

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA (PEQ-UFS)

THAYNAH SILVEIRA DE OLIVEIRA

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS UTILIZANDO RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL (MANIPUEIRA)

São Cristóvão (SE)

(2017)

THAYNAH SILVEIRA DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS UTILIZANDO RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL (MANIPUEIRA)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Dr^o Roberto Rodrigues Souza

Coorientadora: Dr^a Jacqueline Rego da Silva Rodrigues

São Cristóvão (SE)

(2017)

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

O48e Oliveira, Thaynah Silveira de
Estudo da produção de enzimas amilolíticas utilizando resíduo agroindustrial (Manipueira) / Thaynah Silveira de Oliveira ; orientador Roberto Rodrigues Souza. – São Cristóvão, 2017.
89 f. : il.

Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Engenharia química. 2. Enzimas. 3. Metabolismo microbiano. I. Souza, Roberto Rodrigues, orient. II. Título

CDU: 66.0:577.15

THAYNAH SILVEIRA DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS UTILIZANDO RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL (MANIPUEIRA)**

Dissertação de Mestrado aprovada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
da Universidade Federal de Sergipe em 23 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Roberto Rodrigues de Souza, Dsc – Orientador
UFS

Jacqueline Rego da Silva Rodrigues, Dsc – Coorientadora
UFS

Cristina Ferraz Silva, Dsc
UFS

Luiz Fernando Romanholo Ferreira, Dsc
UNIT

Àqueles que são meu alicerce: Lillian e Alberto;
A Yasmim, razão da minha vida, sem você nenhuma conquista valeria a pena;
A Caio, pelo apoio incondicional.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Eu Te agradeço, Deus, por todas as coisas boas e ruins que me aconteceram. Cada uma delas, ao seu modo, me fizeram chegar até aqui e me fizeram ser quem eu sou. Se eu não sentisse Tua presença junto a mim, nunca teria alcançado esta grande vitória. Obrigada pela fé, pela força, pelos sinais de superação e todas as bênçãos concedidas.

À família que Deus me deu e que muito me orgulho: meus pais, Lillian e Alberto, minha irmã Thaylane e minha filha Yasmim. Agradeço por sempre me apoiarem e acreditarem no meu sucesso. Aos meus avós que sempre torcem por mim. Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu namorado Caio, por toda ajuda, pela paciência, compreensão, amizade, cuidado, companheirismo, força e seu imenso amor. Aos meus sogros pelo carinho e torcida.

Ao professor Dr^o Roberto Rodrigues, por ter me aceitado como orientanda e por enfrentar junto a mim o desafio da concretização deste trabalho. Obrigada por todo apoio, paciência, confiança e pelas palavras incentivadoras nos momentos difíceis.

À professora Dr^a Jacqueline Rêgo, pela coorientação, pessoa de coração imenso sempre disposta a ajudar e contribuir para este trabalho.

Aos professores que fizeram parte dessa jornada, em especial à professora Dr^a Cristina Ferraz pelo apoio e ensinamentos que foram indispensáveis para este trabalho. Meu reconhecimento por tudo que me ensinaram, tenho convicção da contribuição de cada um de vocês na minha formação profissional e pessoal.

Aos colegas de mestrado, pelas madrugadas de estudo e palavras de força. Em especial à Elys, Cliff e Douglas, por toda ajuda e parceria nessa jornada tão exaustiva, contar com vocês tornou essa trajetória muito mais gratificante.

Aos professores integrantes da banca examinadora, por terem aceitado contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

Aos (ex) integrantes do Labam que dividiram comigo conhecimentos, experiências, equipamentos (rsrs), que me ajudaram na condução dos experimentos e me deram palavras de apoio nos momentos de desespero.

Aos familiares e amigos que conquistei nessa vida que me enviaram mensagens de apoio, carinho, preocupação e que torcem pelo meu sucesso. Em especial à minha comadre Juliane e minha afilhada Julia, pelos vídeos e mensagens de apoio nas manhãs mais difíceis.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química (UFS), pela oportunidade de realização desse curso. Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.

Os meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

Peça a Deus que abençoe os seus planos, e eles darão certo.

(Provérbios 16:3)

Você nunca sabe a força que tem, até que a sua única alternativa é ser forte.

(Johnny Depp)

RESUMO

As enzimas amilolíticas são consideradas de grande importância biotecnológica. A busca por microrganismos excretadores de amilase é considerada um processo contínuo visto que há uma grande demanda nas indústrias e uma necessidade de enzimas mais específicas para cada processo. Uma alternativa economicamente viável para produção dessas enzimas é o uso de resíduos ricos em amido em substituição aos meios de culturas sintéticos de alto custo. Dentre tais resíduos, destaca-se a manipueira, um resíduo líquido gerado na etapa de prensagem da mandioca para obtenção da farinha, altamente produzido no estado de Sergipe e que apresenta nutrientes necessários ao crescimento de microrganismos. O presente trabalho teve como objetivo isolar microrganismos produtores de enzimas amilolíticas, utilizando a manipueira como fonte de isolamento e meio de produção, através de fermentação submersa. Uma sequência de planejamento fatorial foi proposta para encontrar uma região ótima das condições de processo, visando uma maior produção amilolítica e maior aproveitamento do resíduo. O perfil de produção de amilase foi delineado a partir das atividades dextrinizante e sacarificante. O isolamento foi realizado através da técnica de semeadura por esgotamento em meio ágar nutriente e batata dextrose, o qual apresentou três cepas com capacidade de excretar enzimas amilolíticas (TP02, TN03, TN04), com destaque para o índice de atividade enzimática do isolado TN04 de 9,28. Através da fermentação em meio líquido sintético com amido a 1% como indutor, a linhagem TP02 foi selecionada por apresentar maiores atividades ($16,15 \text{ U.mL}^{-1}$ dextrinizante e $0,66 \text{ U.mL}^{-1}$ sacarificante), sendo assim empregada no estudo da produção de amilases utilizando a manipueira bruta e tratada como substrato, para investigação da influência do tratamento da manipueira. Os valores de atividade para manipueira tratada e bruta foram, respectivamente, para atividade dextrinizante ($34,78 \text{ U/mL}$ e $36,03 \text{ U.mL}^{-1}$), e, para atividade sacarificante ($37,52 \text{ U.mL}^{-1}$ e $36,81 \text{ U.mL}^{-1}$). Esses valores foram maiores do que quando utilizado meio sintético, confirmando o potencial desse resíduo na produção de amilases. O tratamento da manipueira não resultou em grande diferença na produção da amilase, com isso a manipueira bruta foi utilizada no planejamento visando à diminuição dos custos da produção. Através do planejamento fatorial fracionário $2^{(4-1)}$ foi possível selecionar as variáveis de maiores efeitos significativos ($p < 0,05$) para produção de amilases, que foram pH e concentração de manipueira e, fixar os valores de temperatura em 30°C e agitação em 100 rpm, através da análise do comportamento das médias entre esses fatores. O planejamento fatorial completo 3^2 possibilitou encontrar uma região ótima para as condições do processo. A faixa ótima para o pH está entre 7,5 e 8, e para concentração da manipueira entre 80% e 100%. Os maiores valores obtidos de atividade dextrinizante e sacarificante no ensaio com pH 8 e 100% de concentração de manipueira, avaliados no tempo de 144 horas, foram $97,39 \text{ U.mL}^{-1}$ e $79,86 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente. O extrato enzimático produzido nas condições de região ótima possui temperatura ótima para hidrólise entre 50 a 70°C e pH ótimo 7. Esses dados demonstram o potencial do microrganismo isolado e do uso da manipueira para obtenção de enzimas amilolíticas com aplicação promissora nos mais diversos setores das indústrias.

Palavras chaves: microrganismos; enzimas amilolíticas; manipueira.

ABSTRACT

Amylolytic enzymes are considered of great biotechnological importance. The search for amylase excretory microorganisms is considered a continuous process since there is a great demand in the industries and a need for more specific enzymes for each process. An economically viable alternative for the production of these enzymes is the use of starch-rich residues instead of high-cost synthetic culture media. Among these residues, manipueira is highlight, a liquid residue generated in the pressing stage of the cassava to obtain the flour, highly produced in the state of Sergipe and that presents nutrients necessary for the growth of microorganisms. The present work aimed to isolate microorganisms producing amylolytic enzymes, using manipueira as a source of isolation and means of production through submerged fermentation. A sequence of factorial planning was proposed to find an optimum region of the process conditions, aiming a greater amylolytic production and greater utilization of the residue. The amylase production profile was delineated from the dextrinizing and saccharifying activities. Isolation was carried out through the sowing technique by nutrient and potato dextrose, which showed three strains capable of excreting amylolytic enzymes (TP02, TN03, TN04), with emphasis on the enzymatic activity index of TN04 isolate of 9.28. The TP02 strain was selected as the most important activity (16.15 U.mL⁻¹ dextrinizing and 0.66 U.mL⁻¹ saccharifying) by fermentation in synthetic liquid with 1% starch medium as an inducer, being thus employed in the study of the production of amylases using the manipueira crude and treated as substrate, to investigate the influence of the manipueira treatment. The activity values when using the manipueira in its treated and crude form were, respectively, for dextrinizing activity (34.78 U.mL⁻¹ and 36.03 U.mL⁻¹), and for saccharifying activity (37.52 U. mL⁻¹ and 36.81 U.mL⁻¹). These values were higher than when using synthetic medium, confirming the potential of this residue in the production of amylases. The treatment of the manipueira did not result in a great difference in the production of the amylase, with that the crude manipueira was used in the planning aiming at the decrease of the costs of the production. By means of the fractional factorial design 2⁽⁴⁻¹⁾ it was possible to select the variables with the greatest significant effects (p <0.05) for the production of amylases, which were pH and manipueira concentration, and set temperature values at 30 ° C and stirring at 100 rpm, by analyzing the behavior of the means between these factors. The complete factorial design 3² made it possible to find an optimal region for the process conditions. The optimal range for pH is between 7.5 and 8, and for manipueira concentration, 80% to 100%. The highest values of dextrinizing and saccharifying activity in the assay with pH 8 and 100% of manipueira concentration, evaluated at 144 hours were 97.39 U.mL⁻¹ and 79.86 U.mL⁻¹, respectively. The enzymatic extract produced under optimum region conditions has the optimum temperature for hydrolysis at 50 to 70 °C and optimum pH 7. These data demonstrate the potential of the isolated microorganism and the use of the manipueira to obtain amylolytic enzymes with promising applications in a wide range of industries.

Key words: Microorganisms; Amylolytic enzymes; Manipueira.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das enzimas.....	21
Tabela 2 – Exemplos de enzimas amilolíticas e suas características.	25
Tabela 3 – Propriedades de α -amilases microbianas.....	32
Tabela 4 – Teores de macro e micronutrientes em amostras de manipueira.....	40
Tabela 5 – Valores reais das variáveis utilizadas no delineamento fatorial fracionário $2^{(4-1)}$ com 3 pontos centrais.	50
Tabela 6 – Valores reais das variáveis utilizadas no delineamento fatorial completo 3^2 com duplicata no ponto central.	51
Tabela 7 – Caracterização das cepas isoladas.	53
Tabela 8 - Composição da manipueira utilizada neste trabalho.	58
Tabela 9 – Delineamento fatorial fracionário 2^{4-1} para produção de amilases em manipueira após 72, 96 e 144 horas de fermentação.....	62
Tabela 10 – Estimativa dos efeitos e o coeficiente do modelo de regressão para a produção de amilase, por atividade sacarificante, no delineamento fatorial fracionário 2^{4-1} com 144h de fermentação.	63
Tabela 11 – Estimativa dos efeitos e o coeficiente do modelo de regressão para a produção de amilase, por atividade dextrinizante, no delineamento fatorial fracionário 2^{4-1} com 144h de fermentação.	64
Tabela 12 – Delineamento fatorial completo 3^2 para produção de amilases em manipueira após 120, 144 e 168 horas de fermentação.....	69
Tabela 13 – Estimativa dos efeitos e o coeficiente do modelo de regressão para a produção de amilase, por atividade dextrinizante, no delineamento fatorial completo 3^2 com 144h de fermentação.	70
Tabela 15 – Análise de variância para U/mL dextrinizante com 144h de fermentação.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de complementaridade estrutural (chave-fechadura de Emil Fisher).	20
Figura 2 – Estrutura dos principais constituintes do amido: a) Estrutura parcial da amilose. b) Estrutura parcial da amilopectina.....	23
Figura 3 – Representação esquemática da ação da α -amilase sobre a amilose e amilopectina.	26
Figura 4 – Esquema do processamento da mandioca para obtenção da farinha.	37
Figura 5 – Casa de Farinha (a) massa da mandioca prensada e (b) manipueira lançada no solo.	38
Figura 6 – Fluxograma de representação das etapas desenvolvidas.....	41
Figura 7 – Representação esquemática da etapa de isolamento das linhagens promissoras.	42
Figura 8 – Ilustração esquemática do ensaio qualitativo de atividade enzimática.	43
Figura 9 - Ilustração esquemática do ensaio quantitativo de atividade enzimática.....	45
Figura 10 – Manipueira (a) bruta e (b) tratada.	46
Figura 11 - Ilustração esquemática da produção de amilase utilizando a manipueira.	47
Figura 12 – Ilustração esquemática da análise de atividade de amilase sacarificante através do método de DNS.....	48
Figura 13 – Ilustração esquemática da análise de atividade de amilase dextrinizante.	49
Figura 14 – Determinação do índice enzimático através da medida dos halos.	53
Figura 15 – Índice enzimático dos microrganismos isolados.....	54
Figura 16 – Cinética da atividade dextrinizante dos isolados TP02 e TN04 através de fermentação submersa utilizando como substrato meio sintético.	55
Figura 17 – Cinética da atividade sacarificante dos isolados TP02 e TN04 através de fermentação submersa utilizando como substrato meio sintético.	56
Figura 18 – Influência do tratamento da manipueira na atividade dextrinizante pela linhagem TP02.	59
Figura 19 – Influência do tratamento da manipueira na atividade sacarificante pela linhagem TP02..	59
Figura 20 – Efeitos principais e de interações dos fatores estudados no planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ensaio de ponto central, baseado no teste t “student” $t(3; 0,95)= 3,182$, para atividade sacarificante.....	64
Figura 21 – Efeitos principais e de interações dos fatores estudados no planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ensaio de ponto central, baseado no teste t “student” $t(3; 0,95)= 3,182$, para atividade dextrinizante.....	65
Figura 22 – Médias marginais da atividade dextrinizante sob a influência da interação entre Temperatura e Agitação.	66
Figura 23 – Médias marginais para atividade sacarificante sob a influência da interação entre Temperatura e Agitação.	66

Figura 24 – Médias marginais das atividades (a) dextrinizante e (b) sacarificante, sob a influência da interação entre Temperatura e pH.	67
Figura 25 – Médias marginais das atividades (a) dextrinizante e (b) sacarificante, sob a influência da interação entre Temperatura e Concentração.	67
Figura 26 – Produção de amilases em função da concentração e do pH, quantificada através da atividade dextrinizante. (a) superfície de resposta (b) superfície de contorno.	71
Figura 27 – Produção de amilases em função da concentração e do pH, quantificada através da atividade sacarificante. (a) superfície de resposta e (b) superfície de contorno.	72
Figura 28 – Caracterização físico-química da enzima bruta quanto à influência do pH sobre atividade enzimática.	75
Figura 29 – Caracterização físico-química da enzima bruta quanto à influência da temperatura sobre atividade enzimática.	76

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GERAL.....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. ENZIMAS	20
3.2. ENZIMAS AMIOLÍTICAS.....	22
3.2.1. α -Amilases	25
3.2.2. β -Amilases.....	27
3.2.3. Glicoamilases	27
3.3. PRODUÇÃO E CARACTERÍSTICAS DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS MICROBIANAS	28
3.3.1. Fermentação submersa na produção de enzimas amilolíticas microbianas.....	33
3.4. USO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS. 34	
3.4.1. Manipueira	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. OBTENÇÃO DA MANIPUEIRA.....	41
4.2. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS.....	42
4.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS.....	42
4.4. SELEÇÃO DE CEPAS COM POTENCIAL AMIOLÍTICO	43
4.4.1. Ensaio qualitativo de atividade enzimática	43
4.4.2. Ensaio quantitativo de atividade enzimática	44
4.5. PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS UTILIZANDO MANIPUEIRA	45
4.5.1. Substrato.....	45
4.5.2. Fermentação submersa	46
4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	47

4.6.1. Atividade de amilase sacarificante pelo método do DNS	47
4.6.2. Atividade de amilase dextrinizante	48
4.7. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	50
4.7.1. Planejamentos fatoriais	50
4.7.2. Condições de fermentação	51
4.8. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO.....	51
4.8.1. Determinação do pH e temperatura ótimos.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1. ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	53
5.2. ENSAIO QUALITATIVO.....	53
5.3. ENSAIO QUANTITATIVO.....	55
5.4. PRODUÇÃO DE AMILASES UTILIZANDO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL COMO SUBSTRATO.....	57
5.4.1. Perfil da produção de enzimas amilolíticas utilizando manipueira como substrato ao longo do tempo.....	57
5.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	61
5.5.1. Planejamento fatorial fracionário	61
5.5.2. Planejamento fatorial completo.....	68
5.5.3. Condições ótimas definidas.....	74
5.6. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	74
5.6.1. Temperatura e pH ótimo de hidrólise.....	74
6. CONCLUSÃO.....	78
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	79
REFERÊNCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são utilizadas em diversos setores sendo considerada uma alternativa importante aos processos químicos. Entre as conveniências da utilização enzimática destaca-se o fato de ser um produto natural que proporciona benefícios como a melhora na qualidade dos produtos finais, agilidade no processo de obtenção dos mesmos, e ainda, por apresentar atividade que pode ser regulada. Os benefícios do uso de enzimas é consequência do seu alto grau de especificidade aos substratos que atuam, gerando produtos mais puros (BON *et al.*, 2008; FELLOWS, 2006).

As enzimas, em sua maioria, são de grande importância para a indústria e muitos são os trabalhos relatando o potencial e aplicabilidade de todo tipo de enzimas: amilolíticas, celulolíticas, lipolíticas e proteolíticas na indústria farmacêutica, têxtil, couro, papel, mineral, alimentícia e química (ADRIO e DEMAINE, 2014; SUNDARRAM e MURTHY, 2014).

Dentre as enzimas de grande importância biotecnológica, as amilases estão em posição de destaque representando 65% do mercado mundial (VAN DER MAAREL, 2002; BALKAN e ERTAN, 2007). As amilases representam importantes enzimas industriais e possuem aplicações em todos os processos que necessitam da hidrólise parcial ou completa do amido (SOUZA e MAGALHÃES, 2010), tais como produção de glicose proveniente da hidrólise das macromoléculas constituintes do amido, nas indústrias de papel para proteger o mesmo contra danos mecânicos e melhoria do acabamento final, na indústria cervejeira para produção de cervejas claras, na indústria alimentícia para eliminar a turbidez produzida pelos amidos, entre outras aplicações nos mais diversos setores das indústrias (NOROUZIAN *et al.*, 2006; OLIVEIRA, *et al.*, 2010).

As enzimas podem ser obtidas a partir de fonte animal, vegetal e microbiana, sendo as microbianas as mais utilizadas para aplicação biotecnológica por terem menores custos na sua obtenção, facilidade de purificação (enzimas extracelulares), alta especificidade, independência de sazonalidade, além da possibilidade de produção em larga escala (PANDEY *et al.*, 2005; FERNANDES, 2007).

Monteiro e Silva (2009) afirmaram que a busca no desenvolvimento e descoberta de novas enzimas mais tolerantes aos processos industriais iriam aumentar nos próximos anos permitindo não somente o aumento na produção de enzimas já obtidas por outros processos, mas também a busca pela produção de novas enzimas de interesse comercial.

O Brasil, embora ainda importe a maior parte das enzimas que utiliza em diferentes setores industriais, revela grande potencial na produção de enzimas microbianas. Essa potencialidade é evidenciada pela grande diversidade biológica, ainda pouco explorada, que serviria como fonte para a obtenção de novos microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial (MUSSATTO *et al.*, 2007; BON *et al.*, 2008).

Os processos para produção de enzimas microbianas envolvem a fermentação submersa ou a fermentação no estado sólido, que diferem entre si por diversos fatores tais como indutor da produção da enzima, o microrganismo utilizado e as condições do processo. O substrato é um dos componentes de maior custo na produção de enzima, e alguns casos podem corresponder a até 75% dos custos do produto final. A otimização do meio de produção para obtenção do máximo de rendimento é uma tarefa complexa, porém muito importante para redução do custo do produto (SCHMIDELL *et al.*, 2001; DAMASO *et al.*, 2012).

Atualmente, com a implementação de leis e políticas ambientais, o desenvolvimento tecnológico tem se voltado para a sustentabilidade das atividades produtivas, tendendo à substituição de processos químicos baseados em insumos não renováveis por processos químicos ou bioquímicos que utilizem insumos renováveis e contribuam para a redução do custo operacional da produção enzimática. Dentro desse contexto, diversos subprodutos e efluentes agroindustriais, tais como, bagaço de cana, água de lavagem de raízes, farelo de trigo, melaço, são utilizados como substratos para a produção de enzimas. Inúmeros fatores favorecem o emprego destes, tais como: disponibilidade, fonte alternativa com baixo valor comercial, características físicas e químicas que favorecem o crescimento de inúmeros microrganismos, dentre outros (COUTO E SANROMÁN, 2006; WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013).

Os resíduos ricos em amido têm sido usados como fontes alternativas de substratos para a produção de amilases devido à sua grande disponibilidade e por representar baixo valor comercial. Entre estes, tem-se a manipueira, um resíduo líquido oriundo do processamento da mandioca para obtenção da farinha, que apresenta uma composição química rica em amido e macro e micronutrientes que revelam um potencial na utilização como substrato para a produção de enzimas amilolíticas microbianas. No entanto, a manipueira é considerada tóxica, e, devido a grande produção de mandioca no estado de Sergipe e ao grande número de casas de farinha, esse efluente é altamente produzido e descartado, na maioria das vezes, de forma incorreta no meio ambiente. O reaproveitamento deste resíduo na produção de enzimas

mostra-se como uma solução eficiente associando sustentabilidade e economia com a redução dos custos de produção (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013).

Sendo assim, nesse trabalho, foi investigada a obtenção de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas empregando como fonte de isolamento o resíduo manipueira, bem como a possibilidade de produzir tais enzimas utilizando a própria manipueira como substrato para fermentação submersa. Desta forma, almeja-se minimizar os custos da produção da enzima, além de agregar valor a um resíduo e/ou minimizar os impactos ambientais.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Produzir enzimas amilolíticas utilizando microrganismos isolados da manipueira por fermentação submersa tendo como substrato o próprio resíduo agroindustrial.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Isolar e selecionar cepas microbianas produtoras de enzimas amilolíticas a partir do resíduo agroindustrial manipueira;
- II. Utilizar o resíduo agroindustrial como substrato para a produção de enzimas amilolíticas com as cepas selecionadas;
- III. Determinar as regiões de condições ótimas de operação, tais como pH, temperatura e concentração de manipueira para produção da enzima;
- IV. Caracterizar o extrato enzimático bruto produzido na condição ótima quanto à temperatura e pH ótimos de atividade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão bibliográfica irá tratar de tópicos como enzimas, enzimas amilolíticas, produção de enzimas e uso de resíduos agroindustriais para produção de enzimas.

3.1. ENZIMAS

As enzimas são moléculas de natureza protéica com atividade catalítica, embora existam também enzimas constituídas de RNA, as ribozimas ou RNAs catalíticos (FELLOWS, 2006). Estas biomoléculas são extremamente importantes, pois tem como função promover a aceleração da reação, por um fator de 10^{20} vezes a mais que reações não catalisadas, através da diminuição da energia de ativação. O equilíbrio da reação não é afetado pela enzima. E, para que ocorra a catálise, é necessário ter a enzima ligada a um substrato, e essa reação procede-se no denominado sítio ativo, sendo este uma pequena porção da enzima, localizado em uma fenda na superfície da proteína, ilustrada na Figura 1.

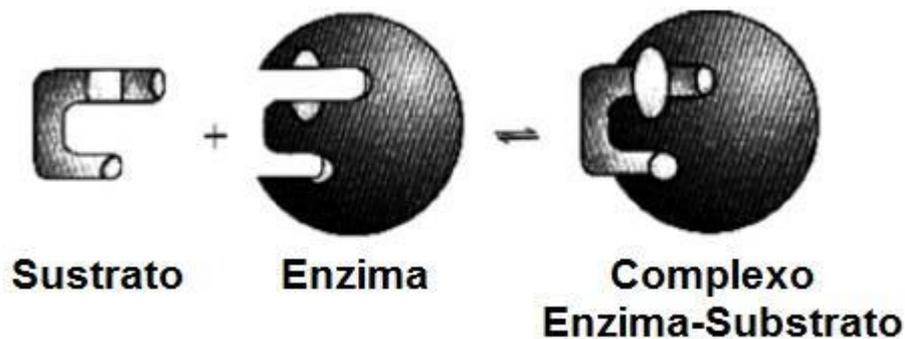


Figura 1 – Modelo de complementaridade estrutural (chave-fechadura de Emil Fisher).
Fonte: MONTEIRO e SILVA, 2009.

O substrato é denominado como a molécula que se liga ao sítio ativo, sofrendo a ação da enzima. Neste processo, geralmente, o sítio ativo engloba o substrato, retirando-o completamente da solução para que aconteça a reação enzimática dentro dos princípios da termodinâmica. Nos casos em que não se tem a atuação das enzimas, muitos dos processos necessários à vida, em que as enzimas atuam, seriam muito lentos ou mesmo não aconteceriam, como a respiração e a digestão animal (LIMA *et al.*, 2001; SCHMIDELL *et al.*, 2001; LEHNINGER *et al.*, 2011).

A tecnologia enzimática é considerada um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para produção de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam vantagens, tais como: acarretam em menor impacto ambiental e também menor consumo energético, por ser um produto natural e biodegradável

e, sendo altamente específicas, minimizam os efeitos indesejáveis. Além disso, as enzimas podem ser usadas em substituição aos produtos químicos que agredem o meio ambiente e provocam desgaste de materiais. Estas, também fornecem uma produção mais eficiente de compostos enantiomericamente puros devido, principalmente, a sua alta quimiosseletividade, regioseletividade, e estereosseletividade (BON *et al.*, 2008; SOETAERT e VANDAMME, 2010; NESTL *et al.*, 2011; KRISHNA, 2011; CHOI *et al.*, 2015).

As enzimas são divididas em seis grandes classes, apresentadas na Tabela 1, como determinado pela International Union of Biochemistry (IUB), baseadas no tipo de reação que elas catalisam.

Tabela 1 – Classificação das enzimas.

Classe	Tipo de reação
Oxidorrredutases	Catalisam reações de óxido-reduções.
Transferases	Catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra.
Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise.
Liasas	Catalisam reações de quebra de ligações.
Isomerases	Catalisam reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um produto isômero.
Ligases	Catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia.

Fonte: Wiseman, 1987

A denominação geral das enzimas ocorre também pela incorporação do sufixo **-ase** ao nome do substrato sobre as quais elas atuam, como por exemplo: as amilases são enzimas que hidrolisam o amido, as proteases que controlam a hidrólise de proteínas, ureases controlam a decomposição da uréia (SANTOS, 2007; JEGANNATHAN e NIELSEN, 2013).

As enzimas podem ser obtidas de fontes animais (amilase pancreática, lipase pancreática, pancreatina, pepsina, quimosina), de fontes vegetais (α -amilase, β -amilase, bromelina, ficina e papaína) ou produzidas por microrganismos, esta última, comumente empregada para fins biotecnológicos (PANDEY *et al.*, 2005).

As enzimas microbianas são consideradas as mais importantes por apresentarem vantagens como: produção em larga escala, apresenta natureza diversa, são relativamente fáceis de serem cultivadas em ambiente controlado, são altamente sensíveis à alterações genéticas o que permite obtenção de linhagens melhoradas, independem das condições sazonais, além de serem produzidas por fermentação, fazendo o uso de matérias-primas menos dispendiosas, que permite grande produtividade e menor custo (ZIMMER *et al.*, 2009).

Segundo Adrio e Demain (2005 e 2014), as enzimas microbianas são conhecidas por desempenhar um papel crucial como catalisadores metabólicos, tendo a sua utilização em diversas indústrias e aplicações. Ainda segundo os autores, o mercado de uso final de enzimas industriais é extremamente difundido com inúmeras aplicações comerciais industriais. As aplicações atuais estão evidenciadas em muitos mercados diferentes, incluindo papel e celulose, couro, detergentes e têxteis, produtos farmacêuticos, produtos químicos, alimentos e bebidas, biocombustíveis, alimentos para animais e cuidados pessoais, entre outros.

O campo de utilização de enzimas em processos industriais vem se expandindo consideravelmente devido à implementação de novas enzimas em novos ramos das indústrias, o que consente na oportunidade de desenvolvimento de novas tecnologias (WANDERLEY *et al.*, 2011).

O mercado total de enzimas industriais chegou a US\$ 3,3 bilhões em 2010 e a um valor de 4,4 bilhões em 2015 (ADRIO e DEMAIN, 2014). As enzimas amilolíticas, dentre as quais as α -amilases, estão entre as enzimas mais importantes e são de grande importância para a biotecnologia, constituindo uma classe de enzimas industriais com aproximadamente 25 a 30% do mercado mundial de enzimas (RAJAGOPALAN e KRISHNAN, 2008; AZAD *et al.*, 2009; DEB *et al.*, 2013).

3.2. ENZIMAS AMILOLÍTICAS

As enzimas amilolíticas, denominadas amilases, são importantes enzimas hidrolases que têm sido amplamente utilizadas desde décadas. Estas enzimas clivam aleatoriamente as ligações glicosídicas da molécula do amido e de oligopolissacarídeos similares, produzindo dextrinas e polímeros progressivamente menores formados por unidades de glicose (GUPTA *et al.*, 2003; SUNDARRAM e MURTHY, 2014). Elas estão entre as enzimas mais amplamente utilizadas em indústrias como alimentícia, fermentação, processamento de amido, têxtil e papel (VAIDYA e RATHORE, 2015).

O amido, principal substrato das amilases, é um polissacarídeo composto por dois tipos de polímeros: amilose e amilopectina, estruturas representadas na Figura 2. O conteúdo relativo de amilose e amilopectina varia com a fonte de amido. A amilose consiste de 20 a 25% da molécula de amido e é formada por cadeias lineares helicoidais que consiste em unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4. A amilopectina constitui 75 a 80% do amido e é caracterizada por cadeias ramificadas de unidades de glicose. As unidades de glicose lineares sucessivas são unidas por ligação glicosídica α -1,4, enquanto ramificação

ocorre a cada 15-45 unidades de glicose, onde ligações glicosídicas α -1,6 estão presentes (LEHNINGER *et al.*, 2002; AMIRA *et al.*, 2012; SUNDARRAM e MURTHY, 2014).

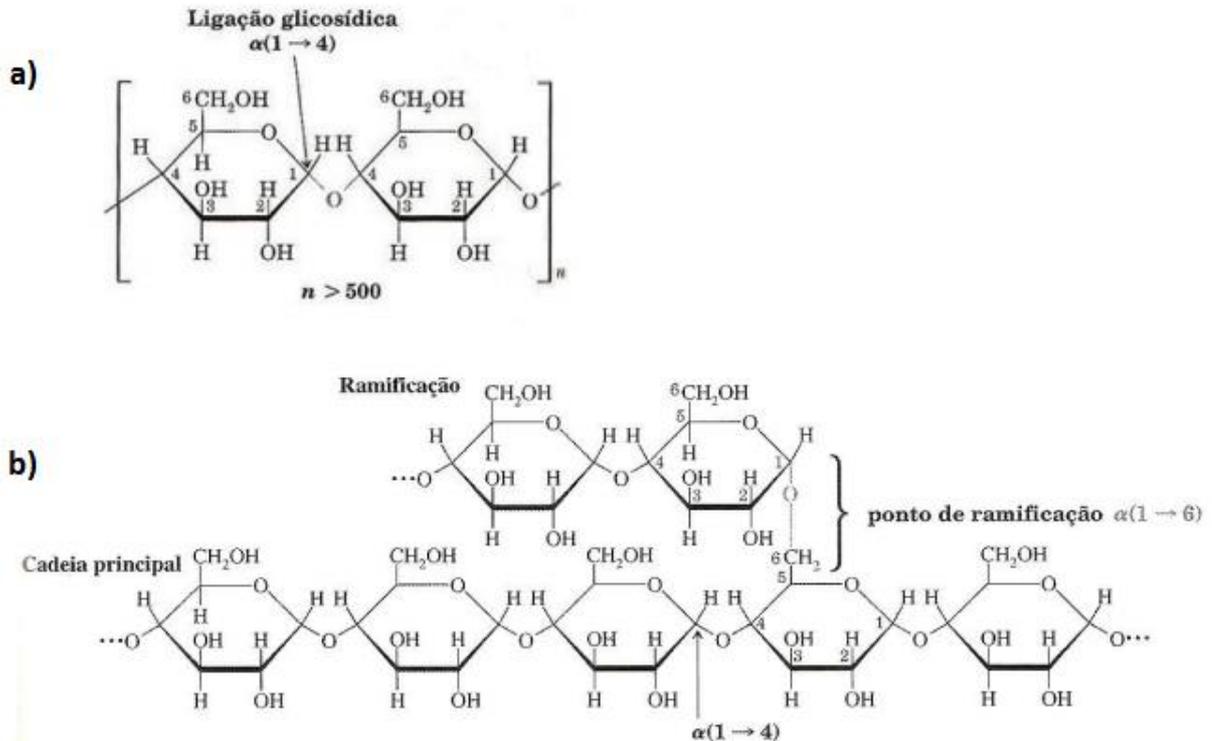


Figura 2 – Estrutura dos principais constituintes do amido: a) Estrutura parcial da amilose. b) Estrutura parcial da amilopectina.

Fonte: Adaptada de SOLOMONS e FRAYHLE (2008).

O amido ocorre principalmente nas sementes, raízes e tubérculos de plantas superiores. As plantas sintetizam o amido como resultado da fotossíntese. É sintetizado em plastídios como um composto de armazenamento para a respiração durante períodos escuros. Também é sintetizado em amiloplastos encontrados em tubérculos, sementes e raízes como um composto de armazenamento de longo prazo (AMIRA *et al.*, 2012).

Várias enzimas amilolíticas são capazes de hidrolisar o amido ou outros polímeros de glicose, podendo estas, de acordo com sua maneira de atuação sobre a molécula de amido, serem classificadas como endoamilases ou exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise de um modo aleatório no interior da molécula do amido, ocasionando a formação de ramos lineares de oligossacarídeos com cadeias de vários comprimentos e, de tal maneira, clivam as ligações glicosídicas α -1,4 presentes internamente nas cadeias de amilose ou amilopectina. As exoamilases atuam a partir da extremidade não redutoras das ligações glicosídicas, em sucessivas hidrólises, resultando em produtos finais curtos (GUPTA *et al.*, 2003; BON *et al.*, 2008).

O processo de hidrólise enzimática do amido é realizado em duas etapas: a liquefação e a sacarificação. Na liquefação, os grânulos de amido são dispersos em solução aquosa, aquecidos (gelatinização) e hidrolisados parcial e irreversivelmente, com auxílio de uma α -amilase (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002). A gelatinização ocorre em variadas temperaturas de acordo com os diferentes tipos de amido, oscilando na faixa de 65 a 105°C, sendo necessário muitas vezes o emprego de altas temperaturas para a total gomificação.

Após a liquefação, a solução de maltodextrina é hidrolisada em glicose por uma enzima desramificante, seja endoenzima (isoamilase e pululanase) ou exoenzima (β -amilase e glicoamilase), atuando sobre as ligações glicosídicas α -1,6 da amilopectina (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002). O resultado dessa liquefação é uma solução de sacarídeos de baixo peso molecular como glicose e maltose.

O conceito adotado por Gupta *et al.* (2003), divide as amilases 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.

São conhecidas várias enzimas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos e a ação combinada destas é necessária para a completa hidrólise do amido. A Tabela 2 apresenta uma variedade de enzimas amilolíticas com suas características quanto ao modo de ação, retenção ou inversão de configuração (α ou β), afinidade pelas ligações e substratos, e resultados da hidrólise (KOBBLITZ, 2008). Sendo as α -amilase, β -amilase e glicoamilase as mais citadas nas literaturas.

Tabela 2 – Exemplos de enzimas amilolíticas e suas características.

Enzimas	Ligação Preferencial a Hidrólise	Substrato Preferencial	Resultado da Hidrólise
Endoenzimas			
α -amilases EC 3.2.1.1	α -1,4	Amido	Dextrinas, maltose, glicose
Isoamilase EC 3.2.1.68	α -1,6	Amilopectina	Amilose (dextrinas lineares)
Isomaltase EC 3.2.1.10	α -1,6	Dextrinas-limite	Maltose, Maltotriose
Ciclomaltodextrinase EC 3.2.1.54	α -1,4	Ciclodextrinas e dextrinas lineares	Maltose, Maltotriose
Pululanase EC 3.2.1.41	α -1,6	Pupulana e Amilopectina	Maltotrioses e dextrinas lineares
Isopululanase EC 3.2.1.57	α -1,4	Pupulana	Isopanose
Exoenzimas			
β -amilase EC 3.2.1.2	α -1,4	Amido	maltose, β -dextrina
Glicoamilase EC 3.2.1.3	α -1,4 , α -1,6	Amido	β -glicose
α -glicosidase EC 3.2.1.20	α -1,4	Diversos	Glicose
Ciclomalatodextrina glucano-transferase EC 2.4.1.19	α -1,4	Amido	Ciclodextrinas

Fonte: KOBLITZ, 2008.

3.2.1. α -Amilases

A α -amilase (E.C.3.2.1.1) é uma endo-hidrolase que catalisa a hidrólise, aleatoriamente, das sucessivas ligações glicosídicas α -1,4 no amido para obter produtos tais como glicose e maltose, não atuando sobre as ligações α -1,6 (SUNDARRAN e MURTHY, 2014).

A ação da α -amilase sobre a amilose se dá em duas etapas. A primeira consiste no ataque aleatório e rápido do substrato, resultando maltose e maltotriose, enquanto que a segunda, bem mais lenta, permite a formação de glicose e maltose (VITOLLO, 2001). As ligações α -1,6 da amilopectina não são hidrolisadas pela α -amilase, desta forma o ataque da

amilopectina pela α -amilase gera produtos finais como glicose, maltose e as α -dextrinas limite (oligossacarídeo contendo 4 ou mais unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo α -1,6). A Figura 3 mostra uma representação esquemática da ação da α -amilase sobre a amilose e amilopectina, para melhor visualização das cadeias de ambas as moléculas, elas foram apresentadas na forma linear ao invés da forma espiral. Segundo Bruchman (1980), teoricamente, a ação da α -amilase sobre a amilose conduz a 87% de maltose e 13% de glicose; e sobre a amilopectina 73% de maltose, 8% de isomaltose e 19% de glicose. Amilases de origens diferentes produzem dextrinas diferentes. A α -amilase ataca os grânulos de amido danificados, formando dextrinas, as quais são hidrolisadas pela β -amilase (VITOLLO, 2001).

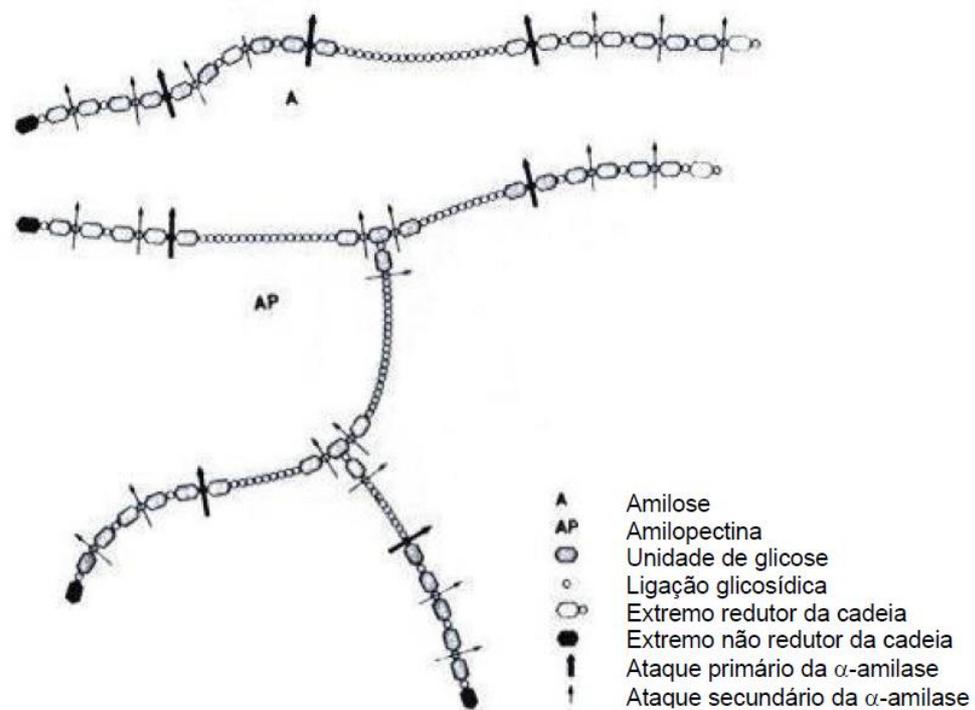


Figura 3 – Representação esquemática da ação da α -amilase sobre a amilose e amilopectina. Fonte: BRUCHMANN (1980).

A α -amilase também é denominada de enzima dextrinizante e de liquefação e encontra-se nos tecidos e diversos meios: saliva, pâncreas, cereais, bactérias, fungos. Sua resistência à desnaturação térmica, a qual inativa a enzima, difere conforme sua origem ou biossíntese. A ação da enzima se dá devido ao efeito combinado dos seus sítios ativos, os quais são formados por grupos carboxílicos e histidínicos (WISEMAN, 1987; AMIRA *et al.*, 2012).

As α -amilases são de ocorrência ubíqua, produzida por plantas, animais e microrganismos. No entanto, as fontes microbianas são as mais preferidas para a produção em grande escala. Atualmente, uma variedade de α -amilases microbianas é comercializada com aplicações em diferentes setores industriais. A α -amilase detém a cota máxima do mercado de vendas das enzimas com sua principal aplicação na indústria de amido, assim como a sua utilização bem conhecida na padaria. Com o advento das novas fronteiras da biotecnologia, o espectro de aplicação da α -amilase também se expandiu para química medicinal e analítica, bem como em detergentes para lavagem automática, desengomagem na indústria têxtil e de papel e celulose (GUPTA *et al.*, 2003; SUNDARRAN e MURTHY, 2014).

3.2.2. β -Amilases

A β -amilase pode ser encontrada em vegetais, mas algumas cepas microbianas são também capazes de produzi-las. Atua como exo-hidrolase na penúltima ligação glicosídica α -1,4- do amido, glicogênio e oligossacarídeos relacionados, removendo a partir da extremidade não redutora da cadeia sucessivas unidades de β -maltose, com inversão da configuração do carbono anomérico inicial do açúcar liberado (PASIN, 2015). O resultado da hidrólise da amilose resulta em cerca de 90% de maltose e 10% de glicose e maltotriose. Uma vez que é incapaz de clivar as ligações glicosídicas α -1,6, na amilopectina, resulta na degradação incompleta da molécula, obtendo-se 50-60% de maltose e uma β -dextrina limite (PANDEY *et al.*, 2000; KOBLITZ, 2008)

As fontes primárias de β -amilase são as sementes de plantas superiores e batata-doce. Durante o amadurecimento de frutas, β -amilase quebra o amido em maltose resultando na doçura da fruta. β -amilase pode ser usada para diferentes aplicações na investigação, para estudos estruturais de amido e moléculas de glicogênio produzidas por vários métodos. Na indústria é utilizada para a fermentação na fabricação de cerveja e indústria de destilação. além disso, ela é utilizada para produzir altos xaropes de maltose (SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2006).

3.2.3. Glicoamilases

A amiloglicosidase (α -D-1,4 glicanglicohidrolase), também conhecida como glicoamilase (EC 3.2.1.3), é uma exoenzima que catalisa a reação de hidrólise das ligações α -1,4 e α -1,6 das extremidades não redutoras do amido, transformando-o em glicose. São conhecidas como enzimas de sacarificação, pois são capazes de hidrolisar o amido

completamente. Além das frações amilose e amilopectina do amido, outras moléculas como maltose, dextrinas e glicogênio são hidrolisadas pela enzima, que atua também sobre as ligações α -1,3. A síntese de amiloglicosidase é regulada pelos mecanismos de indução e repressão catabólica. A indução é ocasionada pela presença de amido ou polissacarídeos derivados do amido, enquanto a repressão é resultante da presença de fontes de carbono mais facilmente assimiláveis, como é o caso da glicose (PAMBOUKIAN *et al.*, 1998; PANDEY *et al.*, 2005; ANTO *et al.*, 2006).

A glicoamilase assume importância industrial devido à habilidade de formar menos produtos de reversão que a hidrólise ácida (PARK E SANTI, 1977), bem como à sua alta taxa de conversão do polissacarídeo em glicose. Assim, a amiloglicosidase é usada em amidos liquefeitos com α -amilase para chegar a produtos que serão usados como substratos para fermentações, ou para a obtenção biotecnológica de glicose e dextrinas (MACKENZIEA *et al* 2000).

3.3. PRODUÇÃO E CARACTERÍSTICAS DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS MICROBIANAS

Amilases microbianas estão entre as enzimas hidrolíticas mais importantes e têm sido estudadas extensivamente. Podem ser produzidas em quantidades que satisfaçam todas as exigências do mercado devido à grande diversidade de enzimas disponíveis a partir de microrganismos (PANDEY *et al.*, 2000; HAG *et al.*, 2003). O isolamento de microrganismos a partir de recursos naturais, tais como solo, água, plantas entre outros, sempre foi considerado uma atividade de grande importância para obtenção de novas linhagens de interesse industrial (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Apesar do fato de existir diferentes amilases microbianas purificadas atualmente e algumas delas terem sido usadas e caracterizadas em aplicações biotecnológicas, as amilases até agora conhecidas não são suficientes para atender a maioria das demandas industriais (KARBALAEI-HEIDARI *et al.*, 2007). Segundo Vaidya e Rathore (2015), o isolamento e caracterização de novos microrganismos promissores para produção de amilases para utilização industrial é considerado um processo contínuo.

Dado esse amplo espectro de aplicações industriais, é imprescindível uma contínua busca de novas amilases com propriedades extremas para enfrentar os desafios em processos industriais severos e condições extremas, tais como o aumento do sal, baixa ou alta temperatura e pH ácido ou alcalino (LI *et al.*, 2014).

Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides (2007) citam como principais razões para o aumento do interesse em fontes microbianas, o rápido crescimento dos microrganismos que por sua vez irá acelerar a produção de enzima, o fácil manuseio quando em comparação com animais e plantas, além de exigirem menos espaço e servirem como fontes mais rentáveis. Os autores ainda destacam a facilidade dos microrganismos em serem manipulados através de técnicas de engenharia genética ou por outros meios, submetendo-os a melhorias, mutações e outras tais mudanças pela qual a produção da enzima pode ser otimizada e, além disso, os microrganismos podem ser adaptados para atender às necessidades das indústrias com características desejadas, como estabilidade térmica, por exemplo. Amilases termoestáveis são desejadas uma vez que minimizam o risco de contaminação e reduzem o tempo de reação, poupando assim uma quantidade considerável de energia (KONSOULA E LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, 2007; SUNDARRAM E MURTHY, 20014).

Amilases foram derivadas a partir de vários fungos, leveduras, bactérias e actinomicetos, no entanto, as enzimas a partir de fontes bacterianas e fúngicas têm dominado os setores industriais (PANDEY *et al.*, 2000). Entre as amilases bacterianas, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* são conhecidos por serem bons produtores de α -amilase termoestáveis e estes têm sido amplamente utilizados na produção da enzima para fins comerciais com várias aplicações.

Enzimas amilolíticas termoestáveis estão sendo investigadas para melhorar os processos industriais de degradação do amido e são úteis para a produção de produtos valiosos, como glicose, a dextrose cristalina, xarope de dextrose, maltose e maltodextrinas. Similarmente, o fungo termófilo *Thermomyces lanuginosus* é considerado um excelente produtor de amilase, autores como Kunamneni *et al.* (2005) provaram a termoestabilidade da enzima produzida. Os fungos filamentosos, tais como *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*, produzem quantidades consideráveis de enzimas que são usados extensivamente na indústria (PANDEY *et al.*, 2000; SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2006; SUNDARRAM e MURTHY, 2014).

Produção de amilase de origem microbiológica pode ocorrer a partir de várias formas de processo, tais como, fermentações em estado sólido (FES) ou submerso (FS). As condições do bioprocessamento, tais como, composição do meio de crescimento, fontes de carbono, fontes de nitrogênio, concentração de fosfatos, velocidade de agitação, pH e temperatura, entre outros, afetam a produção enzimática e, de tal modo, podem ser modificadas de forma a otimizar o crescimento microbiano e o processo de produção (SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2006).

De acordo com Francis *et al.* (2003), a otimização das condições de fermentação, em particular os parâmetros físicos e químicos, são importantes para o desenvolvimento de processos de fermentação devido ao seu impacto sobre a economia e a praticabilidade do processo. Souza e Magalhães (2010) destacam como parâmetros mais notáveis a composição do meio de crescimento, o pH do meio, a concentração de fosfato, idade do inóculo, temperatura, agitação, fonte de carbono e fonte de nitrogênio.

Em relação à fonte de carbono, a produção de α -amilase geralmente é induzida pela presença de amido ou de seu produto hidrolítico, a maltose. Vários estudos demonstram que o amido e maltose funcionam como indutores da atividade de α -amilase e que na presença de outros açúcares como xilose e frutose, diminuem a atividade, pois podem reprimir a sua produção (GUPTA *et al.*, 2003). O uso de resíduos agroindustriais que forneçam essas fontes de carbono é utilizado como alternativa para tornar o processo mais econômico (PANDA *et al.*, 2016).

A fonte de azoto, nitrogênio, é de fundamental importância para o crescimento microbiano, e, portanto, para a produção de enzimas. Em meios de cultura sintéticos, a adição de nitrogênio orgânico como extrato de carne e peptona, tem sido preferida para produção de amilases bacterianas. Entretanto, várias fontes de nitrogênio inorgânico têm sido relatadas para melhor produção de amilase por fungos, como por exemplo, sulfato de amônio, nitrato de amônio, entre outros. A concentração de fosfato apresenta um importante papel regulatório na síntese de metabólitos primários e secundários dos microrganismos. O incremento de fosfatos pode aumentar significativamente a produção de amilases por microrganismos, no entanto, em altas concentrações podem atuar como inibidores (GUPTA *et al.*, 2003).

O pH é um fator de forte influência na produção de amilases. Estudos anteriores revelaram que fungos necessitam de pH ligeiramente ácido e bactérias necessitam pH neutro para um crescimento ótimo. A maioria das linhagens de *Bacillus* usadas comercialmente para a produção de α -amilases bacterianas por fermentação submersa apresenta pH ótimo entre 6 e 7 (GUPTA *et al.*, 2003; SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2006).

A temperatura é um dos fatores mais importantes na produção enzimática, pois atua de maneira decisiva na função das biomoléculas e manutenção das estruturas biológicas, estando, dessa forma, relacionado ao crescimento do microrganismo. Assim, a temperatura ótima depende se a cultura é psicrófila, mesófila ou termófila. Amilases bacterianas são produzidas em uma gama muito ampla de temperatura. Entre os fungos, a maioria dos estudos de produção de amilase foi realizado com fungos mesófilos, dentro da gama de temperaturas

de 25-37°C (GUPTA *et al.*, 2003; SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2006; AMIRA *et al.* 2012).

O processo de agitação influencia na produção enzimática uma vez que atua na homogeneização dos nutrientes e na taxa de transferência de oxigênio, além de influenciar na morfologia micelial e na formação do produto. Altas velocidades de agitação prejudicam a morfologia do micélio do fungo. Para a produção de amilases por diversos microrganismos, tem sido utilizada velocidades de agitação de até 300 rpm (GUPTA *et al.*, 2003; SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2006).

A Tabela 3 apresenta alguns microrganismos produtores de α -amilase e suas propriedades, como temperatura e pH ótimos e inibidores da atividade da enzima.

Tabela 3 – Propriedades de α -amilases microbianas.

Microrganismo	Fermentação	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Inibidores
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	FS	7,0	33	-
<i>Chromohalobacter sp.</i>	FES	7,0-9,0	65	-
<i>Caldimonas taiwanensis sp.</i>	-	7,0	55	Galactose, sacarose, acetato
<i>Halobacillus sp.</i>	FS	7,5-8,5	50	Cd ²⁺ , Cu ²⁺
<i>Bacillus sp.</i>	FS; FES	6,5-10	60-70	EDTA, HgCl ₂ , NH ₄ Cl
<i>Bacillus subtilis</i>	FS;FES	6,5-10	37-135	-
<i>Bacillus caldolyticus</i>	FS	5,0-6,0	70	-
<i>Halomonas meridiana</i>	FS	7,0	37	Glicose
<i>Bacillus licheniformis</i>	FS	7,5	40	-
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	FS	5,5	55	Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Fe ³⁺ , Al ³⁺
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	FES	6,0	50	-
<i>Aspergillus niger</i>	FES	5,5	70	-
<i>Aspergillus sp</i>	FES	6,0	50	-
<i>Aspergillus niger UO-1</i>	FS	4,95	50	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ e Zn ²⁺
<i>Aspergillus oryzae CBS570.64</i>	FES	7,0	35	-
<i>Cryptococcus flavus</i>	-	5,5	50	Hg ²⁺ , Fe ²⁺ e Cu ²⁺

Fonte: Adaptada de SOUZA e MAGALHÃES (2010).

FES = fermentação em estado sólido; FS = fermentação submersa

3.3.1. Fermentação submersa na produção de enzimas amilolíticas microbianas

As enzimas para o uso industrial são produzidas por bactérias e fungos em fermentação no estado sólido (FES) ou submerso (FS). O primeiro é um método relativamente novo, enquanto o segundo é um método tradicional de produção de enzima que tem sido utilizado durante um longo período de tempo. A FS é o modo de fermentação primária e as operações unitárias na produção de enzimas envolvem primeiramente a própria fermentação, seguido pela adição de células de perturbação e posterior filtração ou centrifugação. A enzima bruta é ainda purificada por precipitação, seguida de centrifugação e liofilização, etapas conhecidas coletivamente como “processamento *downtream*” (JEGANNATHAN e NIELSEN, 2013).

O método FS apresenta diversas vantagens, como por exemplo, permitir a utilização de organismos geneticamente modificados com uma extensão maior do que a FES, a esterilização do meio de processo e a purificação dos produtos finais podem ser feitas facilmente. Além disso, o controle de parâmetros de processo, tais como temperatura, pH, agitação, transferência de oxigênio e de umidade pode ser feito convenientemente (KUNAMNENI *et al.*, 2005).

A fermentação submersa (FS) emprega substratos líquidos de fluxo livre, tais como melão e caldos. Consiste na introdução do microrganismo em meio líquido na forma de um inóculo. Os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio líquido tornando-se facilmente acessíveis para utilização pelos microrganismos, e conseqüentemente escassos rapidamente e, portanto, precisam ser constantemente reabastecidos. Este processo é executado em fermentadores fechados, equipados com agitadores, dispositivos de aeração para introdução de ar estéril, camisas e serpentinas para o controle de temperatura. E se o processo de fermentação submersa exigir assepsia, essa se consegue mediante a esterilização do meio (dentro ou fora do fermentador), a desinfecção ou esterilização do equipamento por injeção de vapor ou mediante o calor gerado por serpentinas, sendo essa medida extensiva a todos os ductos de entrada e saída e às válvulas correspondentes e a esterilização do ar mediante filtros adequados. Esta técnica de fermentação é apropriada para os microrganismos, tais como bactérias que necessitem de elevada teor de umidade para o seu crescimento. Este tipo de fermentação é usado primariamente para a extração de metabólitos secundários que precisam ser utilizados em forma líquida (COUTO e SANRÓMAN, 2006).

Comparados com os processos sólidos, os processos submersos oferecem várias vantagens como: facilidade na manipulação, maiores volumes de meio, a massa de microrganismo fica

totalmente submersa no meio de maneira uniforme, a absorção de nutrientes e excreção de metabólitos são executados com mais eficiência, o que acarreta menor tempo de fermentação e, conseqüentemente, maior produtividade. Apresenta algumas desvantagens como o fato dos produtos serem diluídos, dos extratos enzimáticos serem menos estáveis e o fato de gerar volumes consideráveis de resíduos (PANDEY *et al.*, 2000; MALAJOVICH, 2004; MONTEIRO e SILVA, 2009).

3.4. USO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Nos últimos anos, o setor de agroindústria tem se destacado com um importante papel no desenvolvimento da economia, porém gerando uma quantidade significativa de resíduos. Atualmente, toneladas de resíduos agroindustriais, sejam sólidos ou líquidos, resultantes de atividades de processamento ou transformação de matéria-prima, têm sido descartadas de forma incorreta gerando sérios problemas de poluição do solo, águas superficiais e subterrâneas (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013; OELOFSE e NAHMAN, 2013; PANDA *et al.*, 2016).

O aproveitamento de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos surge como uma alternativa para reduzir o volume de resíduos descartados diretamente para o ambiente ou que envolve altos custos de tratamento de efluentes, reduzindo a poluição causada pela destinação final inadequada. Além de diminuir o impacto sobre o meio ambiente, pode ser um fator importante para a produção de subprodutos de alto valor agregado com diminuição dos custos de produção e promoção da sustentabilidade da cadeia produtiva (BARROS *et al.*, 2011; WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013).

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com objetivo de encontrar usos alternativos para estes resíduos, agregando valor a produtos antes descartados e viabilizando assim projetos que levam à sustentabilidade através do reaproveitamento desses resíduos nos sistemas de produção industrial (CASTRO *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2011).

Woiciechowski *et al.* (2013) afirmam que os resíduos agroindustriais podem ser transformados e/ou reaproveitados para a geração de novos produtos de importância comercial, econômica e industrial. O autor ainda cita o uso de vários dos resíduos como matérias-primas em bioprocessos, como fonte de carbono, destacando que eles possuem atributos de um excelente substrato para o crescimento de microrganismos. O uso para a produção de várias biomoléculas de importância comercial e produtos finais de valor

agregado, como por exemplo, na área de biocombustíveis, na produção do etanol e biodiesel; na área alimentícia, na produção de SCP (single cell protein – proteína unicelular), cogumelos comestíveis, aditivos alimentares, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos, aromas, pigmentos entre outros.

A aplicação de resíduos da agroindústria como substratos em processos fermentativos para a obtenção de compostos de interesse comercial tem sido foco de muitos estudos. Mukthar e Haq (2013) citam culturas agrícolas e resíduos de processamentos, tais como farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de cana, palha de milho, resíduos de café, papel e processamento de óleo, farelos e cascas de cereais, entre outros como substratos para fermentações. O uso destes resíduos em processos de fermentação em estado sólido (FES), não apenas representa um substrato alternativo, mas ajuda a reduzir o custo de fabricação do produto com elevado valor agregado e, também, a resolver problemas de poluição ambiental relacionados ao acúmulo ou má disposição desses resíduos. Os subprodutos agroindustriais quando utilizado em meio de cultura submersa são fontes excelente e barata de proteínas, hidratos de carbono, e minerais necessários para o crescimento de microrganismos, como por exemplo, na síntese de enzimas microbianas (BOTELLA *et al.*, 2007; MUKTHAR e HAQ, 2013).

Na produção de amilases, a seleção de fontes apropriadas de carbono, nitrogênio e outros nutrientes como substrato é uma das etapas mais críticas dos processos industriais, uma alternativa viável e economicamente rentável é a utilização de resíduo agroindustrial em contrapartida à utilização de substratos sintéticos considerados dispendiosos (SAXENA e SINGH 2011; AKCAN, 2011). Nesse contexto, o uso de subprodutos de baixo custo como substratos para a produção de enzimas é especialmente interessante em países que geram grandes quantidades destes materiais, como ocorre no Brasil, por sua extensa atividade agroindustrial (GUPTA *et al.*, 2003).

O Brasil é um dos maiores produtores de mandioca, sendo a maior parte do seu consumo na forma natural como farinha, cozida ou na forma fermentada. O processamento industrial da mandioca com o objetivo de se obter a farinha e amido gera uma grande quantidade de resíduo que na maioria das vezes é descartado no meio ambiente de forma inadequada. Em Sergipe, a mandioca tem grande destaque econômico e em função de sua grande produção, são geradas também grandes quantidades de resíduos advindos de seu processamento, dentre eles a água residual, também denominada de manipueira. Recentemente, muitas alternativas têm sido estudadas para utilização da manipueira como substrato em processos fermentativos, na produção de biomassa de vários microrganismos e

várias biomoléculas de interesse comercial (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013; CERATTI, 2015; ASN, 2016).

3.4.1. Manipueira

A mandioca é a sexta cultura mais importante do mundo como fonte de alimento e dieta calórica básica para mais de 700 milhões de pessoas, em vários países do mundo. Na América do Sul, o produto tem a característica de ser base alimentar, consumido na forma in natura, bem como ser matéria-prima para a indústria de fécula e farinha de mandioca, principalmente. O Brasil ganha destaque no cultivo e no processamento industrial da mandioca. Segundo dados do CONAB (2015), na safra 2015 produziu 24,5 milhões de toneladas de mandioca e que nas regiões Norte, Sul e Nordeste houve um acréscimo de 6,4%, 3,4% e 11,5% respectivamente em relação à safra 2013. Em Sergipe, foi produzido cerca de 380.182 toneladas de mandioca no ano de 2015, e em novembro de 2016 uma produção de 286.221 toneladas (IBGE, 2016).

A mandioca é considerada um dos principais produtos de cultivo devido ao aproveitamento de quase todas as partes dessa espécie vegetal. Todavia, um problema que vem sendo observado é a elevada produção de resíduos oriundos do processamento da mandioca, gerando danos ao meio ambiente e a sociedade (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2015).

O processo de industrialização da mandioca para obtenção da farinha, representado na Figura 4, gera resíduos líquidos e sólidos, dentre estes, destaca-se a manipueira, que é um resíduo líquido gerado por ocasião da prensagem da massa ralada da mandioca no processo de obtenção da fécula ou farinha de mandioca, considerado altamente poluente e tóxico devido sua composição (FELIPE *et al.*, 2009; FEMA, 2011; PINTO *et al.*, 2013).

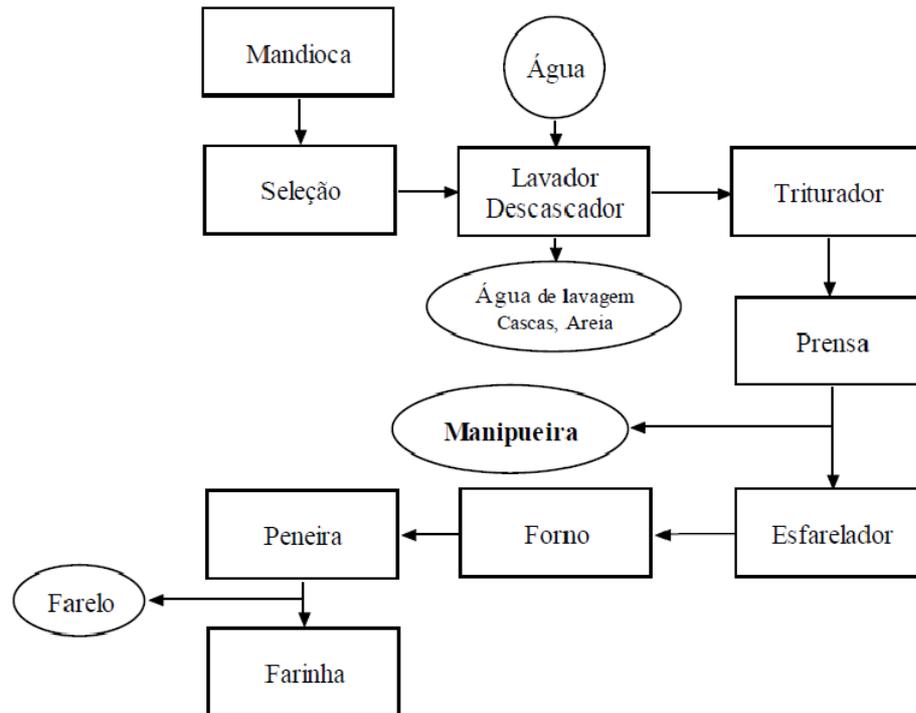


Figura 4 – Esquema do processamento da mandioca para obtenção da farinha.

Fonte: Bezerra, 2012.

Cereda (2001) é mais explícita ao caracterizar a manipueira, em relação à origem, como a água de constituição da raiz, extraída na prensagem da massa ralada da mandioca na confecção da farinha (Figura 5 a), sendo que, na extração da fécula a água usada para diluir a manipueira, diminuindo sua carga orgânica e o teor de cianeto, é denominada de água vegetal (FEMA, 2011). De acordo com Amaral *et al.* (2007), no Brasil, o processo de obtenção de fécula, incide em perda de quase um terço do amido presente na raiz, o que pode ser considerado um fator de elevação do potencial poluidor dos efluentes líquidos industriais, principalmente a manipueira, tendo em vista que tal situação contribui para a geração de um despejo mais concentrado em termos de carga orgânica.

A manipueira possui um aspecto leitoso, cor amarelo-claro e odor fétido, apresenta-se na forma de suspensão aquosa com significativa concentração de material orgânico, todavia os efeitos poluentes não ocorrem somente pelo alto nível de DBO, mas também pela quantidade significativa do composto linamarina (glicosídeo cianogênico) das raízes, que a torna tóxica e a diferencia de outros resíduos da agroindústria. Esta característica da manipueira consiste em sério problema ambiental quando despejada diretamente em corpos hídricos, principalmente quando considerados os pequenos cursos d'água, nas quais comumente acontecem os lançamentos oriundos das pequenas casas de fecularias (Figura 5 b) (MAI, 2006; FELIPE *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2015).

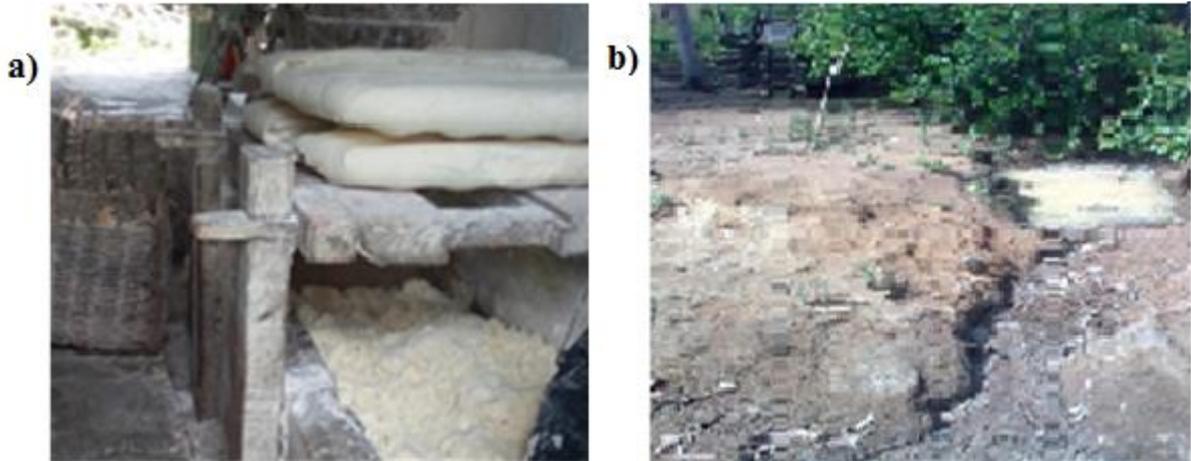


Figura 5 – Casa de Farinha (a) massa da mandioca prensada e (b) manipueira lançada no solo.

Fonte: Autoria própria, 2015.

Segundo Giongo (2011), um grande problema enfrentado pelas indústrias processadoras de mandioca é em relação ao destino dado a manipueira que, na maioria das vezes, é descartado diretamente em efluentes e em terrenos próximos, e possibilita o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios facultativos que consomem o oxigênio livre da água e potencializam a destruição da vida aeróbia do rio, incluindo peixes e vegetal. Santos (2008), em um estudo de caso, cita diversos impactos ambientais gerados pelo descarte da manipueira, como por exemplo, relatos de morte de animais que beberam da água aonde ocorreram descargas da manipueira, sendo a morte de peixes fato comum.

Cardoso (2003) atribui ao setor agrícola e industrial a busca de uma solução viável para os resíduos gerados com o processamento de mandioca, porém, afirma que ainda são pouco aliadas ao processo produtivo, havendo uma clara necessidade de ajustes das alternativas existentes, visando a redução do impacto ambiental, mas também aumentar a eficiência da cadeia, reduzindo os custos e consequentemente aumentando a receita.

O reaproveitamento da manipueira, assim como de qualquer resíduo, tende não apenas reduzir o impacto ambiental, mas também proporcionar maior rentabilidade na atividade agregando valor (GIONGO, 2011).

Segundo Santos (2008), ao mesmo tempo em que a manipueira é um potente agente poluidor, ela é também uma oportunidade devido ao seu multiaproveitamento, seja para fazer tijolos, na alimentação animal, controle de pragas e doenças de plantas, assim como o seu uso para produção de biogás, dentre várias outras utilidades.

Costa e Pastore (2004) citam o aproveitamento da manipueira em processos biotecnológicos como na produção de biomassa oleaginosa, produção de biossurfactantes, de bioaromas, enfatizando a contribuição do uso deste efluente como substrato para

microrganismos tanto na redução da poluição, bem como nos gastos de produção de subprodutos de interesse.

Rabalho (2002) e Barros *et al.* (2013) estudaram a produção de enzimas utilizando a manipueira como substrato através da fermentação submersa. Suman *et al.* (2011) e Urbano *et al.* (2009) citam o aproveitamento da manipueira como substrato na obtenção de etanol. A recuperação de carboidratos, lipídeos e proteínas entre outros compostos existentes para utilização em outros sistemas por meio de flotação foi citado por Pinto *et al.* (2013), como forma de reaproveitamento da manipueira.

No estudo do aproveitamento da manipueira, Souza *et al.* (2015) comprovaram, em seu trabalho, que a mesma apresenta teores consideráveis para macro, micronutrientes e matéria orgânica, e, portanto, podem apresentar diversas aplicações, dentre elas o uso para complementação na ração de animais e principalmente na aplicação no solo como fertilizante, em diversas culturas, gerando renda, diminuindo custos e conseqüentemente minimizando os danos que vem trazendo ao meio ambiente.

Os teores de nutrientes, matéria orgânica e contaminantes presentes nos resíduos de uma forma geral, devem ser estudados antes de sua aplicação, evitando desperdícios e aplicação inadequada e ao mesmo tempo contribuindo para a diminuição do lançamento indiscriminado no ambiente que pode ocasionar desequilíbrios ambientais (SOUZA *et al.*, 2015).

A composição química da manipueira varia de acordo com a variedade da mandioca e das condições edafoclimáticas da região do plantio. Sua composição sustenta a sua potencialidade como nutriente, haja vista seu elevado teor de potássio, magnésio, fósforo, cálcio, enxofre, ferro e micronutrientes em geral (CORDEIRO, 2006; NASU, 2008). Possui apreciável quantidade de amido (em farinhas) sedimentável e em suspensão coloidal, proteínas, glicose, restos de fibras, ácido cianídrico, bem como outras substâncias orgânicas (SAMPAIO, 1996).

Segundo Damasceno *et al.* (2001), a composição média da manipueira em carbono é: 58,18g/L de açúcares totais; 37,96g/L de açúcares redutores; 14,90g/L de frutose; 22,34 g/L de glicose; 0,72g/L de maltose; 20,22 g/L de açúcares não-redutores; 1,52 g/L de dextrinas e 18,70 g/L de sacarose. Leonel e Cereda (1995) relatam a presença de 5,71% de amido e 2,93% de açúcares redutores totais na manipueira coletada na prensa, antes do processo de decantação. Suman *et al.* (2011) citaram valores de 6,3% amido e 1,96% de açúcares solúveis totais na caracterização da manipueira. Pinto *et al.* (2013) encontraram valores menores do que os referidos nas literaturas, em torno de 1,17% de amido e 2,24% de açúcares totais. A Tabela

4 exibe os teores de macro e micronutrientes em amostras de manipueira caracterizada por diversos autores.

Tabela 4 – Teores de macro e micronutrientes em amostras de manipueira.

Parâmetros	Souza <i>et al.</i> (2015)	Bezerra (2012)	Costa e Pastore (2004)
Cobre (mg/L)	0,74	0,69	0,67
Ferro (mg/L)	21,42	2,07	-
Zinco (mg/L)	5,21	2,80	1,1
Manganês (mg/L)	2,28	0,89	-
Nitrogênio total (g/L)	0,98	1,68	0,61
Fósforo (mg/L)	390	210	161,3
Calcio (mg/L)	245	244,80	122,8
Magnésio(mg/L)	222	718,18	366,8
Sódio (mg/L)	199	-	-
Potássio (mg/L)	779	5450	2900

Fonte: Autoria própria.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica Industrial (LBQI) e no Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABAM) do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

A Figura 6 representa as etapas que foram realizadas neste trabalho visando atingir todos os objetivos definidos para este estudo. A metodologia utilizada é uma adaptação de Rabalho (2002) e Barros *et al.* (2013).

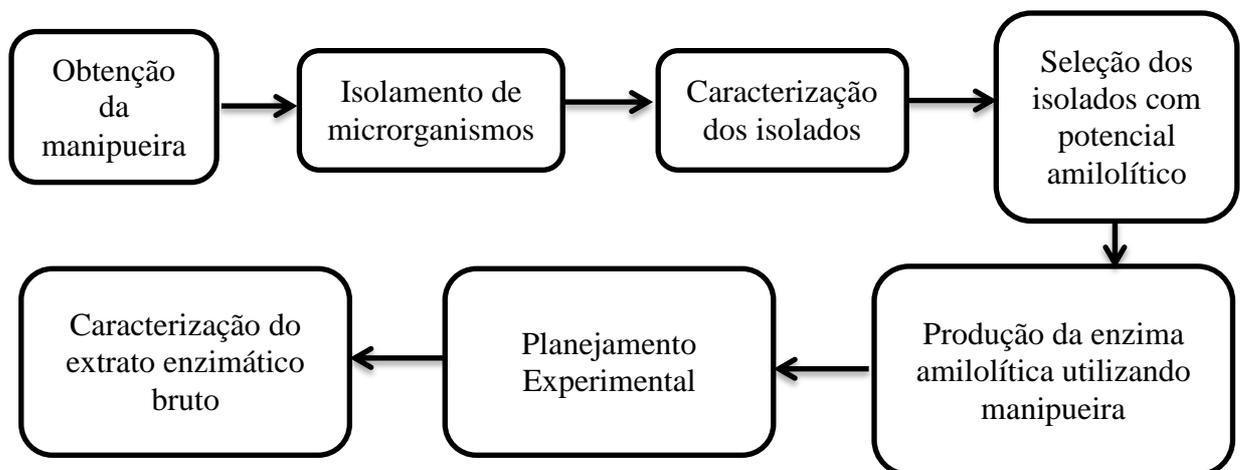


Figura 6 – Fluxograma de representação das etapas desenvolvidas.

4.1. OBTENÇÃO DA MANIPUEIRA

Visando à aquisição de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas, foi utilizado como fonte de isolamento um resíduo rico em amido: a manipueira. Esse resíduo, oriundo do processamento da mandioca para obtenção de farinha, foi coletado em casa de farinha comunitária localizada no município de Itaporanga D'Ajuda, distante 26 km da capital do estado de Sergipe, Aracaju.

A manipueira recém-extraída foi agitada vigorosamente para liberação do cianeto de hidrogênio, filtrada em gaze para remoção dos contaminantes físicos mais grosseiros e acondicionada sob refrigeração para etapa de isolamento e, em seguida, encaminhada para o freezer a -20°C para posterior uso como substrato.

4.2. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS

Para o isolamento, foi transferido uma alíquota de aproximadamente 2 mL da amostra de manipueira para um tubo de ensaio contendo caldo de enriquecimento, previamente aquecido em autoclave a 121°C durante 20 minutos, de composição: 1,5 g/L de extrato de levedura; 5 g/L de NaCl; e, 1,5 g/L extrato de carne. Os tubos foram incubados em estufa a 35°C por 24 horas, e, após incubação, uma alçada do material foi utilizada na semeadura por esgotamento em placas de Petri contendo meios de cultura ágar batata dextrose (do inglês, “PDA”) e ágar nutriente (do inglês, “NA”). As placas com meio NA foram incubadas a 35°C durante 24 horas, enquanto que as placas com PDA foram incubadas por 48 horas sob mesma temperatura. As cepas obtidas no processo de isolamento foram caracterizadas quanto à morfologia macro e microscópica. A Figura 7 esquematiza a metodologia seguida para etapa do isolamento dos microrganismos.

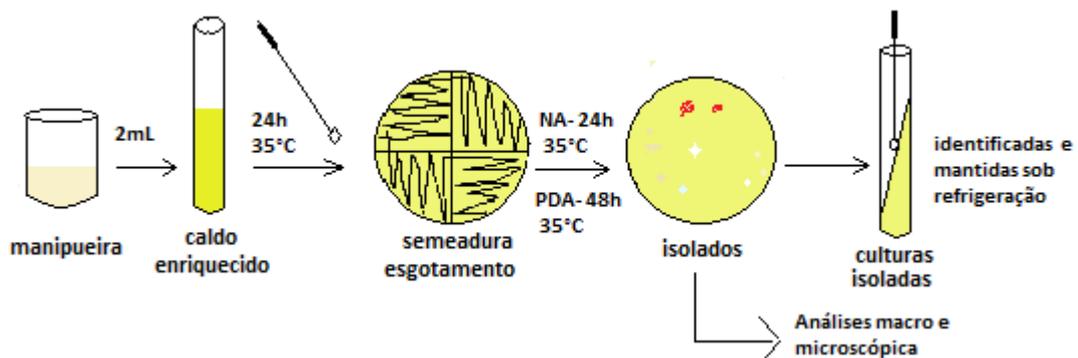


Figura 7 – Representação esquemática da etapa de isolamento das linhagens promissoras.

4.3. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

Foi realizada uma análise macroscópica (cor, forma, elevação, brilho, bordas das colônias) das cepas obtidas no isolamento e todas as colônias morfologicamente diferentes foram purificadas por estriamento em placas de Petri contendo o meio NA para bactérias e PDA para fungos. Após a purificação, os isolados foram analisados por microscopia óptica através da técnica de coloração simples para a identificação das formas e arranjos das células microbianas e confirmação da pureza das culturas. Cada cultura recebeu uma identificação e foi estocada sob refrigeração em tubo inclinado contendo o mesmo meio de cultura de isolamento.

4.4. SELEÇÃO DE CEPAS COM POTENCIAL AMILOLÍTICO

Nesta etapa foram realizados ensaios qualitativos e quantitativos para seleção de microrganismos com potencial amilolítico.

4.4.1. Ensaio qualitativo de atividade enzimática

O teste foi baseado na metodologia descrita por Stamford (1998), onde a capacidade de degradar o amido foi utilizada como critério de determinação da atividade amilolítica. Cada microrganismo isolado foi inoculado no centro de uma placa petri por 96 horas a 28°C contendo um meio composto por ágar nutriente com 0,2 % (m/v) de amido solúvel e ajustado em pH 6,5. Após o período de incubação, as placas foram reveladas com 3 mL de Lugol (2,0%) para evidenciação dos halos de hidrólise, representados pela zona clara em torno da colônia, como esquematizado na Figura 8.

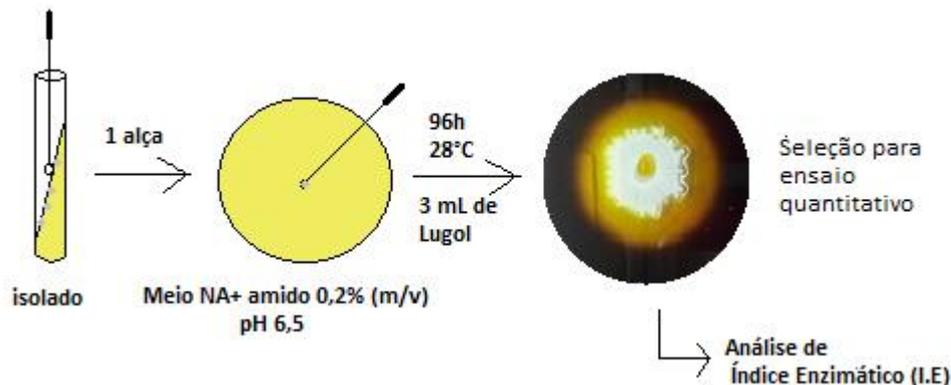


Figura 8 – Ilustração esquemática do ensaio qualitativo de atividade enzimática.

O experimento foi feito em triplicata, e os diâmetros médios das colônias e dos halos de hidrólise foram medidos com um paquímetro. A atividade enzimática foi expressa como índice enzimático (IE), que de acordo com Hankin e Anagnostakis (1975), é determinado através da relação entre o diâmetro médio dos halos de hidrólise e o diâmetro médio das colônias. Os microrganismos produtores de amilase com valores máximos de I.E. foram investigados quanto à produção em meio líquido para quantificação da atividade.

4.4.2. Ensaio quantitativo de atividade enzimática

As cepas selecionadas no ensaio qualitativo foram testadas quanto à produção da enzima sob fermentação submersa utilizando amido solúvel como fonte de carbono. Os experimentos foram baseados na metodologia de Rabalho (2002) com algumas modificações.

Inicialmente, foram preparados pré-inóculos visando à ativação e renovação das células. Uma alçada de cada linhagem foi cultivada em erlenmeyers contendo 50 mL de caldo de enriquecimento (mesma composição do item 4.2.), o quais foram incubados em shaker da marca Certomart® BS-1 com agitação de 150 rpm a 30°C durante 24 horas.

Logo após, visando uma melhor ambientação dos microrganismos ao meio de produção com amido como fonte de carbono, foram realizados inóculos contendo 10% (v/v) do pré-inóculo e 30 mL de meio sintético, composto por (m/v): 0,1% KH_2PO_4 ; 0,5% K_2HPO_4 ; 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 % de extrato de carne; 0,5% de extrato de levedura; 0,5% de peptona bacteriológica e 0,05% de solução de micronutrientes (5 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,6 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,4 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), adicionado de 1% amido solú

vel como indutor para produção de amilase. O pH do meio de produção foi ajustado em 6,5. Foram utilizadas as mesmas condições do pré-inóculo.

As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de meio sintético, inoculados com 10% (v/v) dos seus respectivos inóculos e incubados por 48 horas com agitação de 200 rpm a 30°C. Foi retirado um erlenmeyer de cada meio fermentado nos intervalos de tempo 24 e 48 horas e estes foram centrifugados a 3400 rpm por 30 minutos para obtenção do extrato enzimático bruto, o sobrenadante, que posteriormente foi analisado para quantificação da atividade enzimática através das metodologias de atividade sacarificante (MILLER, 1959) e dextrinizante (FUWA, 1954). A Figura 9 esquematiza o procedimento descrito para realização do ensaio quantitativo.

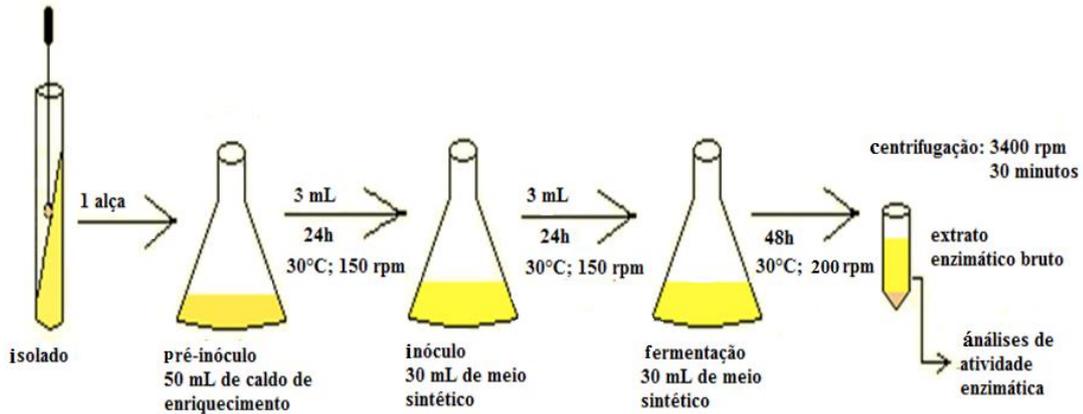


Figura 9 - Ilustração esquemática do ensaio quantitativo de atividade enzimática.

4.5. PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS UTILIZANDO MANIPUEIRA

A linhagem que apresentou maior valor de atividade enzimática no ensaio quantitativo (item 4.4.2) foi testada quanto à produção de enzimas amilolíticas utilizando como substrato a manipueira, um resíduo agroindustrial usado como forma de minimizar os custos do processo de produção e agregar valor econômico ao produto.

4.5.1. Substrato

A manipueira foi selecionada como substrato visando à indução da produção de enzimas amilolíticas por ser um resíduo agroindustrial com elevado teor de amido e nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo. Além disso, a manipueira é altamente produzida e descartada pelos produtores de farinha do estado.

A manipueira utilizada neste estudo foi caracterizada para quantificação dos teores de macro e micronutrientes, de amido e de cianeto. As análises foram realizadas no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP/Unit), através da metodologia padrão para o exame de água e águas residuais, dos Adolfo Lutz e de Lane-Eynon.

Para preparo do substrato, a manipueira foi diluída na proporção 1:1 com o objetivo de diminuir as concentrações de cianeto que podem prejudicar o crescimento do microrganismo e submetida a um tratamento (aquecimento, arrefecimento, centrifugação) – sugerido por Barros *et al.* (2013), visando melhor solubilização do amido, remoção de sólidos suspenso e eliminação do cianeto.

A fim de investigar a influência deste tratamento na produção da enzima foram realizadas fermentações utilizando a manipueira apenas diluída 1:1 (denominada bruta) e a manipueira após tratamento (denominada tratada) como meios de produção. Os meios foram autoclavados a temperatura de 121 °C por 20 minutos. A Figura 10 (a) e (b) apresenta a manipueira na sua forma bruta e tratada, respectivamente.

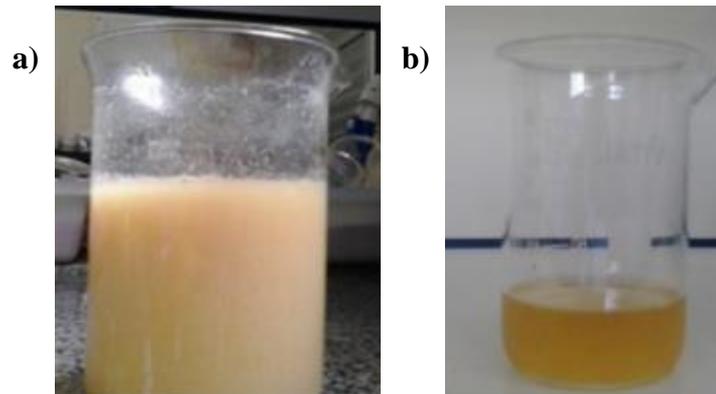


Figura 10 – Manipueira (a) bruta e (b) tratada.

4.5.2. Fermentação submersa

Foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 4.4.2 para reativação das células, e para o inóculo foi feita substituição do meio sintético por manipueira bruta (substrato 1) e tratada (substrato 2), mantendo-se as mesmas condições de operação.

Para início da fermentação, 3 mL de cada inóculo foram transferidos para erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de cada meio, com pH ajustado para 6,5 e incubados em shaker da marca Certomart ® BS-1 com agitação de 200 rpm durante 120 horas. Para cada ensaio, foi retirado um erlenmeyer nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, e o meio fermentado foi centrifugado a 3400 rpm durante 30 minutos para obtenção do extrato enzimático bruto, utilizado nos ensaios de determinação da atividade enzimática. A Figura 11 esquematiza o procedimento descrito acima.

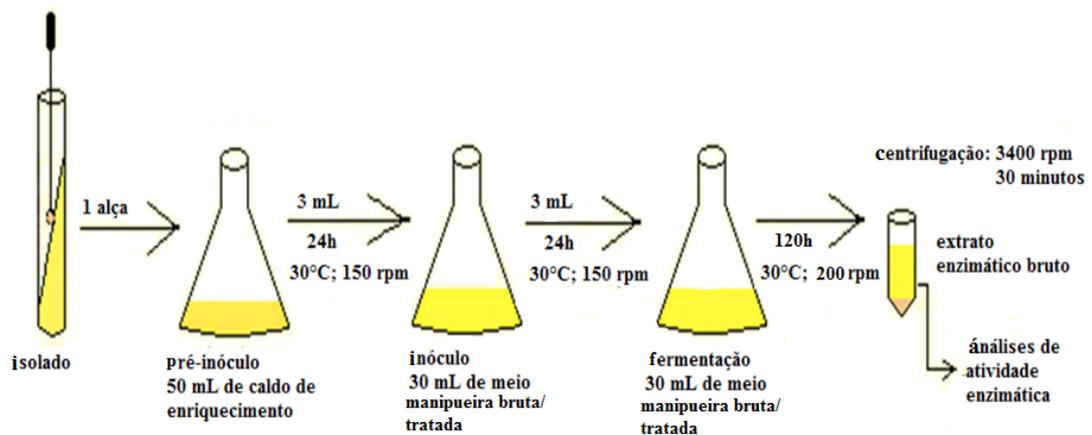


Figura 11 - Ilustração esquemática da produção de amilase utilizando a manipueira.

4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os extratos enzimáticos bruto foram analisados quanto à atividade da amilase sacarificante através do método do DNS (MILLER, 1959) e da atividade dextrinizante (FUWA, 1954).

4.6.1. Atividade de amilase sacarificante pelo método do DNS

A atividade da amilase foi determinada através da quantificação do açúcar redutor liberado pela hidrólise enzimática do amido e dosado pelo método do DNS, descrito por Miller (1959), com modificações.

A mistura de reação foi constituída de 0,5 mL do extrato enzimático bruto com 0,5 mL de solução de amido solúvel 0,5% (m/v) gelatinizado em tampão acetato de sódio 0,25 M e pH 5,0, e incubadas a 50°C durante 10 minutos. Após incubação, foi adicionado 1 mL do reagente DNS, composto por (g/L): 192 de tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); 10 de NaOH; 10 de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

A mistura foi aquecida em banho de ebulição durante 5 minutos, sendo, em seguida, resfriada em banho de gelo e diluída em 10 mL de água destilada. Depois da homogeneização, foi realizada leitura em espectrofotômetro da marca BELL Photonics 20000 UV a 540nm contra um branco preparado como descrito acima, substituindo-se o volume da mistura de reação por água destilada. O procedimento adotado está esquematizado na Figura 12.

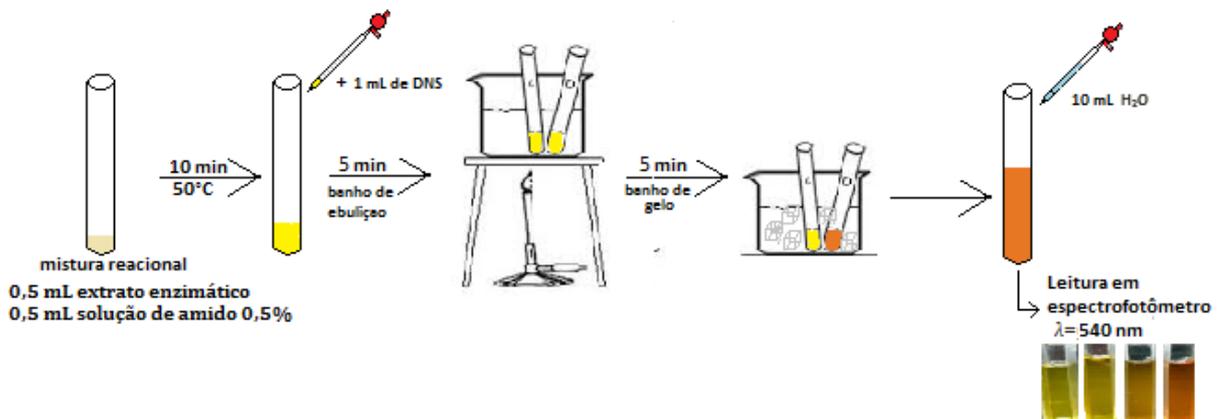


Figura 12 – Ilustração esquemática da análise de atividade de amilase sacarificante através do método de DNS.

Foram realizados controles, conforme o processo descrito acima, fazendo substituição do volume de enzima pelo volume equivalente em água destilada e substituição do volume de solução de amido pelo volume equivalente em tampão para os respectivos, controle de substrato e controle de enzima.

Uma unidade de atividade sacarificante por mL de enzima (U/mL) foi definido como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose, por minuto, nas condições de ensaio.

Esse método quantifica atividade sacarificante das amilases, tendo como açúcar redutor padrão a glicose. A conversão dos valores de absorbância foi feita através da equação de regressão linear obtida pela curva padrão de glicose com concentrações de 0 a 1g/L. Quando necessário, foram realizadas diluições do extrato enzimático para obtenção de concentração de glicose dentro da faixa da curva padrão.

4.6.2. Atividade de amilase dextrinizante

A atividade dextrinizante foi determinada medindo-se a diminuição da capacidade de complexação amido-iodo, segundo Fuwa (1954) com modificações. Neste ensaio, esquematizado na Figura 13, a mistura de reação foi constituída por 0,7 mL de solução de amido 0,3% (m/v) gelatinizado em tampão acetato de sódio 0,25 M, pH 5,0 e 0,3 mL de solução enzimática bruta. As amostras foram incubadas em banho maria a 50°C por 10 minutos.

A reação foi paralisada com adição de 4,0 mL de HCl 0,2 M e, em seguida, adicionou-se 0,5 mL de reativo iodo-iodeto composto por: 0,30% KI; 0,03% I₂ e água destilada na proporção de 1:1:3, respectivamente. Após homogeneização, a mistura de reação foi diluída com 10 mL de água destilada e novamente homogeneizada. As amostras foram lidas em espectrofotômetro da marca BELL Photonics 20000 UV, a um comprimento de onda de 600 nm, contra um branco constituído de água destilada. A Figura 13 esquematiza o procedimento adotado para análise da atividade dextrinizante.

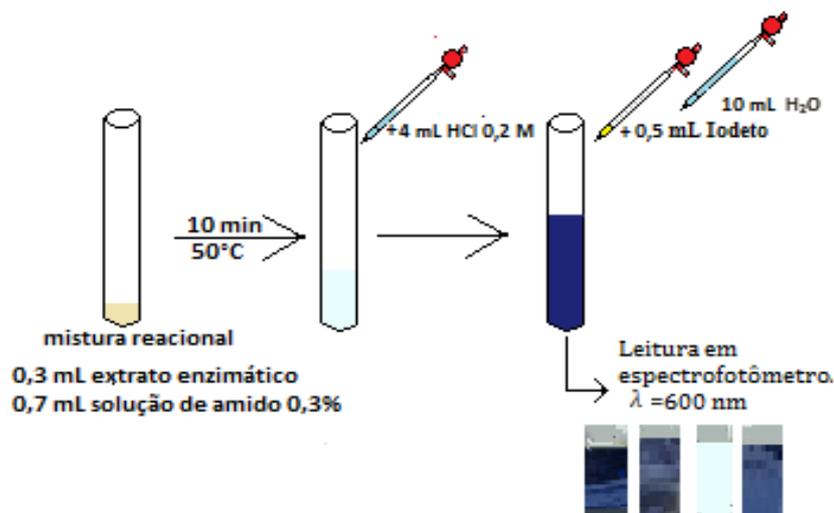


Figura 13 – Ilustração esquemática da análise de atividade de amilase dextrinizante.

Foram preparados dois controles conforme o processo descrito acima, substituindo a enzima por volume equivalente de água destilada (controle de substrato) e, outro substituindo o volume da solução de amido pelo volume equivalente em tampão acetato de sódio 0,25 M a pH 5,0 (controle de enzima), considerando a possibilidade da existência de resíduos de amido nos mesmos.

Uma unidade de atividade dextrinizante por mL de amilase (U/mL) foi definido como 1 mg de amido degradado por mL de enzima por minuto de reação, detectado através da diminuição da cor azul formada pelo complexo de ligação amido-iodo. A conversão dos valores de absorbância foi feita através da equação de regressão linear obtida pela curva padrão de amido. Quando necessário o extrato enzimático foi diluído para detecção de resquícios de cor, oriundo do amido remanescente, dentro da faixa da curva padrão.

4.7. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um estudo para identificar a região de pontos ótimos das condições do processo na produção da amilase através da linhagem isolada e nomeada como TP02, utilizando como substrato a manipueira na sua forma bruta.

4.7.1. Planejamentos fatoriais

Segundo Schwaab e Pinto (2011) uma das hipóteses de se utilizar o planejamento fatorial é quando o objetivo do estudo é avaliar se, e como as variáveis independentes possuem vínculos com as dependentes. Ainda segundo os autores, tendo identificado a influência de cada variável sobre o processo, é comum buscar um ponto de ótimo, ou seja, uma condição que maximize ou minimize uma dada resposta.

Diante disto, uma estratégia sequencial de planejamentos foi adotada para estudar a produção de enzimas amilolíticas. Primeiramente, um delineamento fatorial fracionário $2^{(4-1)}$ acrescido de 1 ponto central executado em triplicata foi realizado para analisar o efeito das quatro variáveis independentes: agitação, temperatura, concentração da manipueira e pH inicial, tendo como variável resposta a atividade enzimática (U/mL), usando os níveis mostrados na Tabela 5. Após a análise dos resultados desse primeiro delineamento, foi escolhido um delineamento subsequente, o qual compreendeu um fatorial completo 3^2 com duplicata no ponto central, usando apenas as variáveis independentes com maior efeito (pH e concentração). Os níveis estudados para esse delineamento são apresentados na Tabela 6. O planejamento e as análises dos resultados foram realizados com o software Statistica® 12.0.

Tabela 5 – Valores reais das variáveis utilizadas no delineamento fatorial fracionário $2^{(4-1)}$ com 3 pontos centrais.

Variáveis	Níveis		
	-1	PC*	+1
Agitação	100	150	200
Temperatura	30	37,5	45
Concentração (% de manipueira em H ₂ O)	50	70	90
pH inicial	5,0	7,0	9,0

* Ponto central

Tabela 6 – Valores reais das variáveis utilizadas no delineamento fatorial completo 3^2 com duplicata no ponto central.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
pH inicial	8	10	12
Concentração (% de manipueira em H ₂ O)	50	75	100

4.7.2. Condições de fermentação

Na etapa do planejamento, foi realizado um acompanhamento da concentração de células do inóculo, visando à redução do tempo de fermentação e também a padronização da quantidade de inóculo, com maior número de células.

O inóculo foi preparado com 50 mL de caldo enriquecido (item 4.1.) acrescido de 0,3% de amido solúvel e 10% (v/v) de pré inóculo (item 4.3.2.). O crescimento de células foi monitorado através da análise da densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro da marca Bell no comprimento de onda de 600 nm, durante 24 horas.

O tempo de incubação do inóculo foi padronizado em 12 horas, correspondendo à concentração de 0,5 a 0,7 de absorbância. As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de manipueira com 10% (v/v) de inóculo sob as condições delineadas no planejamento (Tabela 5 e 6). Os ensaios foram centrifugados nos tempos de 72, 96 e 144 horas para o primeiro planejamento, e 96, 120 e 144 horas para o segundo. O sobrenadante foi submetido às análises de atividade enzimática dextrinizante e sacarificante (item 4.6.).

4.8. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO

O extrato bruto enzimático obtido através do ensaio nas condições ótimas definidas foi caracterizado quanto à influência do pH e temperatura para determinação das condições ótimas de hidrólise.

4.8.1. Determinação do pH e temperatura ótimos

Foi avaliado o efeito do pH sobre a atividade enzimática para determinação do pH ótimo de atuação da enzima. Para tal, foram preparadas soluções de amido em diferentes tampões com faixa de pH entre 4 e 10. Foram utilizadas as seguintes soluções tamponantes na concentração de 0,25 M: tampão acetato de sódio (pH 4 e 5), tampão fosfato de sódio (pH 6,7

e 8) e tampão glicina-NaOH (pH 9 e 10). O extrato enzimático bruto foi incubado nas diferentes soluções de amido, conforme metodologias descritas no item 4.6 para dosagem das atividades dextrinizantes e sacarificantes.

Para determinação da temperatura ótima de hidrólise, o extrato enzimático foi incubado com a solução de amido no pH definido como ótimo, em faixa de temperatura de 30°C a 80°C (com variação de 10°C), seguindo as metodologias descritas no item 4.6. para determinação das atividades.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Para o isolamento dos microrganismos presentes na manipueira foi utilizada a técnica de semeadura por esgotamento, através da qual foram obtidos 08 isolados, sendo 05 em meio NA (identificados como TN) e 03 em meio PDA (identificados como TP). Os isolados foram analisados e caracterizados morfológicamente, conforme apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Caracterização das cepas isoladas.

Isolados	Análise macroscópica	Análise microscópica
TN01	Transparente, regular, ondulada	Bactéria – Cocos
TN02	Vermelha, rizóide, bordos filamentosos	Bactéria – Cocos
TN03	Branca, cremosa, bordos lobados	Bactéria – Bacilos
TN04	Bege, puntiforme, bordos lisos	Bactéria – Diplococos Achatados
TN05	Branca, cremosa, bordos regulares	Bactéria – Micrococos
TP01	Branca, aveludada, circular	Fungos – filamentosos
TP02	Branca, irregular, bordos ondulados	Bactéria – Bacilos
TP03	Branca, aveludada, irregular	Fungos- Levedura ovóides

5.2. ENSAIO QUALITATIVO

As cepas isoladas foram submetidas a um ensaio qualitativo que avalia a hidrólise do amido em meio sólido. Neste ensaio, a atividade enzimática foi determinada através da medida dos halos apresentados na Figura 14.

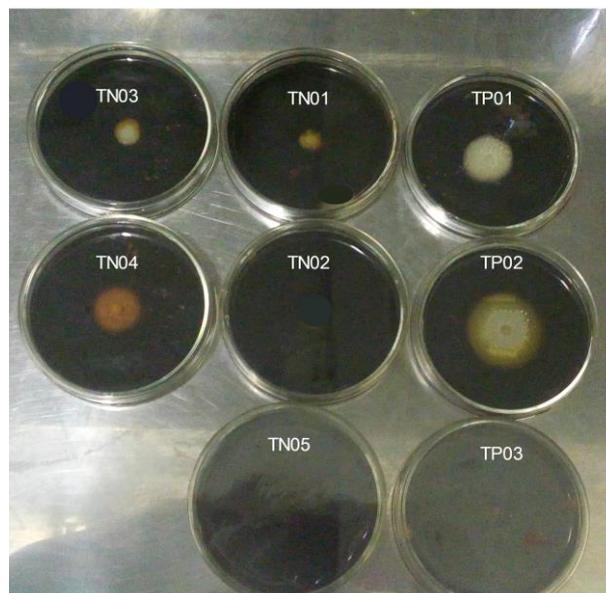


Figura 14 – Determinação do índice enzimático através da medida dos halos.

De acordo com Lealem e Gashe (1994), os microrganismos que apresentarem índices enzimáticos (I.E.) superiores ou igual a 2,0 são considerados como grandes promissores na produção de enzimas extracelulares. Assim, dos oitos isolados, quatro apresentaram halo de hidrólise indicando alguma atividade enzimática, como mostrado na Figura 15.

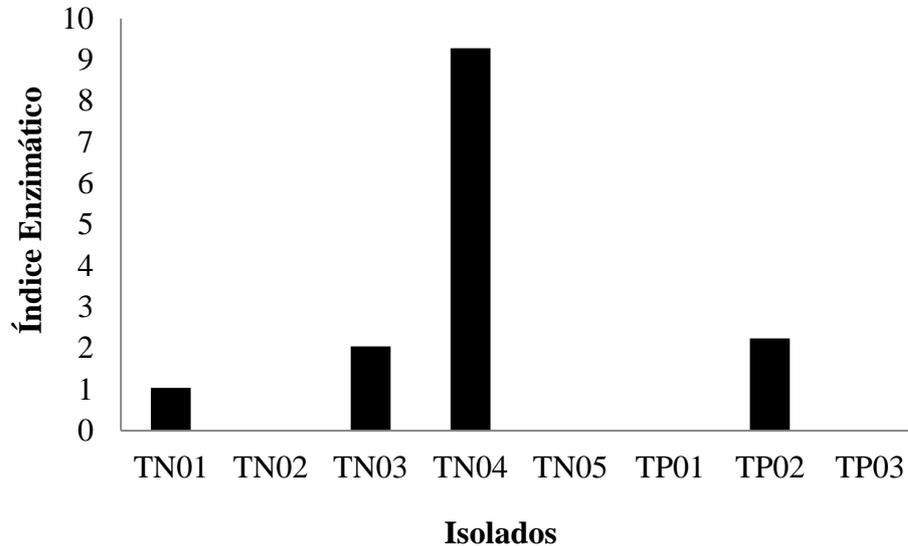


Figura 15 – Índice enzimático dos microrganismos isolados.

Analisando os índices da Figura 15, é possível observar que os isolados TN03, TN04 e TP02 apresentaram índices enzimáticos superiores a 2,0, legitimando os potenciais desses isolados na produção da enzima, assim como a adequação da fonte manipueira como precursor para o isolamento de microrganismos.

O isolado TP01 se desenvolveu no meio contendo amido como fonte de carbono, porém não apresentou nenhum indício de degradação do amido, sendo descartado para o teste. No entanto, o crescimento do microrganismo em um meio contendo amido como fonte de carbono sugere alguma produção da enzima, mesmo que, adsorvidas na parede celular do microrganismo, uma vez que o amido possui alto peso molecular e não pode ser absorvido pelas células do microrganismo. Os isolados TN02, TN05 e TP03 não se desenvolveram, sendo considerados negativos para o teste qualitativo.

A cepa TN04 apresentou um valor de 9,28, considerado destacável quando comparado com os resultados encontrados por Celestino *et al.* (2014), que isolaram fungos da manipueira e não obtiveram nenhum isolado com I.E. maior que 2. Rehman e Saeed (2015) rastreamos bactérias isoladas do solo e encontraram como valor máximo de I.E. 2,11. Rabalho (2002) também isolou microrganismo de água de amido produzida nas casas de farinha para triagem quanto à produção de amilase, porém, eles não degradaram o amido presente no meio, sendo descartados para produção de enzimas amilolíticas. Vaseekaran *et al.* (2010)

relataram que os mais altos índices de degradação dos seus isolados de fontes ricas em amido (solo, grãos de arroz, chá) variaram de 3,4 a 4.

5.3. ENSAIO QUANTITATIVO

As linhagens bacterianas que apresentaram maiores índices no teste anterior, TN04 e TP02, foram então estudadas quanto à produção amilolítica em meio líquido. Os resultados quanto à atividade dextrinizante e sacarificante para os isolados TP02 e TN04, podem ser observados na Figura 16 e Figura 17, respectivamente. As análises foram realizadas em triplicata, sendo os pontos representados pelas médias com suas respectivas incertezas. Por apresentar erros mínimos, as barras de erros ficaram sobrepostas aos pontos. Foi possível confirmar que os isolados selecionados foram capazes de produzir atividade amilolítica em meio líquido sintético com amido solúvel como indutor, detectada pelos dois métodos propostos.

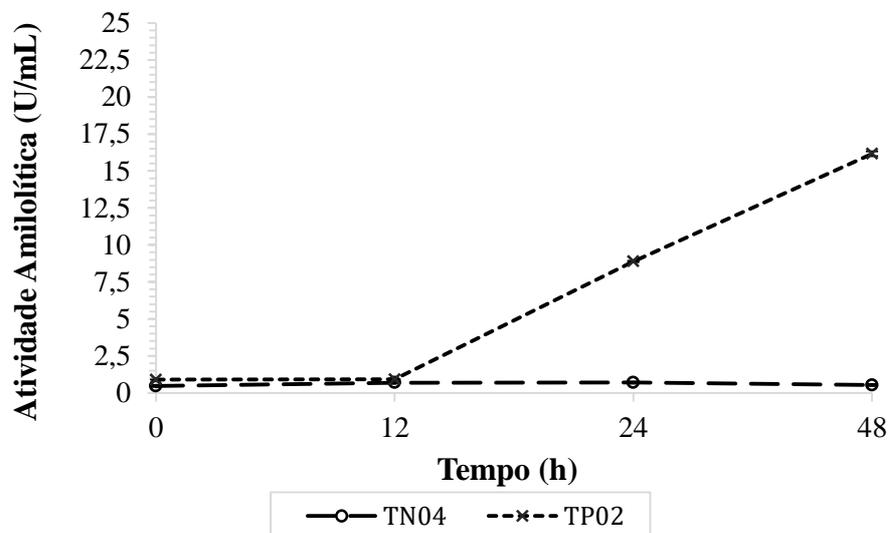


Figura 16 – Cinética da atividade dextrinizante dos isolados TP02 e TN04 através de fermentação submersa utilizando como substrato meio sintético.

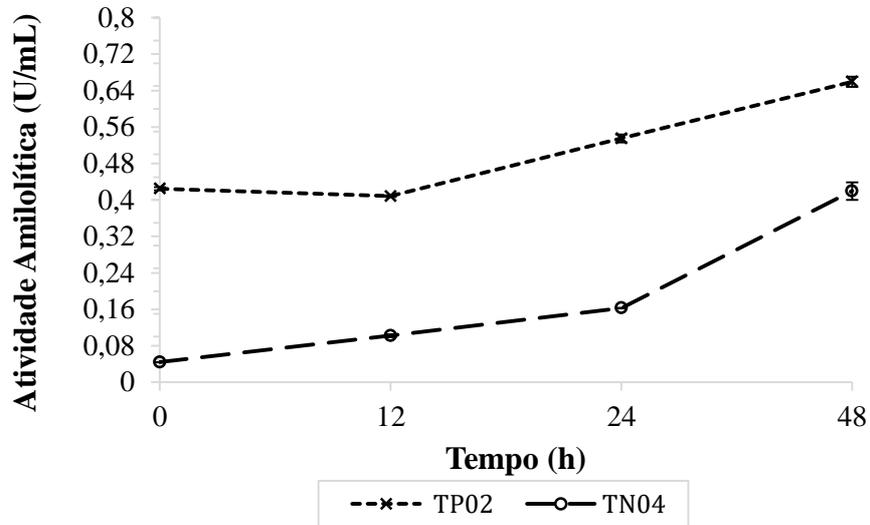


Figura 17 – Cinética da atividade sacarificante dos isolados TP02 e TN04 através de fermentação submersa utilizando como substrato meio sintético.

A Figura 16 e Figura 17 mostram que o isolado TP02 foi mais hábil na produção de amilase tanto com atividade dextrinizante quanto com atividade sacarificante. A atividade dextrinizante foi considerada destacável frente à sacarificante, exibindo um pico no tempo de 48 horas com valor de $16,15 \pm 0,16$ U/mL. Em relação à atividade sacarificante, foi observado valores de atividade não muito elevados, mesmo no ponto máximo, sendo que a maior atividade foi obtida também no ponto de 48 horas com valor de $0,66 \pm 0,011$ U/mL.

A cepa TN04 apresentou baixos valores de atividade dextrinizante e sacarificante em meio líquido. Sendo que, a atividade dextrinizante permaneceu aproximadamente constante em todo o período, com valor máximo de $0,70 \pm 0,017$ U/mL em 24 horas, e a atividade sacarificante máxima foi de $0,42 \pm 0,020$ U/mL em 48 horas. Este resultado não pôde ser correlacionado com a produção de amilase em meio sólido para essa estirpe, que apresentou valores altos de I.E. (Figura 15). Esta discrepância nos ensaios em placas e submersos também foi observada por Celestino *et al.* (2014), que justifica essa diferença devido as condições ambientais mais favoráveis apresentadas no estudo em placas frente a um bioprocessamento submerso.

Os baixos valores na produção enzimática em meio líquido pelo isolado TN04 também podem ser justificados por uma possível repressão catabólica sofrida pelo microrganismo devido ao aumento da concentração de glicose no meio de cultivo, proveniente da degradação do amido pela ação das enzimas amilolíticas excretadas pelo microrganismo (FERNANDES *et al.*, 2007).

Considerando o mesmo substrato e método de quantificação, as linhagens isoladas por Rabalho (2002) exibiram atividade dextrinizante entre 1,5 e 2,52 U/mL e valores de atividade sacarificante entre 2,28 e 4,01 U/mL. A Figura 16 mostra que o TP02 apresentou uma atividade dextrinizante destacável quando comparada com os valores apresentados no trabalho de Rabalho (2002), evidenciando o potencial deste isolado para produção de amilase.

Os valores de atividade sacarificantes, observados na Figura 17, foram condizentes com os apresentados por Baratto *et al.* (2012). Eles obtiveram picos de atividade sacarificante em 48 horas com valores máximos de 0,68 U/mL e 0,60 U/mL, através de microrganismos isolados do solo e do milho e utilizando meio sintético com amido como indutor.

Os experimentos para detecção de atividade enzimática em meio líquido sintético (Figura 16 e Figura 17) ratificaram os dados encontrados na triagem em meio sólido, destacando o potencial da linhagem TP02 como produtor de amilase em fermentação submersa, bem como o uso do resíduo agroindustrial manipueira como fonte de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas.

Através dos resultados obtidos dentro do intervalo de tempo proposto para este experimento não foi possível observar o declínio da curva cinética de produção, podendo, então, serem encontrados valores superiores de atividade dextrinizante e sacarificante para as duas linhagens em intervalos de tempo maiores. Porém, como o objetivo do ensaio foi apenas confirmar o comportamento das linhagens isoladas quanto à produção de enzimas amilolíticas em meio líquido, e selecionar aquela que apresentasse maior atividade para posterior estudo da produção de amilase utilizando resíduo agroindustrial, o isolado TP02 foi selecionado para etapa subsequente por apresentar melhor resposta dentro do tempo estabelecido.

5.4. PRODUÇÃO DE AMILASES UTILIZANDO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL COMO SUBSTRATO

5.4.1. Perfil da produção de enzimas amilolíticas utilizando manipueira como substrato ao longo do tempo

A Tabela 8 apresenta a composição do resíduo manipueira utilizado como substrato para produção de enzimas amilolíticas. A presença de altos níveis de vários micronutrientes importantes para o desenvolvimento microbiano torna a manipueira um substrato importante e promissor.

Tabela 8 - Composição da manipueira utilizada neste trabalho.

Componentes	Concentração	Método
Amido (%)	6,1	Adolfo Lutz
Carboidratos (%)	3,64	ME-LPA 13
Açúcares redutores (g/100mL)	2,04	1EEYNON-LANE
Açúcares não redutores (g/100mL)	1,53	1EEYNON-LANE
Açúcar invertido (g/100L)	2,04	1EEYNON-LANE
Nitrogênio total (mg/L)	2240	SM 4500 N
Fósforo total (mg/L)	461	SM 4500 P-E
Enxofre total (mg/L)	0,010	EPA 6010 B
Zinco total (mg/L)	0,081	SM 3120 B
Manganês total (mg/L)	0,500	SM 3120 B
Ferro total (mg/L)	0,701	SM 3120 B
Cobre total (mg/L)	0,021	SM 3120 B
Cálcio total (mg/L)	25,63	SM 3120 B
Magnésio (mg/L)	33,20	SM 3120 B
Potássio (mg/L)	11,02	SM 3120 B
Cianeto total (mg/L)	48,6	SM 4500 CN E
pH	6,4	

Uma das etapas mais caras no processo de fermentação é a seleção do substrato. O uso de resíduo agroindustrial como substrato torna este processo mais econômico e atraente. Barros *et al.*, 2013 utilizou a manipueira como substrato para estudo da produção de enzimas amilolíticas pelas linhagens LB5a e LB1, porém, o autor realizou um tratamento que consiste em submeter o resíduo a um aquecimento, arrefecimento e centrifugação, antes de utilizá-lo como substrato.

Com o objetivo de estudar a produção de amilase pela linhagem TP02 utilizando a manipueira e métodos menos dispendiosos possíveis, optou-se por verificar a influência deste tratamento realizado por Barros *et al.*, (2013) na atividade amilolítica ao longo do tempo. A Figura 18 e Figura 19 ilustram, respectivamente, as produções amilolíticas dextrinizante e sacarificante, pela cepa TP02, utilizando o meio manipueira na sua forma bruta (apenas diluída) e tratada. As análises foram realizadas em triplicata e os pontos representam as médias com suas respectivas incertezas. As barras de erros nem sempre são visualizadas, ficando sobrepostas aos pontos, devido ao erro ser mínimo.

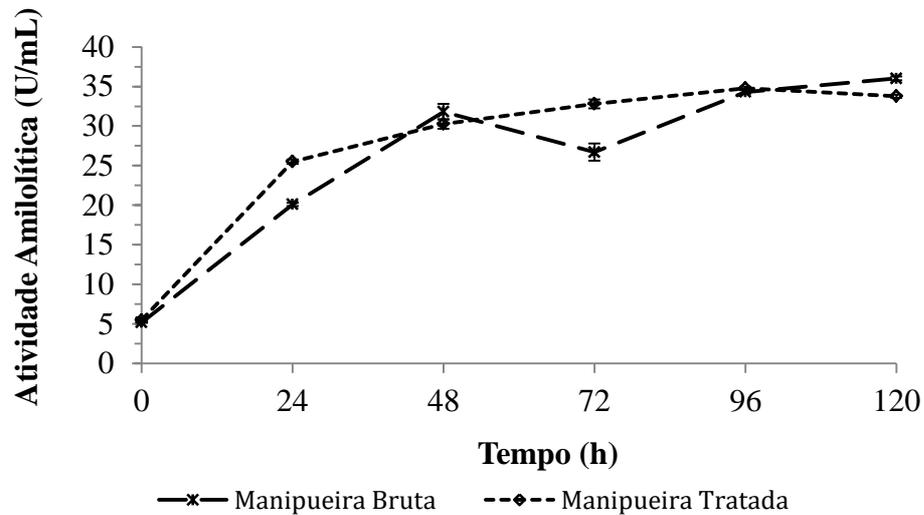


Figura 18 – Influência do tratamento da manipueira na atividade dextrinizante pela linhagem TP02.

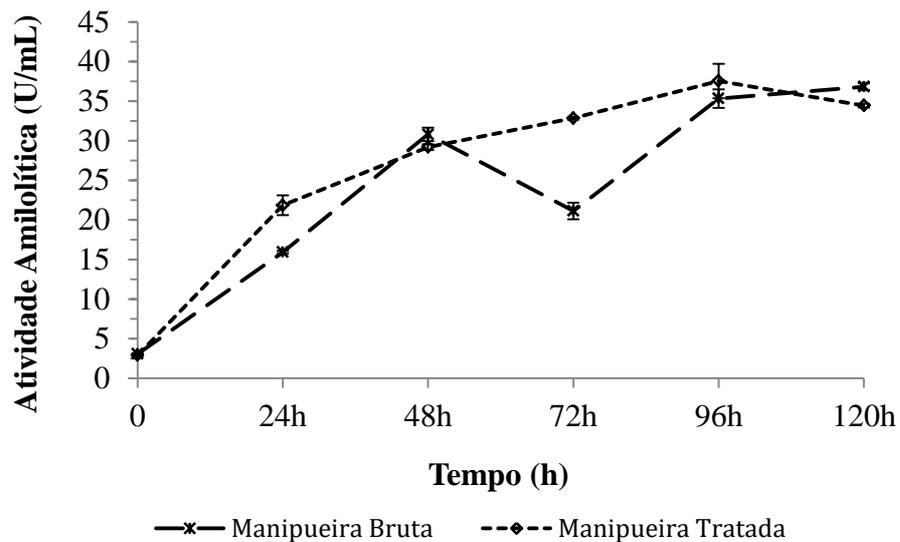


Figura 19 – Influência do tratamento da manipueira na atividade sacarificante pela linhagem TP02.

Inicialmente, é importante observar que a linhagem TP02 apresentou maior atividade quando utilizado o resíduo agroindustrial do que quando utilizado um meio sintético a base de amido solúvel (Figura 16 e Figura 17), o que nos leva a inferir que apesar de ambos meios serem ricos em amidos, os macro e micro nutrientes presentes na manipueira estimulam a produção ou aumentam a eficiência da enzima.

Esse comportamento foi condizente ao de algumas linhagens utilizadas por Barros *et al.* (2013) que apresentaram atividade amilolítica maior em manipueira do que em meio sintético com amido puro como indutor. Tais resultados ressaltam o potencial da manipueira

como substrato alternativo na produção de enzimas, viabilizando os custos operacionais da produção enzimática.

Os autores Abd-Elhalem *et al.* (2015) também obtiveram valores de atividade amilolítica maior quando utilizaram como substrato um resíduo agroindustrial rico em amido, em substituição ao amido solúvel, enfatizando a importância do uso de resíduos para tornar o processo de produção menos dispendioso.

Analisando a Figura 18, é possível verificar que, quando avaliada a atividade dextrinizante, o pico máximo é revelado no tempo de 96 horas para manipueira tratada e 120 horas para manipueira bruta, com valores de $34,78 \pm 0,19$ U/mL e $36,03 \pm 0,24$ U/mL, respectivamente. A análise da atividade amilolítica sacarificante, Figura 19, revela picos de produção no tempo de 96 horas e 120 horas, com valores de $37,52 \pm 2,18$ U/mL e $36,81 \pm 0,43$ U/mL, respectivamente, para os meios de manipueira tratada e bruta.

Avaliando o comportamento da produção de amilase dextrinizante no meio manipueira bruta, de modo geral, pode-se verificar uma produção crescente com o surgimento de um pico no tempo de 48 horas ($31,81 \pm 0,96$ U/mL), logo após, houve um declínio da atividade no tempo de 72 horas ($26,71 \pm 1,09$ U/mL), e em seguida a atividade voltou a aumentar chegando ao pico máximo observado no tempo de 120 horas ($36,03 \pm 0,24$ U/mL), porém, dando indícios de apresentar valores maiores caso se prolongasse o tempo de fermentação. A atividade dextrinizante, utilizando manipueira tratada, teve um crescimento considerável nas primeiras 24 horas ($25,51 \pm 0,29$ U/mL), seguido de um aumento gradativo até o pico máximo observado no tempo de 96 horas ($34,78 \pm 0,19$ U/mL) e um leve declínio no tempo de 120 horas ($33,77 \pm 0,19$ U/mL). O comportamento da atividade sacarificante, de um modo geral, foi similar a atividade dextrinizante.

Os dados indicaram que o comportamento da atividade quando utilizado manipueira bruta ou tratada foi semelhante, e apesar do valor máximo de atividade para o meio manipueira tratada ter sido obtido com 96 horas de cultivo e para bruta com 120 horas, observou-se que os valores para ambos os meios no tempo de 96 horas foram muito próximos. Sendo assim, o meio manipueira bruta foi considerado o melhor para ser utilizado na fermentação, por não utilizar de técnicas que exigem gastos energéticos e que tornam o processo mais dispendioso.

5.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

5.5.1. Planejamento fatorial fracionário

O planejamento fatorial fracionário foi realizado para avaliar o efeito das quatro variáveis de entrada temperatura, agitação, concentração de manipueira e pH na produção de amilases pela linhagem TP02, tendo como variáveis resposta as atividades dextrinizante e sacarificante.

A Tabela 9 exhibe o planejamento fatorial para produção da enzima amilolítica, com seus codificados para cada ensaio, assim como os valores das variáveis resposta atividade dextrinizante e sacarificante observadas nos tempos de 72, 96 e 144 horas. É possível observar que 91,66% dos ensaios exibiram atividade enzimática máxima em 144 horas de fermentação. Assim, o tempo de 144 horas foi escolhido para análise estatística.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 9, a linhagem TP02 apresentou maior atividade amilolítica nos ensaios 5 (100 rpm, 30°C, pH 9 e 90% de manipueira) e 8 (200 rpm, 45°C, pH 9 e 90% de manipueira) para dextrinizante e sacarificante, respectivamente. A variação dos fatores resultou em uma diferença na atividade dextrinizante de $35,098 \pm 0,006$ a $146,78 \pm 0,014$ U/mL, e uma diferença na atividade sacarificante de $21,123 \pm 0,008$ a $118,805 \pm 0,005$ U/mL.

Esses resultados podem supostamente indicar que o microrganismo TP02 possui caráter basófilo, pois os ensaios que resultaram nas maiores atividades foram aqueles com pH inicial 9. Também inferem supostamente na importância dos nutrientes e da quantidade de amido fornecidos pela manipueira que quando em maiores concentrações resultaram numa maior produção de enzima.

Tabela 9 – Delineamento fatorial fracionário 2^{4-1} para produção de amilases em manipueira após 72, 96 e 144 horas de fermentação.

Ensaio	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	pH inicial	Concentração Manipueira (%)	U/mL		U/mL		U/mL	
					72h		96h		144h	
					Dextrinizante	Sacarificante	Dextrinizante	Sacarificante	Dextrinizante	Sacarificante
1	-1	-1	-1	-1	16,126	25,262	35,003	47,860	92,298	83,375
2	-1	+1	+1	-1	33,106	26,587	42,117	30,974	37,153	28,077
3	+1	-1	+1	-1	29,659	20,019	49,201	28,629	58,338	40,659
4	+1	+1	-1	-1	13,723	26,587	68,014	58,043	77,026	65,494
5	-1	-1	+1	+1	47,999	65,991	79,46	97,365	146,78	105,616
6	-1	+1	-1	+1	20,015	12,183	29,881	19,550	35,098	21,123
7	+1	-1	-1	+1	29,975	22,227	54,133	29,291	65,927	51,145
8	+1	+1	+1	+1	47,920	65,991	56,916	73,690	91,824	118,805
9	0	0	0	0	_*	_*	77,975	48,883	105,233	62,293
10	0	0	0	0	_*	_*	79,682	59,065	104,820	61,741
11	0	0	0	0	_*	_*	77,406	55,947	100,296	64,282
12	0	0	0	0	_*	_*	87,793	65,936	106,053	68,253

*Não foi possível coletar dados nesse tempo

As análises dos efeitos das variáveis sobre a produção enzimática e dos coeficientes de regressão foram realizadas para os fatores principais e a interação entre dois fatores, com base na atividade enzimática sacarificante e dextrinizante, respectivamente, apresentadas na Tabela 10 e Tabela 11. Para decidir os efeitos foi empregado o teste t “Student” ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os valores de p são utilizados para checar a significância de cada coeficiente e também indicam a importância de cada variável ou interação entre variáveis na resposta do modelo. Quanto maior o valor de t e menor a magnitude de p, maior será a significância do coeficiente. Foi considerado estatisticamente significativo o efeito cujo valor absoluto excedeu o valor do t tabelado, $t(3); 0,95 = 3,182$.

Tabela 10 – Estimativa dos efeitos e o coeficiente do modelo de regressão para a produção de amilase, por atividade sacarificante, no delineamento fatorial fracionário 2^{4+1} com 144h de fermentação.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(3)	p-valor	Coefficiente de regressão
Média	<u>64,29*</u>	<u>1,0429</u>	<u>61,641</u>	<u>0,0000</u>	<u>64,287</u>
Temperatura (T)	<u>-11,82</u>	<u>2,0859</u>	<u>-5,669</u>	<u>0,0109</u>	<u>-5,912</u>
Agitação (A)	<u>9,48</u>	<u>2,0859</u>	<u>4,544</u>	<u>0,0200</u>	<u>4,739</u>
Concentração (C)	<u>19,77</u>	<u>2,0859</u>	<u>9,479</u>	<u>0,0025</u>	<u>9,886</u>
pH	<u>18,01</u>	<u>2,0859</u>	<u>8,632</u>	<u>0,0033</u>	<u>9,003</u>
T x A	<u>58,07</u>	<u>2,0859</u>	<u>27,841</u>	<u>0,0001</u>	<u>29,036</u>
T x C	3,41	2,0859	1,634	0,2008	1,704
T x pH	<u>12,13</u>	<u>2,0859</u>	<u>5,814</u>	<u>0,0101</u>	<u>6,064</u>

$t_{\text{tab}}(3, 0,95) = 3,182$; * considerados significativos estatisticamente

Com exceção da interação temperatura/concentração, os outros efeitos dos fatores principais e interações foram significativos ($p < 0,05$) para a atividade sacarificante. Já quando avaliados pela atividade dextrinizante, com exceção do fator agitação, todos os outros fatores e suas interações foram significantes estatisticamente. Diante desses resultados, foi realizada uma análise dos fatores que apresentaram maior efeito na variável resposta, objetivando selecionar apenas dois fatores para serem estudados através de um delineamento fatorial completo por questões de limitações do aparato laboratorial, todavia, mantendo-se os outros parâmetros fixos por serem considerados imprescindíveis para o processo.

Tabela 11 – Estimativa dos efeitos e o coeficiente do modelo de regressão para a produção de amilase, por atividade dextrinizante, no delineamento fatorial fracionário 2^{4-1} com 144h de fermentação.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(3)	p-valor	Coefficiente de regressão
Média	<u>75,54</u>	<u>0,9143</u>	<u>82,62</u>	<u>0,0000</u>	<u>75,55</u>
Temperatura (T)	<u>-30,54</u>	<u>1,829</u>	<u>-16,703</u>	<u>0,0005</u>	<u>-15,272</u>
Agitação (A)	-4,54	1,829	-2,481	0,0892	-2,268
Concentração (C)	<u>18,69</u>	<u>1,829</u>	<u>10,219</u>	<u>0,0019</u>	<u>9,343</u>
pH	<u>15,92</u>	<u>1,829</u>	<u>8,706</u>	<u>0,0032</u>	<u>7,960</u>
T x A	<u>52,83</u>	<u>1,829</u>	<u>28,893</u>	<u>0,0001</u>	<u>26,418</u>
T x C	<u>-12,31</u>	<u>1,829</u>	<u>-6,735</u>	<u>0,0067</u>	<u>-6,158</u>
T x pH	<u>-7,49</u>	<u>1,829</u>	<u>-4,098</u>	<u>0,0263</u>	<u>-3,747</u>

$t_{\text{tab}}(3, 0,95) = 3,182$; * considerados significativos estatisticamente

Os gráficos de Pareto para atividade sacarificante e dextrinizante, Figura 20 e Figura 21, respectivamente, apresentam os valores de t, em ordem decrescente, para cada um dos efeitos analisados, confirmando os resultados apresentados na Tabela 10 e Tabela 11, e facilitando a identificação dos fatores e interações de maior efeito.

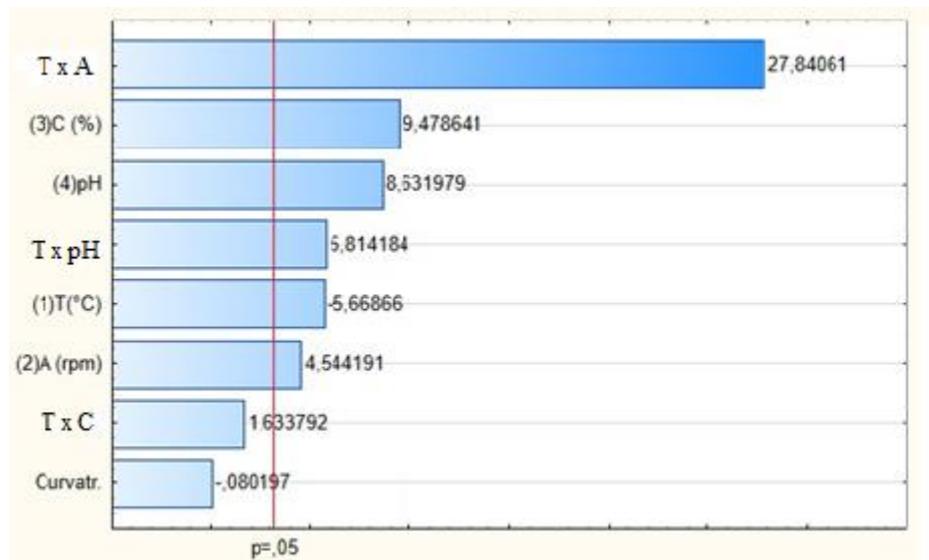


Figura 20 – Efeitos principais e de interações dos fatores estudados no planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ensaio de ponto central, baseado no teste t “student” $t(3; 0,95) = 3,182$, para atividade sacarificante.

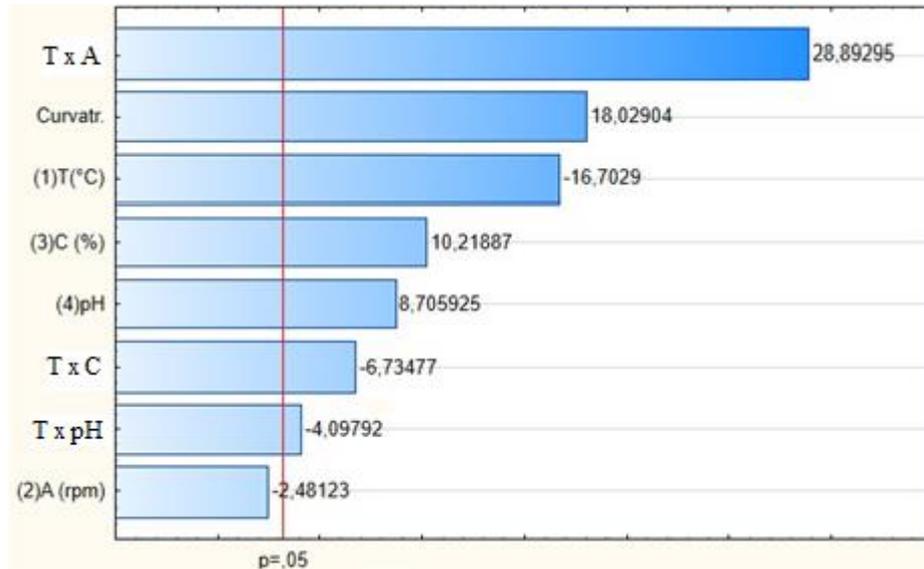


Figura 21 – Efeitos principais e de interações dos fatores estudados no planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ensaio de ponto central, baseado no teste t “student” $t(3; 0,95)= 3,182$, para atividade dextrinizante.

A variável agitação apresentou efeito positivo considerado significativo estatisticamente na faixa estudada para análise da atividade dextrinizante, porém exibiu menor efeito em comparação aos outros fatores principais quando analisados através da atividade sacarificante. No entanto, a sua interação com a temperatura exerceu o maior efeito sobre as duas variáveis resposta. A variável temperatura apresentou um efeito negativo para ambas as respostas, sendo que teve um maior efeito na atividade dextrinizante, o que significa que na maior parte dos ensaios um aumento na temperatura resultou em uma diminuição na atividade, induzindo a fixação dessa variável na temperatura de 30°C (nível -1). Contudo, por apresentar forte interação com agitação, foram plotados gráficos que mostram o comportamento das médias das variáveis atividades dextrinizante e sacarificante, Figura 22 e Figura 23, respectivamente, resultantes dessa interação. Através desses gráficos foi possível fazer uma análise e determinar o melhor nível a ser fixado para temperatura e agitação.

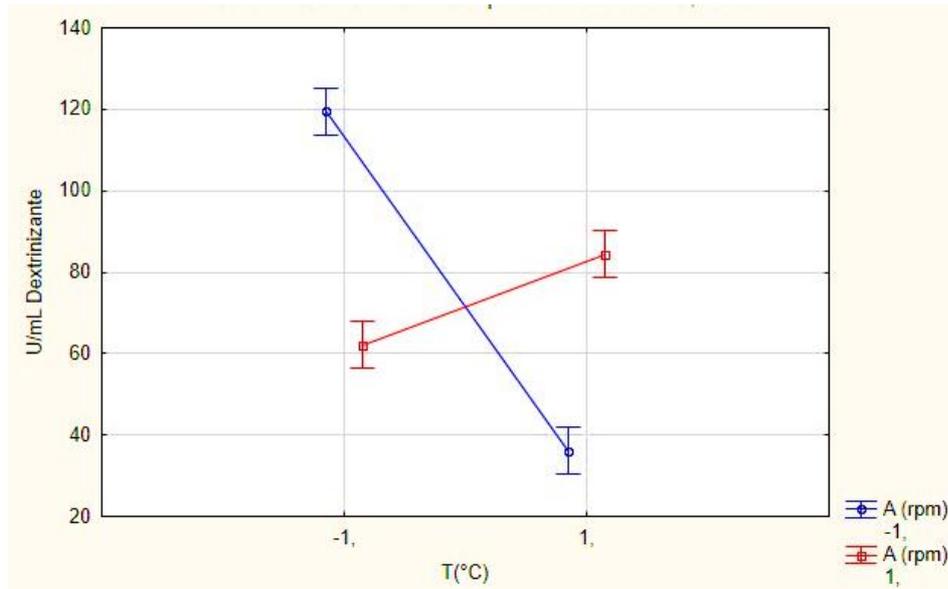


Figura 22 – Médias marginais da atividade dextrinizante sob a influência da interação entre Temperatura e Agitação.

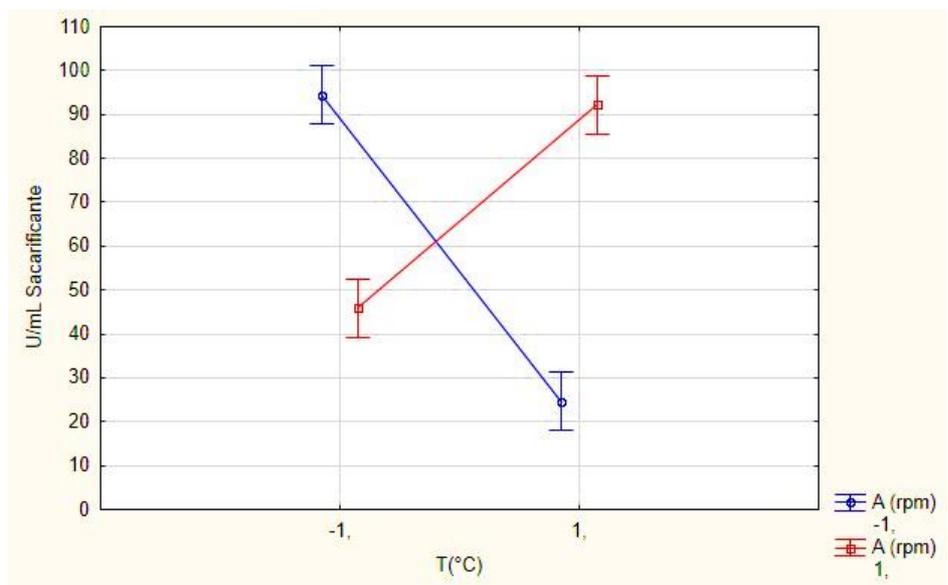


Figura 23 – Médias marginais para atividade sacarificante sob a influência da interação entre Temperatura e Agitação.

Avaliando a Figura 22 e Figura 23, observa-se que combinações entre temperatura de 30°C com agitação de 100 rpm, e, entre temperatura de 45°C com agitação de 200 rpm, resultam em médias maiores da variável resposta, e quando trocadas essas combinações ocorre uma diminuição. Baseado neste comportamento, foram fixados os valores das variáveis temperatura e agitação em 30°C e 100 rpm, respectivamente, tendo em vista serem condições que proporcionariam menores custos energéticos para o processo de produção.

A influência dos efeitos das outras interações de temperatura, consideradas significantes estatisticamente, também foi analisada para incluir uma noção dos valores

médios das atividades quando interagidos e, assim, uma maior confiança na escolha do valor do nível fixado. A Figura 24(a) e (b) apresentam, respectivamente, as médias marginais das variáveis resposta dextrinizante e sacarificante sob influência dos efeitos de interação entre a temperatura e o pH, e, a Figura 25(a) e (b) sob a influência dos efeitos de interação entre temperatura e concentração.

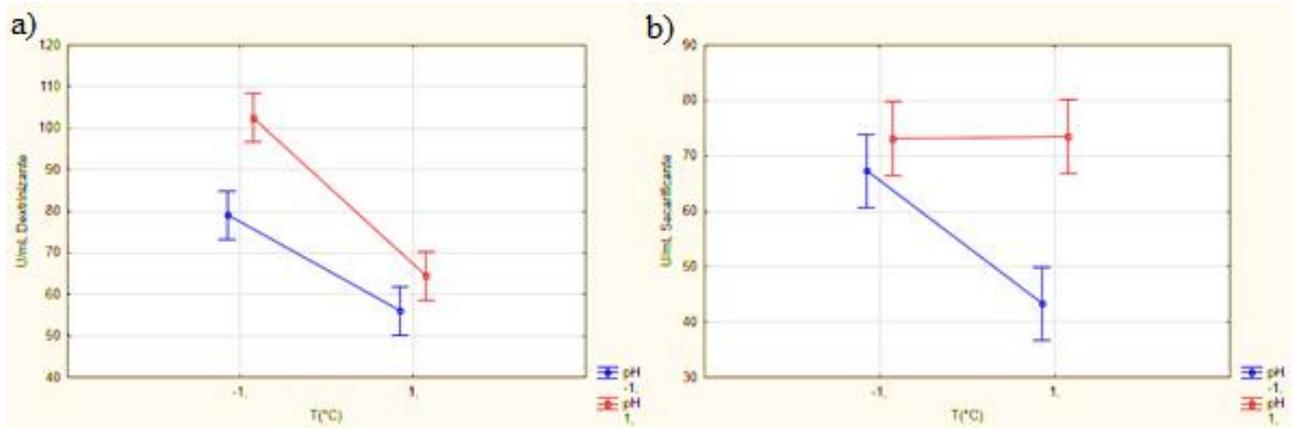


Figura 24 – Médias marginais das atividades (a) dextrinizante e (b) sacarificante, sob a influência da interação entre Temperatura e pH.

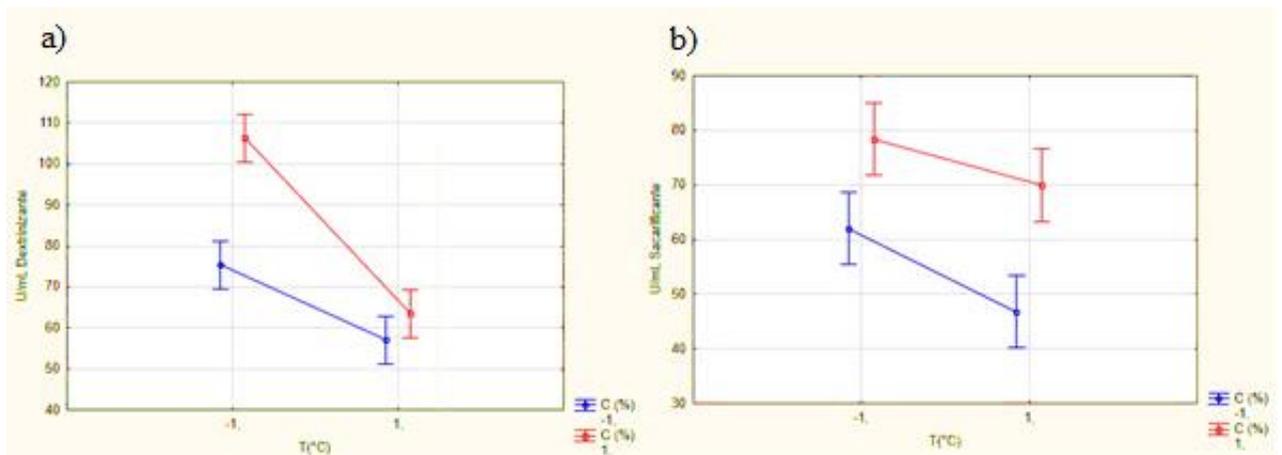


Figura 25 – Médias marginais das atividades (a) dextrinizante e (b) sacarificante, sob a influência da interação entre Temperatura e Concentração.

É possível verificar que o nível negativo estudado (-1) neste trabalho para temperatura (30°C), quando combinado com o pH (Figura 22) ou a concentração (Figura 25) em ambos os níveis, positivo e negativo, apresentaram valor maior ou equivalente para ambas atividades, confirmando, assim, a fixação do parâmetro temperatura em 30°C.

O pH e a concentração foram as variáveis de maior efeito positivo, depois da interação temperatura *versus* agitação, em ambas atividades, ou seja, à medida que houve um aumento nos valores dos níveis estudados, houve também uma elevação no valor das variáveis resposta. Esses dois fatores foram selecionados e estudados através de um

planejamento fatorial completo 3^2 para obtenção das condições ótimas de operação na produção da amilase.

5.5.2. Planejamento fatorial completo

Com base nos resultados do planejamento anterior, foi realizado um planejamento fatorial completo 3^2 , com 2 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. A Tabela 12 apresenta os valores codificados utilizados no planejamento e os resultados das variáveis resposta atividade dextrinizante e sacarificante.

Como foi observado no planejamento anterior que a maioria dos ensaios ainda estava apresentando um aumento da atividade, coletaram-se amostras no tempo de 168 horas para certificação do tempo máximo de atividade.

Analisando os dados da Tabela 12, observa-se que a maior parte dos ensaios apresentaram valores máximos de atividade no tempo de 144 horas, com valores bem próximos no tempo de 168 horas, indicando uma possível constância nos valores de atividade. Com isso, os resultados obtidos no tempo de 144 horas foram utilizados para o planejamento.

Tabela 12 – Delineamento fatorial completo 3² para produção de amilases em manipueira após 120, 144 e 168 horas de fermentação.

Ensaio	pH inicial	Concentração		U/mL		U/mL		U/mL	
		Manipueira (%)	120h		144h		168h		
			Dextrinizante	Sacarificante	Dextrinizante	Sacarificante	Dextrinizante	Sacarificante	
1	-1	-1	58,50	56,73	75,73	55,44	67,86	55,25	
2	-1	0	76,28	62,03	95,73	66,23	95,65	72,85	
3	-1	1	97,94	74,70	97,39	79,86	105,48	72,68	
4	0	-1	88,22	59,05	58,34	45,03	61,47	41,82	
5	0	0	43,00	23,48	70,12	44,48	57,17	38,29	
6	0	1	94,15	59,22	90,60	58,36	90,59	63,51	
7	1	-1	41,74	10,24	37,31	21,10	42,31	26,88	
8	1	0	53,88	43,13	59,13	48,26	55,81	17,52	
9	1	1	64,82	34,66	73,52	44,37	94,07	75,25	
10	0	0	56,92	43,17	81,27	78,70	81,70	75,80	
11	0	0	46,79	38,00	77,47	74,09	74,00	89,16	

A Tabela 13 apresenta os efeitos da influência estatística sobre a produção enzimática e os coeficientes do modelo de regressão das variáveis escalonadas com 95% de confiança.

Tabela 13 – Estimativa dos efeitos e o coeficiente do modelo de regressão para a produção de amilase, por atividade dextrinizante, no delineamento fatorial completo 32 com 144h de fermentação.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(3)	p-valor	Coeficiente de regressão
Média	<u>77,257*</u>	<u>2,906</u>	<u>26,582</u>	<u>0,0014</u>	<u>77,258</u>
pH (L)	<u>-32,964</u>	<u>4,626</u>	<u>-7,126</u>	<u>0,0191</u>	<u>-16,482</u>
pH (Q)	-2,576	7,119	-0,362	0,7521	-1,288
Concentração (L)	<u>30,039</u>	<u>4,626</u>	<u>6,494</u>	<u>0,0229</u>	<u>15,020</u>
Concentração (Q)	-8,505	7,119	-1,195	0,3547	-4,252
pH (L) x C (L)	7,272	5,665	1,284	0,3279	3,636

* considerados significativos estatisticamente

Através da análise dos efeitos, foi possível observar que apenas os termos lineares para pH e concentração foram considerados significantes estatisticamente diante da resposta atividade dextrinizante, sendo que o pH apresentou efeito negativo e a concentração um efeito positivo.

A validade do modelo foi verificada pela análise de variância (ANOVA), Tabela 14, considerando apenas os coeficientes estatisticamente significativos. O coeficiente de relação ajustado (R^2) foi igual a 92% e o valor do teste F calculado foi maior que o do F tabelado para distribuição de F a 95% de confiança com os respectivos graus de liberdade, o que significa que o modelo proposto representa o processo desenvolvido e está adequado aos dados experimentais. Os coeficientes não estatisticamente significativos foram excluídos do modelo sendo incorporados ao resíduo total.

Tabela 14 – Análise de variância para U/mL dextrinizante com 144h de fermentação.

Fatores	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F _{calc}	p-valor
pH (L)	<u>1629,923</u>	<u>1</u>	<u>1629,923</u>	<u>50,78153</u>	<u>0,019129</u>
Concentração (L)	<u>1353,512</u>	<u>1</u>	<u>1353,512</u>	<u>42,16973</u>	<u>0,022902</u>
Falta de ajuste Puro Erro	141,795	6	23,632	0,73629	0,673823
	64,194	2	32,097		
Total SS	3189,424	10			

F_{tab} (0,95,1,10) = 4,96; e (L) = parâmetro linear

A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo linear de primeira ordem que representa o comportamento da atividade enzimática (U/mL) pelo método dextrinizante, em função do pH (x₁) e da concentração (x₂) (Equação 1), e descreve a superfície de resposta e as curvas de contorno da produção de amilase pela linhagem TP02, as quais são respectivamente apresentadas na Figura 26 (a) e (b).

$$U/mL_{dextrinizante} = 77,258 - 16,482x_1 + 15,020x_2 \quad (1)$$

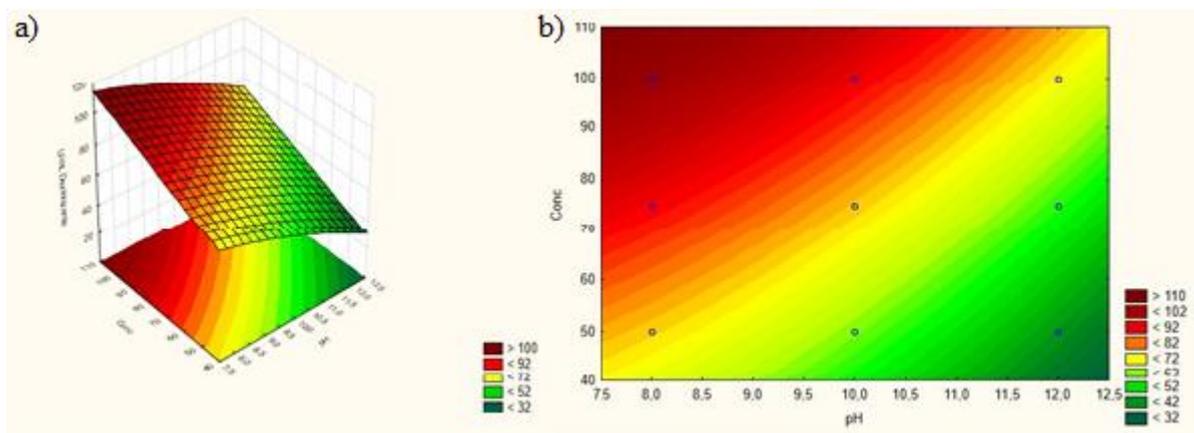


Figura 26 – Produção de amilases em função da concentração e do pH, quantificada através da atividade dextrinizante. (a) superfície de resposta (b) superfície de contorno.

Analisando a Figura 26(b), na qual há uma relação entre a concentração e o pH com a atividade dextrinizante, pode-se notar que existe uma tendência para maiores atividades dextrinizante (área mais escura da Figura) quando a concentração de manipueira está em 100 (%). Esta faixa ótima está relacionada quando o pH está em torno de 7,5 e 9, que corresponde aos pontos dos mínimos. Quando diminuídos os valores da concentração e aumentando o pH, a atividade dextrinizante diminui. Dessa forma pode-se supor que existe uma tendência, como

mostra o gráfico de superfície de resposta, na diminuição da atividade quando o pH for maior que 10.

A análise para atividade sacarificante não apresentou nenhum valor estatisticamente significativo, porém, tal resultado foi justificado por interferências ocorridas durante a realização dos ensaios no ponto central. Contudo, analisando qualitativamente a tendência da superfície de resposta gerada com a interação pH e concentração, apresentada na Figura 27, pode-se observar um comportamento semelhante àquele descrito para atividade dextrinizante. A faixa ótima do pH está voltada para os pontos de mínimo, enquanto a faixa da concentração está acima do ponto central tendendo aos pontos de máximo.

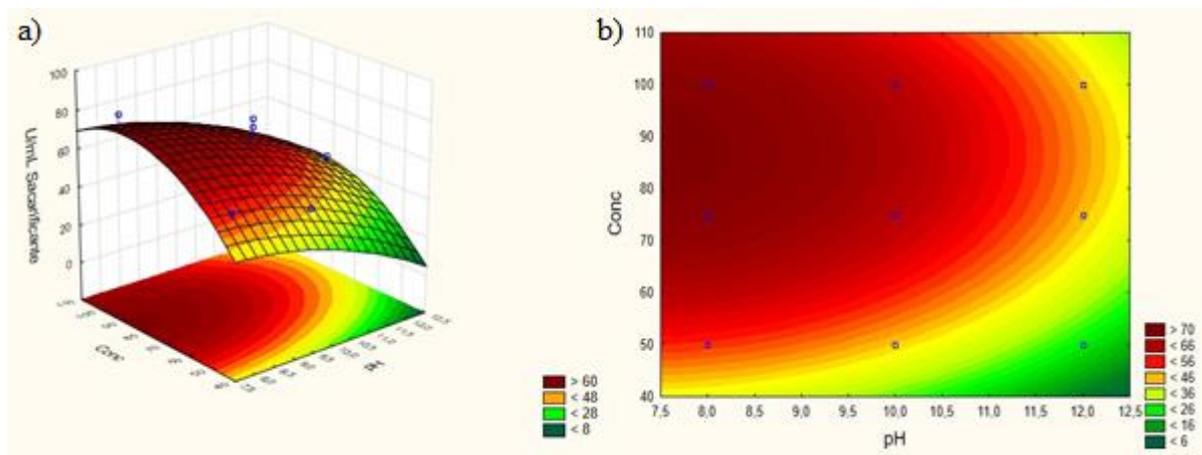


Figura 27 – Produção de amilases em função da concentração e do pH, quantificada através da atividade sacarificante. (a) superfície de resposta e (b) superfície de contorno.

Analisando os resultados obtidos através do planejamento, a melhor condição estudada apresentou uma atividade enzimática de 97,39 U/mL dextrinizante e 79,86 U/mL sacarificante, cerca de 2 a 3 vezes maior em relação ao ensaio com as condições iniciais apresentados no item 5.4.2 para manieira bruta (36,03 U/mL dextrinizante e 38,81 U/mL sacarificante). Tal resultado ressalta a importância dos estudos das variações nas condições de fermentação como alternativa para aumentar os níveis de produção enzimática por microrganismos.

Trabalhos disponíveis na literatura demonstram estudos das diversas condições de cultivo visando à máxima produção de enzimas, seja através de planejamentos de experimentos ou de outras ferramentas estatísticas. A maior parte dos trabalhos utiliza como variável de entrada, além dos parâmetros temperatura, agitação e pH, a composição do meio (diferentes tipos de fonte de carbono, de nitrogênio, suplementações com resíduos, entre outros), tendo em vista que é considerado como uma das etapas mais caras do processo e de

extrema influência na produção (ANTO *et al.*, 2006; EL-BANNA *et al.* 2007; KAMMOUN *et al.*, 2008; ROCHA, 2010; SILVA, 2012; DEB *et al.*, 2013; ABD ELHALEM *et al.* 2015; DASH *et al.*, 2015).

El-Banna *et al.* (2007) estudou a produção de amilase por *Bacillus subtilis* em diferentes condições de fermentação. A máxima produção de amilase ocorreu no tempo de 48 horas, temperatura de 40°C e pH 7,5. Entre os carboidratos testados, a máxima produção de amilase ocorreu quando utilizado uma concentração de 1% de amido como fonte de carbono. O microrganismo produziu altos níveis de amilase usando a peptona como fonte de nitrogênio.

Kammoun *et al.* (2008) demonstraram que o uso de quantidades acrescidas de muitas fontes de nitrogênio conduz a um aumento de expressão de α -amilase, também, e seus resultados experimentais mostraram claramente que o fosfato e magnésio desempenham um papel importante na expressão da enzima, destacando a importância desses minerais para produção enzimática.

Carvalho *et al.* (2007) estudou a influência das condições de cultivo sobre produção de α -amilase pelo termofílico *Bacillus sp.* SMIA-2. Os autores observaram uma produção máxima de amilase pelo microrganismo *Bacillus sp.* SMIA-2 quando utilizado amido solúvel (2,5g/L) como fonte de carbono. A suplementação com proteínas do soro de leite (0,25 g/L) e peptona (2 g/L) proporcionaram uma maior atividade e uma redução no tempo de cultivo. Os microrganismos crescido na temperatura de 50°C e com pH inicial de 8,5 tiveram um maior desempenho na produção da enzima.

É importante ressaltar que nesse trabalho foi utilizada apenas a composição natural da manipueira como meio de cultivo para produção de amilases pelo microrganismo TP02. O uso de suplementações nutricionais para encontrar as condições ótimas do meio de produção poderia resultar em valores maiores de atividade enzimática, uma vez que os resultados deste planejamento mostraram um efeito positivo para variável concentração de manipueira e a mesma está sendo utilizada no seu valor máximo (100%) impossibilitando um aumento da faixa de estudo e, desta forma, limitando o fornecimento de nutrientes importantes para a produção àqueles presentes apenas na composição da manipueira.

Apesar da existência de um bom número de trabalhos sobre a produção e as propriedades de α -amilases bacterianas, as informações apresentadas na maioria dos casos dificilmente podem ser generalizadas para diferentes linhagens. Isto se deve ao fato de que os diferentes microrganismos se comportam de maneira variada frente a uma mesma condição de incubação, podendo produzir enzimas com propriedades diversas.

5.5.3. Condições ótimas definidas

De acordo com Rodrigues e Iemma (2005), a obtenção de uma faixa ótima das variáveis é mais relevante do que um valor pontual, pois ele fornece informação sobre a robustez do processo. No caso deste trabalho, sabendo-se que as regiões de ponto ótimo dos fatores variaram entre 80 a 100% para concentração de manipueira e 7,5 a 9 para pH, para ambas as atividades, os valores propostos para corresponderem à condição otimizada foram pH 7,5 e concentração de manipueira 100%, além dos outros parâmetros já fixados anteriormente: agitação de 100 rpm, temperatura de 30°C e 144 horas de fermentação.

Essa fixação dos valores de pH e concentração, dentro da região ótima, foi tomada com objetivo de utilizar somente o resíduo manipueira e a menor quantidade possível de base (NaOH) para elevar o pH natural da manipueira, que é em torno de 6,5. Foi realizada uma fermentação nas condições descrita acima, a fim de obter-se o caldo bruto enzimático para caracterização quanto ao pH ótimo e temperatura ótima de hidrólise.

5.6. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

5.6.1. Temperatura e pH ótimo de hidrólise

De acordo com Macedo (2005), a determinação da faixa de pH e temperatura de atuação de uma enzima é considerado de extrema importância para manutenção da sua forma ativa durante uma reação enzimática ou para sua inativação quando isso se fizer necessário.

As análises foram realizadas em triplicatas e os pontos representam as médias. As barras de erros ficaram sobrepostas aos pontos, não sendo possível visualiza-las, devido o erro ser mínimo.

A Figura 28 exibe o perfil da atividade enzimática frente às variações de pH. O extrato enzimático bruto produzido pela estirpe TP02 apresentou atividade dextrinizante e sacarificante máxima no pH 7, considerado como pH ótimo. No entanto, é possível observar que houve mais de um pico para atividade sacarificante, o que sugere a presença de mais de um tipo de enzima no extrato bruto. Tais resultados indicam a preferência dessa enzima por meios ácidos e/ou neutro.

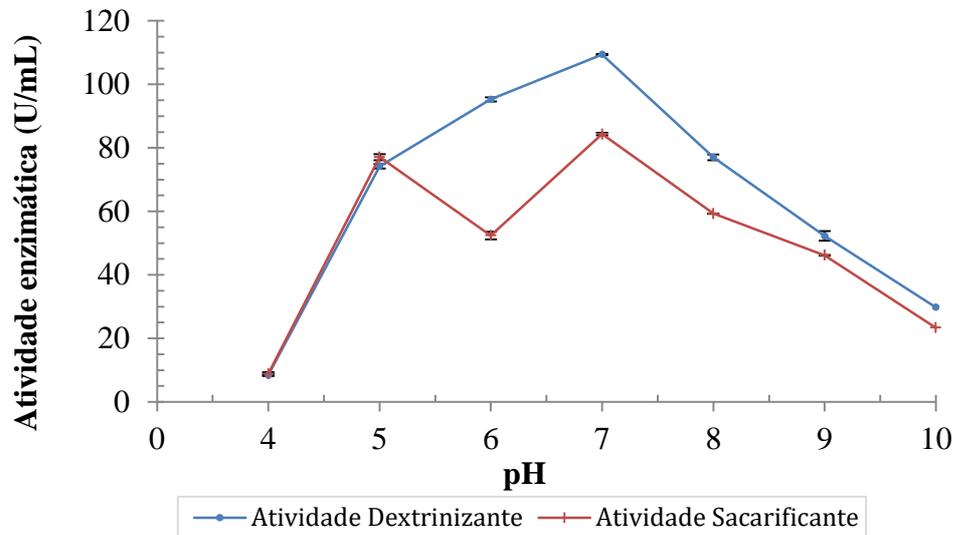


Figura 28 – Caracterização físico-química da enzima bruta quanto à influência do pH sobre atividade enzimática.

Segundo Gupta *et al.* (2003), as amilases bacterianas apresentam uma faixa de pH ótimo de ligeiramente ácido a alcalinos. A maioria das linhagens de *Bacillus* usadas comercialmente para a produção de α -amilases bacterianas por fermentação submersa apresentam pH ótimo entre 6 e 7. No entanto, o pH pode variar de acordo com o gênero e a espécie da bactéria produtora.

As amilases bacterianas obtidas no trabalho de Rabalho (2002) apresentaram pH ótimo de 6,5. Deb *et al.* (2013) caracterizaram uma amilase extracelular produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* P-001 com o pH ótimo de 6,5. A estirpe *Bacillus subtilis* BI19 (DASH *et al.*, 2015), isolada de amostras de solo, produziu amilases com pH ótimo na faixa de 5-7.

A temperatura é um dos fatores que mais interferem na atividade enzimática, uma vez que regulam as reações catalisadas pela enzima, podendo acelerar ou inibir sua atividade. É possível observar que existe uma temperatura limite para cada enzima, acima da qual começa a perda gradativa da atividade possivelmente devido a desnaturação protéica pelo calor, como resultado da perda da conformação nativa.

O perfil da influência do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática é mostrado na Figura 29. Foi utilizada solução de amido com pH 7, considerado ótimo para as duas atividades. Observa-se que a melhor temperatura para atividade enzimática está entre 50-70°C, sendo a maior atividade obtida na temperatura de 70°C. Como houve uma elevada atividade sacarificante com o pH 5, foi analisada também a influência da temperatura sobre a

atividade quando a reação ocorre com o pH 5. É possível verificar que a temperatura ótima quando utilizado o pH 5 está na faixa de 60 a 70°C. É possível observar que acima de 70°C, a atividade da amilase caiu significativamente.

O extrato bruto produzido apresenta características termófilas, ou seja, a enzima produzida apresenta uma máxima eficiência quando expostas a temperaturas mais elevadas (70°C). Essa característica torna a enzima produzida mais vantajosa, pois atende as exigências de alguns processos de hidrólise nas indústrias (GOMES *et al.*, 2007; SUNDARRAM e MURTHY *et al.*, 2014).

Gupta *et al.* (2003) cita que a maioria das amilases bacterianas tem uma temperatura ótima na faixa de 30 a 100°C, corroborando com os resultados alcançados nesse trabalho e em diversos outros disponíveis na literatura.

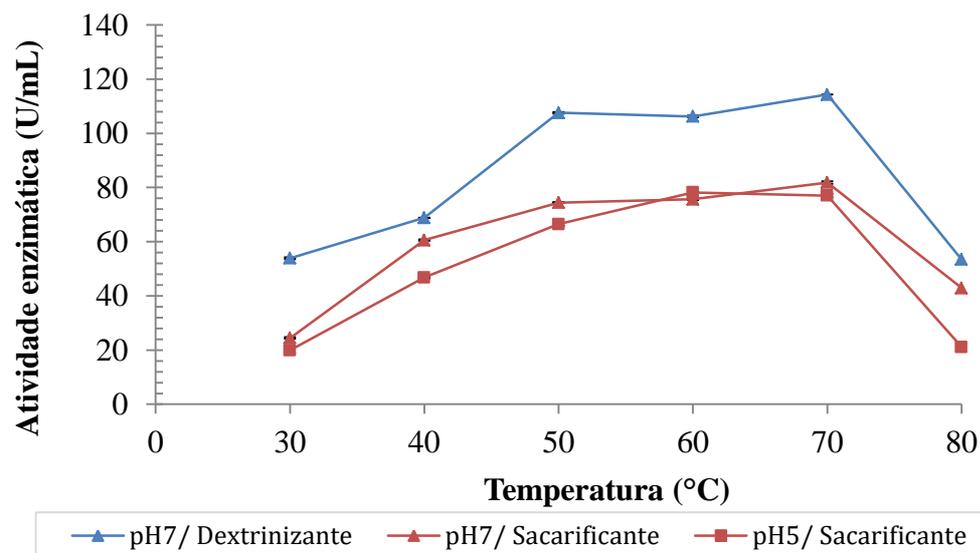


Figura 29 – Caracterização físico-química da enzima bruta quanto à influência da temperatura sobre atividade enzimática.

As amilases produzidas, através de fermentação submersa no meio nutriente-mandioca, pelas linhagens bacterianas isoladas por Rabalho (2002), apresentaram temperatura máxima na faixa de 50 a 80°C e um pH ótimo de 6,5.

A temperatura ótima para a produção da enzima por *Bacillus sp.*, isolado a partir de resíduos da indústria Dhal, foi de 60° C e um pH ótimo de 6.5 (THIPPESWAMY *et al.*, 2006).

Saxena e Singh (2011) encontraram um pH máximo de 6 e uma temperatura máxima de 50°C para amilase produzida pela bactéria RSA-27, isolada do solo. A atividade máxima alcançada pela enzima produzida por *Cronobacter sakazakii* Jor52, foi obtida no pH 8 e temperatura de 37°C (SAMANTA *et al.* 2013).

6. CONCLUSÃO

A manipueira é um resíduo com potencial para processos biotecnológicos, desde fonte de isolamento de microrganismos promissores na produção de enzimas amilolíticas, bem como substrato para fermentação.

A técnica de semeadura por esgotamento foi bem-sucedida. Foram obtidos oito isolados sendo que três apresentaram índices enzimáticos em meio sólido. O microrganismo TP02 se destacou, pois se desenvolveu melhor em fermentações submersas. As maiores atividades dextrinizante e sacarificante em fermentações submersas foram encontradas quando utilizado manipueira como substrato do que quando utilizado um meio sintético. Evidenciando o potencial do resíduo como substrato para fermentações.

O tratamento realizado na manipueira por alguns autores não apresentou grande influência na produção de enzimas amilolíticas, sendo, desta forma, mais vantajoso empregar a manipueira na sua forma bruta.

A busca pela região ótima das condições de processo resultou em um aumento de 2 a 3 vezes maior que nas condições iniciais, demonstrando a importância do planejamento de experimentos. As condições otimizadas foram pH inicial de 7,5, temperatura 30°C, agitação 100 rpm e concentração de manipueira 100%.

O extrato enzimático bruto produzido apresentou um pH ótimo de 7 e uma temperatura ótima entre 50 a 70°C. Sendo considerado um extrato enzimático com propriedades termófilas, característica favorável para diversas indústrias.

Dessa forma, estudos de isolamento de microrganismos com atividade para amilases, e do uso de resíduos como substrato, visando à diminuição dos custos de produção e o aumento da disponibilidade de amilases, são considerados interessantes para o setor industrial.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para trabalhos futuros seria estudar a cinética completa da produção da enzima e da hidrólise de diferentes fontes de amido.

Aplicar a enzima para produção de álcool tendo como matéria prima o amido e estudar a cinética de produção.

Outra sugestão seria recuperar e concentrar o caldo enzimático bruto visando à purificação da enzima e posterior imobilização.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELHALEM, B. T.; EL-SAWY, M.; GAMAL, R. F.; ABOU-TALEB, K. A. Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. **Annals of Agricultural Science**, 2015.
- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial Cells and Enzymes—A Century of Progress. In: BARREDO, J. L. (ed) **Microbial Enzymes and Biotransformations**, v. 17, chap. 1, Totowa: Humana Press, 2005.
- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n.1, p. 117-139, 2014.
- ASN -AGÊNCIA SERGIPE DE NOTÍCIAS. Incentivo do governo à produção de farinha beneficia produtores do Agreste sergipano. **Governo de Sergipe**, fevereiro de 2016 Disponível na internet via www url: http://www.cpatc.embrapa.br/publicações_2007/ct-45.pdf. Arquivo capturado em 28 de novembro de 2016.
- AKCAN, N. High Level Production of Extracellular α -Amylase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 in Submerged Fermentation. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, n. 6, 2011.
- AMARAL, L.; JAIGOBIND, A. G. A.; JAISINGH S. **Dossiê técnico: processamento da mandioca**. Paraná: Instituto de Tecnologia do Paraná. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, v 47. 2007.
- AMIRA E-F, MOHAMMED A. D., AHMED EL-S. and NOHA O. Starch and Microbial α -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications, Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology, Prof. Chuan-Fa Chang (Ed.), **InTech**, 2012.
- ANTO, H.; TRIVEDI, U.; PATEL, K. α -Amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, n.2, p. 241-245, 2006.
- ARAUJO, N.C.; GUIMARÃES, P.L. F.; OLIVEIRA, S.J.C.; LIMA, V. L. A.; BANDEIRA, F.A.; ARAÚJO, F. A. C. Quantificação da geração de resíduos em uma casa de farinha no Estado da Paraíba. **Revista do Centro Natural e Exata**, v.13, n.15, p.3793-3799, 2014.
- AZAD M. A; BAE, J. H.; KIM J. S.; LIM, J. K; SONG, K. S.; SHIN, B. S.; KIM, H. R. Isolation and characterization of a novel thermostable alpha-amylase from Korean pine seeds. **N Biotechnol**, v. 26, p.143–149, 2009.
- BALKAN, B.; ERTAN, F. Production of α -amylase from *Penicillium chrysogenum* under solid state fermentation by using some agriculture by product. **Food Technology Biotechnology**. v.44, p.439-442, 2007.
- BARATTO, C. M., SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência-Ciência e Biotecnologia**. v 11, n. 2, 15-28, 2012.

BARROS, F. F. C.; SIMIQUELI, A. P. R.; ANDRADE, C. J.; PASTORE, G. M. Production of Enzymes from Agroindustrial Wastes by Biosurfactant-Producing Strains of *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Research International**, v. 2013.

BARROS, F. F. C.; DIONISIO, A. P.; SILVA, J. C. A.; PASTORE, G. M. Potential uses of cassava wastewater in biotechnological processes. In: PACE, C. M. (ed) **Cassava: Farming, Uses, and Economic Impact**, New York: Nova Science, 2011.

BASTOS, C.M. S, S.T.C., LIMA, T.L.de A., ZUNIGA,A.D.G.,CARREIRO, S.C. ,Efeito das condições de cultivo na produção de amilase por duas linhagens de leveduras. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 13, n. 3, p. 123-129, 2015

BEZERRA, M. S. **Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIIA utilizando manipueira como fonte de carbono**. 2012. 114 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil, 2012.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 98-101, 2007.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUCHMANN, E-E. **Bioquímica técnica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980. 233 p.

CAMPBELL, M. K; FARRELL, S. O. **Bioquímica: Combo**. 5 ed. São Paulo: Thomson, 2007. 845 p.

CARDOSO, C. E. L. **Competitividade e inovação tecnológica na cadeia agroindustrial de fécula de mandioca no Brasil**. 2003. 188 f. Tese (Doutorado em Ciências - Economia Aplicada) - Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba-SP, Brasil, 2003.

CASTRO, I. P. M.; ALVIM, T. C.; SANTANA, W. R.; CARVALHO, V. D. P.; SILVEIRA, M. A. Efeito da adição de soro de queijo no processo de obtenção de etanol a partir de batata-doce. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 5, p. 980-986, 2011.

CELESTINO, J. R.; DUARTE, A. C.; SILVA, C. M. M.; SENA, H. H.; FERREIRA, M. P. S. B. C.; MALLMANN, N. H.; LIMA, N. P. C.; TAVARES, C. C.; SOUZA, R. O. S.; SOUZA, E. S.; SOUZA, J. V. B. *Aspergillus* 6V4, a strain isolated from manipueira, produces high amylases levels by using wheat bran as a substrate. **Enzyme Research**, v. 2014, 2014.

CEREDA, M. P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da Mandioca. In: Cereda, M.P. (ed) **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. (Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas), v. 4, p. 13-37, São Paulo: Fundação Cargill, 2001.

CHOI, J.-M.; HAN, S.-S.; KIM, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1443-1454, 2015.

CERATTI M. Mandioca: um cultivo milenar reinventado pelos índios terenas [Internet]. São Paulo (SP): **Revista Eletrônica El País**; Ago, 2015 Disponível em: http://brasil.elpais.com/brasil/2015/08/08/politica/1439065484_035712.html 4.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira – cana-de-açúcar**. Monitoramento Agrícola, v.2, n.2, safra 2015/16, agosto 2015.

CORDEIRO, G. Q. **Tratamento de manipueira em reator anaeróbio compartimentado**. 2006. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, Brasil, 2006.

COSTA, G. A. N.; PASTORE, G. M. RESÍDUOS AGROINDÚSTRIAS: FONTE ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULAS. *ICTR 2004 - Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável*, Florianópolis, Santa Catarina, BR, 17-20 Outubro 2004.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry-a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, 3 ed, p. 291-302, 2006.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. Compostos de aroma por *Geotrichum fragans* cultivado em manipueira. In: CEREDA, M.P. (ed) **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. v. 4, p. 96-106, São Paulo: Fundação Cargill, 2001.

DAMASO, M. C. T.; FARINAS, C. S.; SALUM, T. F. C. Produção e imobilização de enzimas aplicadas à produção de etanol e biodiesel [on line]. Embrapa Instrumentações, 2012. Disponível na internet via www url: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/965933/producao-e-imobilizacao-de-enzimas-aplicadas-a-producao-de-etanol-e-biodiesel>. Arquivo capturado em 20 de março de 2016.

DASH, B. K., RAHMAN, M. M., & SARKER, P. K.. Molecular identification of a newly isolated *Bacillus subtilis* BII9 and optimization of production conditions for enhanced production of extracellular amylase. **BioMed research international**, v 2015, 2015.

DEB, P.; TALUKDAR, S. A.; MOHSINA, K.; SARKER, P. K.; SAYEM, SM. A. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. **Springer Plus**, v. 2, n. 1, p. 154, 2013.

EL-BANNA, T.E.; ABD-AZIZ, A.A.; ABOU-DOBARA, M.I; IBRAHIM, R.I. Production and immobilization of α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Pakistan Journal. of Biological Sciences*. v 10, n. 12, p. 2039-2047, 2007 ISSN 1812-5735

FELIPE, F. I.; RIZATO, M.; WANDALSEN, J. V. POTENCIAL ECONÔMICO DOS RESÍDUOS DE MANDIOCA PROVENIENTES DE FECULARIAS NO BRASIL. *SOBER-47º Congresso Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural*, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, BR, 26-30 julho 2009.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.

FEMA - FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. **Avaliação dos aspectos ambientais do cultivo e industrialização da mandioca: relatório final**. Gerência de Produção Sustentável. Belo Horizonte: Fundação Estadual do Meio Ambiente, 2011. 99 p.

FERNANDES, L. P.; ULCHOA, C. J.; ASQUIERI, E. R.; MONTEIRO, V. N. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, p. 43-5, 2007.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Química)-Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil, 2007.

FIORETTO, R. A. Uso direto da manipueira em fertirrigação. In: CEREDA, M.P. (ed) **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização de mandioca**. (Série: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 4, 320 p. São Paulo: Fundação Cargill, 2001.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, v.15, p. 107–115, 2003.

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

GIONGO, C. **Produção de ácidos graxos voláteis por biodigestão anaeróbia da manipueira**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade do Oeste do Paraná, Toledo-PR, Brasil, 2011.

GOMES, E; GUEZ, M. A. U; MARTIN, N.; da SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GONÇALVES, L. G.; CORREA, F. F. B.; SHINYA, T. Y.; SILVA, D. F.; CAMPIONI, T. S.; ESCARAMBONI, B.; OLIVA NETO, P. PRODUÇÃO DE XAROPE DE GLICOSE A PARTIR DA HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE MANDIOCA POR AMILASES DE *Rhizopus oligosporus*. *Simpósio Nacional de Bioprocessos*, 10.17648/sinaferm-2015-33589, Fortaleza, Ceará, BR, 01-04 Setembro de 2015.

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

HAG, I.; ALI, S.; IQBAL, J. Direct production of citric acid from raw starch by *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 921-924, 2003.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro v.29 n.12 p.1-82 dezembro. 2016.

IUB - International Union of Biochemistry e Report of the Commission on Enzymes. Pergamon Press, Oxford, 1961.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228–240, 2013.

KAMMOUN, R., NAILI, B., BEJAR, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresource Technology**. v. 99, p. 5602–5609, 2008.

KARBALAEI-HEIDARI, H. R.; ZIAEE, A. A.; SCHALLER, J.; AMOOZEGAR, M. A. Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 266-272, 2007.

KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de alimentos: teoria de aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 242 p.

KONSOULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M.; Co-production of alpha-amylase and beta-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. **Bioresource Technology**, v.98, p. 150-157, 2007.

KRISHNA, P. N. **Enzyme Technology: pacemaker of biotechnology**. Índia: PHI Learning Private Limited., 2011. 372 p.

KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Bioscience Bioengineering**, v. 100, p.168-171, 2005.

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.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 839 p.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 2, p. 299-304, 1995.

LI, Z.; CHEN, S.; GU, Z.; CHEN, J.; WU, J. Alpha-cyclodextrin: Enzymatic production and food applications. **Trends in Food Science & Technology**, v.35, n.2, p. 151-160, 2014.

- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e Enzimáticos**. Volume 3. São Paulo: Bluncher, 2001. 593 p.
- MACEDO, G. A; PASTORE, G.M; SATO, H H; YON, G; PARK, K. **Bioquímica experimental de alimentos**. 1° ed. Editora Varela, 2005.
- MACIEL, V. F. A.; PACHECO, T. F.; GONÇALVES, S.B. Padronização do uso do corante rodamina B para avaliação de atividade lipolítica em estirpes fúngicas. **Comunicado Técnico Embrapa**, v.1, p.1-3, 2010.
- MACKENZIEA. D. A.; JEENES, D. J.; GOU, X.; ARCHER, D. B. Molecular basis of glucoamylase over production by a mutagenised industrial strain of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.193-200, 2000.
- MAI, H. N. P. **Integrated Treatment of Tapioca Processing Industrial Wastewater: Based on Environmental Bio-Technology**. 2006, 177 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Universidade de Wageningen, Wageningen-NL, Holanda, 2006.
- MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Axcel Books, 2004.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MINAMI, N. M.; LUCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V. Characterization of clarified medium from submerge and semisolid cultivation of *Aspergillus awamori* NRRL3112 by size-exclusion chromatography. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 2, 1999.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.
- MUKHTAR, H.; HAQ, I. Comparative Evaluation of Agroindustrial Byproducts for the Production of Alkaline Protease by Wild and Mutant Strains of *Bacillus subtilis* in Submerged and Solid State Fermentation. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.
- MURALIKRISHNA, G.; NIRMALA, M. Cereal α -amylases—an overview. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 2, p.163–173, 2005.
- MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M. e MILAGRES, A. M. F. Enzimas, poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v.41, n. 242, p. 28-33, 2007.
- NASU, E. G. C. **Composição química da manipueira e sua potencialidade no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro no oeste do Paraná**. 2008. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon-PR, Brasil, 2008.
- NESTL, B. M.; NEBEL, B. A.; HAUER, B. Recent progress in industrial biocatalysis. **Current Opinin in Chemical Biology**, v. 15, p. 187-193, 2011.
- NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J.; YOUNG, M. M. Fungal glucoamylases. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 24, p. 80-85, 2006.

OELOFSE, S. H.; NAHMAN, A. Estimating the magnitude of food waste generated in South Africa. **Waste Managment & Research**, v.31, p. 80–86, 2013.

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**. v.40, n.2, p. 401-404, 2010.

PAMBOUKIAN, C. R. D.; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. Relationship between morphology, rheology and glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in submerged cultures. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 15, n. 3, p. 265-272, 1998.

PANDA, S. P.; MISHRA, S. S.; KAYITESI, E.; RAY, R. C. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. **Environmental Research**, v. 146, p. 161-172, 2016.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, n. 2, p.135–152, 2000.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. **Enzyme Technology**. 1 ed. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005. 760 p.

PARK, Y. K.; SANTI, M. S. S. Induction of High Amyloglucosidase Producing Mutant from *Aspergillus awamori*. **Journal of Fermentation Technology**. v. 55, p. 93-195, 1977.

PASIN, T. M. **Prospecção, purificação e propriedades funcionais de uma glucoamilase de *Aspergillus japonicus*: aplicação do extrato enzimático em reciclagem do papel**. 2015. 156 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto-SP, Brasil, 2015.

PINTO, P. H.; CAMILI, E. A.; CABELO, C. PROCESSO DE FLOTAÇÃO NO TRATAMENTO DA MANIPUEIRA ORIGINADA DA FABRICAÇÃO DE FARINHA DE MANDIOCA. **RETEC - Revista de Tecnologias**, v. 3, 2013. Disponível em: <<http://retec.fatecourinhos.edu.br/index.php/retec/article/view/129>>. Acesso em: 22/01/ 2016

RABALHO, A. A.; **Isolamento de linhagens microbianas termofílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca**. 183 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, Brasil, 2002.

RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C. Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresour Technology**, v. 99, n. 8, p. 3044–3050, 2008.

REHMAN, A.; SAEED, A. Isolation and screening of amylase producing *Bacillus* species from soil. **International Journal of Advanced Research**, v. 3, p. 151-164, 2015.

ROCHA, C.P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia-MG, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.

SAMANTA, A., MITRA, D., ROY, S. N., SINHA, C., & PAL, P. Characterization and optimization of amylase producing bacteria isolated from solid waste. **Journal of Environmental Protection**. v.4, n.6, p. 647, 2013.

SAMPAIO, B. M. L. **Viabilidade do processo de tratamentos de resíduo da industrialização da mandioca em sistemas de duas fases**. 1996. 176 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR, Brasil, 1996.

SANTOS, A. Usos e impactos ambientais causados pela Manipueira na Microrregião sudoeste da Bahia-Brasil. In: LUZÓN, J. L.; CARDIM, M. (eds) **Problemas sociales y regionales en América Latina: Estudio de casos**. Barcelona: Editora Universitat de Barcelona, 2008.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. 151 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil, 2007.

SAXENA, R., SINGH, R. Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1334-1342, 2011.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Volume 2. São Paulo: Blucher, 2001. 541 p.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. **Análise de Dados Experimentais II. Planejamento de Experimentos**. Rio de Janeiro. E-Papers, 2011.

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

SIVARAMAKRISHNAN, S.; GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. α -Amylases from Microbial Sources - An Overview on Recent Developments. **Food Technology & Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 173-184, 2006.

SOCCOL, C. R, CABRERO, M. A., ROUSSOS S., RAIMBAULT M. Selection of *Rhizopus* for growing on raw cassava. In: **Guerrero R (ed) Proceedings of the VI International Symposium on Microbial Ecology**, Barcelona, p. 6-11, 1992, p 302

SOETAERT, W.; VANDAMME, E. J. The Scope and Impact of Industrial Biotechnology. **Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success**, p. 1, 2010.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.. **Química Orgânica**. 9 ed. Rio de Janeiro: LTC Editora 2008.

- SOUZA, A. R. M.; SILVA, Y. P. A.; COSTA, N. V.; ALMEIDA, T. L.; ARTHUR, V.; LAGE, M. L.; ASQUIERI, E. R.; DAMIANI, C. Irradiação em barra de cereais incorporadas com casca de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.41, p. 610-614, 2011.
- SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industry - A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850-861, 2010.
- SOUZA, S. D. O.; DA SILVA, A. P. B.; DA SILVA, R. M.; DE OLIVEIRA, L. C.; GOVEIA, D.; BOTERO, W. G. Resíduos de casas de farinha do agreste alagoano: perspectivas de utilização/waste of flour houses of Alagoas state: use and perspectives. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 9, p. 65-73, 2015.
- STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Enzymatic activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 382-385, 1998.
- SUMAN, P. A.; URBANO, L. H.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). **Acta Scientiarum.Technology**, v. 33, n. 4, p. 379-384, 2011.
- SUNDARRAM, A.; MURTHY, T. P. K. α -Amylase Production and Applications: A Review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 166-175, 2014.
- THIPPESWAMY, S; GIRIGOWDA, K.;MULIMANI, V. H. Isolation and identification of alpha-amylase producing Bacillus sp. from dhal industry waste. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**. v. 43, n.5, 295, 2006.
- URBANO, L. H.; SUMAN, P. A.; LEONEL, M. Rendimento de processo de produção de etanol a partir de manipueira. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 5, n.1, p. 778-782, 2009.
- VAIDYA, S.; RATHORE, P. Isolation, screening and characterization of amylase producing bacteria from soil of potato dump sites from different regions of madhya pradesh. **Sanghvi Institute of Management and Science**, p. 7, 2015.
- VAN DER VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch converting of alpha amylase family. **Journal Biotechnology**, v. 94, p. 137-155, 2002.
- VASEEKARAN, S.; BALAKUMAR, S., ARASARATNAM, V. Isolation and identification of a bacterial strain producing thermostable α -amilase. **Tropical Agricultural Research**, v. 22, p. 1-11, 2010.
- VITOLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (eds) **Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, p. 387-420, 2001.
- WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Aspecto da produção industrial de enzimas. **Citino (Hestia)**, v. 1, n. 1, p. 30-36, 2011.

WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. 2 ed. New York: Ellis Horwood, 1987. 457 p.

WOICIECHOWSKI, A. L.; CARVALHO, J. C.; SPIER, M. R., HABU, S., YAMAGHISHI, C. T., GHIGGI, V.; SOCCOL, C. R. Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. Chapter in **Biotecnologia de alimentos**, São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte: Atheneu, v.12, p. 143-172, 2013.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L; TRENTIN, D. S., JÚNIOR, C. W; FRASSON, A. P., GRAEFF, A. A., GOMES, P.; MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v.10, n. 14, p.123-137, 2009.