Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Seleção de leveduras com potencial para produção de enzimas de interesse industrial

Marília Volpato Vieira

Dourados
Mato Grosso do Sul - Brasil
2012

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Seleção de leveduras com potencial para produção de enzimas de interesse industrial

Marília Volpato Vieira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biotecnologia – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – Universidade Federal da Grande Dourados, sob orientação do Profº. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

Dourados
Mato Grosso do Sul – Brasil
2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

662.1
V658s

Vieira, Marília Volpato.
Seleção de leveduras com potencial para produção de enzimas de interesse industrial : Marília Volpato Vieira – Dourados-MS : UFGD, 2012.
21 f.

Orientador: Rodrigo Simões Ribeiro Leite.
Monografia (Graduação em Biotecnologia) Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Leveduras. 2. Enzimas microbianas. 3. Etanol combustível. I. Título.

Dedico esta monografia a minha mãe, Sueli, por ter sido o maior exemplo de determinação, força, amor e coragem em minha vida. Hoje realizo um de seus sonhos e mesmo que ela não esteja mais presente, sei que deve estar muito feliz e orgulhosa por me ver vencer mais uma etapa.

"Se tu vens, por exemplo, às quatro da tarde, desde as três eu começarei a ser feliz. Quanto mais a hora for chegando, mais eu me sentirei feliz. Às quatro horas, então, estarei inquieta e agitada: descobrirei o preço da felicidade! Mas se tu vens a qualquer momento, nunca saberei a hora de preparar o coração... É preciso ritos."

O Pequeno Príncipe – Antoine de Saint Exupéry

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem ele nada seria possível.

Agradeço aos meus pais, Odilon e Sueli, e a minha irmã, Flávia, por sempre estarem ao meu lado e por me apoiarem em todas as minhas decisões.

Agradeço ao Profº. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, por ter me orientado em meu Trabalho de Conclusão de Curso e em minha iniciação científica, por sua disponibilidade e por ter ensinado a importância do trabalho científico durante a graduação.

Agradeço ao Profº. Dr. Marcelo Fossa da Paz e ao Profº. Dr. Gustavo Graciano Fonseca, por aceitarem participar da banca examinadora do meu Trabalho de Conclusão de Curso.

Agradeço à futura mestre em Bioprospecção, Ana Paula Aguero de Oliveira, por tudo que me ensinou sobre as técnicas laboratoriais, e principalmente, por sua amizade.

Agradeço a todo o Grupo de Enzimologia e Processos Fermentativos: Maria Alice, Nayara, Flávia, Vinicius, Taísa, Gabriela, Ândrea, Ana Carolina, Rodrigo e Marta pelo companheirismo durante a rotina de pesquisa.

Agradeço aos técnicos dos laboratórios da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, por sua disponibilidade.

Agradeço aos professores do Curso de Biotecnologia e Ciências Biológicas que ajudaram a construir o conhecimento que hoje possuo.

Agradeço aos acadêmicos da primeira turma de Biotecnologia e futuros colegas de profissão, por terem feito parte não só desses quatro anos de estudo, mas também pelos laços de amizade criados.

Agradeço a todos os meus amigos por sempre me apoiarem e estarem junto de mim nos momentos de cansaço, fazendo-me seguir em frente, tenho por todos vocês um carinho especial.

Muito obrigada a todos vocês!

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS I
RESUMO 0
INTRODUÇÃO 1
REVISÃO DE LITERATURA 3
1 O ETANOL NO BRASIL 3
2 LEVEDURAS 4
3 ENZIMAS 5
4 CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS 7
OBJETIVOS 7
MATERIAL E MÉTODOS 7
1 MICRO-ORGANISMOS AVALIADOS 7
2 OBTENÇÃO DO INÓCULO 8
3 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS 8
4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS 8
5 CULTIVO SUBMERSO PARA PRODUÇÃO DE INVERTASES 8
6 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS EXTRACEULAR E INTRACELULAR 9
7 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS 9
8 ANÁLISE DOS RESULTADOS 9
RESULTADOS E DISCUSSÃO 9
CONCLUSÃO 13
REFERÊNCIAS 14
ANEXOS 18

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- ATIVIDADES EM U/ML E DESVIO PADRÃO DOS RESULTADOS DE AMILASE, CMCASE, B-GLICOSIDASE E XILANASE OBTIDAS ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO 9

TABELA 2- ATIVIDADES EM U/ML E DESVIO PADRÃO DOS RESULTADOS DE INVERTASE EXTRACELULAR E INTRACELULAR OBTIDAS ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA 11

RESUMO

A utilização de enzimas produzidas por micro-organismos em processos industriais é mais vantajosa em relação às de origem animal e vegetal, uma vez que não sofrem influência de fatores climáticos, apresentam reduzido tempo de produção e baixo custo. A presente proposta teve como principal objetivo selecionar leveduras isoladas da Região Centro-Oeste para produção de enzimas de interesse industrial, tais como: amilases, celulases, hemicelulases e invertases. As linhagens foram cultivadas em farelo de trigo por Fermentação em Estado Sólido visando à produção de enzimas que degradam polissacarídeos vegetais. Para produção de invertases as leveduras foram cultivadas em meio líquido contendo sacarose como principal fonte de carbono. As linhagens que apresentaram maior produção de amilase foram os isolados 29 (14,68 U/mL), 30 (25 U/mL), 37 (14,10 U/mL) e 43 (25,39 U/mL). As linhagens que apresentaram potencial para a produção de celulase foram os isolados 1, 7, 28, 30, 39, 41 e 44, sendo a maior produção de 1,67 U/mL (isolado 7). As linhagens que apresentaram maior produção de xilanase foram os Isolados 1, 28, 30, 41, 43 e 44, sendo que a maior produção foi 2,56 U/mL (isolado 1). Nas condições de cultivo utilizadas no presente trabalho nenhuma linhagem apresentou produções significativas de β-glicosidase. A linhagem comercial "Cat" (*Saccharomyces cerevisiae*) foi utilizada como padrão para produção de invertases, o isolado 46 (12,87 U/mL) apresentou maior produção de invertase extracelular que a linhagem comercial; os isolados 23 (24,49 U/mL), 32 (20,28 U/mL), 35 (47,40 U/mL) e 46 (34,65 U/mL) produziram concentrações de invertase intracelular igual ou maior que a linhagem controle (Cat), que produziu 24,80 U/mL. Os resultados obtidos permitem inferir que as linhagens isoladas apresentam potencial para produção de diferentes enzimas industriais, o que será explorado em trabalhos futuros, visionando a identificação das leveduras selecionadas e a otimização da produção enzimática, contribuindo assim para o desenvolvimento de novos processos biotecnológicos.

Palavras-chave: Etanol, Enzimas Microbianas, Bioprospecção de leveduras.

INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis são muito utilizados no Brasil, colocando o país em um importante lugar no cenário econômico, entretanto, é crescente a busca por fontes energéticas alternativas de menor impacto ambiental. Além disso, o aumento populacional resulta em uma inevitável necessidade de criarmos novas fontes de

alimentos e energia, o que só será possível com melhor aproveitamento dos recursos naturais (VILLAS-BÔAS; ESPOSITO, 2000). Neste contexto, no ano de 1975, foi criado no Brasil o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), que teve como objetivo aumentar a produção e o uso de etanol combustível no país, visando reduzir significativamente a emissão de CO_2. Atualmente o Brasil destaca-se no cenário mundial na produção de etanol combustível.

Nesse sentido, o aperfeiçoamento dos processos já existentes para a obtenção de etanol, assim como, o desenvolvimento de novas tecnologias para a utilização de polissacarídeo de origem vegetal como o amido e a celulose, são de fundamental importância para a economia brasileira (VILLAS-BÔAS; ESPOSITO, 2000).

O etanol é produzido principalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* que utiliza monossacarídeos provenientes da quebra da sacarose (dissacarídeo abundante no caldo da cana de açúcar). Estima-se que em 2013 a demanda desse combustível no Brasil será de aproximadamente 32 bilhões de litros por ano, dessa forma, para suprir as necessidades nacionais será inevitável aumentar o cultivo da cana de açúcar ou utilizar outras fontes energéticas para a produção de etanol. Uma alternativa seria a produção de etanol a partir de polissacarídeos de origem vegetal, como amido e celulose. Nesse tipo de processo enzimas são utilizadas para quebrar esses polissacarídeos e liberar açúcares fermentescíveis (monossacarídeos), que por sua vez serão convertidos em etanol pela *S. cerevisiae* através da fermentação alcoólica, processo convencionalmente utilizado pelas usinas sucroenergéticas (BON et al., 2008).

A conversão dos polissacarídeos vegetais em açúcares fermentescíveis pode ser realizada por via ácida ou enzimática. A hidrólise ácida apresenta uma série de desvantagens, dentre elas: requerimento adicional de calor, necessidade de equipamentos resistentes à corrosão e formação de subprodutos tóxicos indesejáveis (PALMA-FERNANDEZ, 2002). O emprego do método enzimático seria uma alternativa, no entanto, a utilização industrial de algumas enzimas ainda apresenta entraves a serem superados, como: elevado custo de produção, baixa estabilidade estrutural das enzimas e inibição pelo produto de reação (ZANOELO et al., 2004).

A hidrólise enzimática dos polissacarídeos vegetais depende de complexos multienzimáticos que atuam simultaneamente sobre essas macromoléculas. Geralmente, a ação de uma enzima depende da atividade prévia de outras enzimas do complexo catalítico e em sua grande maioria são inibidas pelo próprio produto de reação. Neste contexto, a prospecção de novas fontes microbianas produtoras de enzimas associada ao

estudo de suas propriedades catalíticas, tem despertado grande interesse no cenário energético mundial.

REVISÃO DE LITERATURA

1 O etanol no Brasil

O crescimento populacional e o desenvolvimento industrial trouxeram problemas ao Brasil no que diz respeito à quantidade de alimento, à necessidade energética, ao aumento da poluição e desastres ambientais causados pelo acúmulo de resíduos na atmosfera (NITSCH, 1991).

Sabe-se que os combustíveis fósseis podem ser total ou parcialmente substituídos por biocombustíveis, esses apresentam vantagem, uma vez que são renováveis com pequenos ciclos de tempo, ao contrário dos fósseis que levam períodos geológicos para se degradar (MENEZES, 1980). Ademais, estudos demonstram que os combustíveis fósseis se esgotarão em breve, requerendo fontes alternativas. Nesse cenário surgiu o etanol, produzido pela fermentação da cana-de-açúcar realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No Brasil, esse combustível ganhou grande destaque com o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) (BASTOS, 2007).

O referido programa foi instalado em 1975 em razão da crise energética que ocorreu no país e visava substituir totalmente os combustíveis derivados do petróleo (BASTOS, 2007), o etanol produzido através da cana-de-açúcar é vantajoso visto que não utilizaria fontes minerais esgotáveis, além disso, o Brasil possui vastas regiões para plantação e clima tropical adequado ao seu cultivo. O programa também trouxe várias outras vantagens como desenvolvimento do setor agroindustrial, abertura de indústrias sucroalcooleiras, gerando empregos (NITSCH, 1991).

Como forma de aumentar ainda mais a produção do etanol, estudos começaram a ser realizados com o intuito de encontrar novas culturas, tais como o milho e a beterraba, que pudessem produzir o combustível. Para isso, é necessário que a cultura seja adaptada ao mesmo clima, não tenha um preço elevado e possua açúcares fermentescíveis. Do ponto de vista agronômico, essa variação promove rotação de culturas, conservando os nutrientes do solo e proporcionando maior garantia contra o surgimento de pragas (MENEZES, 1980).

Além de novas culturas para produção de etanol, busca-se também a produção de biocombustíveis a partir de biomassa vegetal (SANTOS et al., 2010), uma vez que são encontrados em grande quantidade e são renováveis (REYES et al., 1998).

Os materiais lignocelulósicos mais utilizados no Brasil são o bagaço de cana, a palha de cana, a palha de soja, a palha de arroz e o sabugo de milho, apesar de representarem uma alternativa viável para a produção de etanol, alguns problemas são encontrados: tais materiais são formados por três polímeros, lignina, hemicelulose e celulose, unidos por ligações covalentes, que resulta em expressiva estabilidade estrutural e dificulta sua degradação para a obtenção de açúcares fermentescíveis (CASTRO; JUNIOR, 2010).

A celulose é um polissacarídeo formado por moléculas de glicose, essas fibras celulósicas são recobertas por hemiceluloses que são polissacarídeos ramificados e lignina, redes poliméricas tridimensionais constituídas por anéis aromáticos de difícil degradação (OGEDA; PETRI, 2010).

Infelizmente, o uso de matérias lignocelulósicas é ainda um processo caro devido à dificuldade de acesso à celulose. Para facilitar esse acesso é necessário pré tratamento para remover a lignina, a hemicelulose, reduzir a cristanilidade da celulose e aumentar a porosidade desta macromolécula (SUN; CHENG, 2002). Como forma de facilitar a hidrólise enzimática, tratamentos físicos e químicos podem ser utilizados para a desestruturação da parede celular vegetal, anteriormente à adição das enzimas (DWIVEDI, 2009; OGEDA; PETRI, 2010).

Na hidrólise enzimática são utilizadas celulases e hemicelulases, enzimas responsáveis em transformar polissacarídeos em monossacarídeos e assim, liberar moléculas de glicose que são então fermentadas para a produção de etanol (DWIVEDI et al., 2009). A hidrólise ácida apresenta algumas desvantagens em relação à outra, uma vez que há possibilidade de ocorrência de substâncias tóxicas para as células microbianas que prejudicam o processo de fermentação alcoólica (CASTRO; JUNIOR, 2010).

2 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares. Apresentam formas ovais, esféricas ou elípticas e são imóveis devido à ausência de flagelos. Sua reprodução pode ser sexuada, ocorrendo por esporos, ou assexuada, ocorrendo por fissão ou brotamento. As leveduras apresentam de 63% a 83% de água, além de uma alta quantidade de proteínas, lipídios e macronutrientes (AIDOO et al., 2005). Para que seu crescimento e reprodução sejam possíveis é necessário água, nitrogênio, oxigênio e minerais (TORTORA et al., 2002), sendo que a fonte de carbono é extremamente importante, podendo ser fornecida por

açúcar, aldeído, ácidos orgânicos, glicerol ou etanol. Quando o açúcar é a fonte de carbono principal, a levedura pode assimilar ou fermentar esse açúcar. Nesse contexto, dependendo das condições de cultivo, podem ser classificadas como fermentadoras as que são capazes de fermentar os compostos de carbono e como não fermentadoras, as que apenas assimilam tais compostos (OLIVEIRA, 2009).

Esses micro-organismos têm a capacidade de se adaptar a diferentes substratos, dessa forma, são capazes de secretar enzimas que hidrolisam macromoléculas que serão utilizadas na sua alimentação (SILVA, 2011); possuem grande importância industrial, uma vez que são utilizadas na elaboração de diversos produtos fermentados, dentre eles, biocombustíveis, alimentos, produtos lácteos, bebidas, enzimas e fármacos. A levedura mais utilizada industrialmente é a *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente no que diz respeito à fermentação de diferentes fontes de açúcar para a produção de etanol (GUIMARÃES, 2005; OLIVEIRA, 2009).

3 Enzimas

As enzimas são macromoléculas capazes de catalisar reações químicas, possuindo grande importância na indústria farmacêutica, química, de alimentos e agricultura. Com o passar dos anos substituiu-se os catalisadores químicos por enzimas, uma vez que estas reduzem o tempo e a energia gasta no sistema (DE-PAULA, 2007). Dentre as enzimas utilizadas na indústria é possível destacar as celulases, hemicelulases, amilases e invertases.

A hemicelulose é o polissacarídeo não celulósico mais encontrado na natureza, localizado na parede celular vegetal. Para que este composto seja quebrado é necessário um complexo de enzimas, entre as mais conhecidas estão as xilanases (RUEGGER; TAUK-TORNISIELO, 2002), que são responsáveis por quebrar cadeias de xilana dispostas ao longo da fibra da celulose, liberando oligossacarídeos, que podem ou não ser continuamente quebrados liberando moléculas menores de açúcar. Dessa forma a celulose fica livre para ser degradada pelas celulases (FERREIRA, 2010).

As xilanases são principalmente utilizadas para o branqueamento de polpas de papel e celulose, porém outras aplicações são descritas: extração de aromas e pigmentos vegetais, aumento da eficiência das ensilagens agrícola, panificação e produção de xilitol (HECK, 2005).

As enzimas celulolíticas são um complexo enzimático formado por endoglucanase, responsável por clivar regiões internas da fibra celulósica;

exoglucanase, responsável por clivar regiões externas da fibra celulósica e β-glicosidase que hidrolisa celobiose e oligossacarídeos provenientes da hidrólise da celulose. As exoglucanases ainda podem ser classificadas como celobio-hidrolase e glucano-hidrolase. As endoglucanases quebram cadeias de celulose e fornecem novos sítios de atuação para as celobio-hidrolases (OGEDA; PETRI, 2010).

As β-glicosidases hidrolisam ligações β-glicosídicas de dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos, a afinidade dessas enzimas por um substrato depende de sua origem e localização. Suas funções são diversas dependendo do organismo em que atuam, nas plantas hidrolisam os precursores de hormônios, degradam a parede celular e são responsáveis pelo amadurecimento de frutos, em humanos elas são responsáveis pela hidrólise de glicosilceramidas e em micro-organismos pela hidrólise de oligossacarídeos de cadeia curta e celobiose (DAROIT, 2007).

O amido é formado por amilose, composta por cadeias lineares helicoidais de glicose com ligações α-1,4 e amilopectina que é altamente ramificada, formada por cadeias de glicose com ligações α-1,4, das quais partem ramificações de cadeias de glicose com ligações α-1,6. Para produção de etanol a partir de amido é necessário hidrolisá-lo até açúcares fermentescíveis, tal hidrólise pode ser realizada por enzimas amilolíticas (PÚGLIA, 2006).

As amilases podem ser divididas em endoamilases e exoamilases; as endoamilases são responsáveis por quebrar ligações glicosídicas ao longo das cadeias de amilose e amilopectina, enquanto que as exoamilases quebram ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora (PÚGLIA, 2006). Essas enzimas representam 25% do mercado de enzimas e possuem variadas aplicações biotecnológicas na indústria química, de alimentos, de bebidas e farmacêutica (COSTA et al., 2011).

As invertases ou sacarases hidrolisam a sacarose transformando-a em glicose e frutose. Em *Saccharomyces cerevisiae* essa enzima pode ser encontrada em duas formas, a invertase extracelular que fica localizada na parede celular e a invertase interna que se encontra no citoplasma (PARAZZI-JUNIOR, 2006).

Suas principais aplicações são na indústria alimentícia para produção de xaropes, doces, leite condensado e bebidas; também é utilizada na produção de mel artificial, agentes plastificantes usados em cosméticos, indústria farmacêutica, de papel e principalmente para a produção do etanol (QURESHI et al., 2012).

4 Cultivo de micro-organismos para produção de enzimas

A produção de enzimas microbianas é dada pelo cultivo dos micro-organismos em meio sólido ou submerso.

O Cultivo em Estado Sólido é bastante interessante, visto que se aproxima das condições naturais de crescimento de micro-organismos e requer pouca energia e equipamentos não sofisticados, o que reduz o custo do processo. Nesse cultivo, o produto é recuperado totalmente por não existir presença de água livre. Além disso, utiliza subprodutos agroindustriais que seriam descartados no meio ambiente, como o farelo de trigo, o bagaço de cana, a palha da cana, palha do arroz, sabugo de milho, entre outros (NOVAKI et al., 2010).

O cultivo submerso é o mais utilizado em escalas industriais, consiste em um processo no qual os micro-organismos desenvolvem-se em meio líquido sob agitação. Este tipo de processo apresenta diversas vantagens, entre elas, a facilidade no controle dos parâmetros de cultivo, fácil recuperação de nutrientes e metabólitos e redução da possibilidade de degradação do produto (FAHEINA-JUNIOR, 2012).

OBJETIVOS

1) Este trabalho teve como objetivo selecionar leveduras isoladas da Região Centro-Oeste, visando a produção de enzimas que possuam interesse industrial, tais como: amilases, hemicelulases, celulases e invertases.

2) Contribuir para a manutenção das leveduras isoladas e depositadas na Rede Centro-Oeste de Leveduras (RECOL).

MATERIAL E MÉTODOS

1 Micro-organismos avaliados

No total foram avaliadas 54 linhagens de leveduras, dentre elas, 47 linhagens foram obtidas da Rede Centro-Oeste de Leveduras (RECOL) e as demais isoladas de diferentes ambientes: as Ave I e Ave II foram isoladas de cama de frango; os isolados Guavira, Gabiroba, Pequi e Marmelo foram isolados destes respectivos frutos do cerrado e a linhagem denominada Cat foi utilizada como padrão, pois é uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada para a produção industrial de etanol. Esta linhagem foi cedida pela Usina São Fernando, Dourados – MS. As linhagens isoladas pelo nosso grupo foram depositadas na RECOL.

2 Obtenção do inóculo

As leveduras foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio ágar YEPD inclinado, mantido por 48 horas a 28ºC.

3 Cultivo em Estado Sólido para produção dos extratos enzimáticos

As linhagens foram cultivadas em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial (farelo de trigo) como meio de cultura complexo. Os extratos obtidos destes cultivos foram utilizados para a determinação das atividades de amilases, CMCases, xilanases e β-glicosidases. A suspensão do micro-organismo já cultivado foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 3 mL de solução nutriente (0,5% de sulfato de amônio, 0,5% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,5% nitrato de amônia) diretamente em cada tubo. A inoculação das leveduras se deu pela transferência dessa suspensão microbiana para os frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de farelo de trigo, previamente umedecido com 8,7 mL de solução nutriente e mantidos por 120 horas a 28ºC.

4 Obtenção dos extratos enzimáticos

Para a extração da enzima foi adicionado 50 mL de água destilada nos meios cultivados e mantidos em agitação por 1 hora. Posteriormente, o material foi filtrado e centrifugado a 1060 x g por 5 minutos a fim de separar a massa celular do sobrenadante, sendo o último denominado de extrato enzimático, que foi utilizado para os ensaios de determinação de atividade enzimática.

5 Cultivo Submerso para produção de invertases

O cultivo submerso foi utilizado para avaliar o potencial de produção de invertases pelas linhagens de leveduras. A suspensão do micro-organismo já cultivado foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 3 mL do próprio meio usado para o cultivo (2% de peptona, 2% de sacarose e 1% de extrato de levedura) diretamente em cada tubo. A inoculação das leveduras se deu pela transferência dessa suspensão microbiana para os frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL do meio já descrito. Esses foram mantidos em agitação de 150 rpm por 72 horas a 28ºC.

6 Obtenção dos extratos enzimáticos extracelular e intracelular

Os meios cultivados foram centrifugados a 1060 x g por 5 minutos a fim de separar a massa celular do sobrenadante, sendo o último denominado extrato enzimático extracelular. A massa celular foi ressuspendida com 5 mL de tampão acetato e centrifugada a fim de eliminar as impurezas. O procedimento foi repetido e após a última centrifugação, a massa celular foi ressuspendida com 10 mL de tampão acetato, sendo denominado de extrato enzimático intracelular. Os extratos extracelular e intracelular foram utilizados para os ensaios de determinação de invertase.

7 Determinação das atividades enzimáticas

A presença de amilases, CMCases, xilanases e invertases nos extratos enzimáticos foi determinada pela quantificação de açúcares redutores liberados pelo método de DNS (3,5-ácido dinitrosalisílico), descrito por Miller em 1959. Os substratos utilizados para a quantificação das respectivas enzimas foram: amido, carboximetilcelulose (CMC), xilana e sacarose. A presença de β-glicosidase nos extratos cultivados foi determinada utilizando o substrato sintético p-NP-β-D-glicopiranosídeo (PNPG) (LEITE et al., 2008). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol dos respectivos produtos por minuto de reação.

8 Análise dos resultados

Todas as leveduras foram cultivadas em duplicata e após a determinação das atividades enzimáticas foi feito o desvio padrão dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 representa o potencial de produção de amilase, CMCase, xilanase e β-glicosidase, por cultivo em estado sólido nas condições utilizadas no presente trabalho.

TABELA 1 - Atividades em U/mL e desvio padrão dos resultados de Amilase, CMCase, β-glicosidase e Xilanase obtidas através de Fermentação em Estado Sólido.

Linhagem	Local de coleta do isolado	Amilase	CMCase	Xilanase
Isolado 1	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	5,07 ($^{+}$/- 0,08)	1,05 ($^{+}$/- 0,11)	2,56 ($^{+}$/- 0,06)
Isolado 7	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	1,67 ($^{+}$/- 0,02)	0
Isolado 10	Cereja do Rio Grande	1,01 ($^{+}$/- 0,04)	0	0

	(*Eugenia involucrata DC*)			
Isolado 12	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	1,08 ($^{+}$/- 0,01)	0	0
Isolado 18	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	1,07 ($^{+}$/- 0,01)	0	0
Isolado 20	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	1,63 ($^{+}$/- 0,19)	0	0
Isolado 28	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	1,04 ($^{+}$/- 0,06)	1,15 ($^{+}$/- 0,11)
Isolado 29	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	14,68 ($^{+}$/- 0,5)	0	0
Isolado 30	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	25,00 ($^{+}$/- 0,16)	1,34 ($^{+}$/- 0,3)	1,03 ($^{+}$/- 0,05)
Isolado 31	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	2,43 ($^{+}$/- 0,11)	0	0
Isolado 36	Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda)	1,15 ($^{+}$/- 0,18)	0	0
Isolado 37	Pêssego do Mato (*Hexachlamys edulis*)	14,10 ($^{+}$/- 0,44)	0	0
Isolado 39	Acerola (*Malpighia glabra* L.)	5,39 ($^{+}$/- 0,19)	1,18 ($^{+}$/- 0,1)	0
Isolado 41	Acerola (*Malpighia glabra* L.)	11,22 ($^{+}$/- 0,27)	1,18 ($^{+}$/- 0,08)	1,09 ($^{+}$/- 0,09)
Isolado 43	Pequi (*Caryocar brasiliense*)	25,39 ($^{+}$/- 0,23)	0	1,08 ($^{+}$/- 0,05)
Isolado 44	Pequi (*Caryocar brasiliense*)	10,17 ($^{+}$/- 0,27)	1,07 ($^{+}$/- 0,01)	1,13 ($^{+}$/- 0,01)
Isolado 45	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	1,18 ($^{+}$/- 0,01)	0	0
Isolado 46	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	5,54 ($^{+}$/- 0,18)	0	0
Isolado BB1	Mosto da Usina	10,30 ($^{+}$/- 1,25)	0	0
Isolado BB2	Mosto da Usina	11,77 ($^{+}$/- 0,2)	0	0

As linhagens que apresentaram maior produção de amilase foram: Isolado 29 (14,68 U/mL), Isolado 30 (25 U/mL), Isolado 37 (14,10 U/mL), Isolado 43 (25,39 U/mL). Os resultados descritos no presente trabalho são bastante promissores quando comparados com a literatura científica; CARVALHO et al. (2011) obteve a produção máxima de 18,22 U/mL pelo do fungo *Aspergillus niger*. BARBIERI et al. (2002) obteve uma produção de 5,04 U/mL de amilase pelo fungo *Sphaceloma ampelinum*.

As linhagens que apresentaram produção de CMCase foram: Isolado 1, Isolado 7, Isolado 28, Isolado 30, Isolado 39, Isolado 41, Isolado 44; sendo que a maior produção foi 1,67 U/mL (isolado 7). As linhagens que apresentaram produção de

xilanase foram: Isolado 1, Isolado 28, Isolado 30, Isolado 41, Isolado 43, Isolado 44; sendo que a maior produção foi 2,56 U/mL (isolado 1).

A produção de CMCase e Xilanase por leveduras é relativamente baixa quando comparada com as obtidas por fungos filamentosos. LEITE et al. (2007) relata a produção de 1,1 U/mL de CMCase e 5,0 U/mL de Xilanase, obtidas pelo cultivo em estado sólido da levedura *Aureobasidium pulluans*. DA-SILVA et al. (2005) obteve 30 U/mL de CMCase e 64 U/mL de Xilanase utilizando o fungo *Thermoascus aurantiacus* e o como substrato o farelo de trigo; SALES et al. (2010), obteve 30,05 U/mL de xilanase utilizando o fungo *Aspergillus phoenicis*.

Nas condições de cultivo nenhuma das linhagens apresentaram resultados significativos para a produção de β-glicosidase. No entanto, as condições de cultivo podem influenciar a produção enzimática dos micro-organismos. Dessa forma, acreditamos que alterações no processo fermentativo possam induzir a produção de β-glicosidase, que serão avaliadas em etapas futuras do trabalho.

A Tabela 2 apresenta a produção de invertase obtida a partir do cultivo submerso.

TABELA 2 - Atividades em U/mL e desvio padrão dos resultados de Invertase Extracelular e Intracelular obtidas através de Fermentação Submersa.

Linhagem	Local de coleta do isolado	Invertase Extracelular	Invertase Intracelular
Isolado 6	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	2,58 ($^{+}$/- 0,04)	14,70 ($^{+}$/- 0,8)
Isolado 8	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	3,03 ($^{+}$/- 0,26)
Isolado 9	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	2,42 ($^{+}$/- 0,01)
Isolado 15	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	1,44 ($^{+}$/- 0,02)	15,57 ($^{+}$/- 1,87)
Isolado 23	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	5,59 ($^{+}$/- 0,15)	24,49 ($^{+}$/- 1,36)
Isolado 28	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	16,71 ($^{+}$/- 5,15)
Isolado 30	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	3,62 ($^{+}$/- 0,48)
Isolado 32	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	20,28 ($^{+}$/- 0,63)
Isolado 35	Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda)	1,45 ($^{+}$/- 0,35)	47,40 ($^{+}$/- 6,70)
Isolado 40	Acerola (*Malpighia glabra* L.)	0	6,15 ($^{+}$/- 0,75)
Isolado 42	Pequi (*Caryocar brasiliense*)	0	1,19 ($^{+}$/- 0,05)

Isolado 44	Pequi (*Caryocar brasiliense*)	1,65 ($^{+}$/- 0,04)	7,67 ($^{+}$/- 0,62)
Isolado 46	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	12,87 ($^{+}$/- 0,12)	34,65 ($^{+}$/- 4,45)
Isolado BB2	Mosto da Usina	1,16 ($^{+}$/- 0,14)	0
Cat (*S. cerevisiae*)	Linhagem comercial	4,92 ($^{+}$/- 0,52)	24,80 ($^{+}$/- 0,50)

Dentre as linhagens avaliadas, o isolado 23 (5,59 U/mL) e o isolado 46 (12,87 U/mL) apresentaram maior produção de invertase extracelular, quando comparados com a linhagem de *S. cerevisiae* (Cat) utilizada como controle neste trabalho, cerca de 4,92 U/mL.

As linhagens que apresentaram melhores resultados para a produção de Invertase intracelular foram: Isolado 6, Isolado 23, Isolado 28, Isolado 32, Isolado 35 e o Isolado 46. No entanto, as linhagens que produziram concentrações de invertases igual ou maior do que a linhagem controle (Cat) foram o isolado 23 (24,49 U/mL), o isolado 32 (20,28 U/mL), isolado 35 (47,40 U/mL) e o isolado 46 (34,65 U/mL).

Considerando que as invertases utilizadas na indústria geralmente são produzidas por linhagens comerciais de *S. cerevisiae* (VITOLO, 2004), é possível afirmar que os resultados do presente trabalho são bastante promissores, até mesmo quando comparados com a produção de outras linhagens microbianas.

Segundo SANGALETTI et al. (2003) a invertase do fungo *Alternaria sp*. obteve como produção máxima de 20 U/mL de invertase; QURESHI et al. (2012) obteve uma produção de 35,89 U/mL de invertase do fungo *Mucor geophillus*, portanto, os resultados obtidos foram satisfatórios quando comparados com os dados obtidos da literatura.

Segundo DÁRIO et al. (2008), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode utilizar a sacarose por duas vias: pela hidrólise extracelular através da invertase periplasmática e pelo transporte ativo da sacarose com posterior hidrólise intracelular. A primeira via não é desejável para a produção de etanol, uma vez que a liberação de açúcar no meio extracelular pode favorecer o desenvolvimento de bactérias lácticas contaminantes, prejudicando o processo. Dessa forma os isolados 28, 32 e 35 tornam-se interessantes para essa aplicação, uma vez que possuem grande atividade de invertase intracelular e atividade nula ou quase nula para invertase extracelular.

CONCLUSÃO

Os objetivos deste trabalho foram alcançados, uma vez que foram selecionadas as melhores linhagens para a produção das enzimas citadas. Os resultados mais promissores foram os de Amilase e Invertase, estas apresentaram 4 e 6 linhagens de leveduras com altas produções para as respectivas enzimas.

A partir dos resultados apresentados visamos identificar taxonomicamente as linhagens selecionadas, otimizar o processo fermentativo para a produção das enzimas e caracterizar físico-quimicamente as enzimas produzidas, contribuindo para a redução do custo de produção de diferentes enzimas microbianas.

REFERÊNCIAS

AIDOO, K. E.; ROB, N. M. J.; SARKAR, P. K. Ocurrence and function of yests in Asian indigenous fermented foods, **FEMS Yest Research**, v. 6, p. 30-39, 2006.

BARBIERI, K. C.; KNOB, A.; BREDA, A. E.; MARESE, A. M.; KADOWAKI, M. K. Estudos dos parâmetros fisiológicos na produção da amilase extracelular do fungo *Sphaceloma ampelinum*. **XI Encontro Anual de Iniciação Científica**, Maringá, 2002.

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias, **BNDES Setorial**, n. 25, p. 5-38, 2007.

BON, E.P.S.; GÍRIO, F.; PEREIRA-JUNIOR, N. Enzimas na Produção de Etanol In: **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro, Interciência, cap. 10, p. 241-272, 2008.

CARVALHO, E. A.; PACHECO, C. S. V.; DE MELO-NETO, B. A.; FERREIRA, A. N.; ROCHA, T. J. O.; DOS SANTOS, T. C.; SILVA, M. G. C. P. C.; FRANCO, M. Produção de Amilase por *Aspergillus niger* a partir de resíduo do fruto da pupunheira (*Bactris gasipaes*, Kunth). **I Simpósio Brasileiro da Pupunheira**, Ilhéus, 2011.

CASTRO A. M.; JUNIOR, M. P. Produção, propriedade e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

COSTA, S. T. C.; ABREU-LIMA, T. L.; CARREIRO, S. C. Atividade Amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (Ipomoea batatas (L.) Lam). **Revista de Biociências da Universidade de Taubaté**, v. 17, n. 2, p. 15-24, 2011.

DÁRIO, M. G.; MACHADO, L. O.; SCHLOGL, P. S.; STAMBUK, B. U. Fermentação de Sacarose por Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deletadas no Gene SUC2. **54º Congresso Brasileiro de Genética**, Salvador, 2008.

DA-SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K.; GOMES, E. Production of Xylanase and CMCase on Solid State Fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235-241, 2005.

DAROIT, D. J. **Caracterização de uma Beta-Glicosidase de *Monascus purpureus*** 2007. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DE-PAULA, F.C. **Imobilização da Inulinase de *Kluyveromyces marxianos* var. *bulgaricus* ATCC 16045: Caracterização e produção de açúcar invertido em biorreator** 2007. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas). Institudo de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro.

DWIVEDI, P.; ALAVALAPATI, J. R. R.; LAL, P. Cellulosic ethanol production in the United States: Conversion technologies, current production status, economics, and emerging developments. **Energy for susteinable Development**, v. 13, p. 174-182, 2009.

FAHEINA-JUNIOR, G. S. **Produção de celulases por fermentação submersa utilizando micro-organismos prospectados em coleções de culturas nacionais** 2012. Tese (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

FERREIRA, V. **Produção de β-glucosidase em *Saccharomyces Cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração** 2010. Tese (Doutorado em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, Identificação e Seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho** 2005. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

HECK, J. X. **Produção, purificação e caracterização de xilanases (EC 3.2.1.8) excretadas por isolados amazônicos de *Bacillus* em cultivo semi-sólido** 2005. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LEITE, R.S.R.; ALVES-PRADO, H.F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F.C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β-glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391 – 395, 2008.

LEITE, R. S. R. BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. S. M.; SILVA, D.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production of Cellulolytic and Hemicellulolytic Enzymes from *Aureobasidium pulluans* on Solid State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 281-288, 2007.

MENEZES, T. J, B. Fermentação alcoólica – Processos e Sistemas de fabricação de álcool In: **Etanol, o combustível do Brasil**, São Paulo, Agronômica Ceres, cap.4, p. 153-154, 1980.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

NITSCH, M. O programa de biocombustíveis Proálcool no contexto da estratégia energética brasileira. **Revista de Economia Política**, v. 11, n. 2, 1991.

NOVAKI, L.; HASAN, S. D. M.; KADOWAKI, M. K.; ANDRADE, D. Produção de Invertase por fermentação em Estado Sólido a partir de farelo de soja. **ENGEVISTA**, v. 12, n. 2, p. 131-140, 2010.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S.; Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, 2010.

OLIVEIRA, A. A. C. **Estudo fisiológico e morfológico da aplicação de estresse eletroquímico em cultivos de levedura** 2009. Tese (Mestrado em Ciências, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PALMA-FERNANDEZ, E.R.P. **Produção, purificação e caracterização bioquímica de β-glicosidases do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*** 2002. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

PARAZZI-JUNIOR, O. **Metabolização de açúcares em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com e sem transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase** 2006. Tese (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PÚGLIA, A. L. **Desempenho de leveduras selvagens com potencial de produção de enzimas amilolíticas em processo fermentativo** 2006. Tese (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

QURESHI, A. S.; KHUSHK, I.; BHUTTO, M. A.; DAHOT, M. U.; IKRAM-UL-HAQ; BANO, S.; IQBAL, H. Production and partial characterization of invertase from *Mucor geophillus* EFRL 03. **African Journal of Microbiology**, v. 11, p. 10736-10743, 2012.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise Enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p. 140-143, 1998.

RUEGGER, M. J. S.; TAUK-TORNISIELO, S. M. Produção de Xilanases por fungos filamentosos isolados do solo da estação ecológica de Juréia-Itatins, SP, Brasil. **HOLOS Environment**, v. 2, n. 2, p. 185-194, 2002.

SALES, M. R.; MOURA, R. B.; PORTO, T. S.; MACEDO, G. R.; PORTO, A. L. F.; Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 1290-1296, 2010.

SANGALETTI, N.; CADORIN, T. L.; HENDGES, D. H.; DARTORA, D. F.; Onofre, S. B.; Alencar, S. M. Produção de Invertase de *Alternaria sp.* por Fermentação Semi-Sólida. **Simpósio Nacional de Fermentações**, Florianópolis, 2003.

SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR A. M.; GOUVEIA, E. R.; MARTÍN, C. Comparação entre processos em SHF e SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae.* **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.

SILVA, M. S. **Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau** 2011. Tese (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal da Feira de Santana, Feira de Santana.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

VILLAS-BÔAS, S.G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço da maçã. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 14, p. 38-42, 2000.

VITOLO, M. Invertases. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto, Legis Summa, cap. 12, p. 207-221, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, Califórnia, Artmed, 6ª ed, 2002.

ZANOELO, F.F.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENZI, H.F.; JORGE, J.A. β-glucosidase activity from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, p. 137-143, 2004.

ANEXOS

TABELA 1- Atividades em U/mL de Amilase, CMCase, β-glicosidase e Xilanase obtidas através de Fermentação em Estado Sólido.

Linhagem	Local de coleta do isolado	Amilase	CMCase	β-glicosidase	Xilanase
Isolado 1	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	5,07	1,05	0	2,56
Isolado 4	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0	0	0
Isolado 5	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0	0	0
Isolado 6	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0	0	0
Isolado 7	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	1,67	0	0
Isolado 8	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0	0	0
Isolado 9	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0	0	0
Isolado 10	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	1,01	0	0	0
Isolado 11	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0	0	0
Isolado 12	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	1,08	0	0	0
Isolado 13	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0	0	0
Isolado 14	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0	0	0
Isolado 15	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0	0	0
Isolado 16	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0	0	0
Isolado 17	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	0	0	0	0
Isolado 18	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	1,07	0	0	0
Isolado 19	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	0	0	0	0
Isolado 20	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	1,63	0	0	0
Isolado 21	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	0	0	0	0
Isolado 22	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	0	0	0	0
Isolado 23	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	0	0	0	0
Isolado 24	Jatobá (*Hymenaea*	0	0	0	0

	courbaril)				
Isolado 25	Cama de Frango	0	0	0	0
Isolado 27	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	0	0	0
Isolado 28	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	1,04	0	1,15
Isolado 29	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	14,68	0	0	0
Isolado 30	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	25,00	1,34	0	1,03
Isolado 31	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	2,43	0	0	0
Isolado 32	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	0	0	0
Isolado 33	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	0	0	0
Isolado 34	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	0	0	0
Isolado 35	Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda)	0	0	0	0
Isolado 36	Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda)	1,15	0	0	0
Isolado 37	Pêssego do Mato (*Hexachlamys edulis*)	14,10	0	0	0
Isolado 38	Pêssego do Mato (*Hexachlamys edulis*)	0	0	0	0
Isolado 39	Acerola (*Malpighia glabra* L.)	5,39	1,18	0	0
Isolado 40	Acerola (*Malpighia glabra* L.)	0	0	0	0
Isolado 41	Acerola (*Malpighia glabra* L.)	11,22	1,18	0	1,09
Isolado 42	Pequi (*Caryocar brasiliense*)	0	0	0	0
Isolado 43	Pequi (*Caryocar brasiliense*)	25,39	0	0	1,08
Isolado 44	Pequi (*Caryocar brasiliense*)	10,17	1,07	0	1,13
Isolado 45	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	1,18	0	0	0
Isolado 46	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	5,54	0	0	0
Isolado BB1	Mosto da Usina	10,30	0	0	0
Isolado BB2	Mosto da Usina	11,77	0	0	0
Isolado BB9	Mosto da Usina	0	0	0	0
Marmelo	Marmelo (*Cydonia oblonga*)	0	0	0	0
Pequi	Pequi (*Caryocar brasiliense*)	0	0	0	0
Gabiroba	Gabiroba (*Campomanesia xanthocarpa*)	0	0	0	0
Guavira	Guavira (*Campomanesia cambessedeana*)	0	0	0	0
Ave I	Cama de Frango	0	0	0	0
Ave II	Cama de Frango	0	0	0	0
Cat (*S. cerevisiae*)	Linhagem comercial	0	0	0	0

TABELA 2.- Atividades em U/mL de Invertase Extracelular e Intracelular obtidas através de Fermentação Submersa.

Linhagem	Local de coleta do isolado	Invertase Extracelular	Invertase Intracelular
Isolado 1	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0
Isolado 3	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0
Isolado 4	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0
Isolado 5	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0
Isolado 6	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	2,58	14,70
Isolado 7	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0
Isolado 8	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	3,03
Isolado 9	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	2,42
Isolado 10	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0
Isolado 11	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0
Isolado 12	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0
Isolado 13	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0
Isolado 14	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0
Isolado 15	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	1,44	15,57
Isolado 16	Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata DC*)	0	0
Isolado 17	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	0	0
Isolado 18	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	0	0
Isolado 19	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	0	0
Isolado 20	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	0	0
Isolado 21	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	0	0
Isolado 22	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	0	0
Isolado 23	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	5,59	24,49

Isolado 24	Jatobá (*Hymenaea courbaril*)	0	0
Isolado 25	Cama de Frango	0	0
Isolado 27	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	0
Isolado 28	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	16,71
Isolado 29	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	0
Isolado 30	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	3,62
Isolado 31	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	0
Isolado 32	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	20,28
Isolado 33	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	0
Isolado 34	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	0
Isolado 35	Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda)	1,45	47,40
Isolado 36	Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda)	0	0
Isolado 37	Pêssego do Mato (*Hexachlamys edulis*)	0	0
Isolado 38	Pêssego do Mato (*Hexachlamys edulis*)	0	0
Isolado 39	Acerola (*Malpighia glabra* L.)	0	0
Isolado 40	Acerola (*Malpighia glabra* L.)	0	6,15
Isolado 41	Acerola (*Malpighia glabra* L.)	0	0
Isolado 42	Pequi (*Caryocar brasiliense*)	0	1,19
Isolado 43	Pequi (*Caryocar brasiliense*)	0	0
Isolado 44	Pequi (*Caryocar brasiliense*)	1,65	7,67
Isolado 45	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	0	0
Isolado 46	Uvaia (*Eugenia pyriformis*)	12,87	34,65
Isolado BB1	Mosto da Usina	0	0
Isolado BB2	Mosto da Usina	1,16	0
Isolado BB9	Mosto da Usina	0	0
Marmelo	Marmelo (*Cydonia oblonga*)	0	0
Pequi	Pequi (*Caryocar brasiliense*)	0	0
Gabiroba	Gabiroba (*Campomanesia xanthocarpa*)	0	0
Guavira	Guavira (*Campomanesia cambessedeana*)	0	0
Ave I	Cama de Frango	0	0
Ave II	Cama de Frango	0	0
Cat (*S. cerevisiae*)	Linhagem comercial	4,92	24,80