, apenas quatro das 46 cepas apresentaram atividade xilanase, dentre as quais se destacou a CHAP-158 com elevada atividade quando comparada às outras três leveduras xilanolíticas.

As quatro linhagens xilanolíticas também foram capazes de hidrolisar CMC. Dentre elas, a CHAP-158 também apresentou a maior atividade celulolítica, demonstrando expressivo potencial de aplicação desta levedura em biorrefinarias que empreguem resíduos lignocelulósicos como matéria-prima.

Nossos dados demonstram também o potencial biotecnológico da prospecção de leveduras na microbiota intestinal de lagartas militares ou outros insetos herbívoros. Até onde verificamos na literatura, este é o primeiro trabalho a isolar leveduras do intestino de *S. frugiperda* e a caracterizar suas capacidades hidrolíticas.

REFERÊNCIAS

- Adelabu, B. A., Kareem, S. O., Oluwafemi, F., & Abideen Adeogun, I. (2019). Bioconversion of corn straw to ethanol by cellulolytic yeasts immobilized in *Mucuna urens* matrix. *Journal of King Saud University - Science*, *31*(1), 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.07.005>
- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., & Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *66*(1), 631–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- Álvarez-Pérez, S. (2022). Ecology: Yeasts on their Natural Environment. In S. Alves Jr., H. Treichel, T. Basso, & B. Stambuk (Eds.), *Yeasts: From Nature to Bioprocesses* (pp. 27–57). <https://doi.org/10.2174/9789815051063122020004>
- Alves, S. L., Müller, C., Bonatto, C., Scapini, T., Camargo, A. F., Fongaro, G., & Treichel, H. (2019). Bioprospection of Enzymes and Microorganisms in Insects to Improve Second-Generation Ethanol Production. *Industrial Biotechnology*, *15*(6), 336–349. <https://doi.org/10.1089/ind.2019.0019>
- Andrade, E. T. de, Carvalho, S. R. G. de, & Souza, L. F. de. (2010). PROGRAMA DO PROÁLCOOL E O ETANOL NO BRASIL. *Engevista*, *11*(2), 127–136. <https://doi.org/10.22409/engevista.v11i2.236>
- Barretto, D. A., Avchar, R., Carvalho, C., Sampaio, J. P., Vootla, S. K., & Baghela, A. (2018). *Blastobotrys bombycis* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast isolated from the gut of the silkworm larva *Bombyx mori*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *68*(8), 2638–2643. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.002890>
- Basso, T. O., Basso, T. P., Luiz Alves Júnior, S., Stambuk, B. U., & Basso, L. C. (2022). Saccharomyces: The 5 Ws and One H. In S. Alves Jr., H. Treichel, T. Basso, & B. Stambuk (Eds.), *Yeasts: From Nature to Bioprocesses* (pp. 73–112). BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. <https://doi.org/10.2174/9789815051063122020006>
- Brasil. (2009). *DECRETO Nº 6.961, DE 17 DE SETEMBRO DE 2009*.
- Brasil. (2019). *DECRETO Nº 10.084, de 5 de NOVEMBRO DE 2019*.
- Cadete, R. M., Melo-Cheab, M. A., Dussán, K. J., Rodrigues, R. C. L. B., da Silva, S. S., Gomes, F. C. O., & Rosa, C. A. (2017). Production of bioethanol in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Scheffersomyces parashehatae*, *Scheffersomyces illinoensis* and *Spathaspora arborariae* isolated from Brazilian ecosystems. *Journal of*

- Applied Microbiology*, 123(5), 1203–1213. <https://doi.org/10.1111/jam.13559>
- Cadete, R. M., & Rosa, C. A. (2018). The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. *Yeast*, 35(2), 191–199. <https://doi.org/10.1002/yea.3279>
- Carvalho, J. K., Panatta, A. A. S., Silveira, M. A. D., Tav, C., Johann, S., Rodrigues, M. L. F., & Martins, C. V. B. (2021). Yeasts isolated from a lotic continental environment in Brazil show potential to produce amylase, cellulase and protease. *Biotechnology Reports*, 30, e00630. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00630>
- CONAB. (2021). *Boletim da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar*.
- Cullen, P. J., & Sprague, G. F. (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13619–13624. <https://doi.org/10.1073/pnas.240345197>
- Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. (2009). Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, 5(6), 578–595. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5.578>
- Feng, T., Liu, H., Xu, Q., Sun, J., & Shi, H. (2015). Identification and Characterization of Two Endogenous β -Glucosidases from the Termite *Coptotermes formosanus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(7), 2039–2052. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1699-7>
- Gagliano, M., Bauer, F. F., & Pretorius, I. S. (2002). The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 2(4), 433–470. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00114.x>
- Gallo, D. et al. (2002). *ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA*. Piracicaba: FEALQ, 10.
- Gancedo, J. M. (2001). Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 107–123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00573.x>
- Ghio, S., Di Lorenzo, G. S., Lia, V., Talia, P., Cataldi, A., Grasso, D., & Campos, E. (2012). Isolation of *Paenibacillus* sp. and *Variovorax* sp. strains from decaying woods and characterization of their potential for cellulose deconstruction. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(4), 352. [/pmc/articles/PMC3533884/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23533884/)
- Granek, J. A., & Magwene, P. M. (2010). Environmental and Genetic Determinants of Colony Morphology in Yeast. *PLoS Genetics*, 6(1), e1000823. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000823>

- Hatefi, A., Makhdoumi, A., Asoodeh, A., & Mirshamsi, O. (2017). Characterization of a bifunctional cellulase produced by a gut bacterial resident of Rosaceae branch borer beetle, *Osphranteria coerulescens* (Coleoptera: Cerambycidae). *International Journal of Biological Macromolecules*, *103*, 158–164.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.042>
- Kim, J. J., Kwon, Y.-K., Kim, J. H., Heo, S.-J., Lee, Y., Lee, S.-J., Shim, W.-B., Jung, W.-K., Hyun, J.-H., Kwon, K. K., Kang, D.-H., & Oh, C. (2014). Effective Microwell Plate-Based Screening Method for Microbes Producing Cellulase and Xylanase and Its Application. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(11), 1559–1565.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1405.05052>
- Lagunas, R. (1986). Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *2*(4), 221–228. <https://doi.org/10.1002/yea.320020403>
- Landry, C. R., Townsend, J. P., Hartl, D. L., & Cavalieri, D. (2006). Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Molecular Ecology* (Vol. 15, Issue 3, pp. 575–591). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02778.x>
- Lara, C. A., Santos, R. O., Cadete, R. M., Ferreira, C., Marques, S., Gírio, F., Oliveira, E. S., Rosa, C. A., & Fonseca, C. (2014). Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *105*(6), 1107–1119. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0172-x>
- Lee, C.-M., Lee, Y.-S., Seo, S.-H., Yoon, S.-H., Kim, S.-J., Hahn, B.-S., Sim, J.-S., & Koo, B.-S. (2014). Screening and Characterization of a Novel Cellulase Gene from the Gut Microflora of *Hermetia illucens* Using Metagenomic Library. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(9), 1196–1206. <https://doi.org/10.4014/jmb.1405.05001>
- Li, Y., Arakawa, G., Tokuda, G., Watanabe, H., & Arioka, M. (2017). Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of a β -glucosidase from the xylophagous cockroach *Panesthia angustipennis* spadic displaying high specific activity for cellobiose. *Enzyme and Microbial Technology*, *97*, 104–113.
<https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2016.11.004>
- Liu, C., Zou, G., Yan, X., & Zhou, X. (2018). Screening of multimeric β -xylosidases from the gut microbiome of a higher termite, *Globitermes brachycerastes*. *International Journal of Biological Sciences*, *14*(6), 608. <https://doi.org/10.7150/IJBS.22763>

- Lopes, M. L., Paulillo, S. C. de L., Godoy, A., Cherubin, R. A., Lorenzi, M. S., Giometti, F. H. C., Bernardino, C. D., de Amorim Neto, H. B., & de Amorim, H. V. (2016). Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *66*(3), 506–577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>
- MAPA. (2015). *Portaria Nº 75 DE 05/03/2015*.
- Morais, C. G., Sena, L. M. F., Lopes, M. R., Santos, A. R. O., Barros, K. O., Alves, C. R., Uetanabaro, A. P. T., Lachance, M. A., & Rosa, C. A. (2020). Production of ethanol and xylanolytic enzymes by yeasts inhabiting rotting wood isolated in sugarcane bagasse hydrolysate. *Fungal Biology*, *124*(7), 639–647. c
- Motlhalamme, T. Y., Zhou, N., Gamero, A., Mehlomakulu, N. N., Jolly, N., Albertyn-Pohl, C., & Setati, M. E. (2022). *Origin and Evolution of Yeasts*. 1–26. <https://doi.org/10.2174/9789815051063122020003>
- Mupondwa, E., Li, X., Tabil, L., Sokhansanj, S., & Adapa, P. (2017). Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part II: Hydrolysis and fermentation technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *79*, 1535–1555. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2016.11.037>
- Otero, D. M., Cavalcante Braga, A. R., & Kalil, S. J. (2021). Diversification of nitrogen sources as a tool to improve endo-xylanase enzyme activity produced by *Cryptococcus laurentii*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *32*, 101941. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2021.101941>
- Ruegger, M. J. S., & Tauk-Tornisielo, S. M. (2004). Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, *27*(2), 205–211. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042004000200001>
- Samir Ali, S., Al-Tohamy, R., Sun, J., Wu, J., & Huizi, L. (2019). Screening and construction of a novel microbial consortium SSA-6 enriched from the gut symbionts of wood-feeding termite, *Coptotermes formosanus* and its biomass-based biorefineries. *Fuel*, *236*, 1128–1145. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.08.117>
- Santos, A. A. dos, Deoti, J. R., Müller, G., Dário, M. G., Stambuk, B. U., & Alves Junior, S. L. (2017). Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. *Brazilian*

- Journal of Food Technology*, 20, e2015113. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.11315>
- Sarsaiya, S., Awasthi, S. K., Awasthi, M. K., Awasthi, A. K., Mishra, S., & Chen, J. (2018). The dynamic of cellulase activity of fungi inhabiting organic municipal solid waste. *Bioresource Technology*, 251, 411–415. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.12.011>
- Sena, L. M. F., Morais, C. G., Lopes, M. R., Santos, R. O., Uetanabaro, A. P. T., Morais, P. B., Vital, M. J. S., de Morais, M. A., Lachance, M. A., & Rosa, C. A. (2017). d-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of Sugiyamaella. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110(1), 53–67. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0775-5>
- Silva, L. F., Taciro, M. K., Raicher, G., Piccoli, R. A. M., Mendonça, T. T., Lopes, M. S. G., & Gomez, J. G. C. (2014). Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.065>
- Stambuk, B. U., Eleutherio, E. C. A., Florez-Pardo, L. M., Souto-Maior, A. M., & Bon, E. P. S. (2008). Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. In *Journal of Scientific and Industrial Research* (Vol. 67, Issue 11, pp. 918–926).
- Tadioto, V., Milani, L. M., Barrilli, É. T., Baptista, C. W., Bohn, L., Dresch, A., Harakava, R., Fogolari, O., Mibielli, G. M., Bender, J. P., Treichel, H., Stambuk, B. U., Müller, C., & Alves, S. L. (2022). Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(2), 35. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03221-0>
- Watanabe, H., & Tokuda, G. (2010). Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology*, 55, 609–632. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ENTO-112408-085319>
- Willis, J. D., Oppert, C., & Jurat-Fuentes, J. L. (2010). Methods for discovery and characterization of cellulolytic enzymes from insects. *Insect Science*, 17(3), 184–198. <https://doi.org/10.1111/J.1744-7917.2010.01322.X>
- Xia, D., Wei, Y., Zhang, G., Zhao, Q., Zhang, Y., Xiang, Z., & Lu, C. (2013). cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the beetle *Batocera horsfieldi*. *Gene*, 514(1), 62–68. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2012.08.044>
- Yu, H., Zhao, S., Fan, Y., Hu, C., Lu, W., & Guo, L. (2019). Cloning and heterologous expression of a novel halo/alkali-stable multi-domain xylanase (XylM18) from a marine

bacterium *Marinimicrobium* sp. strain LS-A18. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(21–22), 8899–8909. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-10140-6>/FIGURES/6