



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR LEVEDURAS
ISOLADAS DO CERRADO TOCANTINENSE**

Aluna: Graziela Barbosa Paludo

Orientadora: Prof^a Dr^a Solange Cristina Carreiro

PALMAS-TO

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR LEVEDURAS
ISOLADAS DO CERRADO TOCANTINENSE**

Aluna: Graziela Barbosa Paludo

Orientadora: Prof^a Dr^a Solange Cristina Carreiro

**Dissertação apresentada à
Coordenação do Programa de
Pós- Graduação em Agroenergia
da Universidade Federal do
Tocantins, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre
em Agroenergia. (Área de
concentração em Processos de
obtenção de biocombustíveis e
avaliação de aproveitamento de
seus resíduos).**

PALMAS-TO

2015

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

P184p Paludo, Graziela Barbosa.

Produção de enzimas por leveduras isoladas do Cerrado Tocantinense. / Graziela Barbosa Paludo. – Palmas, TO, 2015.

112 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Agroenergia, 2015.

Orientadora : Solange Cristina Carreiro

1. Substratos vegetais ; 2. Leveduras. 3. Fermentação submersa. 4. Enzimas. I. Título

CDD 333.7

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).



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR LEVEDURAS ISOLADAS DO CERRADO
TOCANTINENSE**

Aluna: Graziela Barbosa Paludo

APROVADA EM 20/03/2015

Prof. Dra. Solange Cristina Carreiro (Presidente- UFT)

Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda (Examinador Interno - UFT)

Prof. Dr. Thiago Lucas de Abreu-Lima (Examinador Externo)

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

È difícil nessa hora agradecer e expressar o meu carinho com todas as pessoas que se fazem especial em minha vida.

Primeiramente quero agradecer a Deus por ter me dado essa extrema vontade de seguir sempre adiante na ânsia de querer saber mais e mais, agradeço a ele não só hoje, mas todo dia ao acordar por nunca ter me deixado desistir mesmo diante das dificuldades encontradas a você Senhor Deus toda a minha gratidão.

A minha família que mesmo na ausência se faz presente pelos laços sanguíneos e de amor que nos fazem ser para o todo sempre.

A minha amiga e irmã Joice por sempre estar presente em minha vida e dividir as angústias do dia a dia, mesmo distante.

Ao meu esposo Fernando pelo apoio, pela paciência, pelo incentivo e companheirismo.

A orientadora, Dr^a. Solange Careiro, pelo seu espírito inovador e empreendedor na tarefa de multiplicar seus conhecimentos, pela confiança, apoio e presença em todas as dificuldades.

Ao Prof. Dr^o Thiago Lucas Abreu Lima, pelo apoio e a ajuda diante das dificuldades com sua estatística perfeita e seu bom humor me lembrando sempre que tudo passaria.

Aos colegas do Laboratório (LAMA), pelo convívio, amizade e ajuda mútua, e principalmente a meiga, atenciosa e linda Luh, obrigada pela ajuda inicial sem você as coisas teriam sido muito difíceis, para sempre lhe serei grata.

Ao apoio estrutural da UFT e financeiro da CAPES.

RESUMO

A busca por produtos de maior qualidade utilizando processos de baixo consumo energético e menor impacto ambiental tem aumentado o interesse acerca da tecnologia enzimática. As enzimas hidrolíticas estão entre as enzimas amplamente utilizadas no mercado industrial. Inúmeros trabalhos têm apresentado o potencial de leveduras isoladas de diversas fontes para produção de enzimas, muitas das quais são utilizadas para a produção de biocombustíveis. O Brasil, atualmente, importa a maior parte das enzimas que utiliza, embora apresente potencial para produzi-las em função da enorme diversidade biológica, ainda pouco explorada, para a descoberta de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial. Diante de tal oportunidade, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de leveduras isoladas do cerrado Tocantinense para a produção de amilases, celulases, xilanases e lipases por meio de *screening* e fermentação submersa. Foram avaliadas 205 linhagens quanto à produção dessas hidrolases em meio sólido. Os resultados foram dados como Índice Enzimático (IE) que representa a relação entre o halo de hidrólise e o diâmetro da colônia. Para cada enzima foram selecionadas as 5 linhagens que apresentaram maior IE para quantificação de suas atividades enzimáticas usando a fermentação submersa (FSb). A fim de avaliar os efeitos de pH e temperatura sobre a reação enzimática, foi realizado um planejamento fatorial rotacional (DCCR) 2^2 . Um total de 71% das linhagens apresentaram atividade enzimática para pelo menos umas das enzimas testadas. Para amilase, celulase e xilanase as atividades enzimáticas foram baixas, sendo que a maior atividade foi observada para a enzima amilase para a linhagem AS 110 ($0,07 \text{ U.mL}^{-1}$). A atividade lipolítica foi mais expressiva atingindo valores de $18,19 \text{ U.mL}^{-1}$ para a linhagem TAQ 164. Os fatores estudados (pH e temperatura) influenciaram as atividades enzimáticas para a maioria das linhagens estudadas.

Palavras-chave: Substratos vegetais. Leveduras. Fermentação submersa. Enzimas.

ABSTRACT

The search for higher quality products using low-energy processes and reduced environmental impact has increased the interest on the enzyme technology. The hydrolytic enzymes are enzymes of widely used in the industrial market. Several studies have shown the potential of yeasts isolated from different sources for the production of enzymes, many of which are used for the production of biofuels. The Brazil currently imports most of the enzymes it uses, although it has the potential to produce them according to the enormous biological diversity, yet little explored, for the discovery of new organisms that produce enzymes industrial. Diante interest of such an opportunity, the objective of this study was to evaluate the potential of yeasts isolated from Tocantinense cerrado for the production of amylase, cellulase, xylanase and lipase through screening and submerged fermentation. We evaluated 205 lines for the production of these hydrolases in solid medium. The results were given as enzymatic index (EI) which represents the relation between the hydrolysis halo, and the diameter of the colony. For each enzyme were selected the 5 strains showed the highest IE to quantify their enzymatic activities using the submerged fermentation (FSB). In order to evaluate the effects of pH and temperature on the enzymatic reaction, we performed a rotational factorial design (CCRD) 2^2 . A total of 71% of the strains showed enzymatic activity for at least one of the enzymes tested. For amylase, cellulase and xylanase enzyme activities were low, with the highest activity was observed for the amylase enzyme for the line AS 110 (0.07 U.mL^{-1}). The lipase activity was more expressive of reaching $18,19 \text{ U.mL}^{-1}$ values for TAQ line 164. The factors studied (pH and temperature) influence the enzymatic activities for most of the studied strains.

Keywords: Vegetable Substrates. Yeasts. Submerged Fermentation. Enzymes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais aplicações das enzimas em indústrias e os micro-organismos que as secretam	16
Tabela 2. Valores das variáveis independentes em cada nível do planejamento experimental DCCR 2 ²	41
Tabela 3. Valores do IE para amilase, médias das 3 repetições	46
Tabela 4. Valores de IE para celulasas, média das 3 repetições.	47
Tabela 5. Valores de IE para lipase, média das 3 repetições.....	48
Tabela 6. Valores de IE para xilanase, média das 3 repetições	50
Tabela 7. Perfil multienzimático das leveduras produtoras de hidrolases.	52
Tabela 8. Matriz do Planejamento experimental (DCCR 2 ²) com valores originais e codificados das variáveis de estudo (pH e temperatura) e atividade enzimática de alfa-amilase (U. mL ⁻¹) para as 5 linhagens testadas.....	54
Tabela 9. Matriz do Planejamento experimental (DCCR 2 ²) com valores originais e codificados das variáveis de estudo (pH e temperatura) e atividade enzimática de glicoamilase (U. mL ⁻¹) para as 5 linhagens testadas.	54
Tabela 10. Coeficientes significativos para a produção de enzimas amilolíticas	55
Tabela 11. Matriz do Planejamento experimental (DCCR 2 ²) com valores originais e codificados das variáveis de estudo (pH e temperatura) e atividade enzimática de FPase (U.mL ⁻¹) para as 5 linhagens testadas	58
Tabela 12. Coeficientes significativos para a produção de enzima celulolítica.	58
Tabela 13. Matriz do Planejamento experimental (DCCR 2 ²) com valores originais e codificados das variáveis de estudo (pH e temperatura) e atividade enzimática (U. mL ⁻¹) de lipase para as 5 linhagens testadas.	64
Tabela 14. Coeficientes significativos para a produção de enzima lipolítica	64
Tabela 15. Matriz do Planejamento experimental (DCCR 2 ²) com valores originais e codificados das variáveis de estudo (pH e temperatura) e atividade enzimática de xilanase (U. mL ⁻¹) para as 5 linhagens testadas.....	69
Tabela 16. Coeficientes significativos para a produção da enzima xilanolítica.	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hidrólise do amido por amilases com diferentes especificidades.	20
Figura 2: Estrutura da celulose sendo convertida para glicose	22
Figura 3: Hidrólise sequencial do glicerídeo catalisado por uma lipase	24
Figura 4: Estrutura da Xilana sendo convertida em xilose.....	26
Figura 5: Placas após incubação e revelação com vapor de iodo	34
Figura 6: Placas após incubação e revelados com vermelho congo	35
Figura 7: Precipitação formada por sais de cálcio	36
Figura 8: Placas após incubação e revelação com vapor de iodo.....	37
Figura 9: Total de leveduras testadas e porcentagem de produtoras de hidrolases.....	43
Figura 10: Percentual de Índice Enzimático das leveduras por hidrolase	44
Figura 11: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de glicoamilase ($U. mL^{-1}$) produzida em função do pH e temperatura para a levedura BIO 121 e curva de contorno.....	56
Figura 12: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de glicoamilase ($U. mL^{-1}$) produzida em função do pH e temperatura para a levedura AS 110 e curva de contorno	56
Figura 13: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de FPase ($U. mL^{-1}$) produzida em função do pH e temperatura para a levedura AS 122 e curva de contorno.....	60
Figura 14: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de FPase ($U. mL^{-1}$) produzida em função do pH e temperatura para a levedura TAQ 14 e curva de contorno	60
Figura 15: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de FPase ($U. mL^{-1}$) produzida em função do pH e temperatura para a levedura BIO 121 e curva de contorno.....	61
Figura 16: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de lipase ($U. mL^{-1}$) produzida em função do pH e temperatura para a levedura TAQ 616 e curva de contorno	65

Figura 17: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de lipase (U. mL^{-1}) produzida em função do pH e temperatura para a levedura TAQ 164 e curva de contorno	66
Figura 18: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de xilanase (U. mL^{-1}) produzida em função do pH e temperatura para a levedura TAQ 16 e curva de contorno	70
Figura 19: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de xilanase (U. mL^{-1}) produzida em função do pH e temperatura para a levedura TAQ 131 e curva de contorno	71
Figura 20: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de xilanase (U. mL^{-1}) produzida em função do pH e temperatura para a levedura BIO 19 e curva de contorno.....	71
Figura 21: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de xilanase (U. mL^{-1}) produzida em função do pH e temperatura para a levedura TAQ 54 e curva de contorno	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo Gerail.....	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 Enzimas e os aspectos biotecnológicos da sua produção	14
3.1.1 Amilases	19
3.1.2 Celulases	21
3.1.3 Lipases	24
3.1.4 Xilanases	26
3.2 Enzimas e a produção de biocombustíveis	27
3.3 Leveduras produtoras de hidrolases	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Linhagens de leveduras	33
4.2. Seleção de linhagens produtoras de hidrolases	33
4.2.1 Amilases	34
4.2.2 Celulases	35
4.2.3 Lipases	35
4.2.4 Xilanases	36
4.3 Produção dos Extratos Enzimáticos Brutos por fermentação submersa	37
4.3.1 Produção de amilases.....	38
4.3.2 Produção de celulases.....	39
4.3.3 Produção de lipases.....	40
4.3.4 Produção de xilanases.....	40
4.4 Efeito da Temperatura e do pH sobre a atividade enzimática	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Seleção de linhagens de leveduras pela técnica de <i>screening</i>	43
5.1.1 Amilase	45
5.1.2 Celulase	46
5.1.3 Lipase	48
5.1.4 Xilanase	50
5.1.5 Produção de multienzimas	51
5.2 Produção de hidrolases em Fermentação Submersa	53

5.2.1	Produção de amilases.....	53
5.2.2	Produção de celulasas.....	57
5.2.4	Produção de lipases.....	63
5.2.3	Produção de xilanases.....	68
6	CONCLUSÕES.....	74
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE A.....	93

1. INTRODUÇÃO

O custo de produção de uma enzima depende de vários fatores, como a quantidade produzida, o processo de produção e o gasto com sua recuperação, e grau de pureza em que a mesma será vendida. Quanto mais purificada a enzima for, mais alto será seu valor de venda (SAID; PIETRO, 2004). Os custos em processos que necessitem de enzimas para serem desenvolvidos podem ser reduzidos quando empregados redução de custos na etapa de produção das enzimas, bastando para isso utilizar substratos de baixo custo, como os resíduos agroindustriais. O uso desses materiais se justifica por serem recursos renováveis, serem subprodutos de uma cadeia produtiva, serem produzidos em grande quantidade e na maioria das vezes causarem um problema ambiental se não submetidos a um tratamento ou aplicação (MATTHEW T. CAR; JAMES R. HETTENHAUS, 2009).

O desenvolvimento tecnológico vem crescendo anualmente, e neste contexto os processos envolvendo a biotecnologia industrial se destacam, visto existirem um grande número de transformações que são oriundas desses. Um dos principais exemplos de processo biotecnológico em ascensão é o de produção de enzimas, utilizando micro-organismos, em vista da dificuldade de sua extração de tecidos vegetais e animais. O potencial de inúmeras linhagens de leveduras para produção de enzimas tem sido investigado e aponta para interessantes usos biotecnológicos dessas enzimas. Estudos realizados através de *screening* em meios sólidos específicos mostraram que algumas linhagens de leveduras isoladas de folhas em decomposição produzem enzimas de interesse biotecnológico. Nesse sentido, esse estudo se justifica pela capacidade enzimática nessas populações de leveduras ainda pouco estudadas representar um potencial e possibilidades de aplicação dessas na produção de enzimas de interesse industrial.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo verificar a produção enzimática de linhagens de leveduras isoladas de folhas em decomposição em produzir e secretar celulases, lipases, amilases e xilanases.

2.2. Objetivos Específicos

- Verificar a produção de enzimas extracelulares (lipases, amilases, celulases e xilanases) por leveduras isoladas de folhas do cerrado tocaninense, através de *screening* em meios sólidos específicos.
- Selecionar as linhagens com maior potencial para produção por meio da medição dos halos de hidrólise formados em meio sólido;
- Quantificar a produção de enzimas extracelulares, por meio de fermentação submersa (FSb).
- Avaliar o efeito das variáveis pH e temperatura na reação enzimática por meio de planejamento experimental e definir as faixas ótimas operacionais de cada variável através da análise de superfície de resposta;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Enzimas e os aspectos biotecnológicos da sua produção

As proteínas especializadas que catalisam reações químicas em vários processos biológicos são consideradas especiais, e por essa razão recebem a denominação de enzimas (WALSH, 2001). As enzimas são classificadas e codificadas pelo NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*). Essa classificação ocorre de acordo com suas propriedades catalíticas formando seis grupos:

- I. **Oxidoredutases** - atuam em reações de oxi-redução, por meio da transferência de elétrons;
- II. **Transferases** - catalisam reações de transferência de grupos funcionais como amina, fosfato, acil e carboxil;
- III. **Hidrolases** - catalisam reações de hidrólise em ligações do tipo covalente;
- IV. **Liases** - atuam na adição de grupos a ligações duplas ou formação de duplas ligações pela remoção de grupos;
- V. **Isomerases** - catalisam reações de isomerização por meio da transferência de grupos dentro de uma molécula;
- VI. **Ligases** – catalisam reações de síntese de novas moléculas através da formação de ligações C-C, C-S, C-O, e C-N por meio de reações de condensação acopladas a clivagem de ATP.

As células vivas produzem enzimas com a função de catalisar reações químicas em processos vitais para a sua manutenção e sobrevivência. Após serem sintetizadas pela célula, desde que mantidas em condições controladas e adequadas, as enzimas poderão operar de forma autônoma. As enzimas possuem uma característica específica, sua seletividade para um substrato, o que faz com que sua ação seja limitada ou inexistente para outros substratos (SANT'ANA JR, 2001).

De acordo com a sua origem, as enzimas podem ser classificadas como enzimas microbianas, enzimas de origem animal e enzimas de origem vegetal.

Embora as enzimas ocorram amplamente em plantas e animais, aquelas de origem microbiana representam as melhores fontes, principalmente devido à sua ampla diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética (ALTAMIRANO, 2000).

Enzimas de origem microbiana possuem menor tempo de geração, facilidade para manipulação genética, escala de purificação, maior especificidade e estabilidade quando aplicadas na indústria. As de origem fúngicas quando comparadas com às bacterianas possuem a maior faixa de atuação e são ainda produzidas por via extracelular (SINGH, 2012).

O metabolismo biológico está diretamente relacionado com os processos bioquímicos catalisados pelas enzimas. Além disso, desempenham importante papel na degradação da matéria orgânica e, portanto, na ciclagem de elementos nos ambientes naturais. Os mais distintos tipos de enzimas secretadas essencialmente pela microbiota presente nos ecossistemas terrestre e aquático possibilitam a disponibilidade de nutrientes que sustentam a vida no planeta (BEG *et al.*, 2001).

Nos processos envolvendo deterioração de alimentos, processos infecciosos de origem microbiana e em vários processos industriais há o envolvimento das enzimas. Como exemplos no ramo alimentício podem ser citados: a produção de vinho, cerveja, vinagre, queijo e pão. Além disso, estão envolvidas na fabricação de couro, índigo e linho, seja a partir do crescimento espontâneo de micro-organismos, que por meio de seu metabolismo produzem enzimas, ou das obtidas do rúmen de bezerros e de frutas como o mamão (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002). A Tabela 1 mostra as principais aplicações das enzimas em indústrias e os micro-organismos que as secretam.

Tabela 1. Principais aplicações das enzimas em indústrias e os micro-organismos que as secretam.

Enzimas	Fonte	Atuação	Aplicação
Amilase	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Microbacterium imperiale</i>	Hidrólise de goma de trigo, aumento do volume do pão.	Amolecimento da massa; auxiliar na produção de açúcares para fermentação.
Lipase	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Candida sp.</i> <i>Rhizomucor mieh</i> <i>Rhizopus sp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol.	Tempero em produtos de queijo; modificação da função da gordura por esterificação.
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma spp.</i>	Hidrólise de celulose.	Liquefação de frutas para produção de sucos.
Xilanase	<i>Aspergillus sp e</i> <i>Trichoderma sp.</i>	Hidrólise de xilana.	Branqueamento de papel, clarificação de sucos, produção de pães

Fonte: Adaptado de *Fellows*, 2006.

A evolução da biotecnologia nas últimas décadas trouxe à luz uma gama de indústrias com bases na produção de enzimas. A utilização de micro-organismos selecionados torna as enzimas de fácil obtenção e com um grau de purificação maior e, além disso, uma maior facilidade de caracterização, mesmo quando se trata de produção em escala industrial ou larga escala. Os fatores da evolução tecnológica que contribuíram para uma maior produção de enzimas são a recombinação gênica, a engenharia de bioprocessos e a evolução dirigida (SCHMID *et al.*, 2002).

A obtenção de enzimas com características direcionadas de especificidade, atividade e estabilidade para um substrato específico contribui para suas aplicações industriais, promovendo um espectro de aplicações dessas nos mais variados processos. Este campo está experimentando aumentos significativos em pesquisas e desenvolvimento, resultando no desenvolvimento de uma série de novos produtos, melhoria do desempenho e processos de produção de vários produtos. Devido a isso, as indústrias modernas começaram a explorar as vantagens de enzimas nos seus processos de produção (TECNOCIÊNCIA, 2013).

Diante desse cenário, espera-se que o mercado de enzimas global continue a crescer. O mercado de enzimas foi avaliado em cerca de US \$ 1 bilhão em 2010 e estima-se que esse setor chegará em 1,5 bilhões de dólares em 2015. As vendas mais significativas nesta área têm ocorrido em enzimas utilizadas na indústria do couro, seguido pelo mercado de bioetanol. O segmento de enzimas com aplicações na indústria de alimentos e bebidas deve crescer a partir de 975 milhões de dólares em 2010 para em torno de 1,3 milhões em 2015, crescendo a uma taxa anual composta 5,1%. Dentro desse segmento destaca-se mercado de leite e derivados (BCC, 2014).

As produções de enzimas estão centradas principalmente nas empresas: Amano Pharmaceuticals (Japão), Novozyme (Dinamarca), Genencor International (USA), Unilever (Holanda), Biocatalysts (Inglaterra) e Meito Sankyo (Japão). No Brasil a empresa Bioenzima é a principal empresa focada na produção de enzimas comerciais, tendo como finalidade a produção de celulases destinadas à utilização em indústria têxtil, onde são usadas principalmente no tratamento de efluentes (SIMÕES, 2007).

O mercado mundial de enzimas vem crescendo graças ao isolamento de novos micro-organismos presentes na natureza em seus mais diferentes biomas e as novas técnicas de biotecnologia, como a modificação genética. Essa modificação possibilita uma produção mais eficiente de enzimas e também possibilita sua utilização em processos nos quais sem essa alteração gênica não seria possível, como é o caso de processos que ocorrem em elevadas temperaturas ou em condições consideradas de estresse (SERAFINI *et al.*, 2001). O crescimento da indústria de enzimas tem sido vertiginoso, principalmente nos setores ligados a alimentação animal, farmacêutica e síntese de compostos químicos, na indústria processadora de papel e produção de biocombustíveis (JOHNSON, 2013).

Em uma seleção destinada a descobrir novos micro-organismos com propriedades metabólicas úteis e de interesse econômico, investigadores focaram em ecossistemas de regiões geladas e quentes, e sedimentos marinhos. A pesquisa que é realizada em ambientes extremos foi chamada de bioprospecção (BONILLA, 2013).

No meio ambiente há uma vasta diversidade de micro-organismos com potencialidade para produzir enzimas que possam ser economicamente viáveis, entre eles bactérias, fungos filamentosos e leveduras (SANCHEZ *et al.*, 2009; SHARMA *et al.*, 2013). Dentre esses micro-organismos podemos destacar aqueles que produzem enzimas celulolíticas, xilanolíticas, amilolíticas e lipolíticas. Diante das inúmeras vantagens do uso de enzimas, muitas pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de viabilizar o processo de produção destas em escala industrial, principalmente no que diz respeito à redução do custo de sua aplicação. (JAEGER;EGGERT, 2002).

Dessa maneira, é recorrente a busca pelos pesquisadores por novas fontes de micro-organismos com alta atividade enzimática e que produzam moléculas com diferentes propriedades e especificidades, visando à redução dos custos na aplicação de enzimas em tecnologias industriais por meio de novos processos de produção ou adaptando os já existentes, o que agrega alto valor comercial a essas moléculas (KAMINI *et al.*, 2000).

A descoberta da capacidade metabólica dos micro-organismos frente a uma vasta gama de substratos naturais forneceu a base para o início de pesquisas para explorar o potencial de micro-organismos para fins industriais usando engenharia genética para modificar e melhorar suas propriedades, entre elas, a eficiência para a realização dos processos que visam obtenção de insumos biológicos de importância comercial e econômica (SCHMIDT, 2010).

A Biotecnologia Microbiana tem se diversificado em termos de seus objetivos, no entanto, sempre focada em dar solução a dois problemas: a demanda mundial energética e fonte de proteína para a alimentação humana e animal (BONILLA, 2013). Os micro-organismos podem produzir insumos que são comumente usados para a indústria de alimentos e medicamentos (ácido orgânicos, aminoácidos, biossurfatantes, enzimas, exopolímeros, pigmentos, etc.), alguns dos quais, como no caso dos pigmentos e, especificamente, os carotenóides podem ser empregados com diferentes finalidades: corantes alimentares, antioxidantes e precursores de vitaminas (OTERO *et al.*, 2011).

Em algumas das aplicações microbianas são utilizados resíduos agrícolas e agroindustriais como fonte de carbono para a preparação de meios

de cultura. Um aspecto relevante da Biotecnologia tem sido a recuperação desses resíduos, fornecendo usos alternativos para os materiais orgânicos que causam problemas de poluição ambiental (SAVAL, 2012). Os principais resíduos oriundos de bioprocessos são de natureza lignocelulósica, cujas utilizações podem ser destinadas a produção de biomassa microbiana e enzimática para a produção de rações e biocombustíveis (BONILLA, 2013).

3.1.1 Amilases

Amilases são hidrolases e possuem a função de hidrolisar as ligações glicosídicas dos polissacarídeos, atuando sobre as ligações α -1,4 e α -1,6 presentes no amido (KOBLOITZ, 2008). Representam importantes enzimas industriais com aplicações nas indústrias têxteis, de cervejas, bebidas, panificação, ração animal, indústria química e farmacêutica (GUPTA *et al.*, 2003; OLIVEIRA, *et al.*, 2010).

As amilases atuam também na digestão, como as amilases salivar e pancreática, na germinação de grãos e no crescimento microbiano (HIZUKURI, 1996). De acordo com Gupta *et al.* (2003), as amilases podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, que rompem as ligações no interior da cadeia (endoamilases); as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glicoamilases, as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato. A figura 1 mostra a ação das amilases (os círculos representam unidades de glicose e as setas representam a posição que as enzimas amilolíticas podem hidrolisar).

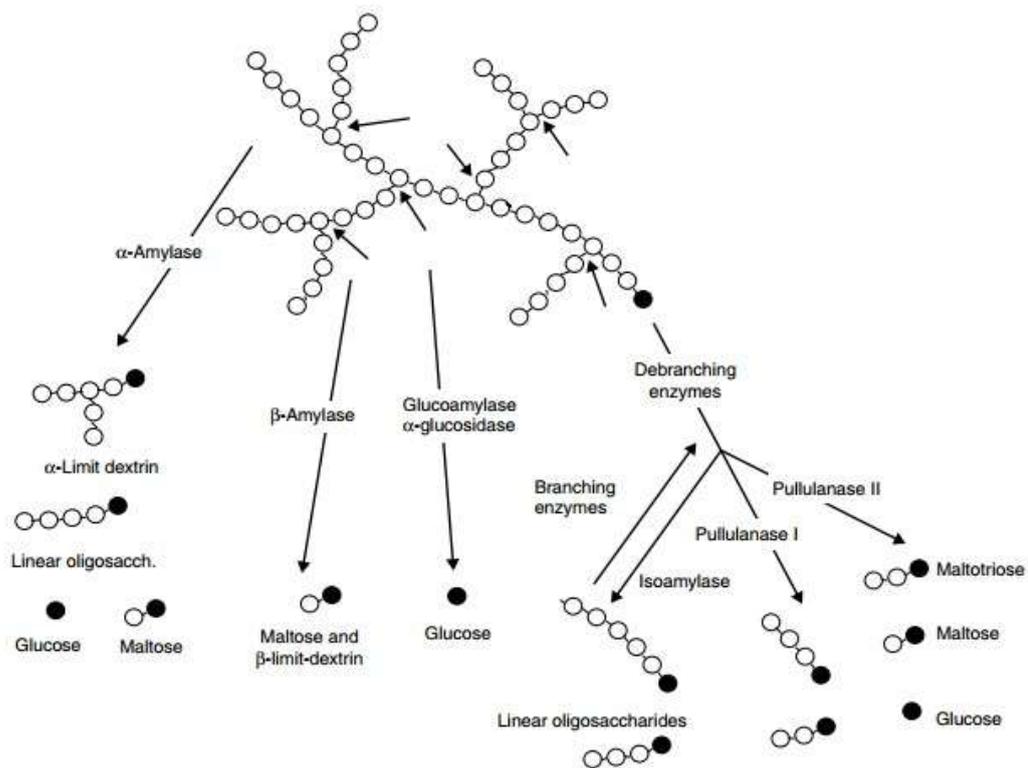


Figura 1: Hidrólise do amido por amilases com diferentes especificidades.

Fonte: (BERTOLDO e ANTRANIKIAN, 2002).

As α -amilases catalisam a hidrólise no interior da molécula do amido quebrando as ligações glicosídicas α -1,4 presentes na parte interna das cadeias de amilose ou amilopectina. Essa ação causa a formação de cadeias lineares de oligossacarídeos de vários comprimentos. As β -amilases hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4, como a α -amilase ou ambas as ligações α -1,4 e α -1,6, como a glicoamilase. A glicoamilase é responsável pela hidrólise sucessiva dos resíduos de glicose terminal dos finais não redutores das cadeias de amido. Também atua nos pontos de ramificação α -1,6-D-glicosídeo, mas com uma velocidade muito menor. Os produtos de reação são glicose e pequenas quantidades de polissacarídeos (OLIVEIRA, *et al*, 2010).

As α -amilases atuam sobre o amido gelatinizado e formam como resultado as dextrinas que são então hidrolisadas pelas β -amilases. No processamento da massa de pães a presença de açúcares na massa melhora as características do produto final influenciando a textura e o sabor da massa além da qualidade do pão, o que pode ser obtido com a adição de enzimas

amilolíticas na massa. As características favorecidas neste processo são a viscosidade e maciez da massa (SUN, 2010).

Na produção mundial de enzimas as amilases são responsáveis por aproximadamente 25%, o que lhe confere o segundo lugar, logo após as proteases. Dentre elas, a mais importante é a α -amilase, que desempenha um papel fundamental na conversão do amido em produtos de baixa massa molecular, os quais podem ser utilizados por outras enzimas do mesmo grupo (SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

As amilases podem ser produzidas por diversos micro-organismos como bactérias e fungos, porém, as mais conhecidas enzimas amilolíticas são as produzidas por fungos filamentosos, principalmente do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus* (SOARES, 2010), sendo escassos os trabalhos que estudam a secreção de amilases por leveduras (COSTA, 1996; PANDEY *et al.*, 2000). Dentre as leveduras produtoras de amilase temos as espécies *Lipomyces kononenkoae*, *Saccharomycopsis fibuligera* e *Cryptococcus flavus* (COUTINHO *et al.*, 2013). O processo de hidrólise de amido quando comparado com métodos químicos ainda é bastante oneroso para a indústria. Dessa forma a busca por micro-organismos capazes de realizar essa síntese é cada vez maior, pois as enzimas microbianas são as que mais atendem às demandas da indústria (XIE *et al.*, 2014).

3.1.2 Celulases

As celulases são enzimas hidrolíticas que conseguem realizar a hidrólise de ligações glicosídicas β -1,4 rompendo as ligações glicosídicas da celulose, liberando oligossacarídeos e glicose (VITOLLO, 2001). A celulose é o principal componente dos materiais de origem vegetal ou lignocelulósicos, e é um polímero composto de resíduos de D-glicose ligados por ligações glicosídicas β -1,4. As celulases são uma mistura de enzimas ligeiramente diferentes que incluem enzimas endo-1,4- β -glucanase, que atacam ligações internas, enzimas exo-1,4- β -glucanase, que atuam no extremo das cadeias de celulose e que

hidrolisam o dissacarídeo celobiose em duas moléculas de glicose (YAN, 2013).

A figura 2 mostra estrutura da celulose, em forma de cadeia estendida rígida resultado de suas ligações por pontes de hidrogênio. O resultado é a formação de micro fibrilas com elevada resistência à tração e uma baixa solubilidade em água (HELD, 2012).

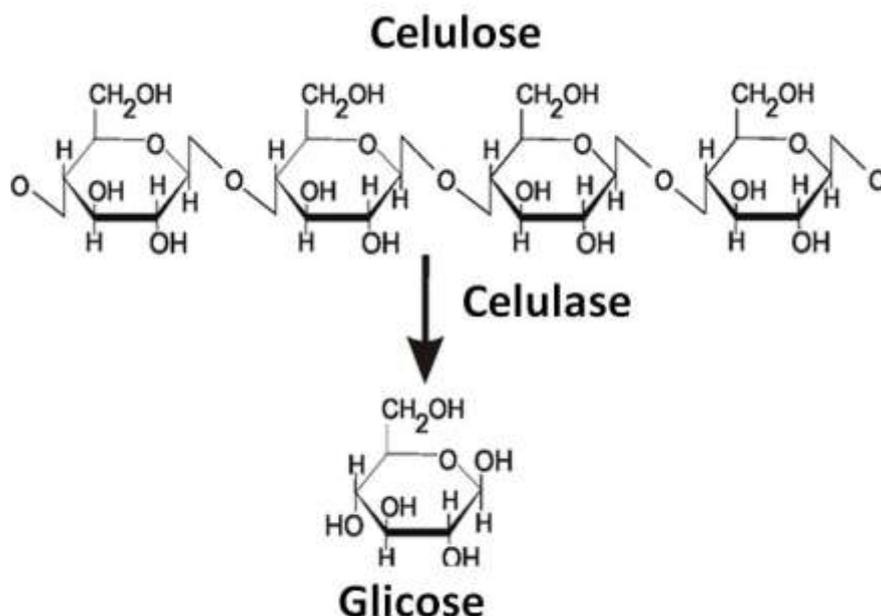


Figura 2: Estrutura da celulose sendo convertida para glicose.

Fonte: HELD, 2012.

As celulasas podem ser aplicadas nas indústrias de alimentos, detergentes, fármacos, cosméticos, biocombustíveis e tecidos (CALADO et al., 2007). São aplicadas também na indústria de sucos (clarificação), na liquefação do tecido vegetal e na extração de pigmentos de frutos que por estarem concentrados nos tecidos epiteliais possuem baixa permeabilidade e apresentam complexidade para se dissociar (KOBLOITZ, 2008).

Essas enzimas são produzidas principalmente por fungos, bactérias e protozoários. Animais herbívoros ruminantes e cupins digerem a celulose através da ação de bactérias simbióticas localizadas no rúmen e em seus intestinos, respectivamente. Diversos micro-organismos são capazes de

degradar e utilizar a celulose e hemicelulose como fontes de carbono e energia (SÁNCHEZ, 2009). As enzimas capazes de hidrolisar a celulose podem ser produzidas por fungos, como, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* ou bactérias como o *Clostridium celluovorans*. As pesquisas para a produção de celulase a nível industrial tem se concentrado nos fungos, em virtude das bactérias que produzem celulases serem anaeróbicas e apresentarem reduzida taxa de crescimento (TALEBNIA, *et al.*, 2010).

Os fungos filamentosos com capacidade de produção de enzimas celulolíticas podem ser isolados de diferentes fontes: manguezais (SOUZA *et al.*, 2009), da microbiota de invertebrados marinhos (SILVA, 2010) e do solo (RUEGUER e TAUKE-TORNISIELO, 2004). As enzimas podem ser obtidas a partir do cultivo submerso (CALADO *et al.*, 2004) ou de fermentação em estado sólido. Dessa forma se demonstra a abundante variabilidade de micro-organismos presentes no ambiente com potencial para secreção de enzimas celulolíticas.

A aplicação potencial das celulases e das β -glicosidases na produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica vem sendo objeto de estudos e, apesar dos esforços, ainda não foi produzido um complexo enzimático econômico e eficiente. A exigência de grande quantidade de enzimas no processo de hidrólise e o elevado custo de obtenção do complexo enzimático, que representa cerca de 40% do custo total da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, limita a produção do combustível em larga escala (BALAT, 2011; DESWAL *et al.*, 2011).

As celulases se destacam na produção industrial de enzimas em todo o mundo, sendo a terceira maior em termos de volume de dólares, devido às suas amplas aplicações. No entanto, as celulases podem se tornar o maior volume de enzima industrial produzida e utilizada caso o etanol obtido de biomassa lignocelulósica por via enzimática venha a tornar-se uma alternativa (SINGHANIA *et al.*, 2010).

3.1.3 Lipases

As lipases, também chamadas de glicerol éster hidrolases, são enzimas hidrolíticas que permitem a hidrólise de ligações de éster-carboxílicas em acilgliceróis, principais componentes de óleos e gorduras, liberando ácidos graxos livres e glicerol (DE CASTRO; 2004, KOBLITZ, 2008). A figura 3 mostra a ação da lipase sobre o glicerídeo.

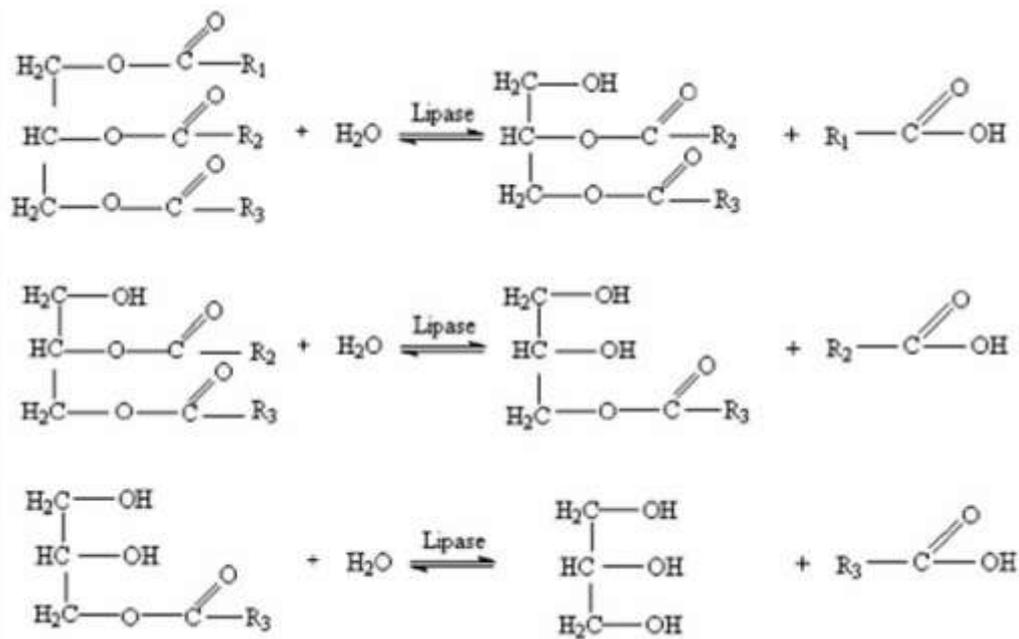


Figura 3: Hidrólise sequencial do glicerídeo catalisado por uma lipase.

Fonte: CASTRO, 2004.

As lipases podem ser obtidas de diversas fontes: animais, vegetais e microbiana (fungos, leveduras e bactérias). Em suas primeiras aplicações eram extraídas do pâncreas de animais e utilizadas como digestivo humano (DE CASTRO, 2004). No entanto o maior índice de lipases comercialmente produzidas são as de origem microbiana, devido à diversidade de atividades catalíticas, alto rendimento, facilidade de manipulação genética, fornecimento regular, pois não possuem variações sazonais e rápido crescimento de microorganismos em meios de baixo custo (HASAN, 2009).

As reações catalisadas por lipases estão entre os processos químicos de maior interesse para a indústria (DE CASTRO et al, 2010). As lipases tem potencial para aplicações nas indústrias de aditivos, alimentícias, químicas, produção de detergentes, tratamento de efluentes, beneficiamento de couro e farmacêuticas (FELTES *et al*, 2013). O que pode ser destacado como vantagem nas lipases é sua alta versatilidade e seu potencial de atuar na modificação de gordura e síntese de compostos orgânicos (ADLERCREUTZ, 2013).

As enzimas lipolíticas atualmente estão sendo estudadas devido ao seu potencial de conduzir reações de transterificação para a produção de biodiesel. Na tentativa de produzir um combustível mais sustentável, pesquisas vêm sendo feitas no sentido de viabilizar a transesterificação enzimática em escala industrial a partir dessa enzima através da seleção de micro-organismos que sejam bons produtores destas, pois originam um produto de alta pureza, de fácil recuperação e de fácil separação do glicerol (PINTO *et al*. 2005; FALCONE, 2009; RIBEIRO *et al* 2011).

A vantagem ainda das lipases microbianas frente a demais é apresentarem ampla diversidade de acordo com sua fonte de produção, variando com o substrato utilizado, pH e temperatura (NAGARAJAN, 2012).

Diversos pesquisadores têm realizado o isolamento e seleção de micro-organismos produtores de lipases das mais variadas fontes. Dentre os fungos filamentosos, os reportados como melhores produtores são os dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Theromyces* (GONÇALVES, 2007). Dentre as leveduras, tem-se o registro de algumas preconizadas como boas secretoras de lipases, sendo elas pertencentes ao gênero *Candida*, e dentre elas as mais importantes, descritas como de grande aplicação industrial por produzir em grandes quantidades esta enzima são as espécies *Candida rugosa* e *Candida antarctica* (GACESA;HUBBLE, 1990; COLEN, 2006).

3.1.4 Xilanases

As xilanases são enzimas hidrolíticas com grande demanda e potencial. As enzimas xilanolíticas, capazes de hidrolisar a xilana, podem ser produzidas por uma variedade de micro-organismos, no entanto os fungos filamentosos se destacam entre os maiores produtores (HALTRICH *et al.*, 1996). De acordo com Haltrich (1996), a produção de xilanases em escala industrial é dominada pelas espécies *Aspergillus sp* e *Trichoderma sp*.

Enzimas xilanolíticas digerem polímeros de xilana, que são os principais constituintes da hemicelulose, em xilose. Xilanas são heteropolímeros consistindo principalmente dos açúcares xilose e arabinose (pentoses). O principal constituinte do esqueleto da xilana consiste em ligações do tipo β - 1,4 e resíduos de xilose ligados com cadeias laterais que se ramificam à partir dos átomos de carbono 2 e 3 (Figura 4) (YAN, 2013).

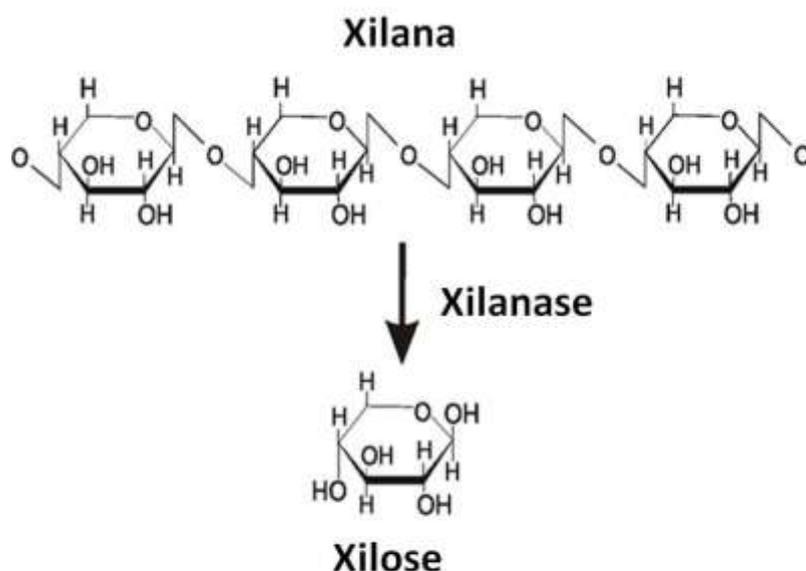


Figura 4: Estrutura da Xilana sendo convertida em xilose.

Fonte: HELD, 2012.

Xilana é o polissacarídeo mais abundante presente em madeiras e plantas e é responsável por 20-35% do peso seco total da biomassa vegetal (KAMBLE, 2012). Nas madeiras menos densas, xilanas são menos abundantes

e podem compreender cerca de 8% do peso seco total (KHANDEPARKAR, 2006). De acordo com Chidi *et al* (2008) a xilana é encontrada principalmente na parede celular secundária, e devido à sua complexidade estrutural, para a degradação completa da xilana é necessário o emprego de várias enzimas hidrolíticas (KNOB, 2013).

Os micro-organismos são indispensáveis na produção de xilanases, as quais são produzidas por vários gêneros e espécies de bactérias e fungos. Várias espécies de *Bacillus* e fungos filamentosos secretam quantidades elevadas de xilanases (BARRATO, 2011). A produção industrial de enzimas em larga escala está ligada ao seu custo de produção, e uma vez que se faz necessário reduzir esse custo, o uso de substratos baratos como resíduos de agroindústrias, se torna uma alternativa eficaz de economia e sustentabilidade.

As xilanases tem importância industrial, pois podem ser utilizadas para o branqueamento de pasta utilizada na produção de papel, aumentando o brilho, para melhorar a digestibilidade de alimentos utilizados como ração para animais e utilização na indústria alimentícia como clarificador de sucos de frutas e vinhos, na fabricação de pães de melhor qualidade, no processamento de sucos, frutas e vegetais, assim como na etapa da filtração da cerveja (BECKER *et al*, 2009). Aplicações de enzimas xilanolíticas evitam a utilização de produtos químicos que são caros e causam poluição (KNOB, 2013).

3.2 Enzimas e a produção de biocombustíveis

As enzimas apresentam grande relevância para a indústria de biocombustíveis, pois podem ser aplicadas em substituição aos processos químicos tradicionais (SALUM, 2011), uma vez que as reações enzimáticas são realizadas em condições brandas de temperatura e pH, e não geram resíduos químicos, podendo ser reutilizadas. No entanto apresentam desvantagens como alto custo. Uma alternativa aparentemente viável é a imobilização de enzimas. O principal interesse em imobilizar uma enzima é proporcionar a reutilização das mesmas com uma atividade catalítica superior ao da sua forma livre (DAMASO, 2013).

As amilases representam 25% do mercado de enzimas e encontram aplicações em todos os processos industriais que necessitam da hidrólise parcial ou completa do amido (SAXENA et al., 2007). O bioetanol produzido a partir de amiláceos necessita dessa hidrólise para transformar o amido em açúcares fermentescíveis. A habilidade das amilases em hidrolisar o amido *in natura* é uma propriedade tecnologicamente interessante, uma vez que tais enzimas podem ser usadas no processamento de amido para a produção de energia limpa a partir de resíduos agrícolas com conteúdo amiláceo (LI et al, 2007).

Recentes avanços em enzimas para a conversão de biomassa celulósica em açúcares trouxe o etanol celulósico ou da biomassa vegetal à beira da realidade comercial. Na produção do etanol celulósico são utilizadas enzimas celulolíticas e xilanolíticas. Um desafio para a indústria de biomassa celulósica será a forma de produzir, colher, armazenar e entregar grandes quantidades de matéria-prima para biorrefinarias de uma maneira econômica e ambientalmente sustentável. O desenvolvimento de micro-organismos geneticamente melhorados (GEMs) e enzimas industriais especializadas têm melhorado muito a eficiência da produção de etanol (MATTHEW T. CAR; JAMES R. HETTENHAUS, 2009).

O Brasil também tem investido nessa tecnologia com a construção da primeira usina de etanol celulósico em escala comercial do País, sediada no Estado de Alagoas. Está representa um grande avanço para o Brasil porque o coloca entre os países que já tem planos concretos de utilização dessa tecnologia. A usina do grupo GraalBio, terá capacidade de produção de 82 milhões de litros/ano e meta para até 2020 de produzir 1 bilhão de litros/ano (UNICA, 2013).

Para acelerar o desenvolvimento em escala comercial do etanol de segunda geração, produzido a partir da palha e do bagaço da cana-de-açúcar, o Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) abriu uma linha de crédito em 2012, que vem sendo utilizada por diversas empresas ativas no desenvolvimento de tecnologias para a produção de biocombustíveis de segunda geração, como Abengoa e DuPont (UNICA, 2013).

Vários desafios tecnológicos para a produção de etanol celulósico comercial ainda permanecem. Estimativas atuais do Departamento de Energia dos Estados Unidos estimam o custo de produção de etanol celulósico em dois ou três dólares por galão. A eficiência do sistema depende ainda de melhorias nos setores de coleta, transporte e armazenamento de biomassa celulósica e em tecnologias de pré-tratamento mais eficientes, para melhorar a receptividade de biomassa para a atuação das enzimas celulase e xilanase (MATTHEW T. CAR; BRENT ERICKSON, 2009).

Nesse contexto há ainda espaço para melhorias em coquetéis enzimáticos de celulase e organismos de fermentação mais eficazes para converter pentoses e hexoses em etanol e isso somente podem ser conquistados com a inserção de micro-organismos geneticamente modificados (MATTHEW T. CAR; BRENT ERICKSON, 2009).

A hidrólise utilizando enzimas adequadas representa um método eficaz para liberar açúcares presentes no material lignocelulósico. Nesse processo as enzimas celulolíticas e xilanolíticas catalisam a reação permitindo a hidrólise da celulose, hemicelulose e xilana (TALEBNIA, *et al.*, 2010). As enzimas capazes de hidrolisar a celulose e xilana podem ser produzidas por fungos, como: *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* ou bactérias como o *Clostridium cellulovorans*. As pesquisas para a produção de celulase a nível industrial tem se concentrado nos fungos, em virtude das bactérias que produzem celulases serem anaeróbicas e apresentarem reduzida taxa de crescimento (TALEBNIA, *et al.*, 2010).

A produção de etanol a partir de material lignocelulósico, utilizando como micro-organismo para fermentação *saccharomyces cerevisiae*, possui uma limitação visto que essa levedura não apresenta aptidão para fermentar pentoses, como a xilose e arabinose (CARDONA *et al.*, 2010). Entre as leveduras que possuem a especificidade para fermentar xilose, e podem ser aplicadas industrialmente destaca-se a *Pichia stipitis*, que fermenta xilose e produz etanol com um alto rendimento (CHO *et al.*, 2010).

Em outra corrente tem-se o biodiesel, um biocombustível obtido através do processo de transesterificação, que pode ser química ou enzimática. A

transesterificação de triacilgliceróis para a síntese de ésteres metílicos ou etílicos (ambos usados como biodiesel), pode ser realizada por catálise química ou enzimática. A catálise química, apesar de bons rendimentos, pouco tempo de reação necessita de elevadas temperaturas e gera resíduos tóxicos, além de produzir toneladas de glicerina com baixo valor comercial. A catálise enzimática, por outro lado, acontece em condições brandas e a glicerina produzida tem alta pureza, alcançando valores de mercado mais elevados (RANGANATHAN *et al.* 2008). A conversão de triacilglicéris em acil-ésteres por transesterificação tem sido proposta para permitir a utilização de óleos vegetais como fonte de combustível renovável e alternativo ao petróleo (NIELSEN *et al.* 2008).

Bajaj *et al.* (2010), utilizando lipases de *Pseudomonas fluorescens*, *Cromobacterium viscosum*, *Penicillium expansum* e *Candida antarctica*, realizaram a produção de biodiesel por transesterificação enzimática e relataram rendimentos entre 92 e 98,4%. O motivo principal de a transesterificação química ser utilizada atualmente em detrimento da enzimática é o custo elevado das lipases. Também existem outros fatores, como a inibição da enzima pelo álcool e o glicerol, presentes na mistura de reação. As lipases descritas como mais resistentes aos alcoóis no processo catalítico são as de *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida Antarctica*, *Pseudomonas cepacia*, além da lipase psicrófila de *Photobacterium lipolyticum* (YANG *et al.* 2009).

3.3 Leveduras produtoras de hidrolases

As leveduras são fungos unicelulares, apresentam forma cilíndrica, esférica ou oval e em sua maioria são classificados como ascomicetos. A reprodução das leveduras ocorre de duas distintas formas: assexuada por brotamento e sexuada, por meio da fusão de duas células (MADIGAN *et al.*, 2004; GONÇALVES, 2007). Estimativas recentes indicam que somente 1% de todas as espécies de leveduras esteja descrita, embora cerca de 1.500 espécies já tenham sido descritas (OLIVERA, 2009).

Estes micro-organismos estão amplamente difundidos na natureza, em diversos substratos como folhas, frutos, solo, ar, lagos, rios, mares ou habitando o interior de insetos e animais e muitos tem sido estudados sob o ponto de vista tecnológico e industrial. As leveduras são utilizadas desde tempos remotos na fabricação de bebidas alcoólicas, no crescimento de massas de panificação, e mais recentemente, na síntese de vitaminas, gorduras e proteínas (CASADEI, 2012).

O emprego na fermentação de açúcares é a mais antiga aplicação das leveduras e a espécie mais utilizada nesse processo é a *Saccharomyces cerevisiae*, devido ao fato de converter rapidamente o açúcar em álcool, com baixa produção de componentes secundários. Além disso, essa possui alta resistência a álcool no meio em que se encontram e tolerância à ampla faixa de temperatura, sendo capaz de manter sua atividade celular em ambientes ácidos (VAN ZYL *et al.*, 2012).

A habilidade das leveduras de utilizar para sua nutrição uma gama variada de nutrientes obtidas dos mais diferentes substratos faz com que elas se encontrem nos mais variados locais, com condições ambientais diferenciadas. A faixa ideal de temperatura e pH para seu crescimento são respectivamente, entre 25 a 30° C e pH de 4 a 7 (MADIGAN *et al.*, 2004). Essa habilidade permite às leveduras estarem presentes em diferentes nichos ecológicos e secretarem enzimas capazes de hidrolisar diferentes carboidratos e fontes de carbono (GALVAGNO;FORCHIASSIN, 2004).

As leveduras são capazes de catabolizar diferentes compostos, orgânicos e inorgânicos, extraíndo a energia necessária à sua sobrevivência. Esse atributo permite sua utilização como agente biológico na solução dos problemas ambientais, como os causados por rejeitos não tratados e lançados. Os diferentes substratos nos quais as leveduras podem se desenvolver resultou, então, no surgimento de enzimas eficientes em produzir moléculas orgânicas diferentes das já conhecidas e produzidas pela natureza, o que confere a células microbianas vantagens adicionais, tais como a exploração de novos nichos ecológicos e a sua utilização em diferentes fontes energéticas (FLEURI, 2008).

Diversos são os trabalhos realizados a fim de identificar novos isolados para a produção de enzimas hidrolíticas (amilases, celulases, lipases e xilanases). Peixoto (2006) isolou 390 leveduras de diferentes regiões brasileiras, dessas 12,3% apresentaram atividade para amilases, 21,54 %, para celulase, 11,79% para celulases em meio sólido. Fossi *et al.* (2005), isolaram leveduras amilolíticas de solos ricos em amido (moinhos de farinha, mercado de farinha), 12 linhagens apresentaram atividade amilolítica. Farias (2008) trabalhou com a produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de solos de áreas preservadas em Roraima, das 397 avaliadas para produção de hidrolases, aproximadamente 90% demonstraram pelo menos uma atividade enzimática e 30%, duas ou mais atividades. Alonso *et al.*, 2010 avaliaram a capacidade de degradação enzimática de 16 linhagens de leveduras. Dessas, 9 apresentaram atividade amilolítica em meio sólido.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Barato *et al* (2011) trabalharam com uma seleção de leveduras produtoras de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina e obtiveram microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas, desses isolados 18 microrganismos apresentaram atividade amilolítica, 4 pectinolíticas e 13 xilanolíticas, a partir de amostras de solo e fontes agroindustriais. Brasiliano *et al* (2012), realizaram uma seleção de micro-organismos produtores de amilase isolados em áreas de cerrado, e obtiveram resultados promissores para os isolados. Melo (2014), trabalhou com Leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex Balzani* (*hymenoptera: formicidae*) de áreas de cerrado do estado do Tocantins e encontrou resultados positivos 95% das linhagens testadas apresentaram produção de pelo menos uma enzima. Xilanase foi detectada em 64,4% do total de estirpes, enquanto celulase, amilase e lipase foram produzidas por 52%, 10,4% e 26,1% das linhagens, respectivamente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Linhagens de leveduras

As linhagens de leveduras utilizadas neste estudo foram isoladas pelo Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LAMBIO) da Universidade Federal do Tocantins (UFT) a partir de folhas em decomposição coletadas em 3 córregos. Os grupos receberam a seguinte nomenclatura de acordo com o local de coleta: grupo TAQ (folhas em decomposição do Ribeirão Taquaruçu), BIO (folhas em decomposição de Córregos em Taquaruçu), ABRT (bromélias terrestres) e AS (folhas em decomposição do Ribeirão Água Suja). As linhagens estão depositadas na Coleção de Culturas Carlos Augusto Rosa da UFT mantidas a -80°C .

4.2. Seleção de linhagens produtoras de hidrolases

A produção de amilases, celulasas, lipases e xilanasas foi avaliada em 205 linhagens de leveduras. Todas as linhagens foram reativadas em placas de meio sólido contendo ágar Sabouraud (20 g.L^{-1} de glicose, 5 g.L^{-1} extrato de levedura, 10 g.L^{-1} de peptona e 18 g.L^{-1} de ágar e $0,2\text{ g.L}^{-1}$ de cloranfenicol) para obtenção de colônias isoladas pela técnica de estriamento. As placas foram incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 48 h.

Para verificar a capacidade hidrolítica das leveduras, as linhagens foram inoculadas, com o auxílio de palitos estéreis, em placas de Petri contendo fonte de carbono específica para cada uma das hidrolases estudadas. Foram inoculadas 6 linhagens por placa e as placas foram incubadas em estufa com temperatura controlada a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 dias para as enzimas amilase e lipase, 10 dias para celulase e 15 dias para xilanase.

Os resultados foram dados como Índice Enzimático (IE), que corresponde à relação entre o diâmetro do halo de degradação do substrato pelo diâmetro da colônia do micro-organismo de acordo com a metodologia de

Hankin; Anagnostakis, (1975). Os halos de degradação foram aferidos com o auxílio de paquímetro.

Todos os ensaios foram realizados em 3 repetições e os dados analisados por análise estatística das médias das repetições dos Índices enzimáticos (IE) de acordo com um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC). Os resultados foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias com auxílio do programa *Assistat 7.0*.

4.2.1 Amilases

A atividade amilolítica foi determinada de acordo com metodologia descrita por Looder *et al.* (1970), em meio contendo: 20 g.L⁻¹ amido solúvel, 5 g.L⁻¹ de Sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, 10 g.L⁻¹ de KH₂PO₄ e 18 g.L⁻¹ de ágar. Após incubação os halos de hidrólise foram revelados de acordo com Hankin e Anagnostakis (1975), onde vapor de iodo foi utilizado como revelador. O resultado da reação enzimática positiva foi identificado pela formação de um halo translúcido em volta da colônia em contraste com a coloração azulada adquirida pelo meio. A figura 5 apresenta a coloração do meio e formação de halo após utilização de vapor de iodo nas placas após incubação.

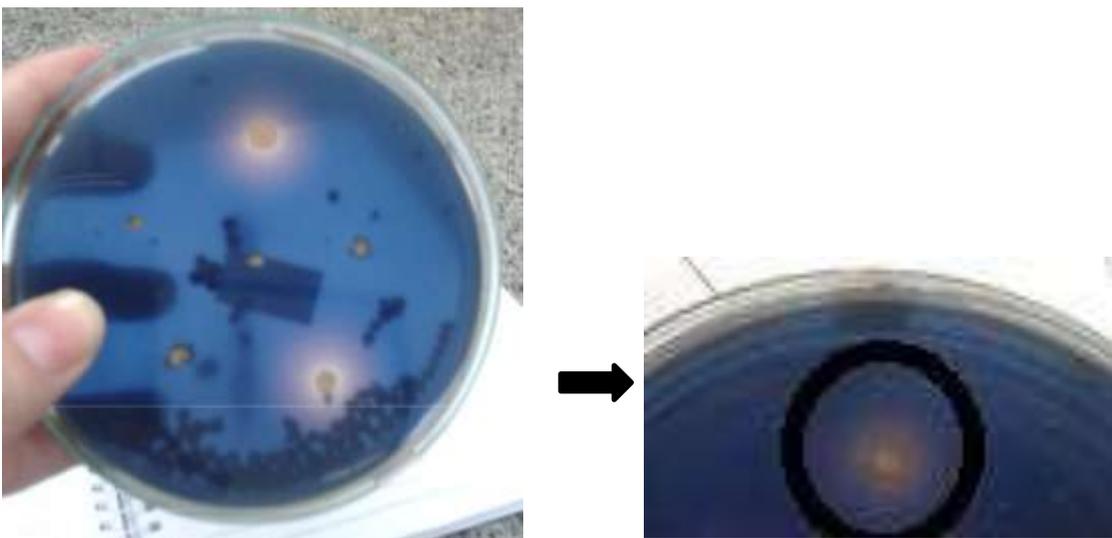


Figura 5: Placas após incubação e revelação com vapor de iodo.

4.2.2 Celulases

A produção de celulases foi determinada de acordo com metodologia descrita por Strauss *et al.* (2001) e Buzzini e Martini (2002), com modificação. A atividade foi testada em meio YP-CMC: 10g g.L⁻¹ extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ de peptona, 4 g.L⁻¹ de carboximetilcelulose e 20 g.L⁻¹ de ágar.

Os halos de hidrólise foram revelados de acordo com Maijala *et al.* (1991), onde 10 mL de solução aquosa de corante vermelho congo a 0,3 g.L⁻¹ foram adicionados à placa, após 30 minutos o excesso foi retirado e adicionou-se 5 mL de solução de cloreto de sódio a 1 mol.L⁻¹, que foi descartada após 15 minutos. As linhagens produtoras de enzimas celulolíticas foram identificadas pela presença de um halo translúcido em volta da colônia, em contraste com a coloração vermelho mais intenso do restante do meio.

A figura 6 demonstra o processo de adição do vermelho congo nas placas após período de incubação e a formação do halo translúcido.

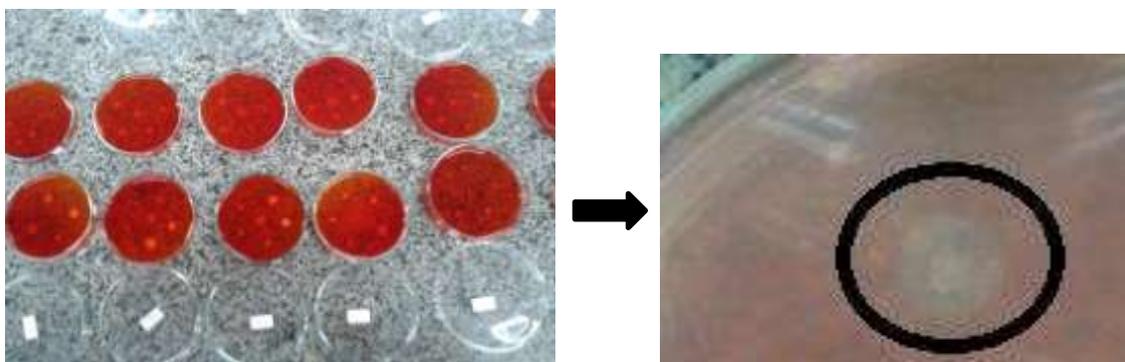


Figura 6: Placas após incubação e revelados com vermelho congo.

4.2.3 Lipases

A produção da enzima lipase foi determinada de acordo com metodologia descrita por Sierra (1956), com modificações. A atividade foi testada em meio contendo: 10 g.L⁻¹ de peptona, 5 g.L⁻¹ de NaCl, 0,1 g.L⁻¹ de CaCl₂, 18 g.L⁻¹ de ágar e 10 g.L⁻¹ de Tween-20 (monolaurato de sorbitan) como

substrato indutor. O pH foi ajustado para 6,0 e o *Tween-20* foi auto-clavado separadamente do meio, adicionado a esse antes de vertê-lo nas placas de Petri e sua homogenização ocorreu por agitação.

A leitura foi realizada de acordo com Sierra (1956), onde foi possível visualizar-se um precipitado cristalizado, devido à formação de cristais de sais de cálcio ao redor das colônias produtoras de lipase. A figura 7 apresenta a precipitação formada no meio pelos sais de cálcio.

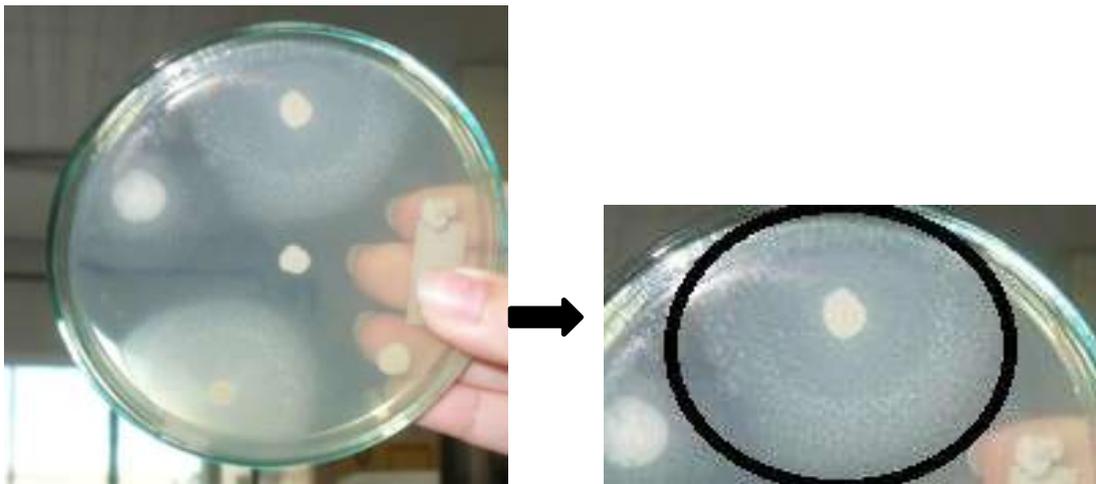


Figura 7: Precipitação formada por sais de cálcio.

4.2.4 Xilanases

A produção da enzima xilanase foi determinada de acordo com metodologia descrita por Mendes *et al.* (2012). A atividade foi testada em meio contendo: 6,7 g.L⁻¹ YNB (Base de Nitrogênio para leveduras), 10 g.L⁻¹ de Xilana *beechwood* (*Sigma*) e 18 g.L⁻¹ de ágar.

A revelação dos halos de hidrólise foi realizada de acordo com Hankin e Anagnostakis, (1975), onde vapor de iodo foi utilizado como revelador dos halos de hidrólise. O resultado da reação enzimática positiva foi identificado pela formação de um halo translúcido em volta da colônia em contraste com a coloração azulada adquirida pelo meio.

A figura 8 apresenta a coloração do meio após utilização de vapor de iodo nas placas após incubação e formação de halo.



Figura 8: Placas após incubação e revelação com vapor de iodo.

4.3 Produção dos Extratos Enzimáticos Brutos por fermentação submersa

A produção das hidrolases foi verificada para as 5 (cinco) linhagens que apresentaram maior Índice Enzimático nos testes realizados em meio sólido, para cada enzima. Os ensaios foram realizados em meio líquido específico contendo o substrato acrescido de uma alíquota de 10 g.L^{-1} de biomassa (peso úmido).

A biomassa utilizada como inóculo foi obtida através da incubação de cada linhagem por 18 horas em 30 ml de meio líquido contendo: *Ágar Sabouraud* (30 g.L^{-1} de glicose, 5 g.L^{-1} extrato de levedura, 10 g.L^{-1} de peptona e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de cloranfenicol) em *Erlenmeyer* de 125 ml, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) e agitação de 150 rpm. Excessão para a enzima lipase onde o inóculo consistiu no cultivo da levedura em caldo *Gymp* (20 g.L^{-1} de glicose, 10 g.L^{-1} de extrato de malte, 5 g.L^{-1} de extrato de levedura, 2 g.L^{-1} de NaH_2PO_4) por 16 horas a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) sem agitação. Após o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas a 3800 rpm, por 1 (uma) hora, o sobrenadante foi descartado, sendo o precipitado de células utilizado para estimar a massa celular utilizada como inóculo em cada ensaio. Para lipase foi utilizado 10 mL do caldo *Gymp* após o tempo de incubação.

Todos os ensaios foram realizados em *erlenmeyeres* de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido específico para cada uma das enzimas de

interesse. Os frascos foram incubados em *shaker* rotatório com temperatura controlada a 30 °C, 150 rpm, exceto lipase para qual foi utilizado 28 °C e 200 rpm. Após incubação as amostras foram centrifugadas a 3800 rpm por 1 (uma) hora e o sobrenadante EEB (extrato enzimático bruto) utilizado para dosagem das atividades enzimáticas.

4.3.1 Produção de amilases

As linhagens amilolíticas selecionadas foram inoculadas em meio líquido contendo 20 g.L⁻¹ de amido, 5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂ SO₄, 10 g.L⁻¹ de KH₂PO₄.

A atividade amilolítica foi determinada após incubação do Extrato Enzimático Bruto com uma solução de amido 0,5% (p/v). A mistura reacional foi composta de 1 mL de solução de amido solúvel a 0,5% (p/v), 200 µL de tampão acetato de sódio 0,5 M e 800 µL de extrato enzimático bruto, incubados em diferentes temperaturas e com diferentes valores de pH de acordo com o delineamento experimental. Após 30 minutos a reação foi paralisada com choque térmico imergindo os tubos em água a 1 °C e foram retiradas alíquotas da mistura reacional para determinação da atividade de α-amilase e glicoamilase.

A atividade de α-amilase foi determinada espectrofotometricamente medindo-se a variação da intensidade da cor do complexo iodo-amido segundo o método descrito por Fuwa (1954), onde 40 µL de tampão acetato de sódio (0,5 mol/L) e 60 µL de água destilada foram adicionados 100 µL da amostra (extrato bruto). Após a homogeneização da mistura foram adicionados 200 µL de ácido acético 1 mol.L⁻¹ e 200 µL da solução de iodo/iodeto (1% Iodo em etanol absoluto, 10% iodeto de potássio em água destilada na proporção de 1:1:3). O volume foi completado para 5 mL com água destilada, homogeneizado e a absorbância determinada a 660 nm. A quantidade de amido consumido foi calculada de acordo com uma curva padrão construída com quantidades crescentes de amido solúvel de 0 a 0,5 mg.mL⁻¹.

Uma unidade de α-amilase (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 0,1 mg de amido por mL por minuto nas condições de ensaio.

A atividade de glicoamilase foi determinada espectrofotometricamente pela dosagem da glicose liberada e foi determinada pela medida da liberação de grupos redutores utilizando-se o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) de acordo com o método descrito por Miller (1959). Foi adicionado 1 mL de DNS a 1 mL da mistura reacional e a solução mantida em ebulição por 5 min, resfriados em banho de gelo e adicionados 10 mL de água destilada. A medição foi conduzida em espectrofotômetro a 540 nm.

Uma unidade de atividade da enzima de glicoamilase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose por mL por minuto nas condições de ensaio. A curva de calibração para glicoamilase foi preparada utilizando-se glicose como padrão.

4.3.2 Produção de celulases

As linhagens celulolíticas selecionadas foram inoculadas em meio líquido contendo 10 g.L^{-1} de extrato de levedura, 20 g.L^{-1} extrato de levedura e 10 g.L^{-1} de carboximetilcelulose (Sigma).

A atividade enzimática foi determinada pela medida da liberação de grupos redutores utilizando-se o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). A mistura reacional utilizada foi obtida conforme descrito no item 4.3.1. As misturas reacionais foram incubadas em diferentes valores de pH e temperaturas de acordo com o planejamento experimental proposto e a reação foi paralisada com choque térmico imergindo os tubos em água a 1°C. Foi adicionado 1 mL de DNS a 1 mL da mistura reacional e a solução mantida em ebulição por 5 min, resfriados em banho de gelo e adicionados 10 mL de água destilada a medição foi conduzida em espectrofotômetro a 540 nm.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de glicose por mL por minuto nas condições de ensaio. A curva de calibração foi preparada utilizando-se glicose como padrão.

4.3.3 Produção de lipases

As linhagens lipolíticas selecionadas foram inoculadas em meio líquido contendo $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona, 5 g.L^{-1} de NaCl_2 e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCl_2 e suplementado com óleo de oliva ($20,0 \text{ g.L}^{-1}$) para a indução da lipase. O meio foi esterilizado durante 30 min a $120 \text{ }^\circ\text{C}$, e o óleo de oliva, foi esterilizado separadamente por calor seco ($180 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 min) e assepticamente adicionado ao o meio antes da inoculação de acordo com a metodologia de (BUSSAMARA *et al*, 2010).

A atividade da lipolítica foi determinada com *p*-nitrofenil palmitato (pNPP) como substrato. O pNPP foi primeiramente solubilizado em 0,5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) e então diluído a $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ com tampão McIlvaine em diferentes valores de pH de acordo com o planejamento experimental proposto e suplementado com 5 g.L^{-1} de Triton X-100. Após pré-incubação do substrato em banho-maria por 5 min., em diferentes valores de temperatura de acordo com o planejamento experimental proposto foi adicionada 10 μL do extrato enzimático bruto. A reação foi interrompida após 1 (um) minuto com choque térmico ($90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 min), seguido da adição de 1 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm (coeficiente de extinção molar para *p*-nitrofenol (pNP): $1,8 \times 10^7 \text{ mol.L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) de acordo com a metodologia de (ALMEIDA, 2012).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de pNP por min por mL. A curva de calibração foi preparada utilizando-se *p*-nitrofenol como padrão.

4.3.4 Produção de xilanases

As linhagens xilanolíticas selecionadas foram inoculadas em meio líquido contendo $6,7 \text{ g.L}^{-1}$ de YNB, 4 g.L^{-1} de Xylana (Sigma).

A atividade enzimática foi determinada pela medida da liberação de grupos redutores utilizando-se o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). A mistura reacional utilizada foi obtida conforme descrito no item 4.3.1. As misturas reacionais foram incubadas em diferentes valores de

pH e temperaturas de acordo com o planejamento experimental proposto e a reação foi paralisada com choque térmico imergindo os tubos em água a 1°C. Foi adicionado 1 mL de DNS a 1 mL da mistura reacional e a solução mantida em ebulição por 5 min, resfriados em banho de gelo e adicionados 10 mL de água destilada e a medição foi conduzida em espectrofotômetro a 550 nm (GHOSE, 1987).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de xilose por ml por minuto de incubação. A curva de calibração foi preparada utilizando-se xilose como padrão.

4.4 Efeito da Temperatura e do pH sobre a atividade enzimática

Para avaliar o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas foi realizado um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional 2² (DCCR) com 11 ensaios, sendo 4 pontos axiais, 4 fatoriais e 3 repetições no ponto central. A variável dependente selecionada para este estudo foi a atividade enzimática, expressa em U/mL, e as variáveis independentes escolhidas foram o pH e temperatura de reação.

O efeito da temperatura e do pH sobre a atividade das enzimas foi determinado através da reação nas temperaturas entre 30°C a 50°C, e o pH entre 4 e 6 (Tabela 2).

Tabela 2. Valores das variáveis independentes em cada nível do planejamento experimental DCCR 2².

Variáveis Independentes	Símbolo	Níveis				
		-1,41	-1	0	1	1,41
pH	X	4	4,3	5	5,7	6
Temperatura (°C)	Y	30	33	40	47	50

Os efeitos foram considerados significativos para $p < 0,10$. Os resultados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e com auxílio do programa *Statistical Analysis System*® versão 9.0, foram

obtidos os modelos matemáticos e os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de linhagens de leveduras pela técnica de *screening*

O *screening* em meio sólido para os substratos contendo diferentes fontes de carbono revelaram o potencial das leveduras testadas em produzir e secretar enzimas hidrolíticas, sendo que 145 linhagens (71%) do total das 205 leveduras testadas apresentaram atividade em pelo menos uma das fontes de carbono testadas (Figura 9).

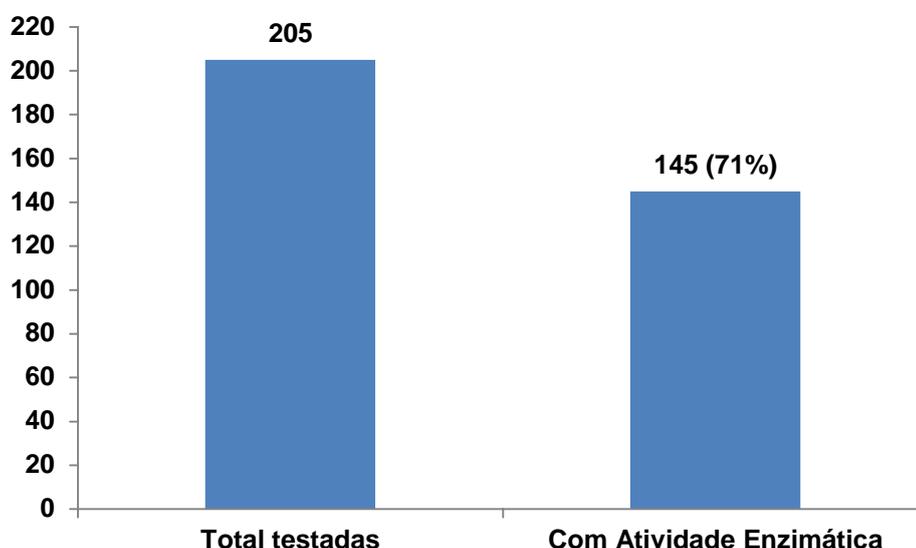


Figura 9: Total de leveduras testadas e porcentagem de produtoras de hidrolases.

Apesar dos avanços nos campos da genética terem ocasionado impactos na produção de enzimas, práticas de *screening* visando à seleção de micro-organismos com habilidades para produção de enzimas continuam a ter importância biotecnológica e são citadas por diversos autores (STEELE; STOWERS, 1991; BULL *et al*, 1992; BUZZINI; MARTINI, 2002; OGAWA; SHIMIZU, 2002; RUIZ *et al*, 2005).

Das leveduras avaliadas, 60 linhagens (29%) não apresentaram nenhuma atividade enzimática para as enzimas testadas (amilase, celulase, lipase e xilanase). A ausência de atividade enzimática de acordo com

Vasconcelos *et al.* (2003), pode ser atribuída à incapacidade de secreção pelas linhagens testadas, ao direcionamento da produção para o metabolismo intracelular ou pela insuficiência dos métodos de detecção utilizados.

Em um estudo sobre a atividade enzimática de leveduras isoladas da fermentação do cacau, Silva (2011) obteve 80% de resultados positivos para pelo menos umas das enzimas testadas (pectinase, protease, amilase, celulase e fosfolipases) em 70 linhagens de leveduras. Contudo, deve ser levado em consideração que para o halo ser visualizado deve haver uma combinação de diversos fatores, como a interferência da presença de outras substâncias no meio que podem originar resultados positivos pela reação com os corantes, ou negativos, por precipitar o corante e ainda por inibir a ligação da enzima com o substrato (COLEN, 2006). Além disso, de acordo com Maccheroni *et al.*, (2004) a atividade enzimática dos micro-organismos pode sofrer interferência tanto dos fatores biológicos bem como físico-químicos (pH e temperatura).

Na Figura 10, são apresentados os resultados de IE das linhagens testadas para cada uma das hidrolases de estudo. Observa-se que 61% das leveduras avaliadas apresentaram IE superior ou igual a 2, e que de acordo com Lealem & Gashe (1994) e citado por Stamford *et al* (1998), é um índice que demonstra que essas linhagens de leveduras são consideradas potencialmente viáveis para a produção enzimática e aplicação industrial.

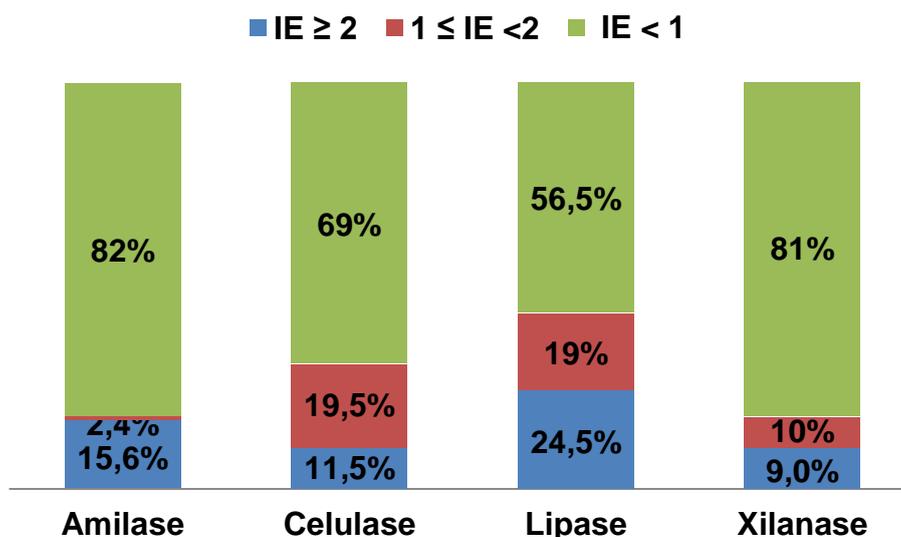


Figura 10: Percentual de Índice Enzimático das leveduras por hidrolase.

De acordo com Gonçalves *et al.* (2007), a difusão da enzima no meio é o que gera o tamanho do halo de hidrólise e o tamanho desse é influenciado pelo peso molecular que a enzima possui, o que pode impedi-la de se difundir pelo ágar, e com isso a atividade pode ser considerada inexistente mesmo havendo a secreção da enzima e presença dela em grande quantidade no extrato enzimático.

Os valores encontrados foram superiores aos descritos por Oliveira *et al.* (2007), que identificaram atividade enzimática para amilase e celulase maior que 2,0 somente em 25 (37%) das linhagens isoladas, demonstrando os potenciais desses isolados na produção de enzimas.

5.1.1 Amilase

Das 205 linhagens de leveduras testadas, 36 linhagens (17,6%) produziram amilases e os resultados encontram-se na Tabela 3. A escala $0 < IE < 1$; $1 < IE < 2$; $IE > 2$ representa, respectivamente, leveduras com fraca, moderada e forte habilidade para a produção de enzimas (STAMFORD *et al.* 1998). Das 36 linhagens positivas, 32 apresentaram Índice Enzimático maior que 2 demonstrando forte habilidade na produção de enzimas amilolíticas. A levedura AS 110 oriunda de folhas em decomposição do Ribeirão Água Suja obteve o maior índice Enzimático (4,546).

Tabela 3. Valores do IE para amilase, médias das 3 repetições.

Levedura	IE Médio*	Levedura	IE Médio*
TAQ 3	3,110 bcde	BIO 119	3,356 bc
TAQ 615	2,466 fghijlm	BIO 121	3,393 b
TAQ 11	2,276 hijlmno	BIO 141	2,483 fghijlm
TAQ 13	1,726 nopq	TAQ 330	1,723 nopq
TAQ 14	2,783 cdefghi	TAQ 465	2,870 bcdefgh
BIO 45	2,150 jlmno	TAQ 611	2,556 efghijlm
TAQ 46	2,703 defghijl	TAQ 615	2,456 fghijlm
TAQ 52	2,043 mnop	TAQ 616	2,313 ghijklmn
TAQ 54	2,203 ijlmno	TAQ 646	2,243 ijlmno
TAQ 59	2,133 lmno	AS 119	1,706 opq
TAQ 61	2,746 defghij	AS 122	3,180 bcd
TAQ 74	3,030 bcdef	AS 142	1,520 pq
BIO 76	2,580 defghijlm	AS 90	2,090 mnop
BIO 77	2,336 ghijlm	AS 49	2,883 bcdefg
TAQ 86	1,366 q	AS 99	2,306 ghijklmno
TAQ 93	2,513 efghijlm	AS 57	2,140 lmno
TAQ 100	3,370 bc	AS 11	2,036 mnop
BIO 104	2,116 mnop	AS 110	4,546 A

*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Gobinath *et al* (2005) testaram 34 espécies de levedura para a produção de amilase, e 22 não apresentaram atividade enzimática, 9 apresentaram baixa atividade e 3 apresentaram habilidade forte para a produção de enzimas amilolíticas. Landell *et al* (2009) analisando o IE de linhagens isoladas de bromélias, constatou que apenas 13% apresentaram resultado positivo para amilases. Costa *et al.* (2011) em um teste de triagem com 98 leveduras, encontraram um percentual de 16,3% de linhagens positivas para a atividade amilolítica.

5.1.2 Celulase

Das 205 leveduras testadas, 63 linhagens (30,7%) produziram celulases e os resultados encontram-se na Tabela 4. Destas, 23 (11,2%) das leveduras apresentaram Índice Enzimático maior que 2 demonstrando forte habilidade na produção de enzimas celulolíticas. Com destaque a levedura AS 122 isolada de folhas em decomposição do Ribeirão Água Suja obteve o maior índice Enzimático (3,071).

Tabela 4. Valores de IE para celulases, média das 3 repetições.

Levedura	IE Médio*	Levedura	IE Médio*
TAQ 03	1,506 op	TAQ 505	2,066 de
TAQ 08	1,263 l	TAQ 506	1,790 ij
TAQ 09	2,530 ab	TAQ 512	2,676 ab
TAQ 10	1,186 l	TAQ 544	1,463 pq
TAQ 11	1,753 j	TAQ 613	2,526 ab
TAQ 12	1,930 f	TAQ 614	1,950 f
TAQ 14	2,876 ab	TAQ 616	1,690 j
TAQ 31	1,633 j	TAQ 625	2,110 cd
TAQ 39	1,526 op	TAQ 631	2,900ab
TAQ 46	2,523 ab	TAQ 636	1,663 j
TAQ 52	1,800 ij	TAQ 638	1,303
TAQ 54	2,656 ab	TAQ 250	2,270 bc
TAQ 61	2,290 bc	AS 04	1,623 mn
TAQ 93	1,876 f	AS 07	1,736 j
TAQ 95	1,453 pq	AS 122	3,070 a
TAQ 101	1,730 j	AS 01	2,366 bc
TAQ 121	1,786 ab	AS 43	1,376 l
TAQ 139	2,223 bc	BIO 609	1,253 l
TAQ 164	1,750 j	TAQ 638	1,306 l
TAQ 232	2,366 bc	AS 68	1,393 q
TAQ 250	2,703 ab	BIO 119	1,603 no
TAQ 251	1,680 j	AS 141	1,286 l
TAQ 270	1,813 hi	AS 61	1,220 l
TAQ 296	1,960 f	AS 172	1,340 l
TAQ 344	2,266 bc	AS 03	2,346 bc
TAQ 349	2,183 cd	AS 155	1,570 no
TAQ 413	1,253 l	AS 46	1,193 l
TAQ 423	1,896 f	AS 52	2,493 ab
TAQ 474	1,886 f	AS 61	1,226 l
TAQ 475	1,980 ef	AS 43	1,440 pq
TAQ 500	2,130 cd	AS 02	2,513 ab

*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

A hidrólise enzimática está ligada a ações sinérgicas capazes de atuar distintamente no material celulósico e liberar monômeros de glicose (LYND *et al*, 2005). Em testes laboratoriais as principais fontes utilizadas para induzir a atividade celulolítica são a carboximetilcelulose, celulose microcristalina e o papel filtro.

Fuentefria (2004), em seu estudo envolvendo micro-organismos isolados a partir de filoplano de *Hibiscus rosa-sinensis*, encontrou 24% de leveduras produtoras de celulases. Os resultados são próximos aos encontrados nesse trabalho. No entanto, Farias (2008), avaliando a habilidade de leveduras isoladas de solo em degradar celulose em um teste utilizando 440 leveduras encontrou 11,4% com atividade celulolítica. Fernandes (2009), testou 24 leveduras isoladas de diversas fontes para a produção de celulases, e 6

isolados apresentaram $IE > 2,0$, sendo que o maior valor evidenciado foi de 5,83. Herculano *et. al.* (2011) ao avaliarem 189 linhagens obtidas de mamona, encontraram 56 linhagens, ou seja, 30% de produtoras de celulasas e destas 15 apresentaram IE superiores a 2,0, resultados muito semelhantes ao encontrados nessa pesquisa.

5.1.3 Lipase

Das 205 Leveduras testadas, 88 linhagens (43%) produziram lipases e os resultados encontram-se na Tabela 5. Destas, 50 leveduras apresentaram Índice Enzimático maior que 2 demonstrando forte habilidade na produção de enzima lipolítica. A levedura ABRT 461 oriunda de folhas de bromélia terrestre obteve o maior índice Enzimático (10,44).

Tabela 5. Valores de IE para lipase, média das 3 repetições.

Levedura	IE Médio*	Levedura	IE Médio*
TAQ 54	7,110 b	TAQ 142	4,940 d
TAQ 461	1,610 j	TAQ 141	2,800 h
TAQ 444	1,676 j	BIO 52	4,646 d
TAQ 02	2,843 h	BIO 39	1,806 i
TAQ 74	1,530 j	BIO 45	7,120 b
TAQ 14	1,943 i	ABRT 461	10,443 a
TAQ 632	2,030 i	AS 119	3,830 f
TAQ 72	2,503 h	AS 121	3,396 g
TAQ 669	1,516 j	BIO 76	3,946 f
TAQ 101	4,750 d	BIO 100	4,693 d
TAQ 343	4,450 e	TAQ 453	2,686 h
TAQ 61	4,470 e	TAQ 571	1,566 j
TAQ 506	2,183 i	BIO 480	1,620 j
TAQ 615	1,590 j	BIO 119	1,633 j
TAQ 12	2,953 g	AS 81	3,640 f
TAQ 97	1,386 j	AS 64	2,906 g
TAQ 109	4,976 d	AS 105	1,873 i
TAQ 75	1,460 j	AS 07	2,343 h
TAQ 488	1,483 j	AS 119	3,826 f
TAQ 667	1,506 j	AS 11	5,266 c
TAQ 396	1,560 j	BIO 43	1,436 j
TAQ 680	1,406 j	BIO 609	1,580 j
TAQ 653	1,536 j	BIO 521	1,556 j
TAQ 13	3,050 g	BIO 541	1,340 j
TAQ 611	3,463 g	B 142	3,070 g
TAQ 646	1,713 j	BIO 231	1,270 j
TAQ 164	7,626 b	BIO 149	1,563 j

TAQ 16	3,160 g	BIO 119	1,516 j
TAQ 616	5,576 c	BIO 139	2,200 i
TAQ 614	2,040 i	AS 110	3,623 f
TAQ 59	4,406 e	AS 86	2,090 i
TAQ 03	2,103 i	AS 46	1,773 i
TAQ 46	4,210 e	AS 95	1,746 i
TAQ 93	2,976 g	AS 98	1,820 i
TAQ 631	3,606 f	AS 69	1,783 i
TAQ 09	2,086 i	AS 138	1,920 i
TAQ 354	2,033 i	AS 126	1,790 i
TAQ 131	1,893 i	AS 125	3,740 f
TAQ 143	2,016 i	AS 33	2,740 h
TAQ 139	2,143 i	AS 36	1,766 i
TAQ 518	2,616 h	AS 18	1,630 j
TAQ 114	2,313 h	AS 75	1,880 i
TAQ 54	5,820 c	AS 02	1,326 j
TAQ 78	2,530 h	AS 34	1,850 i

*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Devido a seu potencial tecnológico, as lipases sempre estão no escopo de busca das indústrias (HÁ *et al.*, 2007). Lipases produzidas por micro-organismos são aditivos muito utilizados na fabricação de detergentes, na indústria farmacêutica, agroquímica, oleoquímica e de biocombustíveis, e a exploração da biodiversidade constitui a principal estratégia para expandir as fontes e o número de novas lipases (BORNSCHEUER *et al.*, 2002). Uma forma simples e rápida de detecção de novas lipases é por meio da utilização de *screening* para testar novos micro-organismos com potencial para a produção de enzimas lipolíticas (HASAN *et al.*, 2006).

Em um estudo utilizando leveduras como micro-organismo produtor de lipases, Fuentesfria (2004), utilizando *Tween 20* como indutor de produção, detectou atividade em 40% das 84 linhagens de leveduras testadas. Buzzini e Martini (2002), em um estudo utilizando 397 linhagens de leveduras obtiveram 40,3% das linhagens com habilidade para produzir enzimas lipolíticas, utilizando como substrato indutor trioleína, substrato considerado padrão para lipases (JAEGER; EGERT, 2002). Em seu trabalho com leveduras isoladas de bromélias, Lock (2007) obteve 26% de atividades positivas quanto à produção de lipase extracelular em 56 leveduras testadas. Molnárová *et al.* (2013), encontraram leveduras lipolíticas a partir de folhas. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados nessa pesquisa, onde utilizando

como substrato o *Tween 20* obteve-se 43% de leveduras com habilidade lipolítica.

5.1.4 Xilanase

Das 205 leveduras testadas, 40 linhagens (19,5%) produziram xilanases e os resultados encontram-se na Tabela 6. Destas, 22 leveduras apresentaram Índice Enzimático maior que 2 demonstrando forte habilidade na produção de enzima xilanolítica. A levedura BIO 119 oriunda de folhas em decomposição do Córrego Taquaruçu obteve o maior Índice Enzimático (5,58).

Tabela 6. Valores de IE para xilanase, média das 3 repetições.

Levedura	IE Médio*	Levedura	IE Médio*
TAQ 61	1,473 nop	TAQ 93	2,030 ghijlmn
TAQ 506	1,530 nop	BIO 120	2,203 fghijl
TAQ 13	1,683 jlmnop	BIO 76	1,313 p
TAQ 611	1,706 jlmnop	TAQ 615	1,430 nop
TAQ 164	1,566 mnop	AS 36	2,466 fgh
TAQ 164	3,110 cde	TAQ 631	2,543 efg
TAQ 46	1,876 hijlmnop	AS 27	2,266 fghij
BIO 121	2,030 ghijlmn	TAQ 638	2,026 ghijlmno
TAQ 631	2,600 efg	TAQ 611	1,766 ijlmnop
AS 24	2,053 ghijlmn	AS 24	2,010 ghijlmno
TAQ 59	1,400 op	TAQ 616	1,720 jlmnop
TAQ 131	3,360 cd	TAQ 46	1,816 ijlmnop
TAQ 143	2,393 fghi	AS 86	1,520 nop
TAQ 616	2,766 def	AS 14	1,590 lmnop
TAQ 139	2,820 def	AS 58	1,990 ghijlmno
TAQ 11	2,193 fghijlm	AS 47	1,563 nop
TAQ 54	3,460 bc	TAQ 611	1,700 jlmnop
TAQ 461	4,033 b	TAQ 61	1,883 hijlmnop
BIO 119	5,586 a	AS 58	1,536 nop
BIO 45	1,333 p	AS 47	1,566 mnop

*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

Lee *et. al.* (1987), testaram 250 leveduras provenientes de coleções de culturas do Canadá e Tchecoslováquia pertencentes a diferentes gêneros, quanto à capacidade de hidrolisar xilana e do total, somente 19 leveduras (7,6%) apresentaram atividade xilanolítica. Rao *et. al.* (2008) testaram 239 leveduras isoladas a partir de 52 amostras de cascas de árvores de áreas

florestais na Índia quanto à produção de xilanase, encontrando somente cinco isolados (2,1%), de leveduras produtoras de enzima xilanolítica.

Dessa forma observa-se que os resultados encontrados nessa pesquisa, 19,5% de leveduras capazes de hidrolisar xilana são maiores daqueles já relatados na literatura para leveduras isoladas de diferentes ecossistemas. Isso pode estar relacionado aos substratos de onde essas foram isoladas (folhas em decomposição) e à metodologia empregada para o isolamento das leveduras. Segundo Blanchette *et. al.* (1978), linhagens de leveduras estão presentes tanto nos estágios iniciais quando avançados da decomposição de folhas e restos de caule. Além disso, as leveduras podem apresentar associações simbióticas com insetos herbívoros, produzindo enzimas que auxiliam na decomposição de materiais vegetais (VEJA & DOWD, 2005).

5.1.5 Produção de multienzimas

Alguns micro-organismos possuem um sistema multienzimático, o que lhes confere uma vantagem competitiva no que diz respeito a fontes nutricionais. De acordo com Panke; Wubbolts (2002), do ponto de vista biotecnológico, micro-organismos produtores de várias enzimas de interesse industrial e em grandes quantidades são mais valiosos do que aqueles que produzem somente uma enzima, pois apresentam uma versatilidade de aplicações industriais, além de serem economicamente mais rentáveis, pois podem ser utilizados em uma gama maior de processos.

Nesse estudo sete leveduras apresentaram perfil multienzimático (AS 11, AS 30, AS 33, AS 36, AS 47, AS 49 e AS 52) e 18 leveduras mostraram-se positivas para três dos substratos testados. A Tabela 7 apresenta os resultados positivos para os substratos em estudo.

Tabela 7. Perfil multienzimático das leveduras produtoras de hidrolases.

Linhagem	Amilase	Celulase	Lipase	Xilanase
AS 11	+	+	+	+
AS 30	+	+	+	+
AS 33	+	+	+	+
AS 36	+	+	+	+
AS 47	+	+	+	+
AS 49	+	+	+	+
AS 52	+	+	+	+
AS 101	-	+	+	+
AS 110	+	-	+	+
BIO 45	+	-	+	+
BIO 76	+	-	+	+
BIO 121	+	+	-	+
TAQ 13	+	-	+	+
TAQ 139	-	+	+	+
TAQ 164	-	+	+	+
TAQ 506	-	+	+	+
TAQ 611	+	-	+	+
TAQ 615	+	-	+	+
TAQ 11	+	-	+	+
TAQ 13	+	-	+	+
TAQ 631	-	+	+	+
TAQ 59	+	-	+	+
TAQ 131	+	+	-	+
TAQ 143	+	+	-	+

(+) = Resultado positivo; (-) = Resultado negativo.

Todas as linhagens que exibiram habilidade para produzir mais de uma enzima pertenciam ao mesmo grupo de leveduras (AS) provenientes de folhas em decomposição do Arroio Água Sujas. Dessas, 88% das leveduras que degradaram mais de uma fonte carbono apresentaram resultado positivo para a enzima celulase. Farias (2004), avaliou 39 linhagens de leveduras oriundas de solo de áreas preservadas para avaliar a produção de enzimas hiorolíticas e 29 linhagens foram positivas para a atividade de pelo menos uma das enzimas testadas (amilase, celulase, lipase e esterases e proteases), porém apenas três linhagens foram positivas para duas ou mais enzimas testadas.

Os resultados obtidos nesta pesquisa confirmam a importância de se conhecer a biodiversidade presente no cerrado brasileiro, onde se encontram linhagens que apresentam atividade enzimática, tornando-as biotecnologicamente interessantes, o que aumenta a necessidade de estudos mais detalhados para viabilizar sua aplicação em processos industriais.

5.2 Produção de hidrolases em Fermentação Submersa

Segundo Soares *et al*, (1999), a relação entre produção de enzimas extracelulares em placa e produção em meio líquido nem sempre ocorre de forma real, por essa razão foram testadas para produção de hidrolases em fermentação submersa as 5 (cinco) leveduras que apresentaram maiores Índices Enzimáticos no testes qualitativos.

Para cada espécie de micro-organismo utilizado, existe um valor ótimo de pH e temperatura para o crescimento celular, porém esse pode não coincidir com o melhor valor para a expressão do produto que se pretende obter no processo, como por exemplo, a produção de enzima (AMORIM, 2011). A fim de avaliar os efeitos de temperatura e pH na atividade das enzimas foram realizados Delineamentos Compostos Centrais Rotacionais (DCCR), que de acordo com Bruns (1995), é uma das mais importantes metodologias utilizadas em estudos de otimização de processos, cujo objetivo é desenvolver um modelo empírico para o processo estudado e obter respostas com maior precisão para determinação de condições ótimas de desenvolvimento do processo avaliado.

Os melhores tempos de fermentação das linhagens estudadas que representaram a maior produção enzimática foram 48 horas para as enzimas amilase e xilanase e 72 horas para as enzimas celulase e lipase com base nos testes preliminares realizados.

5.2.1 Produção de amilases

As 5 linhagens submetidas à fermentação submersa para a produção quantitativa de amilases, foram submetidas a testes de produção para α -amilase e glicoamilase. A maior atividade foi verificada para a linhagem AS 110 que corresponde à levedura que produziu maior IE em meio sólido.

A matriz com os dados do planejamento experimental DCCR 2² (valores reais e codificados de pH e temperatura) e os resultados das atividades enzimáticas para os diferentes valores de pH e temperatura expressas em (U.

mL⁻¹) de alfa-amilase e glicoamilase obtidas para as linhagens AS 110, TAQ 100, BIO 19, AS 122 e BIO 121 encontram-se nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Matriz do Planejamento experimental (DCCR 2²) com valores originais e codificados das variáveis de estudo (pH e temperatura) e atividade enzimática de alfa-amilase (U.mL⁻¹) para as 5 linhagens testadas.

Ensaio	pH (X1)	°C (X2)	AS 110	TAQ 100	BIO 19	AS 122	BIO 121
1	4,3 (-1)	33 (-1)	0,0676	0,0285	0,0345	0,0253	0,0272
2	5,7 (+1)	33 (-1)	0,0678	0,0306	0,0246	0,0350	0,0291
3	4,3 (-1)	47 (+1)	0,0419	0,0285	0,0348	0,0306	0,0281
4	5,7 (+1)	47 (+1)	0,0420	0,0253	0,0246	0,0352	0,0351
5	4 (-1,41)	40 (0)	0,0556	0,0260	0,0331	0,0259	0,0237
6	6 (+1,41)	40 (0)	0,0416	0,0292	0,0203	0,0310	0,0310
7	5 (0)	30 (-1,41)	0,0681	0,0211	0,0329	0,0307	0,0191
8	5 (0)	50 (+1,41)	0,0703	0,0206	0,0355	0,0318	0,0287
9	5 (0)	40 (0)	0,0702	0,0229	0,0276	0,0191	0,0261
10	5 (0)	40 (0)	0,0704	0,0230	0,0258	0,0179	0,0289
11	5 (0)	40 (0)	0,0680	0,0228	0,0260	0,0195	0,0259

°C – Temperatura de atividade enzimática.

Tabela 9. Matriz do Planejamento experimental (DCCR 2²) com valores originais e codificados das variáveis de estudo (pH e temperatura) e atividade enzimática de glicoamilase (U.mL⁻¹) para as 5 linhagens testadas.

Ensaio	pH (X1)	°C (X2)	AS 110	TAQ 100	BIO 19	AS 122	BIO 121
1	4,3 (-1)	33 (-1)	0,0114	0,0072	0,0067	0,0047	0,0080
2	5,7 (+1)	33 (-1)	0,0117	0,0075	0,0073	0,0045	0,0086
3	4,3 (-1)	47 (+1)	0,0283	0,0065	0,0065	0,0070	0,0082
4	5,7 (+1)	47 (+1)	0,0247	0,0062	0,0076	0,0062	0,0080
5	4 (-1,41)	40 (0)	0,0164	0,0056	0,0078	0,0085	0,0076
6	6 (+1,41)	40 (0)	0,0118	0,0071	0,0075	0,0063	0,0073
7	5 (0)	30 (-1,41)	0,0212	0,0073	0,0045	0,0065	0,0087
8	5 (0)	50 (+1,41)	0,0262	0,0062	0,0067	0,0079	0,0084
9	5 (0)	40 (0)	0,0294	0,0077	0,0051	0,0084	0,0099
10	5 (0)	40 (0)	0,0295	0,0067	0,0067	0,0082	0,0096
11	5 (0)	40 (0)	0,0296	0,0074	0,0059	0,0084	0,0090

°C – Temperatura de atividade enzimática.

Na Tabela 10, são mostrados os coeficientes que foram significativos ao nível de significância de 10%, para a reação enzimática das enzimas α -amilase e glicoamilase. Para as linhagens AS 122 (α e glicoamilase) e BIO 121 (alfa-amilase) não houve efeito significativo na atividade enzimática entre as variáveis estudadas. Dessa forma as variáveis atuam independentemente umas das outras.

Tabela 10. Coeficientes significativos para a produção de enzimas amilolíticas.

Enzima	Leveduras			
	AS 110	BIO 121	TAQ 100	BIO 119
Alfa-amilase	Coeficientes quadráticos e linear de pH.	-	Coeficientes quadráticos e linear de pH.	Coeficientes quadráticos e linear de pH.
Glicoamilase	Coeficientes quadráticos e linear de pH e coeficiente linear de temperatura.	Coeficientes linear/quadrático de pH e temperatura.	Coeficiente linear de temperatura.	Coeficientes quadráticos e linear de pH.

As atividades de alfa-amilase e glicoamilase mais altas foram obtidas pela linhagem AS 110. Os modelos matemáticos sem os coeficientes não significativos que representam a atividade para glicoamilase na região experimental estudada para linhagem AS 110 pode ser expresso pela Equação 1 e para linhagem BIO 121 pode ser expresso pela Equação 2.

$$U = -0,332 + 0,135x - 0,0136x^2 + 0,0006y \quad (1)$$

$$U = -0,093 + 0,197x + 0,00197x^2 + 0,00068y - 0,00009y^2 \quad (2)$$

Onde: U = Atividade enzimática (U. mL⁻¹); x = pH; y = Temperatura (°C).

Para ilustrar os efeitos das variáveis na atividade enzimática, são apresentados os gráficos de superfície de resposta e as curvas de contorno nas Figuras 11 e 12. As atividades amilolíticas para glicoamilase da linhagem BIO 121 e AS 110 alcançaram os valores máximos na região do ponto central de pH e temperatura de (5 e 40 °C, respectivamente) e para a linhagem AS 110 a temperatura de 50 °C. As superfícies de resposta geradas a partir dos modelos matemáticos apresentaram um ponto de máximo, no qual a atividade enzimática foi igual a 0,0351 U.mL⁻¹ e 0,0296 U.mL⁻¹ para a linhagem BIO 121 e AS 110, respectivamente.

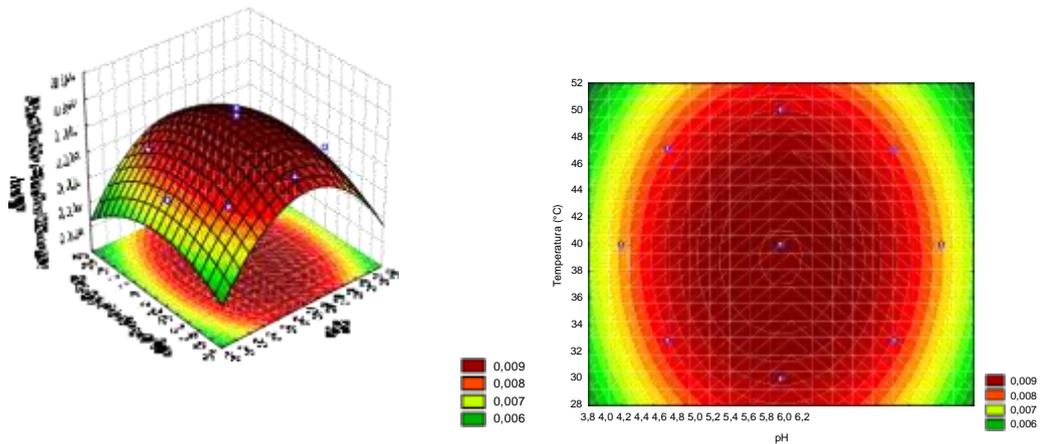


Figura 11: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de glicoamilase (U.mL^{-1}) produzida em função do pH e temperatura para a levedura BIO 121 e curva de contorno.

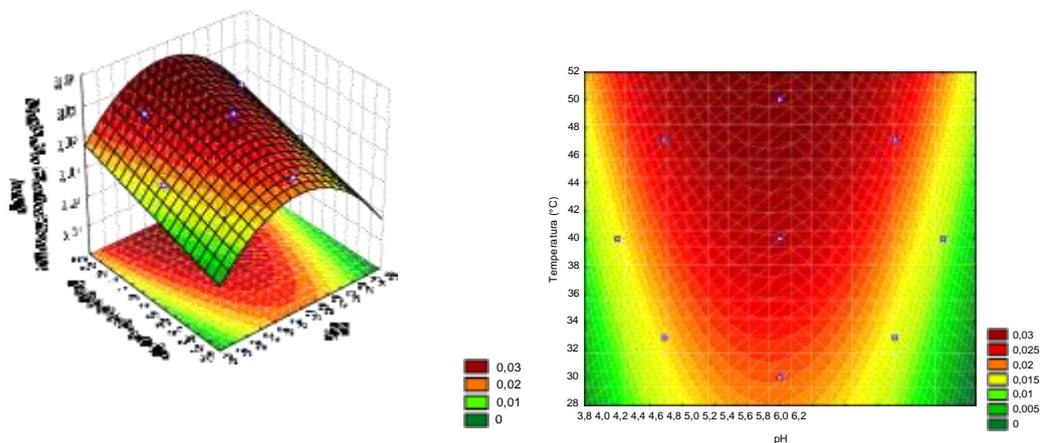


Figura 12: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de glicoamilase (U.mL^{-1}) produzida em função do pH e temperatura para a levedura AS 110 e curva de contorno.

A baixa atividade enzimática observada nos isolados que apresentaram halos de hidrólise em meio sólido pode ser explicada pela retenção das enzimas no espaço periplasmático, o que dificulta a detecção de atividade nos extratos brutos livres de células. Ainda, segundo Palma *et al.* (2000) a queda da atividade com o aumento do tempo de fermentação pode estar relacionada à desestabilização da enzima pelo efeito do pH, temperatura ou ainda à produção de enzimas inibidoras pelo micro-organismo. Os resultados de

temperatura e pH ótimos obtidos pelas enzimas em estudo são considerados promissores para futuras aplicações em soluções energéticas (CASTRO; PEREIRA, 2010).

Soccol *et al.* (2005), destacam que a glicoamilase nas maioria das vezes, são produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*, *Endomyces sp.* Entretanto diversos autores afirmam que a avaliação qualitativa da produção de enzimas, muitas vezes, não corresponde à produção real, sendo necessário avaliar qual a melhor metodologia a ser empregada para obter resultados promissores. Os baixos valores de atividade de alfa-amilase e glicoamilase estão de acordo com os resultados encontrados por Almeida *et al* (2009) que obtiveram valores abaixo de $0,20 \text{ U.mL}^{-1}$ para atividade dextrinizante de *Aspergillus awamori*.

De acordo com Spencer-Martin; Van Uden (1985) são poucas as leveduras capazes de produzir alfa-amilase e glicoamilase simultaneamente. Ao trabalhar com bactérias usando como substrato farelo de trigo, Rabalho (2002) encontrou resultados baixos, inferiores a $0,07 \text{ U/mL}$ para glicoamilase. Em sua pesquisa Costa *et al.* (2011), ao trabalhar com leveduras isoladas de batata doce encontrou em suas linhagens baixa atividade ou não foi possível detectá-las. Nesse sentido, Vihinen & Mäntsälä (1989) afirmam que os fungos filamentosos são os micro-organismos considerados como melhores produtores de glicoamilase.

Com base nos resultados obtidos nessa pesquisa, observa-se a necessidade de novos estudos otimizando as condições de cultivo submerso para as linhagens que apresentaram um bom desempenho na pesquisa.

5.2.2 Produção de celulases

As 5 (cinco) leveduras submetidas à fermentação submersa tiveram suas atividades enzimáticas testadas para CMCase, que representa a dosagem de endoglucanases, e FPase (atividade de papel filtro) que abrange uma mistura de exoglucanases e endoglucanases. Para a atividade de endoglucanase não foi possível detectar atividade enzimática e para atividade

de FPase todas as leveduras apresentaram valores de atividades baixas ou não detectáveis. A maior atividade foi verificada para a linhagem TAQ 631 (0,017 U.mL⁻¹).

A matriz com os dados do planejamento experimental DCCR 2² (valores reais e codificados de pH e temperatura) e os resultados das atividades enzimáticas para os diferentes valores de pH e temperatura de FPase obtida para as linhagens AS 122, TAQ 250, TAQ 631, TAQ 14 e BIO 121 encontram-se nas Tabela 11.

Tabela 11. Matriz do Planejamento experimental (DCCR 2²) com valores originais e codificados das variáveis de estudo (pH e temperatura) e atividade enzimática de FPase (U.mL⁻¹) para as 5 linhagens testadas.

Ensaio	pH (X1)	°C (X2)	AS 122	TAQ 250	TAQ 631	TAQ14	BIO 121
1	4,3 (-1)	33 (-1)	ND	ND	0,0037	ND	ND
2	5,7 (+1)	33 (-1)	ND	ND	0,0037	ND	ND
3	4,3 (-1)	47 (+1)	ND	0,0058	0,0067	ND	0,0061
4	5,7 (+1)	47 (+1)	ND	0,0046	0,0109	ND	0,0061
5	4 (-1,41)	40 (0)	ND	0,0061	0,0050	0,0031	0,0032
6	6 (+1,41)	40 (0)	0,0086	0,0061	0,0175	0,0061	0,0062
7	5 (0)	30 (-1,41)	ND	ND	0,0031	0,0032	ND
8	5 (0)	50 (+1,41)	ND	0,0046	0,0042	ND	0,0056
9	5 (0)	40 (0)	0,0070	0,0070	0,0061	0,0071	0,0156
10	5 (0)	40 (0)	0,0096	0,0071	0,0059	0,0070	0,0154
11	5 (0)	40 (0)	0,0071	0,0070	0,0058	0,0071	0,0154

°C – Temperatura de atividade enzimática. ND – Não detectável.

Ao nível de significância de 10%, os coeficientes que apresentaram significância para a produção da enzima FPase para as leveduras testadas estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Coeficientes significativos para a produção de enzima celulolítica.

Enzima	Levedura				
	TAQ 250	BIO 121	TAQ 631	TAQ 14	AS 122
FPase	Coeficientes quadrático e linear de temperatura.	Coeficientes quadráticos e lineares de pH e temperatura.	Coeficientes quadráticos e linear de pH.	Coeficientes quadráticos de pH e temperatura e linear de temperatura.	Coeficientes quadráticos de pH e temperatura.

A atividade de FPase mais alta foi obtida pela linhagem BIO 121. As faixas de pH e temperatura consideradas melhores para a produção de

atividade enzimática para FPase para todas as linhagens testadas foi de 5 para a variável pH, exceção para a linhagem TAQ 631 para qual apresentou maior atividade enzimática em pH 6 e para a variável temperatura os melhores resultados foram obtidos em 40°C.

Como os fatores pH e temperatura foram significativos para as leveduras AS 122, TAQ 14 e BIO 121 seguem as equações que definem os modelos matemáticos que representam as atividades enzimáticas de FPase nas condições estudadas.

Os modelos matemáticos sem os coeficientes não significativos que representam as atividades celulolíticas para FPase na região experimental estudadas para linhagens AS 122, TAQ 14 e BIO 121 pode ser expresso pelas equações 3, 4 e 5, respectivamente .

$$U = -0,261 - 0,0046x^2 - 0,000089y^2 \quad (3)$$

$$U = -0,086 - 0,00006x^2 + 0,004y - 0,00006y^2 \quad (4)$$

$$U = -0,487 + 0,111x - 0,011x^2 + 0,010y - 0,00012y^2 \quad (5)$$

Onde: U = Atividade enzimática (U. mL⁻¹); x = pH; y = Temperatura (°C).

Para ilustrar os efeitos das variáveis na atividade enzimática, são apresentados os gráficos de superfície de resposta e as curvas de contorno nas Figuras 13, 14 e 15. A atividade de FPase para as linhagens AS 122, TAQ 14 e BIO 121 alcançaram o pico de produção na região do ponto central tanto para pH quanto para temperatura, com exceção a linhagem TAQ 14 que o pH ideal foi 6,0. As superfícies de resposta geradas a partir dos modelos matemáticos apresentaram pontos de máximo, em pH 5 e Temperatura de 40°C, no qual a atividade enzimática foi igual a 0,0096 U.mL⁻¹, 0,0071 U.mL⁻¹ e 0,0156 U.mL⁻¹, respectivamente para as linhagens AS 122, TAQ 14 e BIO 121.

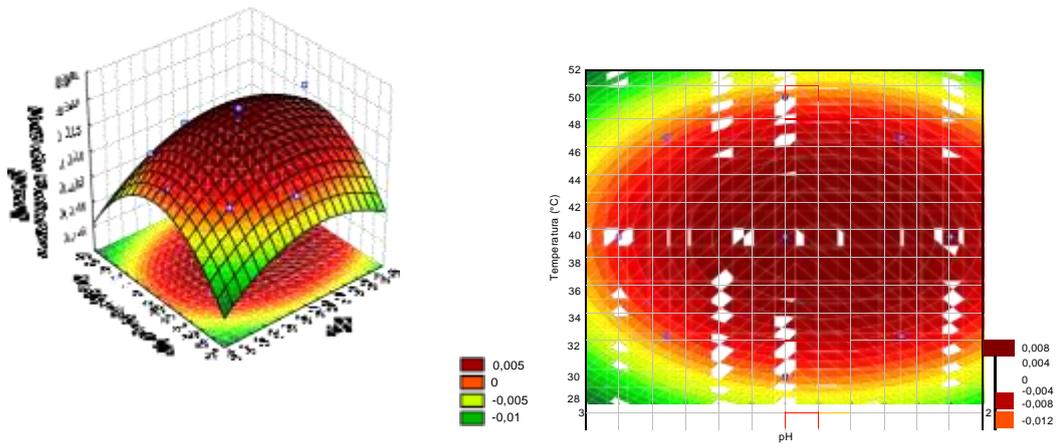


Figura 13: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de FPase (U.mL⁻¹) produzida em função do pH e temperatura para a levedura AS 122 e curva de contorno

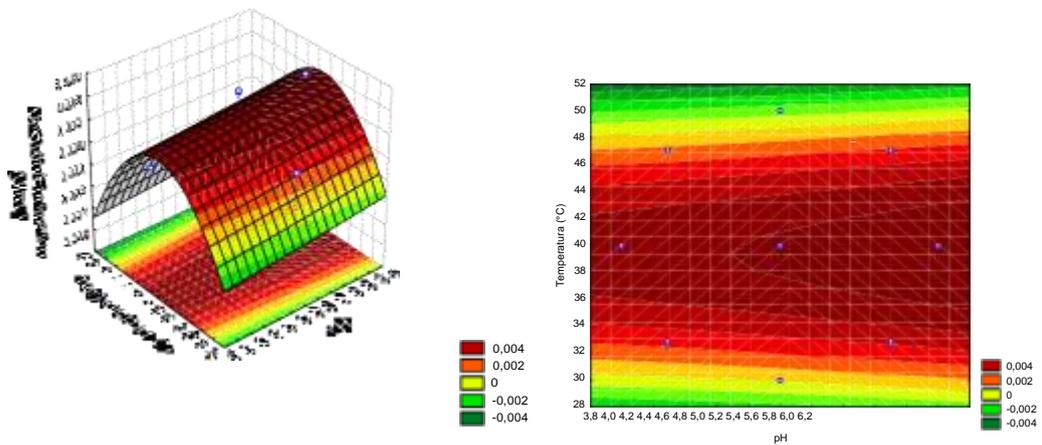


Figura 14: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de FPase (U.mL⁻¹) produzida em função do pH e temperatura para a levedura TAQ 14 e curva de contorno.

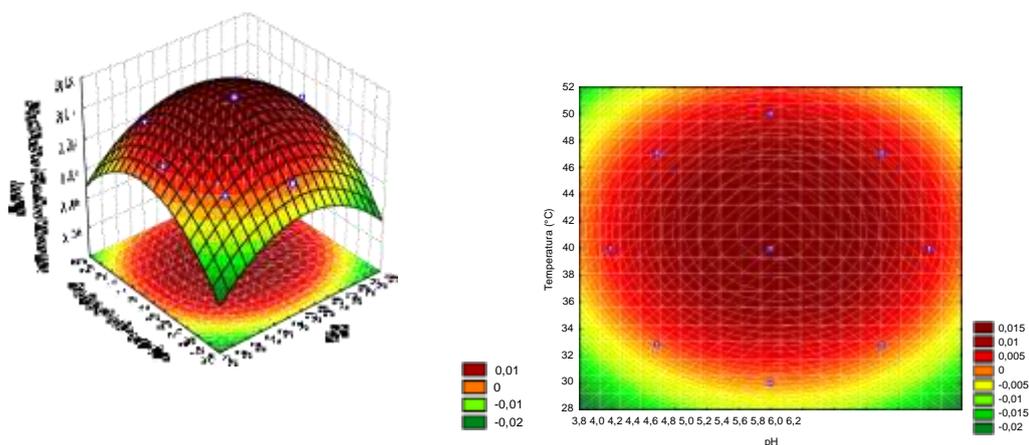


Figura 15: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de FPase (U.mL^{-1}) produzida em função do pH e temperatura para a levedura BIO 121 e curva de contorno.

Souza (2011) em sua pesquisa para a utilização de celulases de leveduras na produção de bioetanol de segunda geração encontrou atividade apenas para β -glicosidases, não encontrando atividades para endo e exoglucanases e mesmo para β -glicosidases os valores encontrados foram baixos (maior atividade $0,024 \text{ U.mL}^{-1}$). Dessa forma, os valores encontrados nessa pesquisa, apesar de baixos, são condizentes com outras pesquisas que relatam baixas atividades para celulases produzidas por leveduras.

Facchini *et al* (2011) observaram a temperatura ótima entre $50 - 55 \text{ }^\circ\text{C}$ para CMCase de *Aspergillus japonicus*, com pH ótimo em 4,0. A grande maioria dos micro-organismos de interesse para a área biotecnológica, incluindo a maior parte dos patógenos, pertence ao grupo dos mesófilos, possuindo temperatura ótima de crescimento entre 25 e 40°C , e temperatura máxima entre 40 e 50°C . Portanto, em alguns casos, são necessários uso de temperatura numa certa faixa que não favoreça o crescimento desses micro-organismos.

A baixa atividade enzimática observada na fermentação submersa nos isolados que apresentaram halos de hidrólise em meio sólido pode ser explicada pela retenção das enzimas no espaço periplasmático, o que dificulta a detecção de atividade nos extratos brutos livres de células. Ainda, segundo Palma *et al.* (2000) a queda da atividade com o aumento do tempo de fermentação pode estar relacionada à desestabilização da enzima pelo efeito

do pH, temperatura ou ainda à produção de enzimas inibidoras pelo micro-organismo com o aumento do tempo de fermentação.

Poucos estudos reportam a produção de celulases por leveduras na presença de papel filtro ou atividade FPase (THONGEKKAEW *et al.*, 2008). A hidrólise desta molécula requer a ação sinérgica de diferentes classes de celulases (endo e exoglucanases) (BHAT, 1997; LYND *et al.*, 2002), dessa forma a pouca atividade de celulase na presença de papel filtro como substrato da reação pode estar associada ao difícil acesso da enzima ao substrato.

Muitos trabalhos relatam uma eficiente degradação da celulose por fungos dos grupos *Trichoderma*, *Chyso sporium* e *Fusarium*, porém ainda são poucas as pesquisas com a utilização de leveduras produtoras de celulase (THONGEKKAEW *et al.*, 2008). Nesse sentido, as comparações nesse trabalho se tornam restritas visto que mesmo os trabalhos já realizados diferem nas condições de estudo e formas de condução do experimento.

Em pesquisa realizada por Thongekkaew *et al.* (2008) os autores relatam a produção, purificação e caracterização da enzima endoglucanase utilizando como substrato carboximetilcelulase para a levedura *Cryptococcus*. Este micro-organismo tem a capacidade de liberar a enzima após 72 horas de cultivo, sob agitação. Dessa forma, os resultados encontrados nesse estudos corroboram com os encontrados nessa pesquisa, valores baixos de produção de enzimas endo e exoglucanases para leveduras.

Marco (2012) trabalhando com produção e caracterização de celulases encontrou atividades de 0,04 a 0,12 (U.mL⁻¹) após incubação a 50°C usando papel filtro como substrato para a produção de celulase, resultados esses que demonstram que a produção e secreção dessa enzima são baixos. Os resultados encontrados nessa pesquisa para a levedura BIO 121 demonstram que essa tem potencial biotecnológico e necessita de maiores estudos a fim de viabilizar sua utilização. Portanto, os resultados de temperatura e pH ótimos obtidos pelas enzimas em estudo são considerados promissores para futuras aplicações em soluções energéticas, embora seja ainda necessário avaliar a estabilidade a temperatura e ao pH para se avaliar o potencial de uso das celulases (CASTRO; PEREIRA, 2010).

Nessa pesquisa optou-se por utilizar como substrato a carboximetilcelulase como forma rápida e prática de se avaliar a capacidade

celulolítica das leveduras isoladas. A carboximetilcelulose é uma molécula solúvel, ao contrário dos demais substratos, o que favorece a sua biodegradação, e conseqüentemente o aumento do crescimento microbiano e a produção enzimática. A baixa atividade observada em substratos alternativos como casca de arroz, palha de trigo, milho, pode estar relacionada à estrutura altamente cristalina da celulose (dificulta o acesso aos sítios ativos) ou à presença lignina que adsorve à celulase, restringindo a hidrólise (OGEDA; PETRI, 2010).

Zuniga (2011) desenvolveu uma pesquisa que utilizou o bagaço de cana para a produção de celulases específicas por meio de fermentação em estado sólido com o microrganismo *Aspergillus niger*. Essas celulases produzidas permitiram conversões de 15% da matéria-prima em etanol. A aplicabilidade deste coquetel enzimático poderá proporcionar um crescimento sustentável na produção de bioetanol.

5.2.4 Produção de lipases

A maior atividade lipolítica foi verificada para a linhagem TAQ 164 e foi de 18,14 U.mL⁻¹ para a temperatura de ensaio de 40°C e pH 5. Destaque também para os isolados ABRT 461 e TAQ 616 que apresentaram atividades enzimáticas de 7,28 U.mL⁻¹ e 3,52 U.mL⁻¹, respectivamente. As variáveis pH e temperatura da reação são fatores que influenciam fortemente a atividade enzimática.

A matriz com os dados do planejamento experimental DCCR 2² (valores reais e codificados de pH e temperatura) e os resultados das atividades enzimáticas para os diferentes valores de pH e temperatura expressas em (U. mL⁻¹) de lipase obtidas para as linhagens BIO 45, TAQ 54, TAQ 616, TAQ 164 e ABRT 461 encontram-se na Tabelas 13.

Tabela 13. Matriz do Planejamento experimental (DCCR 2²) com valores originais e codificados das variáveis de estudo (pH e temperatura) e atividade enzimática (U.mL⁻¹) de lipase para as 5 linhagens testadas.

Ensaio	pH (X1)	°C (X2)	BIO 45	TAQ 54	TAQ 616	TAQ164	ABRT461
1	4,3 (-1)	33 (-1)	0,5629	0,4256	2,7361	14,7950	5,9788
2	5,7 (+1)	33 (-1)	0,3528	0,4956	5,1589	15,7439	9,0742
3	4,3 (-1)	47 (+1)	1,0235	1,0797	6,1262	14,9977	7,4988
4	5,7 (+1)	47 (+1)	0,6836	0,6200	3,5560	10,2257	5,3800
5	4 (-1,41)	40 (0)	0,6522	0,4376	1,6214	14,0857	7,4436
6	6 (+1,41)	40 (0)	0,4496	0,5583	3,5928	14,1041	6,9737
7	5 (0)	30 (-1,41)	2,6624	0,1962	3,3994	15,1082	10,5297
8	5 (0)	50 (+1,41)	0,7766	0,5887	2,5702	14,4081	5,5182
9	5 (0)	40 (0)	0,5804	0,2275	2,9572	18,1667	5,8038
10	5 (0)	40 (0)	0,5444	0,2414	3,2980	17,2547	9,0005
11	5 (0)	40 (0)	0,4929	0,4063	3,7310	18,1944	6,8816

°C – Temperatura de atividade enzimática. ND – Não detectável.

Ao nível de significância de 10%, os coeficientes que apresentaram significância para a produção da enzima lipase para as leveduras testadas estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14. Coeficientes significativos para a produção de enzima lipolítica.

Enzima	Leveduras		
	TAQ 54	TAQ 616	TAQ 164
Lipase	Coeficiente quadrático de pH.	Coeficiente de interação entre os dois fatores (pH e temperatura).	Coeficientes linear e quadrático de temperatura, o coeficiente quadrático de pH e interação entre os dois fatores.

As faixas de pH e temperatura consideradas melhores para a produção de atividade enzimática para lipase para todas as linhagens testadas foi de 4,3 e 5 para a variável pH e para a variável temperatura os melhores resultados foram obtidos em 30°C, 40°C e 47°C, demonstrando que as linhagens testadas apresentam um espectro mais amplo de atuação para a variável temperatura do que para as alterações de pH .

Como os fatores pH e temperatura foram significativos para as leveduras TAQ 616 e TAQ 164 foram elaborados os modelos matemáticos que representam as atividades enzimáticas de lipase nas condições estudadas.

Os modelos matemáticos sem os coeficientes não significativos que representam a atividade lipolítica na região experimental estudada para as

linhagens TAQ 616 e TAQ 164 pode ser expresso pela Equação 6 e 7, respectivamente.

$$U = -39,9 - 0,026xy \quad (6)$$

$$U = -17,12 + 0,127x^2 + 1,86y - 0,021y^2 - 0,052xy \quad (7)$$

Onde: U = Atividade enzimática (U/mL); x = pH; y = Temperatura (°C).

Para ilustrar os efeitos das variáveis na atividade enzimática, são apresentados os gráficos de superfície de resposta e as curvas de contorno nas Figuras 16 e 17. A atividade de lipase para as TAQ 616 e TAQ 164 alcançaram o pico de produção na região do ponto central tanto para pH quanto para temperatura. Os gráficos de superfície de resposta geradas a partir dos modelos matemáticos apresentaram pontos de máximo, no qual a atividade enzimática foi igual a 6,63 U.mL⁻¹ e 18,19 U.mL⁻¹, respectivamente, para as linhagens TAQ 616 e TAQ 164.

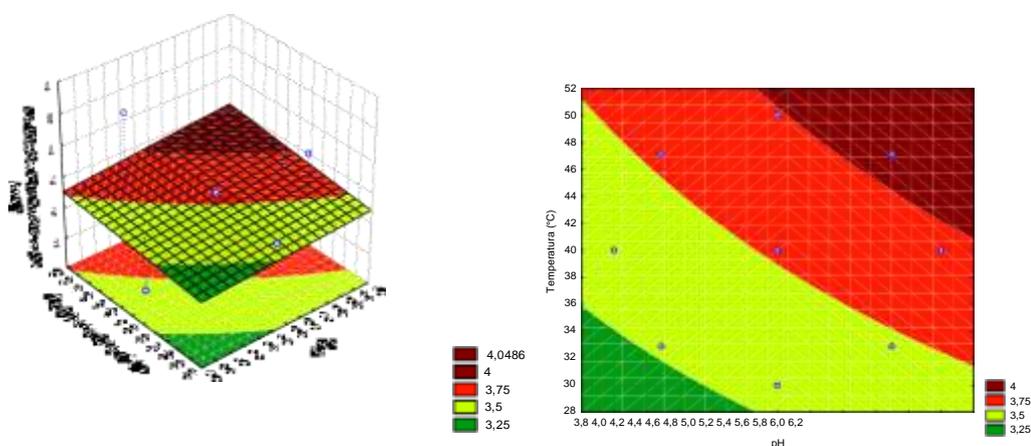


Figura 16: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de lipase (U.mL⁻¹) produzida em função do pH e temperatura para a levedura TAQ 616 e curva de contorno.

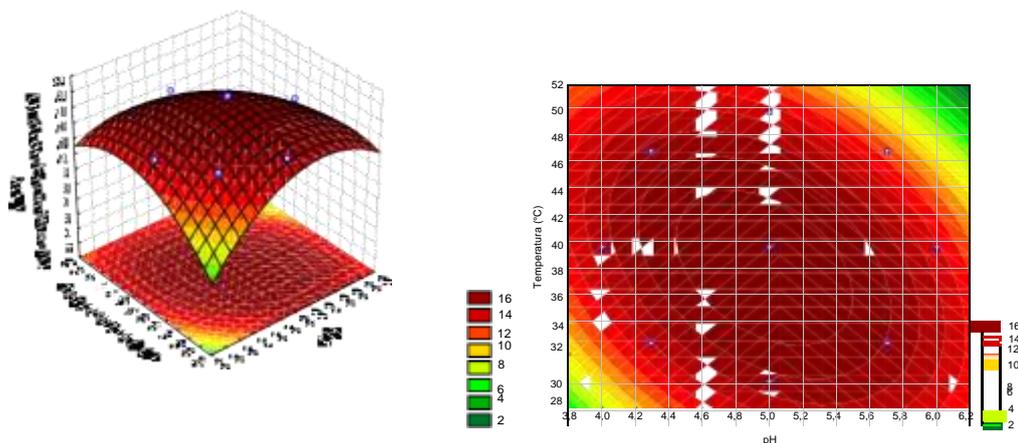


Figura 17: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de lipase (U.mL^{-1}) produzida em função do pH e temperatura para a levedura TAQ 164 e curva de contorno.

As fontes de carbono comumente mencionadas em trabalhos de produção de lipases microbianas são azeites de oliva e palma, *Tween 20* e *40*, trioleína e tripalmitina, óleos de soja, girassol, algodão e milho. As fontes lipídicas de carbono são essenciais para a obtenção de elevados rendimentos (SHARMA *et al.*, 2001). Nessa pesquisa, a fonte de carbono utilizada como substrato indutor de lipases foi o óleo de oliva na concentração de 20 g.L^{-1} .

Os valores de atividade enzimática obtidos na hidrólise do azeite de oliva são amplamente utilizados para comparação e seleção de linhagens produtoras de lipase. Estes valores podem variar significativamente dependendo do tipo de fermentação, da composição do meio de cultivo e também de outras variáveis do processo fermentativo, tais como pH, temperatura de incubação e presença de indutores da síntese de lipase como os óleos vegetais (CARVALHO *et al.*, 2005).

O azeite de oliva tem sido indicado como o indutor que apresenta os melhores resultados de indução da síntese de lipase por fungos (MAIA *et al.* 2001), indicação que está de acordo com o utilizado neste trabalho. Entretanto, o custo da adição de azeite de oliva como indutor é elevado se for considerada a produção de enzimas em larga escala. Desta forma, devem-se buscar alternativas para a utilização de outros indutores, tais como o óleo de soja proveniente de frituras, o qual seria facilmente obtido, visto ser um resíduo de restaurantes e quando não descartado corretamente traz prejuízo ao meio ambiente.

Maia *et al.* (2001) avaliaram a atividade lipolítica do fungo *Fusarium solani* também cultivado a 28°C e 120 rpm testando diferentes tipos de óleo como fonte de carbono. Os resultados encontrados variaram entre 0,06 e 0,45 U/mg, sendo a maior atividade lipolítica determinada com o óleo de gergelim como fonte de carbono e pH 7,8.

Baron *et al.* (2005) estudaram a produção de lipases por *Penicillium corylophilum* IOC 4211 em dois meios de cultivo com diferenças na porcentagem de óleo de oliva, suplementação com 1% e 2% de óleo de oliva respectivamente. As atividades enzimáticas obtidas com o segundo meio de cultivo foram superiores (7,1 U.mL⁻¹) nas condições de cultivo estudadas. Semionato (2006) obteve valores de atividade lipolítica para linhagens bacterianas isoladas de dispositivos de remoção de gordura entre 0,076 e 3,20 U.mL⁻¹ de proteínas após 120h de cultivo a 28°C e pH 8. Esses resultados estão de acordo com os encontrados nessa pesquisa.

Plou *et al.* (1998) avaliaram a atividade lipolítica de enzimas comerciais em condições ótimas de pH variando entre 7 e 8 a temperatura de 25°C para lipase pancreática. As enzimas puras comerciais apresentam uma atividade normalmente mais alta que as lipases avaliadas em linhagens de micro-organismos, demonstrando dessa forma que os valores encontrados para os isolados dessa pesquisa são bons e que essas leveduras possuem um potencial biotecnológico.

Ellaiah *et al.* (2004) utilizaram azeite de oliva para a produção de lipases por células livres e imobilizadas de *Aspergillus niger*. Foram testadas concentrações de 0 (zero) a 1,25% de azeite de oliva, sendo as maiores atividades enzimáticas obtidas na concentração de 1% da fonte de carbono. D'Annibale *et al.* (2006) estudaram a utilização de efluentes do processo de extração de azeite de oliva como substrato para a produção de lipases e identificaram que a produção de lipases foi afetada pela adição de fontes de carbono suplementares como o azeite de oliva e os óleos de soja e milho, na concentração de 0,3%. A adição do azeite de oliva aumentou a atividade enzimática de 1,24 para 9,0 U.mL⁻¹, enquanto que a adição dos óleos de milho e soja resultou em atividades de 6,42 e 6,34 U.mL⁻¹, respectivamente. Esses resultados demonstram que o óleo de oliva é um bom indutor e fornece

resultados satisfatórios para a produção de enzimas lipolíticas, pois o aumento com sua utilização resultou em 72% de aumento na produtividade.

Mahadik *et al* (2002) relataram que a atividade enzimática foi praticamente nula ($0,02 \text{ U.mL}^{-1}$) quando a fermentação foi realizada sem a adição do óleo de oliva. Entretanto, valores superiores de atividade foram relatados para as lipases produzidas pelos fungos *Aspergillus niger* ($7,6 \text{ U.mL}^{-1}$) e *Aspergillus oryzae* ($9,5 \text{ U.mL}^{-1}$), quando cultivados em meio de composição mais rica em fonte de carbono (2,0% p/v de glicose) e fonte de nitrogênio (extrato de levedura, 1,0% p/v e peptona 2,0% p/v), adicionado de óleo de oliva (2,0% p/v) após 48h de incubação a 30°C .

Os resultados encontrados para a enzima lipase nessa pesquisa demonstram um grande potencial das leveduras testadas serem utilizadas em processos biotecnológicos em indústrias transformadoras. O grande número de isolados com essa habilidade somados aos valores de atividade encontrados sugere a continuação da pesquisa para avaliar a otimização do processo produtivo a fim de aplicá-los em escala industrial.

5.2.3 Produção de xilanases

A matriz com os dados do planejamento experimental DCCR 2² (valores reais e codificados de pH e temperatura) e os resultados das atividades enzimáticas para os diferentes valores de pH e temperatura expressas em (U.mL^{-1}) de xilanase obtidas para as linhagens TAQ 16, TAQ 131, BIO 19, TAQ 54 e ABRT 461 encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15. Matriz do Planejamento experimental (DCCR 2²) com valores originais e codificados das variáveis de estudo (pH e temperatura) e atividade enzimática de xilanase (U.mL⁻¹) para as 5 linhagens testadas.

Ensaio	pH (X1)	°C (X2)	TAQ 16	TAQ131	BIO 19	TAQ 54	ABRT461
1	4,3 (-1)	33 (-1)	0,0068	0,0136	0,0046	0,0158	0,0213
2	5,7 (+1)	33 (-1)	0,0118	0,0179	0,0108	0,0250	0,0177
3	4,3 (-1)	47 (+1)	0,0066	0,0145	0,0136	0,0165	0,0242
4	5,7 (+1)	47 (+1)	0,0146	0,0218	0,0185	0,0248	0,0234
5	4 (-1,41)	40 (0)	0,0031	0,0151	0,0141	0,0130	0,0243
6	6 (+1,41)	40 (0)	0,0146	0,0217	0,0220	0,0259	0,0239
7	5 (0)	30 (-1,41)	0,0120	0,0133	0,0054	0,0170	0,0212
8	5 (0)	50 (+1,41)	0,0147	0,0175	0,0150	0,0180	0,0241
9	5 (0)	40 (0)	0,0228	0,0138	0,0107	0,0156	0,0257
10	5 (0)	40 (0)	0,0213	0,0153	0,0169	0,0127	0,0229
11	5 (0)	40 (0)	0,0179	0,0142	0,0104	0,0148	0,0176

°C – Temperatura de atividade enzimática. ND – Não detectável.

Ao nível de significância de 10%, os coeficientes que apresentaram significância para a produção da enzima xilanolítica para as leveduras testadas estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Coeficientes significativos para a produção da enzima xilanolítica.

Enzima	Leveduras			
	TAQ 16	TAQ 131	BIO 19	TAQ 54
Xilanase	Coeficientes linear e quadrático de pH e temperatura.	Coeficientes linear de temperatura, coeficiente quadrático e linear de pH e interação entre os dois fatores.	Coeficientes linear de temperatura e coeficiente linear de pH.	Coeficientes linear e quadrático de temperatura e de pH.

A maior atividade xilanolítica foi verificada para a linhagem ABRT 461 e foi de 0,026 U. mL⁻¹ para a temperatura de ensaio de 40°C e pH 5. Como os fatores pH e temperatura foram significativos para as leveduras TAQ 16, TAQ 131, BIO 19 e TAQ 54 seguem as equações 8, 9, 10 e 11 definindo os modelos matemáticos que representam as atividades enzimáticas de xilanase nas condições estudadas .

$$U = -0,44 + 0,129x - 0,012x^2 + 0,006y - 0,00007y^2 \quad (8)$$

$$U = -0,11 - 0,039x + 0,0037x^2 - 0,0005y - 0,00015xy \quad (9)$$

$$U = -0,028 + 0,039x + 0,00053y \quad (10)$$

$$U = 0,201 - 0,0548x + 0,006x^2 - 0,003y - 0,00004y^2 \quad (11)$$

Onde: U = Atividade enzimática (U.mL⁻¹); x = pH; y = Temperatura (°C).

Para ilustrar os efeitos das variáveis na atividade enzimática, são apresentados os gráficos de superfície de resposta e as curvas de contorno nas figuras 18, 19, 20 e 21. A região ótima encontra-se situada entre os pH 4,5 e 6,0, e as temperaturas 40°C e 50°C. Os gráficos de superfície de resposta gerados a partir dos modelos matemáticos apresentaram pontos de máximo, no qual a atividade enzimática foi igual a 0,0228 U.mL⁻¹, 0,0218 U.mL⁻¹, 0,0220 U.mL⁻¹ e 0,0259 U.mL⁻¹, respectivamente para as linhagens TAQ 16, TAQ 131, BIO 19 e TAQ 54.

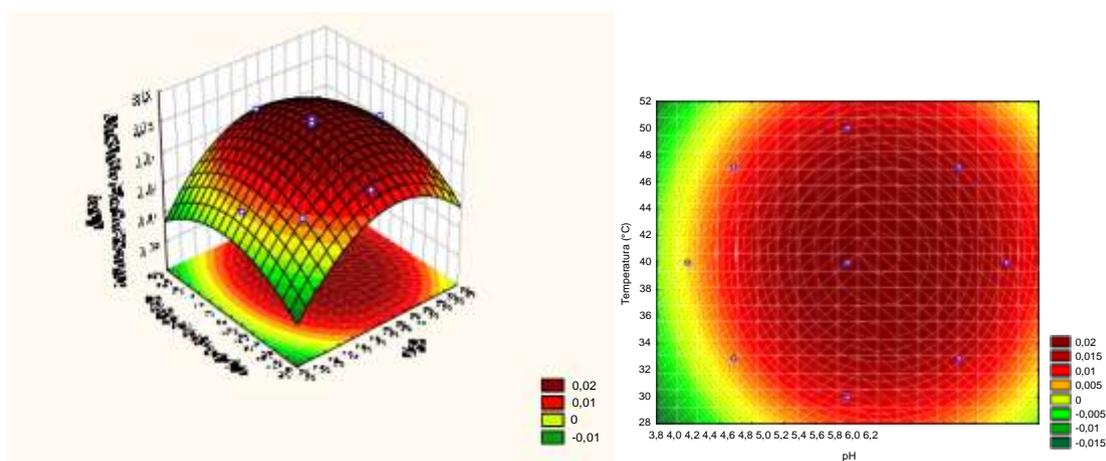


Figura 18: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de xilanase (U.mL⁻¹) produzida em função do pH e temperatura para a levedura TAQ 16 e curva de contorno.

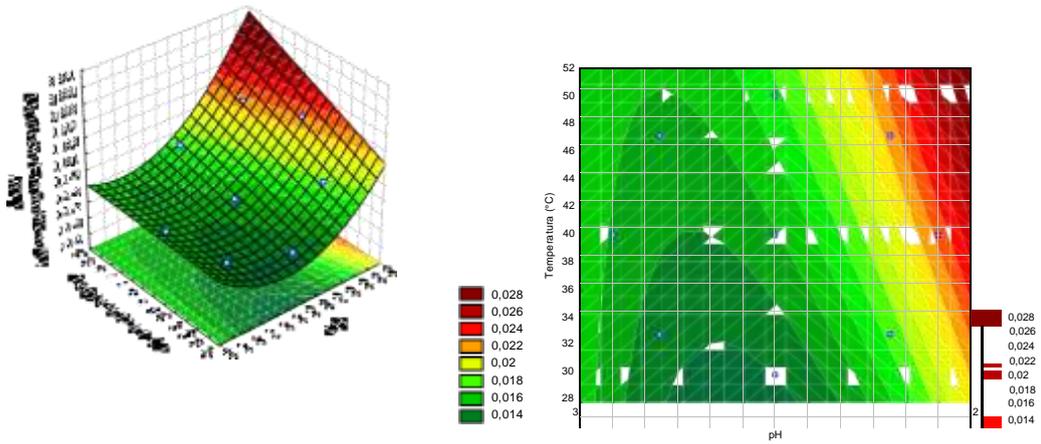


Figura 19: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de xilanase (U.mL⁻¹) produzida em função do pH e temperatura para a levedura TAQ 131 e curva de contorno.

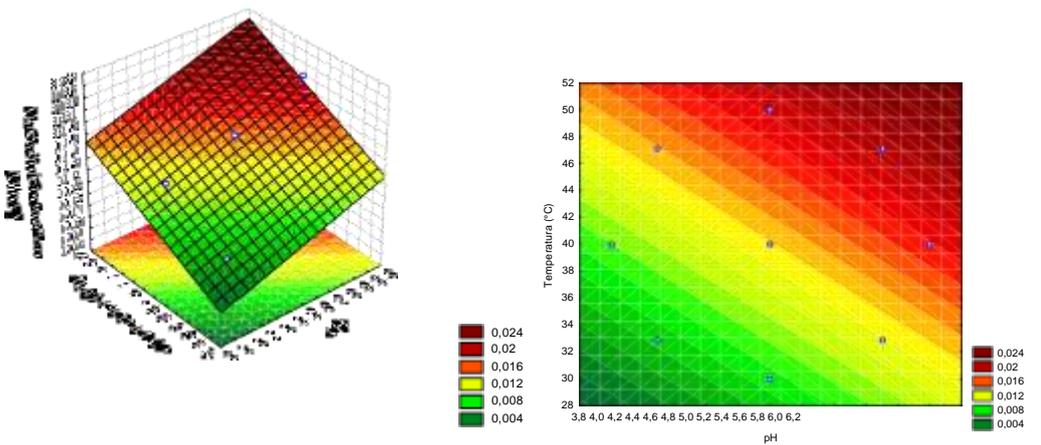


Figura 20: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de xilanase (U.mL⁻¹) produzida em função do pH e temperatura para a levedura BIO 19 e curva de contorno.

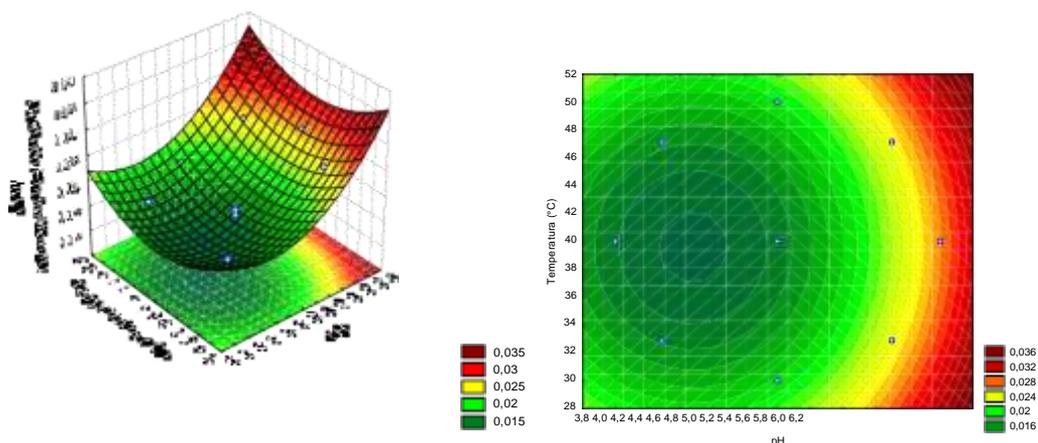


Figura 21: Gráfico de superfície de resposta que representa a atividade de xilanase (U.mL^{-1}) produzida em função do pH e temperatura para a levedura TAQ 54 e curva de contorno.

Pierozzi *et al.* (2011) trabalhando com uma seleção de leveduras produtoras de celulase e xilanase isoladas de reservas naturais brasileiras, encontraram para atividades xilanolíticas valores correspondentes a ($0,4 \text{ U.mL}^{-1}$). Adsul *et al.* (2009) ao estudarem a produção de xilanases pela levedura *Pseudozyma hubeiensis* demonstraram que essa apresenta atividade específica para produção de xilooligossacarídeos com 3 a 7 U.mL^{-1} .

Parachin *et al.* (2009) testaram leveduras isoladas de folhas e flores do cerrado em meio contendo xilana e sulfato de amônio e conseguiram resultados altos quando comparados aos encontrados nessa pesquisa (120 U.mL^{-1}) para a levedura *Cryptococcus flavus*. Os resultados baixos encontrados nesse trabalho ao se utilizar também leveduras isoladas de folha em decomposição podem ser atribuídos à falta de suplementação com sulfato de amônio ou também ao fato de as leveduras isoladas não possuírem especificidade para a produção de enzimas xilanolíticas. Dessa forma, sugere-se que novas pesquisas sejam realizadas com a utilização de sulfato de amônio para se averiguar a influência desse sal na produção enzimática.

Carvalho (2012), trabalhando com leveduras isoladas do cerrado mineiro para a produção de enzimas xilanolíticas encontrou valores semelhantes aos encontrados nessa pesquisa trabalhando com substratos alternativos, sendo que todos os isolados testados apresentaram valores abaixo de $0,002 \text{ U.mL}^{-1}$. A levedura *Candida neerlandia* apresentou os melhores resultados para a produção de enzima xilanolítica, em resíduo de palha de milho ($0,00178$

U.mL⁻¹) e em farelo de trigo (0,000802 U. mL⁻¹). Biely *et al.* (1980), utilizando a levedura *Cryptococcus albidus* encontraram 0,0106 U.mL⁻¹ ao utilizar como substrato xilana extraída de madeira.

Todo interesse no estudo dos sistemas de enzimas xilanolíticas vem sendo estimulado pela sua utilidade em uma variedade de processos biotecnológicos, dentro dele a geração de energia limpa e renovável por isso estudos de termoestabilidade e pH ótimo destas enzimas são propriedades de importância particular (BAJPAI, 1997).

6 CONCLUSÕES

- ✓ As linhagens testadas apresentaram resultados de frequência de produção de amilases, celulases, lipases e xilanases em meio sólido compatíveis com relatos da literatura e com o meio do qual foram isolados.
- ✓ A atividade enzimática de amilases, celulases e xilanases por fermentação submersa mostrou valores baixos, indicando a necessidade de mais estudos das variáveis pH, temperatura e substrato.
- ✓ A atividade enzimática de lipases foi expressiva, os resultados encontrados para a atividade dos isolados testados demonstraram que essas leveduras são promissoras para uso industrial e biotecnológico.

As perspectivas para futuros estudos no que diz respeito às enzimas produzidas pelas linhagens avaliadas nessa pesquisa, incluem:

- ✓ Identificação das linhagens de leveduras utilizadas nesta pesquisa;
- ✓ Otimização dos parâmetros de pH e temperatura na produção de enzimas via fermentação submersa;
- ✓ Purificação e caracterização da enzima produzida pelas linhagens mais promissoras;
- ✓ Avaliação da produção de enzimas em substratos alternativos via fermentação em estado sólido;
- ✓ Avaliar a produção de celulases e xilanases empregando diferentes materiais lignocelulósicos, como bagaço de cana-de-açúcar e capim elefante como perspectiva para a produção de energia limpa.

REFERÊNCIAS

ADLERCREUTZ, P. Immobilization and application of lipases in organic media. *Chemical Society Review*, v.42, p. 6406-6436, 2013.

ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Biochemical characterization of two xylanases from yeast *Pseudozyma hubeiensis* producing only xylooligosaccharides. *Bioresour. Technol.* , V.100, n.24, p.6488-6495, 2009.

ALMEIDA, A. F. Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida de *Candida viswanathii*. Programa de pós-graduação em ciências biológicas (microbiologia aplicada). Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho Instituto de biociências – Rio Claro. Tese de Doutorado do Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. 216 pag., Rio Claro, São Paulo-SP, 2012.

ALMEIDA, M.C.O. *et al.* Análise da produção de amiloglucosidase e alfa-amilase por *Aspergillus awamori* através de fermentação batelada em frascos agitados. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Faculdade de Ciência e Tecnologia de Montes Claros-FACIT. São João dos Montes Claros, MG, 2009.

ALTAMIRANO, M.; BLAKBUR, J.M.; AGUAYO, C.; FERSHT, A, R. Directed evolution of new catalytic activity using the alpha/beta-barrel scaffold. *Nature*, v.403, n.6770, p.617-622, 2000.

AMORIM, G. M. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal. 77 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UESB, Itapetinga-SP, 2011.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Amsterdam, v. 62, p. 9-14, 2010.

BAJPAI, P. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. *Advance in applied Microbiology*. vol. 43, p. 141-194, 1997.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical. *Energy Conv. Manag.* 52: 858-875, 2011.

BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de micro-organismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. *Evidência, Joaçaba* v. 11 n. 2, p. 15-28, julho/dezembro 2011.

BARON, A. M. Produção e caracterização de lipases de *Penicillium corylophilum* IOC 4211, XV Simpósio Nacional de Fermentações, Recife, 2005.

BCC Research, 2012. Global markets for enzymes in industrial applications. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-markets-bio030g.html>. Acesso em: 04 de março 2015.

BECKER, N. B.; BARATTO, C. M.; GELINSKI, J. M. L. N. Propriedades das enzimas α -amilase e xilanase comerciais e sua influência na reologia da massa e na qualidade do pão de forma. *Evidência*. v. 9, n. 1-2, p. 67-82, 2009.

BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOODAL, G. S. Microbial xylanases and rindustrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 56, n. 3/4 p. 326-338, june 2001.

BHAT, M.K; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, New York, v. 15, (3/4) p. 583-620, 1997.

BLANCHETTE, R.A.; SHAW, C.G. Associations among bacteria, yeasts and *basidiomycetes* during wood decay. *Phytopathology* v. 68, p.631-637, 1978.

BONILLA, JUDITH PIÑERO. Importancia biotecnológica de la microbiodiversidad. Los nuevos cazadores de micróbios. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. V. Pag. 284-317. Julio-Diciembre, 2013. Disponível em: http://www.rvcta.org/Publicaciones/Vol4Num2/Archivos/Pinero-Bonilla_Judith_RVCTA-V4N2.pdf. Acesso em 20 de Dezembro de 2014.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 73-81, mar. 2002.

BRASILIANO, R. A. P.; CASTRO, M. C. 1; SENNA, S. N.; ALVES-PRADO, H. F. Seleção de micro-organismos produtores de Amilase isolados em áreas de Cerrado-MS. UNESP, 2014. Disponível em: <http://www.feis.unesp.br/Home/Eventos/encivi/viiencivi-2013/24---selecao-de-micro-organismos-produtores-de-amilase-isolados-em-areas-de-cerradoms.pdf>.

BRUNS, R.E, BARROS NETO, B., SCARMÍNIO, I.S, 1995. Planejamento e Otimização de experimentos. Editora UNICAMP, 1995.

BULL, A.T., GOODFELLOW, M.; SLATER, J. H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. Annual Reviews of Microbiology, Palo Alto, v. 46, p. 219-246, oct. 1992.

BUSSAMARA R, FUENTEFRÍA AM, DE OLIVEIRA E, BROETTO L, SIMCIKOVA M, VALENTE P, SCHRANK A, VAINSTEIN MH. Isolation of a lipase secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. Bioresource Technology. 101: 268-275, 2010.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast like strains isolated from tropical environments. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 93, n.6, p.1020-1025, nov. 2002.

CALADO, V.M.M. DILLON, A.J.P., SALGUEIRO, A.A. Produção de celulases por linhagens de *Humicola grisea* sob cultivo submerso. Revista de Ciências e Tecnologia. v.1 p. 1, 2007.

CARVALHO, F. P. Enzimas celulolíticas e xilanolíticas de leveduras isoladas do cerrado mineiro. Tese de Doutorado Universidade Federal de Lavras. 118 pag. Lavras-MG, 2012.

CARVALHO, P.O.; *et al.* Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. Química nova, vol. 28, nº4, 614 – 621p, 2005.

CASADEI, Maria E. Processos fermentativos a partir da cana-de-açúcar. 2012. 38 f. TCC (Tecnologia em Biocombustíveis) - Faculdade de tecnologia de Araçatuba. Araçatuba, 2012.

CASTRO, A.M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. Química Nova, vol.33, n.1, pp. 181-188. 2010.

CHIDI S. B.; GODANA, I.; NCUBE, E. J.; VAN RENSBURG, A.; CRONSHAW, E. K. ABOTSI, —Production, purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209, African Journal of Biotechnology, vol. 7, no. 21, pp. 3939–3948, 2008.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. 206p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciência de alimentos da faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. 2006.

COSTA, J.A. V. Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz. 1996. 203 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1996.

COSTA, Samira Tenório Cavalcante, ABREU-LIMA, Thiago Lucas, CARREIRO, Solange Cristina, Atividade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) RevBio - Revista de Biociências da Universidade de Taubaté Vol.17 - nº 2 – 2011.

COUTINHO, F. S; MARQUES, D. R.; DIAS, D.S.; SILVA, J. A.; GRANJEIRO, P. A.; GONÇALVES, D. B.; GALDINO, A. S. Perfil de degradação de amido de mandioca por *Saccharomyces cerevisiae* expressando uma amilase de *Cryptococcus flavus*. BBR - BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLY REPORTS. Jul./Dez., v.2, n.4, p. 15-21, 2013.

D'ANNIBALE, A., SERMANI, G.G., FEDERICI, F., PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 15, p. 1828- 1833, 2006.

DAMASO, M. C. T.; TERZI, S. da C.; COURI, S. Assay methods for lipase activity. In: VERMELHO, A. B.; COURI, S.; (Ed.). *Methods to determine enzymatic activity*. USA: Bentham Science Publishers, p. 161-194, 2013.

DE CASTRO, H., F.; ZANN, G.,M.; MORAES, E. E; SÁ-FERREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização. *Química Nova*. V.27, n.1, p. 146-156, 2008.

DESWAL, D.; KHASA, Y. P.; KUHAD, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis sp.RCK2010* under solid state fermentation. *Bioresour. Technol.* 102: 6065–6072, 2011.

ELLIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMADRISHNA, B.; THAER TALEB, A.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 525-528, 2004.

FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; REIS, V. R. A.; JORGE, J. A.; TEREZI, H. F.; REIS, R. A.; POLIZELI, M. L. T. DE M., Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 34, p. 347–355, 2011.

FALCONE, C.O. Avaliação de lipase bacteriana visando sua utilização na geração de biodiesel a partir de resíduos oleosos do saneamento. 2009, 71 p. (Monografia) – Programa de Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal do Espírito. Espírito Santo, 2009.

FARIAS, M. V. Produção de toxinas *-killerI* por leveduras isoladas de solos de savana de Roraima, Brasil. Boa Vista. 36f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Roraima, 2004.

FARIAS, M.V. Produção de enzimas hidrolíticas por leveduras isoladas de Solos de áreas preservadas em Roraima, Brasil. Dissertação de Mestrado do

Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Federal de Roraima, 2008.

FELTES, M. M. C. et al. Lipase-catalyzed synthesis of biodiesel via ethanolysis of chicken fat from processing by-products. *New Biotechnology*, v.25S, p.S277, 2013.

FERNANDES, A.P; Avaliação do potencial Enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes. 2009. 58 páginas. Dissertação de Mestrado em Ciências dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG, 2009.

FLEURI, L.F.; SATO, H.H. Study of different parameters in the production of lytic enzymes. *Ciência Tecnologia Alimentos*, Campinas, v.28, p.299-310, 2008.

FOSSI, B. T.; TAVEA, F.; NDJOUENKEU, R. Production and partial characterization of a thermostable amylase from *ascomyces* yeast strain isolated from starchy soils. *African Journal of Biotechnology*, v. 4, n.1, p.14-18, 2005.

FUENTEFRIA, A. M. Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras isoladas de fitoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*. Porto Alegre. 122 pag. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. *Journal of Biochemistry*. v. 41, p.583-603, 1954.

GACESA, P.; HUBBLE, J. Tecnología de las Enzimas. Acribia, Zaragoza. 1990.

GALVAGNO, M.A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In:ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Org.). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul, RS: EDUCS, p.125-169, 2004.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. In: *Pure and Applied Chemistry*, v.59, p. 257- 268, 1987.

GONÇALVES, F.A.G. Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso. Dissertação (Mestrado). 2007, 67p. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2007.

GOPINATH. S. C. B.; ANBU, P.; HILDA, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*, Tokyo, v. 46, n. 2, P. 119-126, 2005.

GUPTA A, GAUTAM N, MODI DR. Optimization of α -amylase production from free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. *J Bio Pharm Res.*, 2010.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biotechnol.*, 38, 1599-1616p. 2003.

HA, S. H.; LAN, M. N.; LEE, S. H.; HWANG, S. M.; KOO, Y. M. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v.41, n. 4, p. 480-483, sept. 2007.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. *Bioresour Technol*, v.58, n. 2, p.137-161, 1996.

HANKIN, Lester; 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.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 39, n. 2, p. 235-251, June 2009.

HELD, P. Enzymatic Digestion of Polysaccharides. Part II: Optimization of Polymer Digestion and Glucose Production in Microplates. *Laboratory Manager*,

Applications Dept, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT. Biofuel Research, 2012.

HERCULANO, P.N, *et al.* Isolation of cellulolytic Fungi from waste of castor (*Ricinus Communis L.*). *Current Microbiology*. New York. V. 62. N. 5. Pag 1416-1422. May 2011.

HIZUKURI S. STARCH: analytical aspects. In: Eliasson A-C. *Carbohydrates in food*. New York: Marcel Dekker; p. 347-429, 1996.

IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org>. Acesso em 17 de Fevereiro de 2015.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, Amsterdam, v. 13, n. 4, p. 390-397, aug. 2002.

JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the ascomycetes. *Applied microbiology and biotechnology*, Alemanha, v. 97, n. 2, p. 503-517, 2013.

KAMBLE RAJASHRI D.; JADHA ANANDRAO R. Isolation, Purification, and Characterization of Xylanase Produced by a New Species of *Bacillus* in Solid State Fermentation. Hindawi Publishing Corporation. *International Journal of Microbiology*. Volume 2012, 8 pages, 2012.

KAMINI, N. R.; FUJII, T.; KUROSU, T.; IEFUJI, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus sp.* S-2. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 4, p.317-324, 2000.

KHANDEPARKAR R. D.S.; BHOSLE N. B. —Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter sp.* MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, no. 4, pp. 732–742, 2006.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, Amsterdam, v. 13, n. 4, p. 345-351, aug. 2002.

KOBLITZ, M.G. *Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 242 p. 2008.

LANDELL, M. F. *et al.* *Cryptococcus bromeliarum* sp. nov., an orange-coloured *basidiomycetous* yeast isolated from bromeliads in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Online), v. 59, p. 910-913, 2009.

LEALEM, F.; GASHE, B.A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef. (*Eraglostis tef.*). *Journal of Applied Bacteriology*, v. 77, p. 348-352, 1994.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnol.* 56: 1-24, 1997.

LI, H.; CHI, Z.; WANG, X.; DUAN X.; MA, L.; GAO, L. Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 40, n. 5, p. 1006-1012, apr. 2007.

LOCK, L.L. Seleção de leveduras lipolíticas isoladas de bromélias e produção e caracterização de lipase bruta de *Debaryomyces melissophilus* BI81. 2007, 125p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

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

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Washington, v. 66, n. 3, p. 506-577, sept. 2002.

LYND, L. R.; VAN ZYL, W. H; MCBRIDE, J. E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, Amsterdam, v. 16, n.5, p. 577-583, oct. 2005.

MACCHERONI JUNIOR, W.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, J.L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. *Scientia Agricola*, v. 61, n. 3, p. 298-302, 2004.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Pearson Education., v.1, p.466-467. 2004.

MAHADIK, N.D.; *et al.* Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 715-721, 2002.

MAIA, M.M.D.; *et al.* Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresource Technology*, v. 76, p. 23-27, 2001.

MAIJALA, P., FAGERSTEDT, K.V. AND RAUDASKOSKI, M. Detection of extracellular cellulolytic and proteolytic activity in ectomycorrhizal fungi and *Heterobasidion annosum* (Fr.) *New Phytology*, v.117, p.643-648, 1991.

MARCO, E. G. Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de *Bacillus* sp. Mestre (Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2012.

MATTHEW T. CARR AND JAMES R. HETTENHAUS, Sustainable Production of Cellulosic Feedstock for Biorefineries in the USA, in *Biofuels* Edited by Wim Soetaert, Erick J. Vandamme, John Wiley & Sons Ltd, 9-13, 2009.

MELO, WEILAN G. DA P. Leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex Balzani* (hymenoptera: formicidae) de áreas de cerrado do estado do Tocantins. Programa de pós-graduação em ciências biológicas (microbiologia aplicada). Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filholl Instituto de biociências – Rio Claro. Tese de Doutorado do Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. 160 pag., Rio Claro, São Paulo-SP, 2014.

MENDES, T. D.; RODRIGUES, A.; DAYO-OWOYEMI, I.; MARSON, F. A. L.; PAGNOCCA, F. C. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. *Insects, Postfach*, v. 3, n. 1, p. 228-245, 2012.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. Vol. 31, no. 3, march 1959.

MOLNÁROVÁ, J.; VADKERTIOVÁ, R.; STRATILOVÁ, E. Extracellular enzymatic activities and physiological profiles of yeasts colonizing fruit trees. *Journal of Basic Microbiology, Berlin*, v. 53, n. 7, p. 1–11, 2013.

NAGARAJAN S. New tools for exploring "old friends-microbial lipases". *Appl Biochem Biotechnol*. Nov;168(5):1163-96, 2012.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: technical and economical considerations. *European journal of lipid science and technology, weinheim*, v. 110, p. 692-700, 2008.

OGAWA, J.; SHIMIZU, S. Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in japan. *Current opinion in biotechnology, amsterdam*, v. 13, n. 4, p. 367-375, aug. 2002.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química nova*, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n7/a23v33n7.pdf>. Acesso em: 20 de fevereiro 2015.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. *Ciência e tecnologia de alimentos*, v. 27, n. 1, p. 61-66, 2007.

OLIVEIRA, A.N.; FLOR, N.S.; OLIVEIRA, L.A. influência do ph e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da amazônia. *Acta amazônica*. 40(2) 2010: 401 – 404. 2010.

OLIVEIRA, B. M. Comportamento killer em leveduras associadas à fermentação espontânea do mosto da cana-de-açúcar de produtores de

cachaça de alambique da bahia. 2009.123 f. Dissertação (mestrado em biotecnologia)- universidade estadual de feira de santana, feira de santana, 2009.

OTERO, MIGUEL A. Y CABELLO, AGUSTÍN J. Obtención de extracto de levadura a partir de residuo de extracción alcalina de ácido ribonucleico de *Candida Utilis*. Icidca. Sobre los derivados de la caña de azúcar. 44(2):16-20, 2010.

PALMA, M. B., PINTO, A. L., GOMBERT, A. K., SEITZ, K. H., KIVATINITZ, S. C., CASTILHO, L. R., FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium Restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. Applied biochemistry and biotechnology, v.84, p.1137-1145, 2000.

PANDEY, A. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Current science, v. 77, n. 1, p. 149-161, 2000.

PANKE, S.; WUBBOLTS, M. G. Enzyme technology and bioprocess engineering. Current opinion in biotechnology, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 111-116, apr. 2002.

PARACHIN, N. S.; BERGDAHL, B.; HAHN-HÄGERDAL, BÄRBEL; GORWA-GRAUSLUND, MARIE F. Improved xylose consumption in recombinant *saccharomyces cerevisiae*. In: 31st symposium on biotechnology for fuels and chemicals, 2009, San Francisco. V. 59. P. 52-57, 2009.

PEIXOTO, A. B. Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do brasil. 99f. Dissertação (mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

PIEROZZI, M., GIESE, E. C., CADETE, R. M., ROSA, C. A., SILVA, S. S. Seleção de leveduras produtoras de celulasas e xilanases isoladas de reservas naturais brasileiras. XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e XI Encontro Latino Americano de pós-graduação – Universidade do Vale do Paraíba, Paraíba-Pb, 2011.

PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C.; RIBEIR, M.; TORRES, E.A.; LOPES, W. A., PEREIRA, P. A. P. Biodiesel: An Overview j. Braz. Chemical Societe., v. 16, p.1313-1330, 2005.

PLOU, F. J. Analysis of tween 80 as an esterase/lipase substrato for lipolytic activity assay. Biotechnology Techniques. Netherlands, v.12. P. 183-186, 1998.

RANGANATHAN, S. V.; SRINIVASAN, L. N.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. Bioresource technology, essex, v. 99, p. 3975-3981, 2008.

RAO, R.S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of etanol producing yeasts from fruits and tree barks. Lett Appl Microbiol. V. 47, p. 19–24, 2008.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. AZ.; FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. Enzyme Reserch, v.2011, p. 1-16, 2011.

RUEGGER, M.J.S. ; TAUK-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da estação ecológica de Juréia-Itatins. São Paulo, Brasil. Revista brasileira de botânica, v.27, p.205-211, 2004.

RUIZ, C.; PASTOR, F. I. J.; DIAZ, P. Isolation of lipid-and polysaccharide-degrading micro-organisms from subtropical forest soil, and analysis of lipolytic strain *Bacillus sp.cr-179*.letters in Applied Microbiology, Malden, v. 40, n. 3, p. 218-227, mar. 2005.

SAID, S.; PIETRO R. C. L. R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ed. Legis summa, ribeirão preto. 2004.

SALUM, T. F. C. Catálise enzimática produz biodiesel mais verde. Agroenergia em revista, ano 2, n. 2, p. 26-27, maio 2011.

SALUM, THAÍS FABIANA CHAN. Catálise enzimática produz biodiesel mais verde. Embrapa, 2013. Disponível em: <http://www.campograndenews.com.br/artigos/catalise-enzimatica-produz-biodiesel-mais-verde>. Acesso em 10 de janeiro de 2015.

SÁNCHEZ C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, v.27, p.185–194, 2008.

SANT'ANA JR., G.L. Produção de enzimas microbianas. In: lima, u.a. (coord.) *Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos*. 1. Ed., v.3. São Paulo: Edgard Blücher. Cap. 14. P.351-362, 2001.

SAVAL, SUSANA. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *Biotecnología*. 16(2):14-46, 2012.

SAXENA, R.K. A highly thermostable and alka- line amylase from a *Bacillus sp. Pn5*. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 2, p. 260-265, 2007.

SCHMID, A.; HOLLMANN, F.; PARK J. B.; BÜHLER, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology*, Amsterdam, v.13, n. 4, p. 359-366, aug, 2002.

SCHMIDT, CHARLES W. Synthetic biology. Environmental health implications of a new field. *Environmental Health Perspectives*. 118(3): a118-a123, 2010.

SEMIONATO, S. Avaliação da atividade lipolítica de bactérias isoladas dos dispositivos de remoção de gordura. Vitória: UFES, 2006. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental), 2006.

SERAFINI, R.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. *Biotecnologia na agricultura e na agroindústria*. Guaíba: Agropecuária. 463 p., 2001.

SHARMA, A.; SHRIVASTAVA, A.; SHARMA, S.; GUPTA, R.; KUHAD, C. R. Microbial pectinases and their applications. In: KUHAD, R. C.; SINGH, A. *Biotechnology for environmental management and resource recovery*. Springer, India, p. 107-124, 2013.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.

SIERRA, G. A. Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Laboratory of Microbiology, Amsterdam, holland and department of biochemistry, Institute, Jaime Ferrán" of microbiology, Madrid, Spain. Received July 24, 1956.

SILVA, C. H. D. Fungos associados a invertebrados marinhos: isolamento, seleção e avaliação da produção de enzimas celulolíticas. 2010. 69p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.

SILVA, M.S. Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau. UESC, 83p. Dissertação (Mestrado). Programa de pós – graduação em Biotecnologia – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia-Ba, 2011.

SIMÕES, J. Pesquisa e desenvolvimento em etanol ii. Produção de etanol celulósico no país depende de investimento privado: Unicamp, São Paulo, 7 dez. 2007. Disponível em: <http://www.inovacao.unicamp.br/report/noticias/>. Acesso em: 3 de janeiro de 2015.

SINGH A.K., MUKHOPADHYAY M. Overview of fungal lipase: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.166(2):486–520, 2012.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme microbial Technology*. 46: 541-549, 2010.

SOARES I. A.; FLORES A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA M.M.; PATERA BARCELOS, R. TREVISOL, L.R.; CARVALHO, R.D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C.M.S.C; BARONI, S. Identification of the amylolytic potential of

mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.30, p. 700-705. 2010.

SOARES, M.M.C.N.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus sp.* *Revista de microbiologia*, v. 30, p. 225-230, 1999.

SOCCOL, C.R. Glucoamylase. In: enzyme technology. New delhi: Asiatec Publishers Inc., p. 221- 230, 2005.

SOUZA, A. C. Utilização de celulases de leveduras para a produção de bioetanol de segunda geração. 90 p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2011.

SOUZA, C.G., BRAGA, R.M., AMORIM, M.V.F.S., FAHEINA JUNIOR, G.S., LOPES, V.R.O., MARTINS, S.C.S., PINTO, G.A.S., MARTINS, C.M. atividade celulolítica de fungos isolados do solo do manguezal da Reserva Ecológica de Sapiranga. In: XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. *Brazilian Journal of Microbiology*. V.40, p.623-630. 2009.

SOUZA, T.C. DE; MAGALHÃES, P.C.; PEREIRA, F.J.; CASTRO, E.M. DE; SILVA JÚNIOR, J.M. DA; PARENTONI, S.N. Leaf plasticity in successive selection cycles of 'Saracura' maize in response to periodic soil flooding. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.45, p.16-24, 2010.

SPENCER-MARTIN, I.; VAN UDEN, N. Inactivation of archive glucose transport in *Candida wickerhamii* is triggered by exocellular glucose. *Fems. Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 277- 279, 1985.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Enzymatic activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*pachyrhizus erosus* L. Urban) (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciência e tecnologia de Alimentos*, v. 18, p. 382-385, 1998.

STEELE, D. B.; STOWERS, M. D. Techniques for selection of industrially importante microorganisms. Annual Reviews of Microbiology, Palo Alto, v. 45, p. 89-106, oct. 1991.

STRAUSS, M. L. A.; JOLLY, N. P.; LAMBRECHTS, M. G.; VAN RENSBURG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non *Saccharomyces wine* yeasts. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 91, n. 1, p. 182-190, julho, 2001.

SUN, H; ZHAO, P; GE, X. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes, Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 160, no. 4, pp. 988–1003, 2010.

TALEBNIA, F., *ET AL.* Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hidrólisis and fermentation. Bioresource Technology, Essex, v. 101, n. 13, p. 4744-4753, jul. 2010.

TECNOCIÊNCIA- Disponível em: http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2013/08/012-015_pesquisafapesp_2103.pdf. Acesso em 20 de janeiro de 2015.

THONGEKKAEW, J., IKEDA, H., MASAKI, K., IEFUJI, H. 2008. Na acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus sp. S-2*: purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification, San Diego, v. 60, n.2, p. 140-146, agosto 2008.

UNICA. União da indústria de cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticia/29810917920343378786/usina-pioneira-de-etanol-celulosico-coloca-brasil/>. Acesso em: 22 out. 2014.

VAN ZYL, W. H.; BLOOM, M.; VIKTOR, M. J. Engineering yeasts for raw starch conversion. Appl Microbiol Biotechnol, v. 95, n.6, p.1377-88, 2012.

Vasconcelos, w.e. rios, m.s. sousa, a.h. medeiros, e.v. silva, g.m.c. maracajá, p.b. caracterização bioquímica e enzimática de cunninghamella isoladas de manguezal. Revista de biologia e ciências da terra. V.3, 2003.

VEGA, F. E.; DOWD, P. F. The role of yeasts as insect endosymbionts. In VEGA, F. E. & BLACKWELL, M. (Eds.). *Insect-fungal associations: Ecology and evolution*. Oxford University Press, New York, p. 211–243, 2005.

VIHINEN, M.; MÄNTSÄLÄ, P. Microbial Amylolytic Enzymes. Issue, v. 24, p. 329-418, 1989.

VITOLLO, M. Aplicação de enzimas na tecnologia de alimentos. In: *Biotecnologia Industrial: Biotecnologia na Produção de Alimentos*. 1 ed. Volume 4. Ed. Edgard Blucher Ltda. 387-420. 2001.

WALSH, C. Enabling the chemistry of life. *Nature*. London, v. 409, n. 6839, p. 26-231, jan. 2001.

WONG-PAZ, J. E.; DE LA C., R.; REYES-ARREOZOLA, M. I; LOREDO-TREVIÑO, A. Y AGUILAR, C. 2011. El pasado de la tecnología e ingeniería biológica. *Acta Química Mexicana*. 3(6):1-7, 2011.

XIE, F.; QUANA, S.; LIUA, D.; MAA, H.; LI, F.; ZHOUB, F.; CHENB, G. Purification and characterization of a novel alfa-amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus strain p11-2*. *Process Biochemistry* v.49 47–53, 2014.

YAN, S.; WU, G. Secretory pathway of celullase: a mini-review. *Biotechnology for Biofuels*, 2013. Disponível em: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/177>. Acesso em 15 de janeiro de 2015.

YANG, K. S.; SOHN, J-H.; KIM, H. K. Catalytic properties of a lipase from photobacterium lipolyticum for biodiesel production containing a high methanol concentration. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Osaka, v. 107, p. 599-604, 2009.

ZUNIGA, U. F. R. Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração. Tese de doutorado. São Paulo: USP. 228p, 2011.

APÊNDICE A

Quadro 1. Análise de variância (ANOVA) para amilase (*screening*).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	40.702	35	116.292	34.12	0,0001
Resíduo	2.454	72	0.05606		
Total	43.156	107			

$R^2 = 94\%$; $F_{tab} = 3,11$

Quadro 2. Análise de variância (ANOVA) para celulase (*screening*).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	47.577	62	0.76738	13.68	0,0001
Resíduo	7.063	126	0.05606		
Total	54.640	188			

$R^2 = 87\%$; $F_{tab} = 3,11$

Quadro 3. Análise de variância (ANOVA) para lipase (*screening*).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	718.570	88	816.558	62.05	0,0001
Resíduo	23.423	178	0.13159		
Total	741.993	266			

$R^2 = 96\%$; $F_{tab} = 3,11$

Quadro 4. Análise de variância (ANOVA) para xilanase (*screening*).

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	8.258	39	211.763	58.67	0,0001
Resíduo	288.740	80	0.05606		
Total	8.547	119			

$R^2 = 87\%$; $F_{tab} = 3,11$

Quadro 5. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de alfa-amilase para a levedura AS 110.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0008	2	0,000407	4,30	0,0001
Resíduo	0,000758	8	0,000095		
Total	0,001573	10			

$R^2 = 51\%$; $F_{tab} = 3,11$

Quadro 6. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de alfa-amilase para a levedura TAQ 100.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0001	2	0,00035	5,64	0,0001
Resíduo	0,000050	8	0,000006		
Total	0,000122	10			

$R^2 = 58\%$; $F_{tab} = 3,11$

Quadro 7. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de alfa-amilase para a levedura BIO 119.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0003	5	0,00005	49,5	0,0001
Resíduo	0,000005	5	0,000001		
Total	0,000274	10			

$R^2 = 98\%$; $F_{tab} = 3,45$

Quadro 8. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de alfa-amilase para a levedura AS 122.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0004	4	0,000094	25,14	0,0001
Resíduo	0,000023	6	0,000004		
Total	0,000401	10			

$R^2 = 94\%$; $F_{tab} = 3,18$

Quadro 9. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de alfa-amilase para a levedura BIO 121.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	0,0001	5	0,00023	2,44	0,0001
Resíduo	0,000048	5	0,000010		
Total	0,000165	10			

$R^2 = 71\%$; $F_{tab} = 3,45$

Quadro 10. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de glicoamilase para a levedura AS 110.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	0,0005	3	0,000157	9,45	0,0001
Resíduo	0,000116	7	0,000017		
Total	0,000587	10			

$R^2 = 80\%$; $F_{tab} = 3,07$

Quadro 11. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de glicoamilase para a levedura TAQ 100.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	0,0000	4	0,00007	3,20	0,0001
Resíduo	0,000001	6	0,000001		
Total	0,000004	10			

$R^2 = 72\%$; $F_{tab} = 3,18$

Quadro 12. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de glicoamilase para a levedura BIO 119.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	0,0000	5	0,0000015	2,27	0,0001
Resíduo	0,000003	5	0,000001		
Total	0,0000011	10			

$R^2 = 69\%$; $F_{tab} = 3,45$

Quadro 13. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de glicoamilase para a levedura AS 122.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0000	5	0,000003	2,05	0,0001
Resíduo	0,000007	5	0,000001		
Total	0,000021	10			

$R^2 = 67\%$; $F_{tab} = 3,45$

Quadro 14. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de glicoamilase para a levedura BIO 121.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0000	6	0,0000014	12,74	0,0001
Resíduo	0,000001	4	0,000001		
Total	0,000006	10			

$R^2 = 91\%$; $F_{tab} = 3,05$

Quadro 15. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de celulase para a levedura AS 122.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0001	2	0,0000595	9,337	0,0001
Resíduo	0,000051	8	0,000006		
Total	0,000170	10			

$R^2 = 70\%$; $F_{tab} = 3,11$

Quadro 16. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de celulase para a levedura TAQ 250.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0001	2	0,000372	25,53	0,0001
Resíduo	0,000012	8	0,000001		
Total	0,000086	10			

$R^2 = 70\%$; $F_{tab} = 3,11$

Quadro 17. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de celulase para a levedura TAQ 631.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0001	2	0,000543	6,41	0,0001
Resíduo	0,000068	8	0,000008		
Total	0,000176	10			

$R^2 = 61\%$; $F_{tab} = 3,11$

Quadro 18. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de celulase para a levedura TAQ 14.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0001	3	0,000259	6,94	0,0001
Resíduo	0,000026	7	0,000004		
Total	0,000104	10			

$R^2 = 75\%$; $F_{tab} = 3,07$

Quadro 19. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de celulase para a levedura BIO 121.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0004	4	0,000934	97,29	0,0001
Resíduo	0,00006	6	0,000001		
Total	0,000379	10			

$R^2 = 98\%$; $F_{tab} = 3,05$

Quadro 20. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de xilanase para a levedura BIO 45.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	2,160	5	0,432	1,09	0,0001
Resíduo	1,980	5	0,396		
Total	4,141	10			

$R^2 = 52\%$; $F_{tab} = 3,05$

Quadro 21. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de xilanase para a levedura TAQ 54.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,4569	4	0,114	3,76	0,0001
Resíduo	0,152	6	0,303		
Total	0,608	10			

$R^2 = 75\%$; $F_{tab} = 3,05$

Quadro 22. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de xilanase para a levedura TAQ 616.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	7,47	4	1,86	1,23	0,0001
Resíduo	7,55	6	1,51		
Total	15,03	10			

$R^2 = 50\%$; $F_{tab} = 3,05$

Quadro 23. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de celulase para a levedura TAQ 164.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	44,9272	5	11,2318	10,43	0,0001
Resíduo	5,38398	5	1,07680		
Total	50,31117	10			

$R^2 = 89\%$; $F_{tab} = 2,52$

Quadro 24. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de celulase para a levedura ABRT 461.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	18,25	4	4,55	2,42	0,0001
Resíduo	9,42	6	1,88		
Total	27,65	10			

$R^2 = 66\%$; $F_{tab} = 3,05$

Quadro 25. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de xilanase para a levedura TAQ 16.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0004	4	0,000891	28,46	0,0001
Resíduo	0,000019	6	0,000003		
Total	0,000375	10			

$R^2 = 98\%$; $F_{tab} = 3,05$

Quadro 26. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de xilanase para a levedura TAQ 131.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0001	4	0,000232	38,88	0,0001
Resíduo	0,00004	6	0,000001		
Total	0,000097	10			

$R^2 = 96\%$; $F_{tab} = 3,05$

Quadro 27. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de xilanase para a levedura BIO 19.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0002	2	0,000888	7,03	0,0001
Resíduo	0,000101	8	0,000013		
Total	0,000278	10			

$R^2 = 64\%$; $F_{tab} = 3,11$

Quadro 28. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de xilanase para a levedura TAQ 54.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0002	4	0,000555	25	0,0001
Resíduo	0,000013	6	0,000002		
Total	0,000235	10			

$R^2 = 94\%$; $F_{tab} = 3,05$

Quadro 29. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão da produção de xilanase para a levedura ABRT 461.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc	p-valor
Regressão	0,0001	5	0,00004	20	0,0001
Resíduo	0,000012	5	0,000002		
Total	0,000225	10			

$R^2 = 96\%$; $F_{tab} = 3,05$