

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

MAYARA VIEIRA DE JESUS

**USO DE MEMBRANAS DE MICROFILTRAÇÃO E ULTRAFILTRAÇÃO PARA
RECUPERAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE AMILASE PRODUZIDA EM
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL (MANIPUEIRA) COMO SUBSTRATO**

São Cristóvão (SE)

(2019)

MAYARA VIEIRA DE JESUS

**USO DE MEMBRANAS DE MICROFILTRAÇÃO E ULTRAFILTRAÇÃO PARA
RECUPERAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE AMILASE PRODUZIDA EM
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL (MANIPUEIRA) COMO SUBSTRATO**

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza
Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Jacqueline Rego da Silva Rodrigues

São Cristóvão (SE)

(2019)

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

J58u Jesus, Mayara Vieira de
Uso de membranas de microfiltração e ultrafiltração para recuperação e concentração de amilase produzida em resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato / Mayara Vieira de Jesus ; orientador Roberto Rodrigues de Souza. – São Cristóvão, SE, 2019.
65 f.: il.

Dissertação (mestrado em Engenharia química) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Engenharia química. 2. Membranas filtrantes. 3. Amilase. 4. Resíduos industriais. I. Souza, Roberto Rodrigues, orient. II. Título.

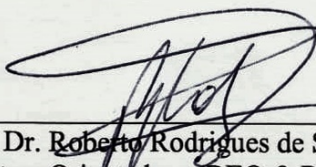
CDU 66.081.6

MAYARA VIEIRA DE JESUS

**USO DE MEMBRANAS DE MICROFILTRAÇÃO E ULTRAFILTRAÇÃO PARA
RECUPERAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE AMILASE PRODUZIDA EM
RESÍDUO AGROINDUSTRIAL (MANIPUEIRA) COMO SUBSTRATO**

Dissertação aprovada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe em 21 de maio de 2019.

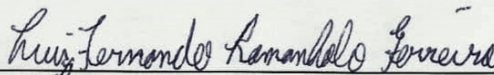
BANCA EXAMINADORA



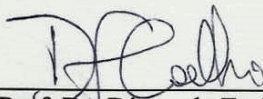
Pro. Dr. Roberto Rodrigues de Souza
(Presidente – Orientador – DEQ & PEQ / UFS)



Profa. Dra. Jacqueline Rego da Silva Rodrigues
(Coorientadora – DEQ / UFS)



Prof. Dr. Luiz Fernando Romanholo Ferreira
(Examinador – ITP / UNIT)



Prof. Dr. Diego de Freitas Coêlho
(Examinador – PEQ / UFS)

*Este trabalho é dedicado às pessoas que sempre estiveram ao meu lado:
minha mãe, meu irmão, meu esposo e especialmente ao meu pai.*

RESUMO

Amilases são enzimas altamente específicas atuantes na degradação via hidrólise da molécula de amido, principal polímero natural sintetizado pelas plantas, renovável e biodegradável. Tal substância é relatada como insumo de extrema importância especialmente na indústria alimentícia e de papel, todavia a produção enzimática em escala industrial revela altos custos, que por sua vez refletem no valor final do produto. Este trabalho teve por objetivo recuperar e concentrar amilase de qualidade compatível com o mercado, reduzindo gastos na produção mediante uso de resíduo agroindustrial, a manipueira. Além de incentivar a aplicação de resíduos agrícolas, este trabalho também discute a aplicação dos métodos de separação por membranas, mais especificamente a microfiltração e a ultrafiltração nos processos de recuperação e concentração enzimática. O processo iniciou com a produção da amilase a partir de *Bacillus subtilis* via fermentação submersa em manipueira, sendo o caldo fermentado submetido primeiramente ao processo de microfiltração com membrana, visando reter material em suspensão com característica massa molecular superior a 500 kDa. O permeado microfiltrado deu continuidade ao experimento sendo submetido ao processo de ultrafiltração, onde o objetivo foi concentrar a amilase, a mantendo no caldo concentrado. O produto enzimático foi submetido a testes de atividade enzimática que apontaram maiores valores no permeado do experimento de microfiltração que utilizou a pressão de 500 N/m² combinado a vazão de 8 mL/s, chegando a 173,9% de recuperação, enquanto que na ultrafiltração, maiores valores de atividade foram obtidos no concentrado do experimento que utilizou a pressão de 1000 N/m² combinado a vazão de 8 mL/s, resultando em 42,66% de recuperação. O fluxo do permeado também foi avaliado durante todo o processo, indicando que valores entre 19,11 e 18,48 foram atingidos com uso das pressões 500 e 1000 N/m² combinadas a vazões 8 e 18 mL/s na microfiltração, enquanto que na ultrafiltração os melhores fluxos utilizaram pressão de 500 N/m² associada a vazões de 18 e 28 mL/s. Os resultados corroboram que o uso de membranas é importante ferramenta na concentração e recuperação amilolítica, todavia, a microfiltração apresenta melhores resultados, tanto em termos de recuperação da atividade enzimática, quanto em relação ao fluxo do permeado, quando relacionados aos procedimentos de ultrafiltração.

PALAVRAS-CHAVE: amilase, resíduo agroindustrial, membranas

ABSTRACT

Amylases are highly specific enzymes involved in the degradation via hydrolysis of the starch molecule, the main natural polymer synthesized by plants, renewable and biodegradable. This substance is reported as an extremely important input, especially in the food and paper industry. However, enzymatic production on an industrial scale reveals high costs, which in turn reflects the final value of the product. The goal of this work was to recover and concentrate amylase with market compatible quality, reducing production expenses through the use of agroindustrial residue, the manipueira. In addition to encouraging agricultural residues application, this work also discusses the application of membrane separation methods, more specifically microfiltration and ultrafiltration in the recovery processes and enzymatic concentration. The process started with the production of amylase from *Bacillus subtilis* via submerged fermentation in manipueira, the fermented broth being submitted first to the microfiltration process with membrane, aiming to retain suspended material with molecular mass characteristic greater than 500 kDa. The microfiltered permeate gave continuity to the experiment being submitted to the ultrafiltration process, where the objective was to concentrate the amylase, keeping it in the concentrated broth. The enzymatic product was submitted to enzymatic activity tests that showed higher values in the permeate of the microfiltration experiment that used the pressure of 500 N / m² combined the flow of 8 mL / s, reaching 173.9% of recovery, while in the ultrafiltration, higher values of activity were obtained in the concentrate of the experiment that used the pressure of 1000 N / m² combined the flow of 8 mL / s, resulting in 42.66% recovery. The permeate flux was also evaluated along the process, indicating that values between 19.11 and 18.48 were reached using pressures of 500 and 1000 N / m² combined at flow rates 8 and 18 mL / s in the microfiltration, while in the ultrafiltration, the best flows used a pressure of 500 N / m² associated with flow rates of 18 and 28 mL / s. The results corroborate that the use of membranes is an important tool in the concentration and amylolytic recovery, however, microfiltration presents better results both in terms of recovery of enzymatic activity and in relation to permeate flux when related to ultrafiltration procedures.

KEYWORDS: amylase, agroindustrial residue, membranes

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

FSm	Fermentação Submersa
MF	Microfiltração
PSM	Processo de separação por membrana
UF	Ultrafiltração

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔP Diferença de pressão transmembranar, N/m²

A_m Área de permeação na membrana, m²

FP Fator de purificação

J Fluxo; L/h¹.m²

J_i Fluxo inicial; L/h¹.m²

R Coeficiente de retenção ; %

R_a Resistência à adsorção ; m²/kg

R_A Recuperação da atividade enzimática: %

R_b Resistência ao bloqueio físico ; m²/kg

R_c Resistência do soluto formado na superfície da membrana ; m²/kg

R_{cf} Recuperação da permeabilidade após a limpeza física ; %

R_{cq} Recuperação da permeabilidade após a limpeza química ; %

R_m Resistência da membrana ; m²/kg

R_{pc} Resistência a polarização por concentração ; m²/kg

RRF Redução Relativa do Fluxo do Permeado: %

R_t Resistência total; m²/kg

t Tempo; s

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Manipueira	17
Figura 2- Etapas de um processo genérico de purificação	20
Figura 3- Definição de membrana	22
Figura 4- Processo simplificado de operação com membrana de fibra oca com capilares	25
Figura 5- Membranas Dead end e Crossflow	26
Figura 6- Esquema genérico da estrutura utilizada nos processos de microfiltração e ultrafiltração.....	36
Figura 7- Comportamento do fluxo permeado em função do tempo de filtração nas operações com membrana à temperatura ambiente: a) MF, b) UF	39
Figura 8- Comparativo entre atividade enzimática no concentrado e permeado em um mesmo experimento a) MF, b) UF	43
Figura 9- Superfície de resposta mostrando os pontos ótimos para recuperação da atividade enzimática na MF obtido via software STATISTIC 9.0.....	46
Figura 10- Superfície de resposta mostrando os pontos ótimos para recuperação da atividade enzimática na UF obtido via software STATISTIC 9.0.	48
Figura 11- Comparativo entre a concentração de proteína no caldo concentrado e no caldo permeado ao longo do tempo, levando em consideração os experimentos 01 em ambos processos a) MF, b) UF.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais componentes da manipueira	18
Tabela 2- Exemplos de aplicação dos PSM.....	23
Tabela 3- Membranas comerciais.....	24
Tabela 4- Condições experimentais utilizadas	38
Tabela 5- Valores médios do fluxo permeado.....	41
Tabela 6- Redução relativa dos fluxos do permeado ao longo dos experimentos de MF e UF	42
Tabela 7- Recuperação da atividade enzimática (RA) e Fator de purificação (FP)	45
Tabela 8- Recuperação da atividade enzimática (RA) e Fator de purificação (FP) para a Ultrafiltração.....	47
Tabela 9- Recuperação da atividade enzimática (RA) e Fator de purificação (FP) de amilases utilizando variados procedimentos de purificação.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Amilase	15
2.2	Produção de amilase	15
2.3	Manipueira como fonte alternativa de carbono	17
2.4	Aplicações das amilases.....	18
2.5	Recuperação da amilase.....	19
2.6	Processos de separação por membranas (PSM).....	21
2.6.1	Fluxos em uma membrana.....	25
2.6.2	Fluxo do Permeado	26
2.6.3	Polarização da concentração.....	28
2.6.4	Incrustação.....	29
2.6.5	Microfiltração (MF).....	30
2.6.6	Ultrafiltração (UF).....	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1	Obtenção das enzimas amilolíticas em meio a manipueira	33
3.2	Determinação da atividade enzimática	33
3.3	Determinação de proteína total	34
3.4	Configurações das membranas utilizadas	35
3.5	Limpeza da Membrana	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Fluxo do permeado	38
4.2	Recuperação da atividade enzimática	42
4.3	Proteína total	49
5	CONCLUSÃO.....	51
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	53
7	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

O uso de enzimas nos mais diversos ramos da indústria, tem ocasionado aumento da comercialização das mesmas devido ao potencial que representam no que tange a aceleração de reações sem alterar o equilíbrio cinético. Tal potencialidade está diretamente relacionada ao crescimento de trabalhos focados em desenvolver novas tecnologias de obtenção e purificação das mesmas (MARDANI *et al*, 2018).

Podendo ser definidas como moléculas de natureza proteica, sabe-se que as enzimas têm por principal característica a sua atividade catalítica que torna célere as reações das quais participam, sem que o equilíbrio seja afetado e sua descoberta, em meados do século XIX, teve como marco estudos direcionados a desvendar os fenômenos envolvidos na digestão de alimentos (LEHNINGER, 1993; MORGADO, 2013).

Nesse sentido, as amilases apresentam grande importância biotecnológica, pois encontram aplicações nas indústrias têxteis, de papel e celulose, de bebidas destiladas e fermentadas, na panificação, na liquefação e sacarificação do amido voltadas para a produção de vitaminas, aminoácidos, antibióticos na indústria farmacêutica e química (TORRES, LEONEL e MISCHAN, 2012).

A exploração das amilases seja em processos laboratoriais, industriais ou comerciais, é motivado pela elevada especificidade para o substrato amido, que acarreta na alta seletividade do produto e incentiva a expansão do uso dessas moléculas em novos campos, agregando-lhe alto valor biotecnológico (WANDERLEY *et al.*, 2011).

Segundo dados divulgados pela Novozymes Latin America LTDA, empresa dinamarquesa líder mundial em produção e comercialização de enzimas, a corporação atestou que em 2016 o mercado de enzima industrial tinha um valor aproximado de US\$ 2,2 bi com uma quota de mercado acima de 47%, estando presente em diversas indústrias como a de detergentes 33%, alimentos & bebidas 26%, bioenergia 17%, agricultura e ração animal 16%, enzimas técnicas e farmacêutica 8%. Especificamente as amilases, são atuantes na produção de etanol de amiláceos (muito promissor com o advento dos biocombustíveis), de xaropes de açúcar em indústrias alimentícias, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras nas indústrias têxtil e de papel e produção de ciclodextrinas na indústria farmacêutica, dentre muitas outras utilidades (GUPTA *et al.*

2003; POLITZER *et al*, 2005; SIVARAMAKRISHNAN *et al*, 2005; TORRES *et al*, 2012, NOVOZYMES, 2016).

O emprego de materiais renováveis com vistas a preservação ambiental quando aliado a produção enzimática, é sempre visto com bons olhos, não sendo diferente na produção de amilases. Partindo do pressuposto de que a atividade industrial é a principal geradora de resíduos agroindustriais e que grande parte desses resíduos não é aproveitada, sendo muitas vezes descartada no meio ambiente podendo prejudicar à flora e à fauna ocasionando desequilíbrio de ecossistemas, o uso de resíduos agroindústrias representa não apenas a redução dos custos relativos aos insumos da produção de enzimas, mas também a redução no impacto ambiental (DICOSIMO, 2013; SHELDON, 2013).

Resíduos provenientes da mandioca envolvem folhas, caules, as cascas das raízes e em especial o líquido amarelado resultante do processamento da mandioca, a manipueira, que possui minerais, como fósforo, potássio, magnésio, açúcares fermentescíveis e nitrogênio, nutrientes indutores de crescimento de micro-organismos (DUARTE *et al*, 2012).

Tais resíduos figuram como fontes de baixo custo e que podem ser utilizadas como substrato ou fonte de carbono em processos fermentativos para obtenção de compostos de interesse industrial (BARRETO *et al* 2014; BRITO *et al*, 2015). Parte daí o interesse dos processos que envolvem tecnologia com baixo custo energético e a importância do conhecimento acerca de novas técnicas de produção enzimática, uma vez que envolvem menor impacto ambiental associado ao reaproveitamento de subprodutos da agroindústria de interesse biotecnológico (ZHAO *et al.*, 2008).

Referência quando se deseja estabelecer uma barreira física que separa duas fases, os processos de separação por membranas (PSM), mais especificamente a microfiltração (MF) e a ultrafiltração (UF), têm por características principais a facilidade de manuseio, a economia de energia, visto que não promove mudança de fase e separação de termolábeis, já que são operadas a temperatura ambiente, podendo ser aplicado em misturas termossensíveis (HABERT *et al*, 2006; KHOSRAVI *et al*. 2011, MIORANDO *et al* 2017).

Cabe frisar que os procedimentos que utilizam membrana ocasionam aumento na qualidade do produto final e considerando o alto preço da enzima, em específico a amilase, com valores que giram entorno de U\$ 265 por apenas 1g, o uso de tecnologia

menos invasiva a estrutura e funcionalidade enzimática torna-se indispensável (MOTA, 2012; NOVOZYMES, 2017; SHUKLA *et al.* 2013).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Amilase

A principal e destacável característica de uma enzima amilase reside no fato da sua capacidade de hidrolisar a molécula de amido gerando produtos diferentes como dextrinas, maltose, maltotriose e glicose que podem ser empregadas em variados industriais (WHITEHURST, 2010).

Essa capacidade de produção de substâncias distintas facilita a sua comercialização, haja vista que é requisitada na obtenção dos ácidos glutâmico, láctico e cítrico, além de ser influente na produção de sorbitol e etanol (KUMAR *et al.*, 2012; TIWARI *et al.*, 2015).

2.2 Produção de amilase

Data do início do século XX o interesse pela produção de amilases em larga escala, atribuindo-se a este fato a demanda industrial de glicose. Sabe-se que a partir dos estudos de Takamine (1914), foi desenvolvido o primeiro método para a produção microbiológica de enzima, utilizando insumos amilolíticos via fermentação em estado sólido, resultando deste pioneiro procedimento a α -amilase fúngica takadiastase.

Muito embora tenha sido processo pioneiro e levando em conta o fato de que os pesquisadores tenham se empenhado em introduzir processos de fermentação em estado sólido na produção de enzimas, a fermentação submersa (FSm) permanece como processo industrialmente mais utilizado para tal finalidade, devido à facilidade de manipulação e maior controle de fatores ambientais (HÖLKER *et al.* 2004, VENGADARAMANA, 2012)

Em termos de trabalhos científicos, a fermentação em estado sólido tem sido mais expressiva, Gonçalves (2006) por exemplo, decidiu por esse tipo de fermentação haja vista o emprego das cascas da mandioca servirem de suporte físico e nutricional para o desenvolvimento de tal processo, ao passo que Reis (2015) confrontou os resultados obtidos da FES com os resultados obtidos com FSm. Morgado (2013) e Silva (2008),

produziram e caracterizaram amilase a partir de um fungo em fermentação sólida, empregando o bioproduto em diferentes finalidades e que justificou a sua escolha pela variedade das fontes de nitrogênio nessa modalidade.

Em contrapartida, Vengadaramana *et al* (2012) otimizaram a produção de α -amilases por meio da fermentação líquida em escala de bancada e Oliveira (2017) afirma que utilizou resíduo agroindustrial líquido como fonte de nutrientes e meio de fermentação para uma cepa de bactérias do gênero bacilos, obtendo sucesso na recuperação de amilases em relação ao meio fluido.

Acerca da fermentação submersa, existem diversos fatores que afetam a produção de amilases, os mais significativos são pH, temperatura, aeração, composição do meio de crescimento, fonte de carbono e de nitrogênio, concentração de determinados sais e a idade do inóculo. Fica destacada a importância de proporcionar condições ótimas de crescimento para minimizar problemas e controlar o processo de produção e obtenção (GUPTA *et al.*, 2003; GHASEMI *et al.*, 2010; NWAGU, 2011).

Passin (2015) realizou testes de fermentação submersa utilizando cinco tipos de meios fermentativos líquidos, sem agitação, tendo as variáveis controladas visando diferenciar qual dos meios induziria mais expressivamente a produção das amilases. Silva *et al* (2017) fizeram um estudo comparativo entre a fermentação submersa agitada e a fermentação submersa estática com relação a produção de amilases fúngicas, relatando a maior facilidade do cultivo do micro organismo escolhido em meio líquido, aliado ao melhor controle de condições como pH, temperatura.

No tocante a escolha do micro-organismo produtor entre fungos ou bactérias para prospecção das amilases, se relaciona com fatores como a viabilidade e a disponibilidade do micro-organismo e sua potencialidade em relação a quantidade e a qualidade das enzimas produzidas (SIVARAMAKRISHNAN *et al* 2006). Em ambas formas de obtenção, é possível notar características peculiares como estabilidade térmica (70°C-15 minutos), labilidade ácida (todas são inativadas a pH 3,6 por curto tempo), e aumento da estabilidade na presença de íons de cálcio (REIS, 2015).

Conforme Soares *et al* (2010), as linhagens de *Aspergillus niger* empregadas em seu trabalho demonstraram destacável potencial na produção de enzimas amilolíticas em suas condições ótimas de cultivo, além de que as enzimas obtidas demonstraram atividade amilolítica acelerada.

Lotterman (2012), por sua vez utilizou bactérias *Cryptococcus flavus* expressas em *Saccharomyces cerevisiae* na produção de α -amilase, em seguida as caracterizou e purificou, obtendo resultados satisfatórios.

Uma linhagem das bactérias *Paenibacillus campinasensis* foi utilizado como micro-organismo produtor nos estudos de Reis (2015), obtendo características físico-químicas destacáveis em relação a solução enzimática bruta produzida.

2.3 Manipueira como fonte alternativa de carbono



Figura 1- Manipueira

Fonte: EMBRAPA (2015).

A manipueira, resíduo agroindustrial resultante do processamento da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), é um líquido altamente poluente, produzido em grandes volumes e nem sempre descartado da maneira adequada, acarretando em sérios problemas para comunidades circunvizinhas às casas de farinha e manufatura da raiz (SANTOS, 2008). Apesar do alto potencial poluente, a manipueira traz em sua composição média uma importante porcentagem de amido, fato este que motivou a utilização de tal resíduo na execução neste trabalho, na condição de meio líquido para desenvolvimento de bactéria produtora da enzima em destaque, a saber amilase.

Bonfim Rêgo *et al* (2019) avaliaram a produção de CMCase e pectinase utilizando uma linhagem de *Aspergillus spp.* cultivada sob fermentação estado sólido em

casca de café suplementada com manipueira enquanto que, Oliveira (2017) decidiu utilizar cepas de *Bacillus subtilis* com o intuito de estudar a produção de enzimas amilolíticas e mapear as melhores condições deste cultivo em manipueira, levando em conta a sua rica composição nutricional, conforme a Tabela 1.

Tabela 1- Principais componentes da manipueira

Componente	Teor
Amido	6,1
Enxofre total (mg/L)	0,010
Cobre total (mg/L)	0,021
Manganês total (mg/L)	0,500
Ferro total (mg/L)	0,701
Magnésio (mg/L)	33,2

Fonte: Oliveira (2017).

2.4 Aplicações das amilases

As amilases são requisitadas em um amplo leque de indústrias, especialmente a alimentícia, onde se destaca a panificação, produção de xaropes, farinhas e também nas cervejarias (SINDHU *et al.*, 2017; TIWARI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016). Esse fato faz com que tal enzima se diferencie no mercado mundial de enzimas haja vista sua representatividade chegue a alcançar 30% (ELMARZUGI *et al.*, 2014).

Todavia, dentre as inúmeras possibilidades de aplicações industriais e biotecnológicas das enzimas amilolíticas, a mais expressiva é a liquefação do amido quando da produção de bebidas alcoólicas (LOTTERMAN, 2012).

A degradação industrial do amido é usualmente iniciada pela α -amilase, seu uso torna mais eficientes os ingredientes, mais céleres os processos e por fim geram quantidades menores de resíduos. O emprego das enzimas amilolíticas na panificação por exemplo, aumenta o volume de massa, tornando o pão mais macio e o mantém fresco por mais tempo. Já no ramo das cervejarias, atuam na redução de concentração de álcool e na baixa de calorias, reduz o teor de enxofre na enologia, mantém o nível de clarificação,

melhora a qualidade da filtração. Enquanto que no setor de ração animal, aumenta a disponibilidade nutricional do alimento (LEE *et al*, 2013; AMID *et al*, 2014; SAGU *et al*, 2015; SPOHNER *et al*, 2015)

Cardoso *et al* (2011) e Morgado (2013), empregaram complexo que envolve α -amilase na suplementação de rações para frangos de corte, enquanto Gomes *et al* (2014) utilizaram a amilase para avaliar fibras insolúveis em detergente neutro em amostras com alto teor de amido. Pasin (2015), por meio da prospecção e purificação, fez a aplicação do extrato enzimático de glucoamilase de *Aspergillus japonicus* em processos de reciclagem de papel. Já no estudo de caso desenvolvido por Carvalho *et al* (2010), o objetivo da produção da alfa-amilase maltogênica estava voltado à sua aplicação no setor de panificação industrial.

2.5 Recuperação da amilase

Pelo fato de ter posição de destaque no cenário industrial, o valor final da amilase recuperada do seu meio de produção e purificada é bastante elevado e movimenta a economia mundial, dessa forma gerando preocupação em desenvolver processos menos onerosos, capazes de reduzir o tempo de produção e otimizar o rendimento, além de aguçar a busca por insumos sustentáveis na produção enzimática (REIS, 2015).

A recuperação de tal enzima a partir do fermentado onde se encontra, utiliza-se de princípios baseados em propriedades moleculares distintas, tais como solubilidade, hidrofobicidade, afinidade por outras moléculas, localização celular (endo ou extra), resistência a variadas temperaturas, carga elétrica (BARBOSA, 2011; MACHADO, 2015). Não existindo processo de recuperação com aplicação global, este é dividido em quatro etapas: clarificação, que consiste em na remoção de material insolúvel do meio de cultivo; concentração de baixa resolução (microfiltração); concentração de alta resolução (ultrafiltração) e por fim, procedimentos relativos ao melhoramento do acondicionamento do produto final, geralmente associado à cristalização (LUCARINI, 1998; NÓBREGA, 2005; PESSOA JR & KILIKIAN, 2008).

A Figura 2, mostra de maneira generalizada um fluxograma do processo de purificação e suas etapas básicas.

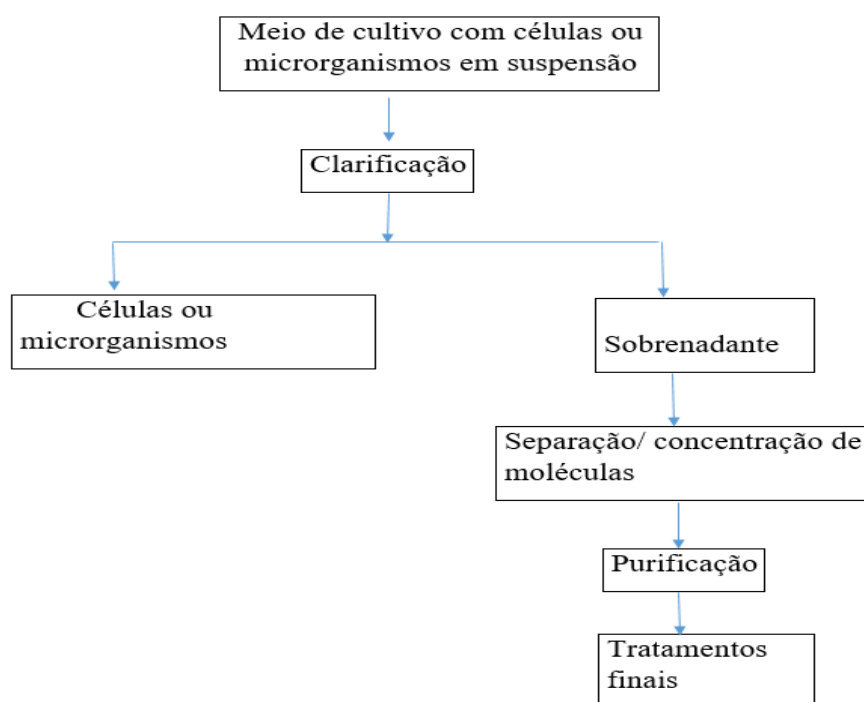


Figura 2- Etapas de um processo genérico de purificação

Fonte: Adaptada de PESSOA JR. & KILIKIAN (2008).

Ao mesmo tempo que buscam alcançar a pureza relativa das biomoléculas, os processos de purificação devem obedecer às normas e às exigências estabelecidas por agências reguladoras como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), no que diz respeito às características que devem ser preservadas no produto final, tais como limites relativos a cor e a quantidade residual permitida de impurezas, por exemplo, a depender da sua aplicabilidade.

Consoante os trabalhos de Pyle (1990), o processo de purificação exprime um certo grau de desafio em razão da dificuldade que é isolar o produto requisitado produzido a partir da cultura de células, que está muitas vezes diluído no caldo fermentado de alta proporção de água, em casos de fermentação submersa.

Tanto Sagu (2015) quanto Amid (2014) relatam que em cada uma das etapas de purificação perde-se uma porcentagem da capacidade de atividade enzimática então, visando minimizar estas perdas, é sensato escolher o menor número de procedimentos possível, bem como observar a eficiência de cada um deles antes de pô-los em prática, possibilitando por conseguinte melhora no rendimento e minimização de perdas.

O aperfeiçoamento de técnicas bem como o advento de novas tecnologias de separação e concentração, aliados às pressões econômicas para otimizar o processamento, tem ajudado a superar esse desafio. Nesses processos, o objetivo primeiro é o de preservar algumas características peculiares da enzima, como estrutura tridimensional, e por consequência disto, a sua atividade biológica.

Entretanto, para obter o resultado esperado, muitas vezes é de fato necessário que se aplique mais de um método de purificação e, dentre as técnicas utilizadas, os métodos de separação por membranas, como a ultrafiltração e microfiltração, fornecem resultados expressivos aos mais diversos objetivos.

Nesse sentido, Santos (2018) lançou mão da precipitação com sulfato de amônio seguido de centrifugação, assim como fez Barbosa (2011) para obter as enzimas, que empregou também a precipitação, porém associada ao sistema aquoso bifásico. Carreira (2003) utilizou para recuperação o método de precipitação por via do ácido tricloroacético (TCA) seguida da ultrafiltração com membrana.

Ruiz (2016) obteve seu concentrado enzimático por centrifugação seguida do sistema de ultrafiltração em membrana acoplado a uma bomba com variados níveis de agitação, repetindo esse processo para concentrar o extrato 2 vezes e então avaliar a atividade enzimática. Diferentemente, Pasin (2015) dialisou e em seguida submeteu amostras de concentrado de amilases a corrida em coluna de cromatografia de troca iônica DEAE- celulose, equilibrada com tampão tris-HCl 50 MM.

2.6 Processos de separação por membranas (PSM)

Habert (2006), afirma que membrana é uma barreira física atuante na separação de fases mediante retenção total ou limitada do transporte de determinada substância presentes nas fases, a Figura 3 aponta de maneira genérica como atua uma membrana, onde o fluído que consegue atravessar a membrana é chamado de permeado, e o fluído que fica retido pela membrana recebe o nome de concentrado ou retentado.

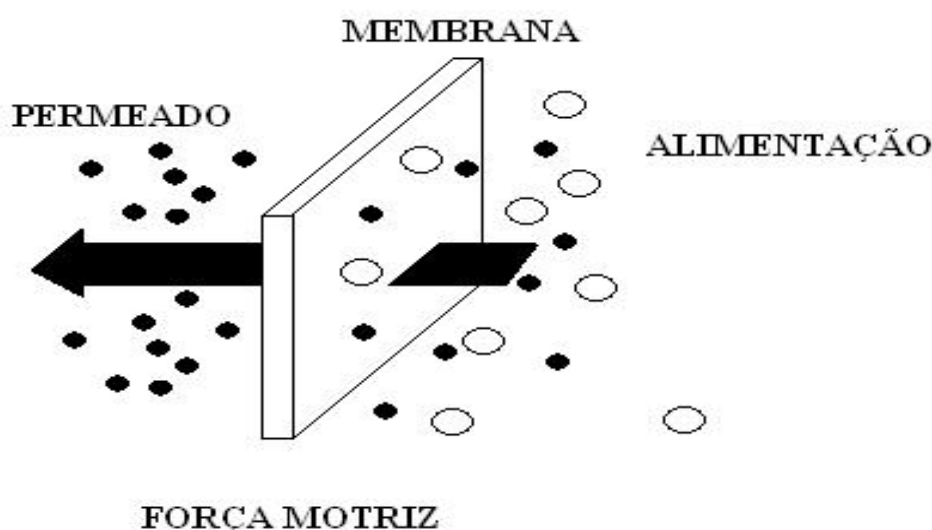


Figura 3- Definição de membrana

Fonte: Adaptada de APTEL & BUCKLEY (1998)

As forças que direcionam a passagem desse fluido podem ser a diferença de pressão, diferença de concentração, pressão de vapor. Pode ser classificado em: Microfiltração, Ultrafiltração, Nanofiltração e Osmose reversa, onde dada classificação é baseada no tamanho dos poros das membranas. Os PSM são requisitados em vários ramos da indústria com o objetivo de estabelecer certo grau de pureza dos produtos finais (PESSOA JR, KILIKIAN, 2005)

Partindo desse princípio, Amaral *et al* (2014) fizeram uma avaliação sobre o emprego de membrana de microfiltração (MF) no processo de remoção de fibras de efluente de branqueamento alcalino de polpa celulósica e definiram as melhores condições de operação da membrana de poli(éter imida) bem como apontaram, de acordo com os experimentos realizados, a eficiência do sistema para a remoção de sólidos suspensos como sendo de aproximadamente 99%.

Seguindo esse pensamento, Magalhães *et al* (2018) realizaram um trabalho que teve como objetivo principal a clarificação do extrato de pequi por meio de membrana de microfiltração posterior a centrifugação. A partir desse método, conseguiram purificar o caldo, haja vista a redução significativa do teor de sólidos totais e destacaram que o uso de membranas foi de suma importância para a clarificação do extrato de pequi, possibilitando posterior aplicação em alimentos e medicamentos.

Abreu e Figueiredo (2017) demonstraram que os processos de separação por membranas são de grande importância também na separação de macromoléculas, especialmente as proteínas que foram tratadas mediante a separação seletiva da membrana com gradiente de concentração como força motriz.

No trabalho de Nogueira e Venturini Filho (2007), caldo de cana foi clarificado por meio de membranas cerâmicas de microfiltração e de ultrafiltração, removendo assim variáveis importantes como a sua turbidez e cor, avaliando o fluxo do permeado. Em face disso, a Tabela 2 apresenta alguns exemplos importantes de uso das membranas em variadas áreas.

Tabela 2- Exemplos de aplicação dos PSM

Área	Aplicações
Química	Recuperação de H_2 ; Fracionamento do ar
Biotecnologia e Farmacêutica	Purificação de enzimas; Desidratação do álcool
Alimentícia e de bebidas	Concentração de leite; clarificação de cervejas
Tratamento de águas	Dessalinização de águas; Tratamento de esgotos
Medicina	Rim artificial; Pulmão artificial

Fonte: Adaptada de Habert *et al.*, (2006)

A partir de uma breve avaliação da Tabela 2, podemos constatar que o grau pureza enzimática pode variar de acordo as aplicações industriais onde são requisitadas, podendo ser secundário quando comparado aos custos, a exemplo do que ocorre na indústria alimentícia; ou primordial, quando a alta pureza do produto final é indispensável, obtendo enzimas em pequenas quantidades, como ocorre na indústria farmacêutica e na química fina. Sobre enzimas, sabe-se que estas moléculas são comumente purificadas ou por processos de uma única etapa como a cromatografia, ou mediante etapas seguidas e neste caso se encaixa a tecnologia de membranas.

Nos processos de produção que usam meios fermentativos submersos para obter enzimas, existe a dificuldade em recuperar os produtos finais desejados devido a labilidade e sensibilidade a variações de pH, temperatura e força iônica de tais moléculas. Além disso, sabe-se que uma bactéria pode produzir cerca de 5 mil diferentes substâncias em baixíssima concentração, de dimensões que variam entre alguns nanômetros a alguns milímetros. Esses motivos são suficientemente necessários para a indicação do uso dos PSM, que possuem como algumas vantagens a economia de energia, já que não ocorre mudança de fases; fracionamento de misturas termossensíveis, pois atua em temperatura ambiente; simplicidade do processo, que também é seletivo, separando moléculas do permeado (NÓBREGA *et al*, 2005; HABERT *et al*, 2006; MACHADO, 2015).

Os fabricantes de membranas, quando da venda do produto, fornecem variados dados especificadores do processo à exemplo da porosidade, permeabilidade hidráulica e curva de retenção, dados esses que indicam qual tipo de partícula ficará retido e qual permeará a barreira. A Tabela 3 exemplifica os PSM comerciais e suas principais características (HABERT *et al*, 2006)

Tabela 3- Membranas comerciais

Processo	Força Motriz	Material Retido	Aplicações
Microfiltração	ΔP (0,5- 2 atm)	Material em suspensão, bactérias	Esterilização bacteriana; Clarificação de vinhos
Ultrafiltração	ΔP (1-7 atm)	Coloides Macromoléculas	Concentração de proteínas; Recuperação de óleos
Diálise	ΔC	Moléculas de massa molar > 5000 Da	Hemodiálise; Recuperação de NaOH
Pervaporação de gases	Pressão de vapor	Líquido menos permeável	Desidratação de álcool

Fonte: Adaptado de NÓBREGA *et al* (2008).

Existe grande variedade de membranas que podem ser classificadas de acordo com a sua morfologia e força motriz empregada e cada uma dessas classificações se subdividem em muitas outras categorias (KASTER, 2009)

No âmbito deste trabalho, trataremos apenas da microfiltração e da ultrafiltração, que são membranas fabricadas em material sintético, com superfícies porosas, denominadas membranas de fibra oca e que trabalham mediante diferença de pressão como força motriz. Dentro dos aspectos supracitados, a Figura 4 expõe um esquema explicando de maneira simples como ocorre o fluxo no tipo de membranas empregadas (HARBERT *et al*, 2006)

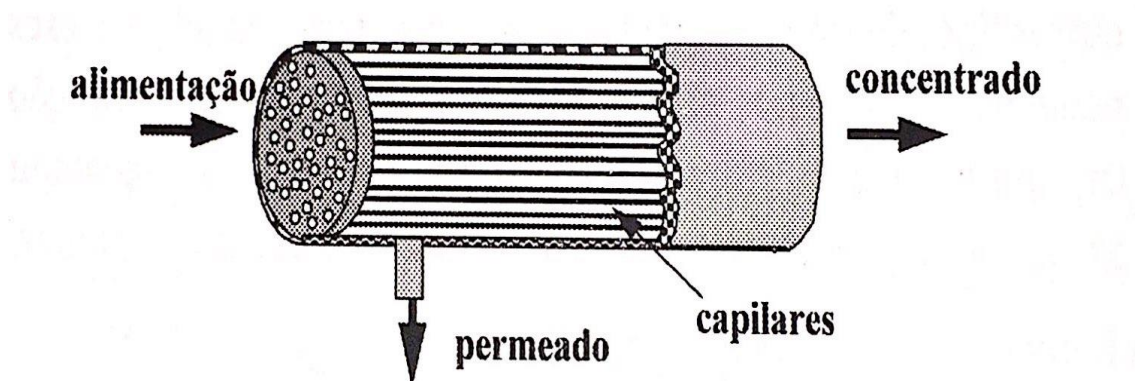


Figura 4- Processo simplificado de operação com membrana de fibra oca com capilares

Fonte: Adaptado de Habert *et al* (2006)

2.6.1 Fluxos em uma membrana

A retenção numa membrana pode ocorrer via dois mecanismos, ou *dead end*, tido como convencional ou *crossflow*, também chamado de tangencial; singelamente esquematizados na Figura 5 (BAKER, 2012; WESCHENFELDER, 2015; PESSOA JR. e KILIKIAN, 2005; CHERYAN, 1998)

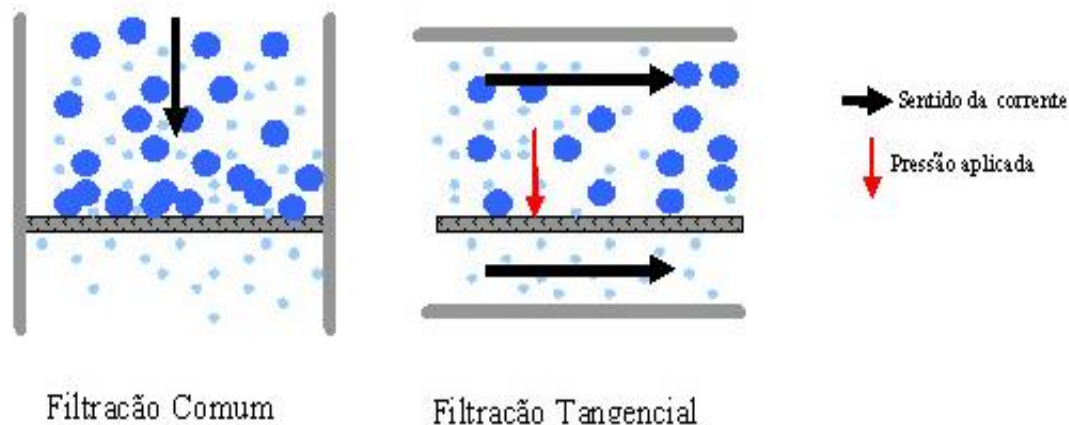


Figura 5- Membranas *Dead end* e *Crossflow*

Fonte: Adaptada de WGM sistemas, 2018

Os fitros *crossflow* possibilitam a passagem de duas correntes: uma paralela ao filtro, que arrasta os sólidos retidos, diminuindo o volume de torta formada; e uma segunda, purificada, que permeia a membrana (AQUINO, 2011).

Em contrapartida, nas operações *dead end*, uma corrente de fluido passa através do filtro e com o passar do tempo, acumulam-se sólidos sobre a superfície e no interior do meio filtrante, formando uma torta, obtendo assim uma versão clarificada do caldo submetido. Por conta desse acúmulo na superfície membranar, procedimentos relativos a retro lavagem são recomendados STURM (2012).

2.6.2 Fluxo do Permeado

O fluxo do permeado serve como medida da eficiência na recuperação da amilase e em processo de separação por membrana, observa-se que ao longo do tempo ocorre formação de incrustação sobre a superfície membranar, dificultando a transferência do produto que se deseja separar neste caso, as enzimas amilolíticas.

A expressão geral utilizada para calcular o fluxo do permeado, J_i , baseia-se na lei de Fick e é expressa pela Equação 1 (HABERT *et al*, 2006)

$$J_i = J_v C_i^m - D_i \frac{dC_i}{dz} \quad (1)$$

onde:

J_v : fluxo do solvente puro

C_i^m : concentração média do soluto entre os dois lados da membrana

D_i : coeficiente de difusão do soluto na fase líquida

C_i : concentração do soluto

Em contrapartida, o fluxo de permeado é diretamente proporcional à diferença de pressão e inversamente proporcional à soma de resistências ao escoamento, explicitado pela Equação 2 (MULDER, 2000).

$$J = \frac{\Delta P}{\mu R_T} \quad (2)$$

Onde:

J: fluxo permeado;

ΔP : diferença de pressão através da membrana;

μ : viscosidade do permeado

R_T : resistência total à transferência de massa através da membrana.

A resistência total, R_T , indica a soma de todas as resistências adicionais à filtração e é representada pela Equação 3 (MULDER, 2000).

$$R_T = R_a + R_b + R_m + R_g + R_{cp} \quad (3)$$

Onde:

R_T : resistência total;

R_a : resistência devido à adsorção;

R_b : resistência devido ao bloqueio físico de poros;

R_m : resistência da membrana;

Rg: resistência relativa à formação da camada gel;

Rcp: resistência devido ao fenômeno de polarização de concentração.

De acordo com o que diz Mulder (2013), durante o processo de microfiltração, o fluxo do permeado pode cair aproximadamente 5% quando comparado ao fluxo de água pura, fato esse que pode ser explicado por variados fatores, especialmente a polarização da concentração, em casos onde a filtração tangencial é empregada, além de outros fatores como o o entupimento dos poros.

2.6.3 Polarização da concentração

A polarização, que representa uma das resistências à passagem de fluxo, pode ser explicada como o acúmulo de soluto na superfície da membrana, gerando dessa forma gradiente de concentração entre a superfície da membrana e o seio do líquido, a partir do qual é criado um estado estacionário com a difusão do soluto de volta para o caldo inicial. (JONSSON E BOESEN, 1984). Pelo fato de ser muito comum nos PSM, os efeitos da polarização devem ser minimizados haja vista o gradiente de concentração gerado promover a redução do desempenho do processo de separação, além de aumentar a incrustação da membrana (WIJMANS, 2000).

Segundo Smith (2004), dentre as possibilidades existentes que objetivam a redução do efeito da polarização está o aumento da velocidade do fluido de alimentação e o emprego de módulos de membrana giratórios ou vibrantes.

Zare *et al.* (2013) aplicaram em seus trabalhos um modelo Euleriano-Euleriano com a finalidade de avaliar o comportamento da camada de polarização de concentração e concluíram que apesar de conseguir prever o comportamento da camada de concentração, pequenos ajustes no modelo seriam necessários para que haja precisão no fluxo do permeado.

Gu *et al.* (2017) fizeram importantes observações acerca da influência de variadas configurações de espaçadores no fluxo e na polarização de concentração em membranas. De acordo com o acompanhamento de quatro trançados diferentes de

espaçadores e diferentes ângulos entre os filamentos obtiveram conclusões positivas relacionadas aos espaçadores totalmente retorcidos em face a redução do efeito da polarização da concentração.

Partindo do mesmo princípio, Chaudhuri e Jogdand (2017) utilizaram um módulo de membranas giratório para observar o comportamento do efeito da velocidade de rotação na camada de polarização de concentração. Além disso, empregaram variação na velocidade de rotação e na pressão da alimentação, que demonstraram que acréscimos na velocidade de rotação contribuem para redução no efeito da polarização de concentração, ao passo que aumenta o efeito de mistura da solução. Todavia, chegaram à conclusão de que tais modificações exibem melhora aquém em relação ao fluxo de permeado da membrana.

2.6.4 Incrustação

De maneira geral, nos processos de separação por membranas ocorre queda contínua no fluxo permeado com o tempo, apontando que tal problemática é ocasionada por outros fenômenos além da polarização de concentração. Tais fenômenos causam alterações na superfície da membrana em virtude da composição da solução e podem dirimir o fluxo permeado a ponto de inviabilizar todo o processo (HABERT *et al.*, 2006)

A incrustação ou *fouling* é a denominação adequada para essas alterações, sendo tratada como um parâmetro importante no processo, haja vista que influencia de maneira negativa o processo de separação por membrana, sendo relatado como o principal percalço quando se trata desse tipo de tecnologia (SHAFIA *et al.*, 2017).

Fatores como o acúmulo de partículas de natureza orgânica ou inorgânica na superfície da membrana, entupimento dos poros e a adsorção de moléculas podem representar danos total ou parcialmente irreversíveis, tornando o *fouling* um fenômeno inevitável nos PSM e que podem acarretar na diminuição da vida útil da membrana, bem como na qualidade do fluido obtido. Sendo assim, a incrustação representa a principal resistência a transferência de massa através da membrana (MATIN, 2011, KWON; SHON; CHO, 2009, HABERT *et al.*, 2006).

Em razão de ser um fenômeno difícil de ser evitado, existem diversos tratamentos que objetivam a limpeza das membranas e proporcionam a redução da incrustação, ao passo que buscam agregar melhorias ao fluxo. Processos químicos, hidráulicos e mecânicos podem ser empregados, com a finalidade de reduzir a interação entre a superfície membrana e os solutos presentes na solução a ser permeada, todavia os processos de limpeza química são relatados como mais eficiente, já que existe grande variedade de agentes químicos que podem ser utilizados, a exemplo do ácido cítrico e do hidróxido de sódio (MOKHTARI *et al.*, 2017; SHAFIA *et al.*, 2017; RANA; MATSUURA, 2010).

2.6.5 Microfiltração (MF)

A microfiltração é o processo de separação via membranas que mais se assemelha a filtração clássica. Utiliza como força motriz baixa pressão para reter material em suspensão, bactérias e moléculas de massa molar maior que 500 kDa . É considerada como etapa inicial, uma espécie de pré-filtração, pois nesta etapa os filtros têm poros de dimensões relativamente discretas, na faixa entre 100 e 10.000 nm, por onde o solvente e todo material solúvel permeiam (HABERT, 2006)

Nessa lógica, Marangoni (2018) realizou avaliação acerca da eficiência do processo de microfiltração na clarificação e em substituição à pasteurização de cerveja artesanal. Seu trabalho analisou o fluxo de permeado em condições pré-estabelecidas, observando o rendimento do permeado, bem como a coloração do permeado, a partir desses dados pode constatar rendimentos entre 75% a 80% dentre as microfiltrações realizadas.

Em contrapartida, Cimini *et al.*, (2017) estabeleceram um ponto ótimo para microfiltração no processo de produção da cerveja, deduzindo que a clarificação da bebida em questão via PSM é de fato um processo válido no ramo de cervejarias.

A membrana de MF utilizada por Oliveira *et al.* (2012) filtrou suco de maracujá a partir de um módulo tubular e de fibra oca. Tal processo resultou em redução significativa no teor de sólidos solúveis, inclusive na cor e, consequentemente, na absorbância e propriedades de turvação do suco.

Lira *et al.* (2009) microfiltraram em seu trabalho o soro de leite de búfala objetivando estabelecer-lo como processo de pasteurização e os resultados apontaram

redução expressiva na concentração de micro-organismos, o que serviu para destacar tal processo como sendo eficiente.

2.6.6 Ultrafiltração (UF)

Acerca das principais diferenças entre os processos de microfiltração e ultrafiltração, pode-se dizer que não são observadas grandes divergências. Todavia, é importante frisar a diferença entre o diâmetro de poros e, também, a necessidade do emprego de maior pressão com vistas a promover a separação ou concentração de macromoléculas.

De posse dessa informação, temos neste tópico um processo de fracionamento seletivo que visa reter macromoléculas em solução, seu filtro é permeado por solutos de baixa massa molecular já que os poros obedecem a ordem de 1 a 100 nm, bem menores quando comparados aos poros utilizados na microfiltração. Separam coloides, material particulado, micro-organismos e moléculas dissolvidas de alto peso molecular (OLIVEIRA, 2010; AQUINO, 2011)

Nóbrega *et al* (2008) ressaltam que o tamanho dos poros define a capacidade seletiva da membrana e neste caso, a ultrafiltração é caracterizada pelo uso do termo estrangeiro *cut off* para indicar o limite de retenção nominal do filtro, que se refere ao valor de massa molecular rejeitada em 95% pela membrana. Então, pode-se dizer que uma membrana com retenção de 15 kDa é capaz de rejeitar 95% das moléculas em solução com massa molecular de 15 kDa. Por ter poros mais fechados, a membrana de UF necessita de força motriz maior para obter o fluxo permeado, que apesar de sofrer incrustação e polarização de concentração, comumente está entre 150 a 250 L/h.m² (HABERT *et al*, 2006)

Proner (2018) modificou e caracterizou a superfície de membranas poliméricas comerciais de ultrafiltração para posterior avaliação de desempenho da filtração de solução aquosa de albumina do soro bovino.

Em termos de manutenção de atividade enzimática, Santos (2018) afirma ter conseguido potencial biológico satisfatório em relação a α -amilase e neurase, dentre várias outras moléculas biológicas que atuam sobre o leite de bubalino, das quais algumas

frações chegaram a alcançar valores percentuais entre 39,35 e 89,58%, assegurando que o método de ultrafiltração se mostrou eficaz no fracionamento de peptídeos.

Baptista (2013) comparou quatro membranas de ultrafiltração no procedimento de obtenção de extratos etanólicos da casca do *E. globulus*, e avaliou o desempenho individual de cada uma das membranas no tocante à rejeição de partículas, bem como a resistência total e o comportamento em relação a lavagem química após o procedimento.

Molon *et al* (2012) buscou verificar a eficiência da ultrafiltração (UF) na concentração e purificação da enzima beta-galactosidase, levando em consideração o fluxo de permeado no processo e com isso, demonstrou a viabilidade do processo de ultrafiltração com membrana de 100 kDa. Os resultados apontam que houve concentração de volume superior a 7 vezes e recuperação da enzima alcançou 106,4%.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste tópico serão apresentados os métodos e as técnicas que foram utilizados para recuperar e concentrar enzimas amilolíticas, combinando microfiltração e ultrafiltração para tal finalidade. A fase experimental foi desenvolvida por completo nas dependências do Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABAM), situado na Universidade Federal de Sergipe, Campus de São Cristóvão.

3.1 Obtenção das enzimas amilolíticas em meio a manipueira

Fermentação submersa foi desenvolvida, tendo manipueira como fonte de carbono para o desenvolvimento do microrganismo escolhido. Foram utilizadas a metodologia e as condições ótimas empregadas para o cultivo do microrganismo, citada no trabalho de Oliveira (2017).

A manipueira utilizada em todos os experimentos foi oriunda de casa de farinha comunitária localizada no município de Itaporanga D'Ajuda, no estado de Sergipe o seu manuseio em laboratório iniciou-se com agitação vigorosa com vistas a liberação do cianeto de hidrogênio, sendo em seguida filtrada em gaze para remoção dos contaminantes físicos mais grosseiros, diluída na ordem de 1:1 objetivando a redução da concentração de cianeto, substância prejudicial ao desenvolvimento do micro-organismo produtor, esterilizada e por fim acondicionada sob refrigeração posterior uso como substrato na produção enzimática.

O micro-organismo empregado nos experimentos foi o *Bacillus subtilis*, previamente qualificado como produtor e isolado para o momento da inoculação em meio sintético.

A fermentação submersa dependeu do uso de 3 mL do inóculo adicionado a 30 mL da manipueira previamente tratada. Esse caldo foi então disposto em erlenmeyers de 125 mL e incubados em shaker da marca Certomart® BS-1 com agitação de 200 rpm durante 72 horas, sendo ao final desse prazo, armazenado sob refrigeração.

3.2 Determinação da atividade enzimática

A determinação dos valores referentes a atividade enzimática da amilase foi realizada mediante construção de uma curva de calibração da glicose, a partir da qual os valores da absorbância das amostras foram obtidos mediante método DNS apontado por Miller (1959). Tal método quantifica atividade sacarificante da enzima amilase, considerando a glicose como açúcar redutor padrão.

Para realizar a análise, 0,5 mL da amostra foi adicionado a 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, sendo essa solução incubada a 50°C durante 10 minutos.

Na sequência, ocorreu a adição de 1 mL do reagente DNS, uma solução composta 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, reagente DNS*. O preparo foi então aquecido em banho de ebulição durante 5 minutos, sendo direcionada para o resfriamento em banho de gelo e diluição em 10 mL de água destilada. O branco foi preparado de maneira similar, todavia o volume da amostra foi substituído por água destilada.

As soluções finais foram lidas em triplicata em espectrofotômetro da marca BELL Photonics 20000 UV a 540nm e as concentrações de glicose produzida foram associadas aos valores da curva de calibração de glicose versus absorbância, levando em consideração que uma unidade de atividade sacarificante por mL de enzima (U/mL) equivale a quantidade de enzima requerida para liberação de 1 μmol de glicose, por minuto nas condições do experimento.

*O reagente DNS é obtido, por sua vez, pela mistura entre 100 mL de solução A com 250 mL de solução B. A solução A consiste na adição de 5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico em 100 mL de NaOH (2M), ao passo que para obtenção da solução B foi necessário dissolver 150 g de tartarato de sódio e potássio em água destilada e completar com água destilada até o volume de 250 mL.

3.3 Determinação de proteína total

A determinação da concentração de proteína total seguiu o método descrito por Bradford (1976), que utiliza reagente de nome idêntico, ocasionando mudança de coloração do castanho claro para tons de azul, de acordo com a concentração de proteína na amostra a ser testada, mediante elaboração de curva de calibração. A curva de calibração utilizou concentrações conhecidas, permitindo assim a determinação da

concentração da proteína nas amostras analisadas para em seguida ocorrer o preparo das amostras para posterior análise.

Em um tubo de ensaio foram dispostos 0,5 mL de amostra, somado a 2,0 mL do reagente de Bradford e 7,5 mL de água destilada. Agitada, a solução final ficou incubada por 5 minutos em temperatura ambiente sendo em seguida utilizado o comprimento de onda 595nm para a leituras das amostras. Para o branco, foram utilizados 8 mL de água adicionado de 2 mL do reagente de Bradford, sendo a absorbância medida no mesmo comprimento de onda das amostras.

3.4 Configurações das membranas utilizadas

Foram utilizadas membranas de MF e UF em escala de bancada, operando mediante mecanismo *cross flow*, adquiridos da Pam-Membranas Seletivas, ambas de geometria de fibra-oca. A membrana de MF apresentava porosidade de 0,4 μm e material de produção polieterimida, ao passo que a membrana de UF apresentava retenção molar de 50 quilodaltons (kDa) e material de produção polietersulfona (PAM-MEMBRANAS, 2012). O procedimento foi conduzido com recirculação total para verificar o comportamento das membranas na recuperação da amilase e também para possibilitar a coleta das amostras para análise, por meio do fator de concentração. A Figura 6 mostra de forma genérica como era o funcionamento dos equipamentos utilizados na microfiltração e na ultrafiltração.

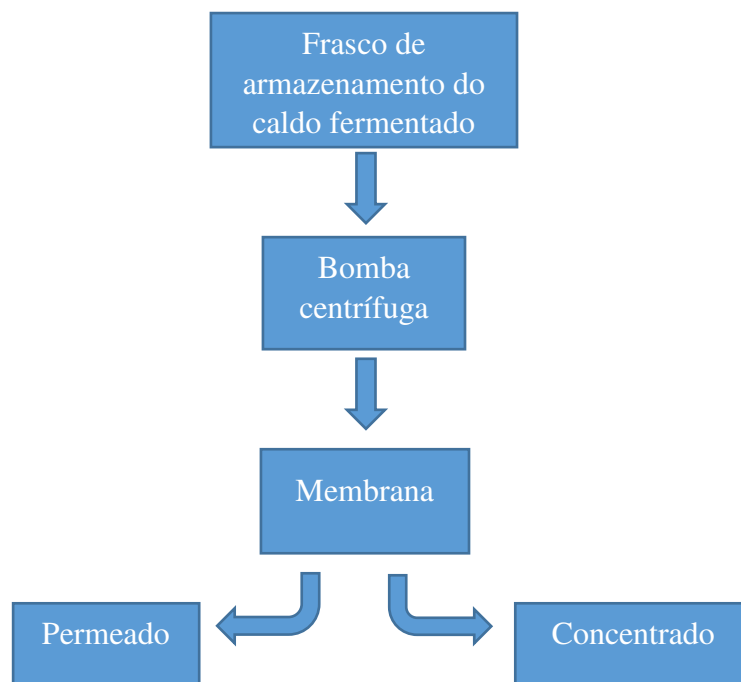


Figura 6- Esquema genérico da estrutura utilizada nos processos de microfiltração e ultrafiltração

A área total do módulo da membrana de microfiltração foi de $0,03 \text{ m}^2$, ao passo que a membrana de ultrafiltração tinha área de $0,05 \text{ m}^2$. As enzimas amilolíticas foram concentradas operando ambas membranas nas pressões de 500; 1000 e 1500 N/m^2 , com o propósito de estudar a influência da pressão no fluxo e na retenção de compostos. Além disso, ocorreu variação controlada da vazão nos valores de 8, 18 e 28 mL/s em temperatura ambiente.

Para dar início ao processo de recuperação da amilase, em cada filtração o volume de 300ml de caldo fermentado foi adicionado ao frasco de armazenamento e foram realizados os devidos ajustes relativos a pressão transmembranar e vazão no sistema. Ao final da operação de filtração, 180ml do caldo permeado rico em enzimas foi coletado, levando em consideração que foram pré-determinados volumes de coleta específicos e sequenciais para cada filtração, obedecendo a ordem de 30ml, 40ml, 40ml, 20ml, 20ml, 10ml, 10ml, 10ml, com a finalidade de analisar os dados relativos ao fluxo permeado ao longo do tempo.

Ao longo dos experimentos, 5 alíquotas de 3ml foram coletadas do caldo concentrado e também do permeado em momentos diferentes da filtração para fazer um comparativo entre a recuperação da atividade enzimática presente nos dois fluidos. Essas

retiradas ocorreram antes do início da filtração e durante a primeira, terceira, quinta, sétima e oitava coleta de permeado e também do concentrado. Ao final do processo de microfiltração também foram retirados 3ml do permeado total.

Finalizados os ensaios de MF, o permeado deste processo foi submetido à condição idêntica, porém, agora ao processo de ultrafiltração, sendo coletados volumes iguais e número de amostras nos mesmos pontos do processo de microfiltração, todavia, o fluido de interesse final dessa vez era o concentrado.

3.5 Limpeza da Membrana

Ao final de cada filtração, foi necessário realizar a limpeza da membrana, que consistiu em permear aproximadamente 8 litros de água destilada no sentido normal de operação, sem utilizar a recirculação e sem pressão.

Como complemento, ao final de todo o procedimento fez-se necessário empregar a operação de retro lavagem com volume de água destilada idêntico ao da etapa anterior, para que o fluxo permeado de água ao fim da lavagem alcançasse mesmo valor do fluxo permeado antes do início da filtração, tendo assim o fluxo inicial do permeado recuperado.

Pelo fato de o fluxo através da membrana ter sido recuperado apenas com a passagem dos 8 litros de água destilada, não foi necessário utilizar procedimentos mais severos para a limpeza das membranas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

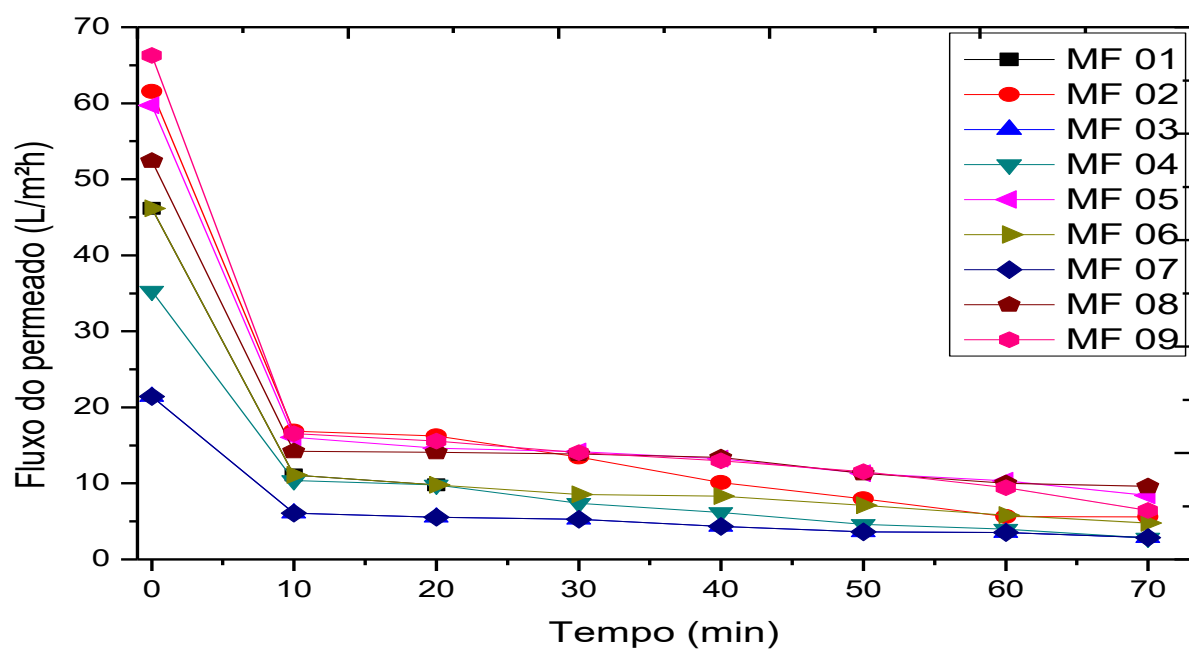
4.1 Fluxo do permeado

Para facilitar a compreensão, cada experimento de microfiltração foi indicado pela sigla MF seguida do seu número de ordem de realização e o mesmo ocorreu com as ultrafiltrações, que foram indicadas pela sigla UF conforme explicita a Tabela 4.

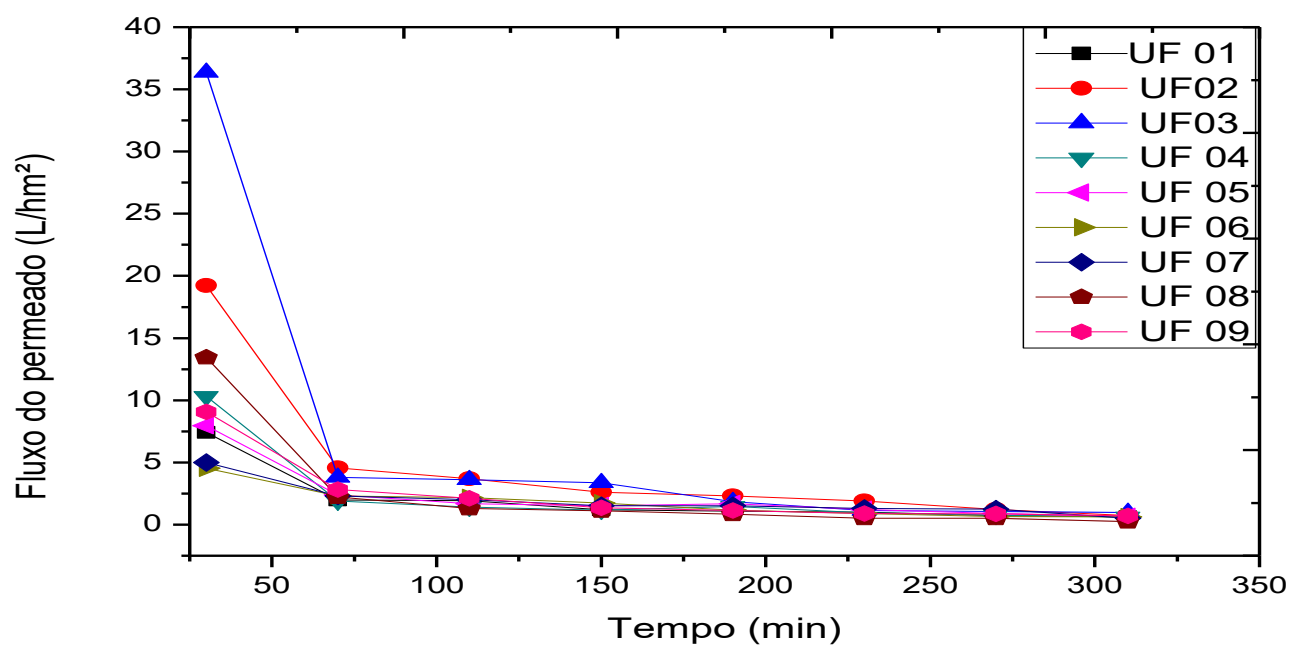
Tabela 4- Condições experimentais utilizadas

Microfiltração	Ultrafiltração	Pressão (N/m^2)	Vazão (mL/s)
MF01	UF01	500	8,00
MF02	UF02	500	18,00
MF03	UF03	500	28,00
MF04	UF04	1000	8,00
MF05	UF05	1000	18,00
MF06	UF06	1000	28,00
MF07	UF07	1500	8,00
MF08	UF08	1500	18,00
MF09	UF09	1500	28,00

Nesse sentido, a Figura 7 mostra que todos os experimentos desenvolveram o comportamento típico daqueles que ocorrem nos processos de separação com membrana, onde ocorre o declínio do fluxo permeado em relação ao tempo no início da filtração do caldo fermentado.



a)



b)

Figura 7- Comportamento do fluxo permeado em função do tempo de filtração nas operações com membrana à temperatura ambiente: a) MF, b) UF

Observa-se também na Figura 7, que a principal diferença entre os comportamentos de MF e UF reside no fato de que o tempo de operação dos experimentos de ultrafiltração foi muito maior quando comparado ao tempo gasto nas microfiltrações. Sabe-se que isso ocorreu pelo simples motivo de que nos PSMs que utilizam UF, os poros das membranas têm tamanhos muito reduzidos, dificultando o permeio das substâncias contidas no fluido e requisitando aplicação de valores mais elevados de pressão para favorecer a fluidez, haja vista o seu objetivo de retenção de macromoléculas.

Quando consideramos a queda no fluxo, fica evidenciado que tal situação ocorre em ambos processos, sendo tal fato explicado especialmente pela polarização de concentração que ocasiona o fato do primeiro ponto de cada um dos experimentos obter fluxo destacado em relação aos subsequentes. Partindo desse princípio, Reinehr (2015) associa dois mecanismos principais à redução do fluxo do permeado, a saber, o bloqueio dos poros, que causa o declínio inicial, sendo seguido pela formação de torta, que a longo prazo também ocasiona a diminuição do fluxo.

Acerca dos fluxos médios permeados de cada microfiltração, tais informações estão dispostas na Tabela 7, de onde observa-se que nas microfiltrações 09, 05 e 08 nas quais foram empregadas as pressões transmembranares de 1500, 1000 e 1500 N/m^2 , respectivamente, ocorreram os melhores resultados em termos de média de fluxo permeado, demonstrando que o aumento da pressão afeta significativamente a variável requerida, isto é, o fluxo permeado, o que pode significar que a amilase é impulsionada a ultrapassar os poros com o emprego de maiores pressões, levando em consideração as MFs.

Por outro lado, comportamento diferente pode ser notado em relação as ultrafiltrações, onde fica evidenciado que em baixas pressões os valores do fluxo permeado são mais expressivos. Então, pode-se relacionar o aumento de pressão nas membranas de ultrafiltração como um fator inibidor da atividade amilolítica, uma vez que tal acréscimo pode ter causado prejuízos estruturais as amilases como a sua fragmentação durante o permeio do caldo de alimentação.

Tabela 5-Valores médios do fluxo permeado

Microfiltração	Fluxo Médio Permeado (L/h. m ²)	Ultrafiltração	Fluxo Médio Permeado (L/h. m ²)
MF01	12,70	UF01	1,99
MF02	17,17	UF02	4,53
MF03	16,58	UF03	6,52
MF04	10,04	UF04	1,76
MF05	18,48	UF05	2,25
MF06	12,70	UF06	2,32
MF07	6,58	UF07	1,92
MF08	17,36	UF08	2,37
MF09	19,11	UF09	2,52

Os resultados exibidos na Tabela 5 estão em consonância com o que Carvalho (2017) alcançou em seu trabalho, quando empregou membranas de microfiltração para remover celulose de efluente de lodo ativado, destacando uma pressão crítica de 0,75 bar como a ideal para recuperar a enzima desejada.

Com o objetivo de facilitar a percepção de como o fluxo do permeado foi afetado ao longo do tempo, determinou-se para cada um dos experimentos a redução relativa do fluxo do permeado (RRF) em termos de porcentagem utilizando a Equação 4

$$RRF = J_i - J_f / J_i \times 100 \quad (4)$$

onde, J_i e J_f correspondem ao fluxo inicial e corresponde ao fluxo final, respectivamente.

Os dados obtidos foram dispostos na Tabela 6, a partir da qual pode-se observar que a MF 08 e a UF 04 obtiveram a menor redução de fluxo permeado em termos de porcentagem, fato esse que pode ser explicado pelo emprego de alta e média pressão nos ensaios citados, respectivamente.

Tabela 6- Redução relativa dos fluxos do permeado ao longo dos experimentos de MF e UF

Microfiltração	RRF (%)	Ultrafiltração	RRF (%)
MF01	89,6	UF01	91,59
MF02	90,9	UF02	96,26
MF03	86,7	UF03	92,35
MF04	92	UF04	86,17
MF05	85,9	UF05	91,71
MF06	89,6	UF06	87,97
MF07	86,7	UF07	89,58
MF08	81,6	UF08	92,11
MF09	90,2	UF09	98,27

Também se fez necessária a avaliação do coeficiente de retenção ou rejeição, a partir do qual têm-se a representação a eficiência do processo e é calculado pela equação 5

$$\%R = \frac{X_f - X_i}{X_i} \times 100 \quad (5)$$

Onde

%R: rejeição

Xi: valor inicial do parâmetro no permeado

Xf: o valor final do parâmetro no permeado

4.2 Recuperação da atividade enzimática

Esta é a principal variável a ser acompanhada, haja vista que a cada etapa de recuperação e de concentração é possível que ocorra perda da atividade enzimática e caso o produto obtido não tenha atividade, estará desprovido de sua função catalítica.

Antes de demonstrar os resultados acerca desse tópico e partindo do princípio de que as enzimas são influenciadas pela presença de substâncias inibidoras ou ativadoras de sua atividade, a Figura 8 mostra uma destacável diferença entre as atividades de

amilase no concentrado e no permeado para um mesmo experimento, nesse caso, a título meramente exemplificativo, a MF 01 e a UF 01.

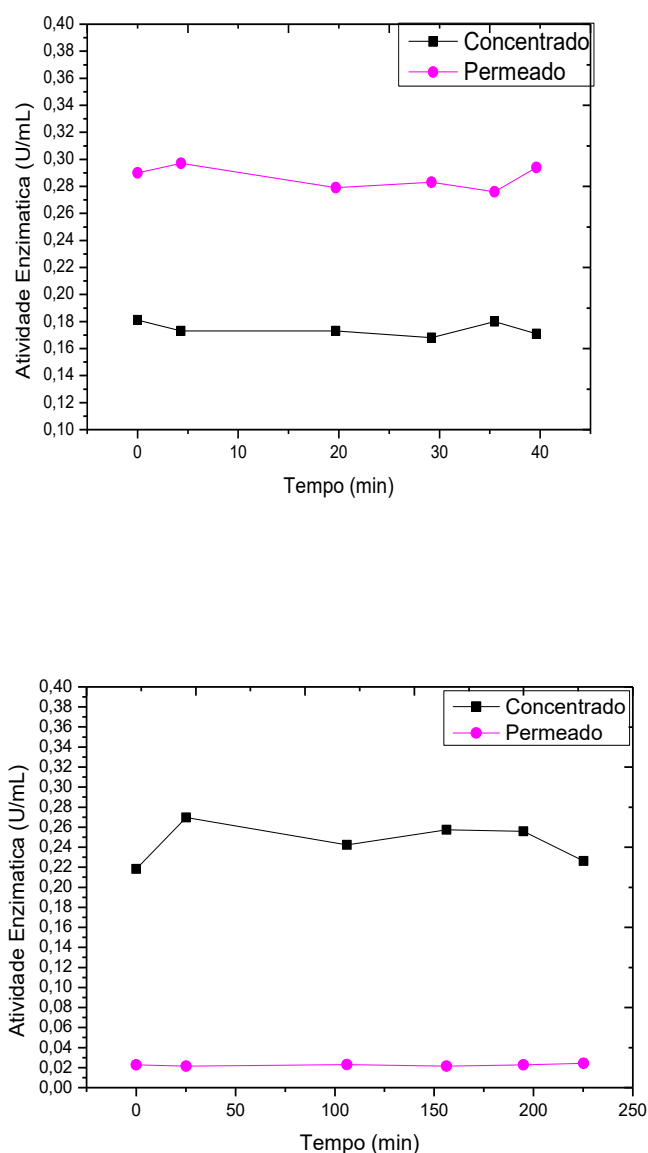


Figura 8- Comparativo entre atividade enzimática no concentrado e permeado em um mesmo experimento a) MF, b) UF

Tal diferença de concentração foi observada em todos os experimentos, sempre levando em consideração que os maiores valores de atividade enzimática para os PSM de MF estão no permeado, ao passo que nas UFs, as maiores atividades enzimáticas estão no caldo concentrado recolhido após a filtração.

De acordo com o que aponta Paludo (2018) e Bernardes *et al* (2017), a temperatura é um dos fatores altamente influenciadores no aumento da atividade para

amilases, especialmente acréscimos até o limite de 50 °C, todavia, como todos os processos foram operados a temperatura ambiente, podemos inferir que as diferenças encontradas podem não ter decorrido da variação desprezível de temperatura nos experimentos deste trabalho.

Por outro lado, Vyas e Sharma (2015) e Nwagu e Okolo (2011) afirmam que a atividade da α -amilase aumenta na presença dos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} , ao passo que Du *et al.* (2013) obtiveram resultados positivos para aumento na atividade devido a presença de Mn^{2+} . Ambos resultados podem ser explicados por conta da capacidade de interação que as enzimas amilolíticas têm com aminoácidos carregados (LINDEN *et al.* 2003) os íons citados acima, dentre vários outros.

Em contrapartida, Shah *et al.* (2014) perceberam que íons de Fe^{2+} inibem aproximadamente 50% da atividade amilolítica, bem como Ca^{2+} e Cu^{2+} .

Tais observações são totalmente aceitáveis dentro do escopo desse trabalho, haja vista o exposto anteriormente na Tabela 3, onde está a composição básica da manipueira, fluido que mistura todos os íons citados como ativadores, bem como os íons capazes de inibir a atividade enzimática da amilase.

Por este fato, no princípio do processo de microfiltração o caldo fermentado apresenta volume maior, onde estão inseridas diversas substâncias, inclusive as enzimas amilolíticas. Com o decorrer do experimento, obtêm-se volume reduzido contendo o produto desejado, haja vista o diâmetro da molécula ser diminuto em comparação ao poro da membrana.

Outrossim, o permeado da MF sendo empregado como caldo de alimentação da UF resultou num fluido de cor clara e pobre em substâncias de interesse, ao passo que o concentrado deteve em seu seio as enzimas amilolíticas com atividade enzimática positiva, que ficaram retidas pelos poros de tamanho aquém a sua massa molecular.

Acerca da eficiência dos processos, é importante salientar que foi avaliada de acordo com a recuperação da atividade enzimática (RA), a partir da qual é possível realizar comparação entre a atividade total no material purificado com a atividade total no caldo inicial. Além disso, também foi utilizado o fator de purificação (FP), que é um parâmetro capaz de comparar a atividade enzimática específica total no material

purificado com a atividade enzimática específica total no material bruto, que também foi calculado e ambos parâmetros são explicitados nas Equações 6 e 7 (BIAZUS *et al.*, 2010).

$$RA = \frac{\text{Atividade Enzimática Recuperada}}{\text{Atividade Enzimática Inicial}} \times 100 \quad (6)$$

$$FP = \frac{\text{Atividade Enzimática Específica Recuperada}}{\text{Atividade Enzimática Específica Inicial}} \quad (7)$$

Em face disso, a Tabela 7 exhibe os dados coletados referentes a recuperação da atividade enzimática, assim como os dados do fator de purificação de cada uma das MF.

Tabela 7- Recuperação da atividade enzimática (RA) e Fator de purificação (FP)

Microfiltração	RA %	FP
MF01	173,9	0,90
MF02	143,8	0,48
MF03	148,9	0,45
MF04	151,0	1,14
MF05	138,2	1,06
MF06	149,5	0,78
MF07	137,9	1,02
MF08	123,0	0,91
MF09	146,0	1,08

Diante dos dados coletados, percebe-se que em termos de microfiltração, o ensaio MF 04 obteve valor mais expressivo em termo de fator de purificação, 1,14, o que significa dizer que a combinação entre a vazão de 8 mL/s e a pressão de 1000 N/m² fornece melhores resultados sob esse aspecto, conseguindo recuperar a amilase com valores significantes de atividade enzimática. Isso também reforça a ideia de que aumentos progressivos na pressão e na vazão em sistemas de membranas não causam aumentos significativos na recuperação do produto desejado, haja vista que no experimento MF 04 foram utilizados valor intermediário de pressão e baixa vazão.

Em contrapartida, a MF 01 foi o experimento que alcançou melhor porcentagem em termos de recuperação da atividade enzimática. Isso pode significar que aumento na pressão e na vazão expõem a amilase a fatores prejudiciais a sua função biológica, como a degeneração da sua estrutura tridimensional, que por sua vez prejudica irreversivelmente a atividade amilolítica.

Os resultados obtidos encontram-se em consonância com resultados de Gonçalves (2016), que apontou a concentração do substrato de amido no caldo fermentado como potencial inibidor da ação enzimática da amilase. Tal consideração é, de fato plausível dentro do presente trabalho, uma vez que o substrato empregado como fonte de amido foi a manipueira.

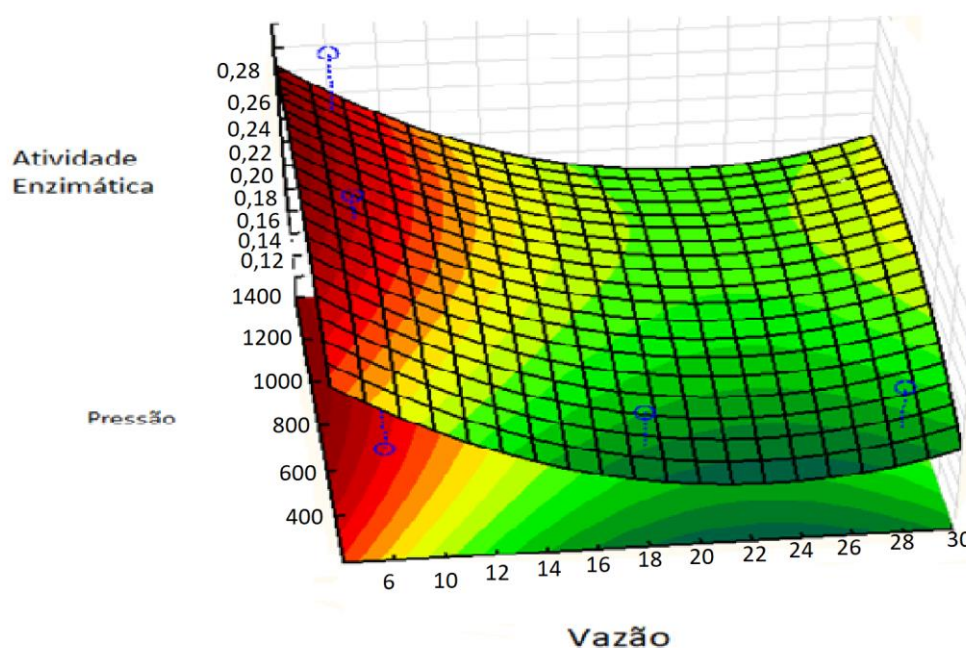


Figura 9- Superfície de resposta mostrando os pontos ótimos para recuperação da atividade enzimática na MF obtido via software STATISTIC 9.0.

Acerca das condições ótimas para a sensibilidade da variável resposta, que é a atividade enzimática, a Figura 9 evidencia que altos valores de pressão associados a vazões baixas são fatores que influenciam positivamente o processo de microfiltração, reforçando as ideias supracitadas.

Em termos de ultrafiltração, a Tabela 8 apresenta os valores percentuais de recuperação da atividade enzimática e do fator de purificação de cada um dos experimentos.

Tabela 8- Recuperação da atividade enzimática (RA) e Fator de purificação (FP) para a Ultrafiltração

Ultrafiltração	RA %	FP
UF01	8,20	0,70
UF02	8,97	0,85
UF03	21,34	0,45
UF04	42,66	7,73
UF05	9,04	3,46
UF06	18,31	2,89
UF07	15,46	0,89
UF08	21,10	1,54
UF09	12,30	3,89

O melhor resultado, se tratando de fator de recuperação da atividade amilolítica, ocorreu na UF 04, conseguindo recuperar 42,66 % contra o menor valor da UF 01, com 8,20% de recuperação. Nessa etapa do processo percebe-se o uso das vazões mais altas não influenciam positivamente na recuperação da atividade enzimática.

Acerca do fator de purificação, a associação entre a pressão de 1000 N/m² e vazão de 8 mL/s alcançaram os melhores resultados para a UF 04, indicando que para a vazão baixa o fator de purificação é mais significativo.

Tabela 9- Recuperação da atividade enzimática (RA) e Fator de purificação (FP) de amilases utilizando variados procedimentos de purificação

Técnica de purificação	RA %	FP	Autores
Precipitação Salina (NH ₄) ₂ SO ₄ (Sulfato de amônio)	4,18	5,0	(SIAN et al., 2005)

Precipitação salina (NH ₄) ₂ SO ₄ (Sulfato de amônio)	17,7	21,7	(AVCI et al., 2012)
Precipitação com solvente (Acetona) 50%	6	2	(ELBAZ; SOBHI; ELMEKAWY, 2015)

Fonte: Adaptado de Sanches (2019).

Observa-se de acordo com a Tabela 9, que tanto os valores referentes a recuperação da atividade enzimática quanto os valores referentes ao fator de purificação obtidos no presente trabalho estão em consonância com aqueles encontrados quando técnicas diferentes de purificação de amilases foram empregadas.

O uso de pressão mais elevada também fornece bons resultados nesse sentido, o que pode ser observado na Figura 10 que exhibe os pontos ótimos de obtenção da atividade enzimática para os experimentos de ultrafiltração, levando em consideração as variáveis empregadas no trabalho.

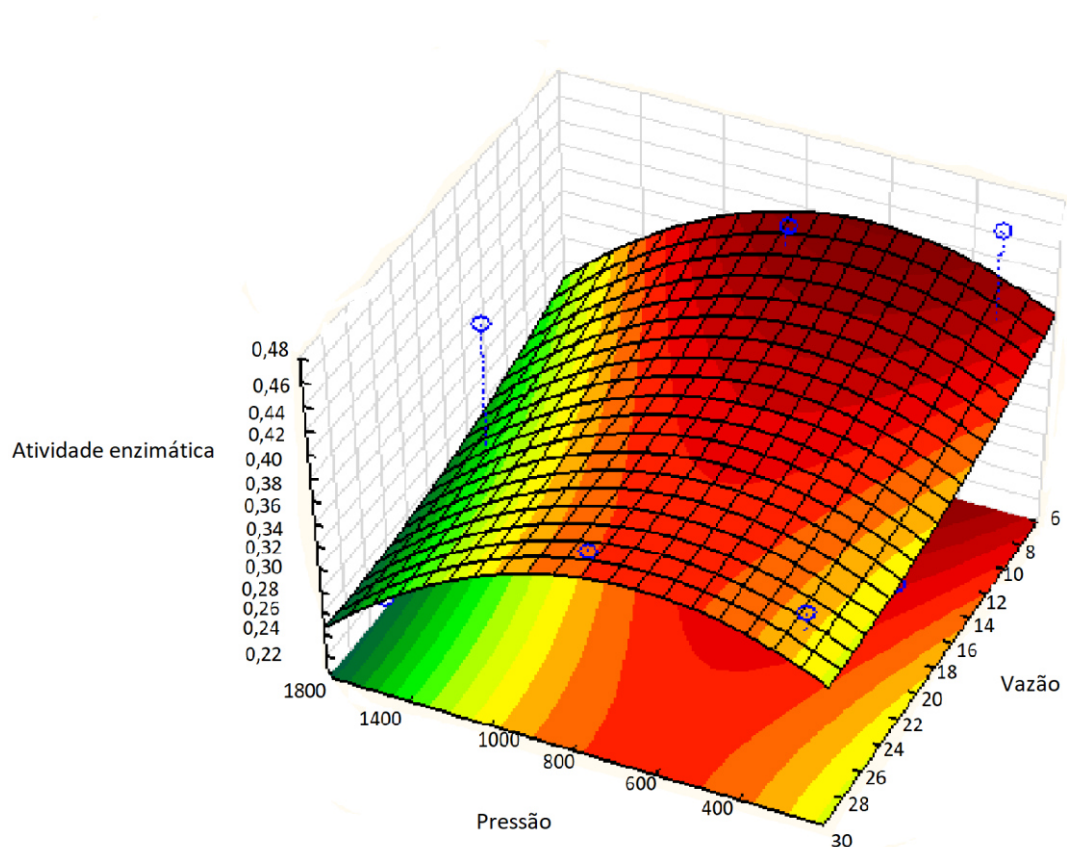


Figura 10- Superfície de resposta mostrando os pontos ótimos para recuperação da atividade enzimática na UF obtido via software STATISTIC 9.0.

4.3 Proteína total

Acompanhar a variação da concentração de proteína total durante os procedimentos é uma ação importante e necessária pelo fato de viabilizar a verificação de da transferência da amilase do concentrado para o permeado através do tempo de operação e das condições empregadas. A Figura 11 traz o comparativo entre as concentrações de proteína no concentrado e no permeado ao longo do tempo e observa-se o mesmo comportamento citado anteriormente acerca da atividade enzimática, haja vista na microfiltração nota-se maior presença da proteína no permeado, enquanto que na ultrafiltração a proteína está mais evidente no caldo concentrado. Tal constatação se dá independentemente da pressão de operação e da vazão empregadas na membrana, pois não houve variações significativas dos valores de proteína total ao longo de um mesmo experimento, considerando a corrente de permeado e a de concentrado individualmente.

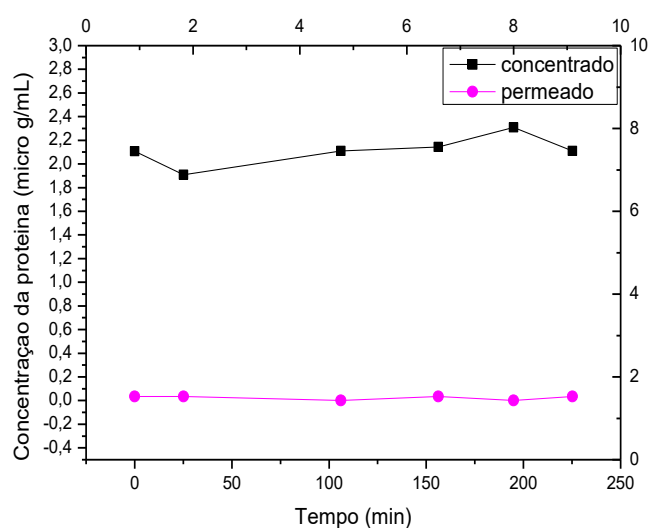
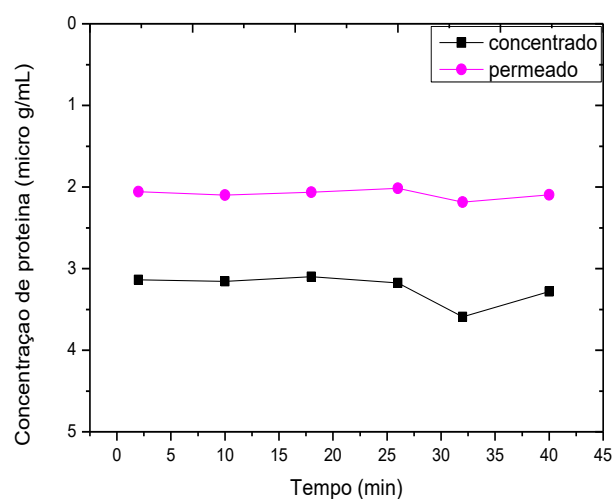


Figura 11- Comparativo entre a concentração de proteína no caldo concentrado e no caldo permeado ao longo do tempo, levando em consideração os experimentos 01 em ambos processos a) MF, b) UF.

5 CONCLUSÃO

O uso da manipueira pode ser considerado como uma técnica sustentável, possibilitando a redução de custos de produção de amilase, já que acaba influenciando diretamente na redução do impacto ambiental ao destinar esse subproduto da manipulação da mandioca como fonte de carbono para que o micro-organismo produza a enzima em questão. No contexto deste trabalho, o emprego do líquido residual advindo do processamento da mandioca foi de grande importância e serve de incentivo para que tal resíduo seja mais frequentemente utilizado com a finalidade de produção amilolítica.

Sobre o uso das membranas de microfiltração e ultrafiltração em conjunto, observa-se, de maneira geral, que as altas porcentagens de recuperação da amilase concentrada pela membrana de MF estão diretamente associadas ao fato de o procedimento ser operado em temperatura ambiente, o que é de grande importância para o mercado de enzimas, já que tais enzimas são termossensíveis. Por outro lado, essa mesma condição foi utilizada nos procedimentos de UF, então a principal diferenciação entre esses dois procedimentos se dá pelas variações de pressão e vazão, observando-se que nas microfiltrações que operaram mediante combinações entre valores baixos e intermediários de pressão e de vazão as amilases foram obtidas com atividade elevada, ao passo que na ultrafiltração, os melhores resultados vieram de experimentos que envolviam baixas pressões e vazão intermediária e alta. Tal acontecimento pode significar que altas pressões causam efeitos degenerativos na estrutura da enzima, como por exemplo a sua fragmentação, prejudicando ao final do processo a sua principal característica catalítica.

Outro fator importante é que a queda nos valores de atividade enzimática quando comparados os valores da MF com as dos experimentos de UF pode estar relacionada a possíveis interações físico-químicas entre o material do qual a membrana de ultrafiltração é constituída, no caso a polietersulfona, e os compostos presentes na corrente de fluido a ser processada.

Quedas no fluxo do permeado em ambos experimentos de filtração são extremamente difíceis de controlar, em especial no caso deste trabalho que utilizou manipueira como base para fermentação líquida, em virtude da presença de

macromoléculas que inevitavelmente causam o entupimento dos poros de ambos equipamentos, gerando acréscimo no tempo de operação do processo.

Então, em termos de recuperação da enzima amilase, fica evidenciado o potencial associado ao uso das membranas de microfiltração, devendo-se levar em consideração porém, a interferência causada nas amilases quando em contato com inibidores competitivos a exemplo dos sais Fe^{2+} , Ca^{2+} e Cu^{2+} que, por sua vez, estão presentes no caldo de alimentação à base de manipueira e que prejudicam a atividade amilolítica.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Realização de estudo relativo às interações físico-químicas entre os componentes químicos da manipueira e o material do qual é constituído a membrana.

7 REFERÊNCIAS

- ABREU, D. C. A.; FIGUEIREDO, K. C. de S. Separação De Proteínas De Uma Solução Salina Por Membrana De Diálise De Acetato De Celulose. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, [S.l.], v. 3, n. 7, p. 1023-1033, nov. 2017. ISSN 2527-1075. doi:<https://doi.org/10.18540/jcecvl3iss7pp1023-1033>.
- AMARAL, M. C. S. *et al* Avaliação Do Emprego De Microfiltração Para Remoção De Fibras Do Efluente De Branqueamento De Polpa Celulósica. **Eng Sanit Ambient** | v.18 n.1 | jan/mar 2013 | 65-74 p.
- AMID, M. *et al* Optimization of Processing Parameters for Extraction of Amylase Enzyme from Dragon (*Hylocereus polyrhizus*) Peel Using Response Surface Methodology. Serdang, Selangor: Hindawi Publishing Corporation **The Scientific World Journal**. p.1-12, 2014.
- APTEL, P.; BUCKLEY, C. A. Tipos de operaciones de membrana. In: BUKLEY, C. A.; HURT, Q. E. **Tratamiento del agua por procesos de membrana- principios, procesos y aplicaciones**. 1ªed 2º cap Madrid:, Mc Graw Hill, 1998. 17 p.
- AQUINO, A. **As diferenças entre nanofiltração, ultrafiltração microfiltração e osmose reversa**. Edição Nº 53 - Novembro/Dezembro de 2011 - Ano X .[on line]
- BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 588, 2012.
- BARBOSA, J. M. P. **Purificação e caracterização da lipase de: Bacillus sp. Itp-001**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processo). –Universidade Tiradentes, Aracaju, 2011.
- BARRETO, M. T. L. *et al* Desenvolvimento e acúmulo de macronutrientes em plantas de milho biofertilizadas com manipueira. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 5, p. 487-494, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662014000500004>.
- BERNARDES, A. V. *et al* Utilization of agroindustrial by-products for the production of α -amylase by *Rhizomucor miehei*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v8, n. 2, pg. 1439-1451, 2014. D.O.I. 10.3895/S1981-36862014000200012

BEZERRA, M. S. **Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIA 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.

BIAZUS, J.P. M. et al. Purification of amylases from Zea mays malt. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 218-223, 2010.

BONFIM RÊGO, A. P. *et al* Produção De Enzimas Cmcase E Pectinase Por Processo Fermentativo Utilizando Casca De Café Suplementada Com Manipueira Como Substrato. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.8, n.1, p. 104-121, 2019

BRADFORD, M. M.; **Anal. Biochem.** 1976, 72, 248.

BRITO, V. H. S.; SILVA, E. C.; CEREDA, M. P. Digestibilidade do amido in vitro e valor calórico dos grupos de farinhas de mandioca brasileiras. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 3, p. 185-191, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.2714>.

CARREIRA, R. L. *et al* Efeito da precipitação pelo ácido tricloroacético (tca) e da ultrafiltração sobre o perfil peptídico de hidrolisados de caseína. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. V.27, n.2, p.414-421, mar./abr., 2003

CARDOSO, D.M. *et al* . Efeito do uso de complexo enzimático em rações para frangos de corte. **Arch. zootec.**, Córdoba , v. 60, n. 232, p. 1053-1064, dic. 2011

CARVALHO, A. G. **A Convergência Entre Sustentabilidade Ambiental E A Rentabilidade De Processos Industriais Estudo De Caso Da Aplicação Da Enzima Alfa-Amilase Maltogênica Na Panificação Industrial.** Universidade Federal do Paraná, 2010.

CARVALHO, N. L. *et al*. Análise De Regressão Não Linear Aplicada A Dados Provenientes Do Tratamento De Efluente De Indústria De Papel E Celulose Por Meio De Ultrafiltração E Microfiltração. **O Papel** vol. 78, num. 6, pp. 88 - 93 jun. 2017.

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.

CHAUDHURI, A.; JOGDAND, A. Permeate flux decrease due to concentration polarization in a closed roto-dynamic reverse osmosis filtration system. **Desalination**, v. 402, p. 152-161, 2017. ISSN 0011-9164.

CHERYAN, M.; RJAGOPALAN, N.; Membrane Processing of oily stream. Wastewater treatment and waste reduction. **Journal of membrane Science**, v. 151, p. 13-18, 1998.

CIMINI, A.; FRANCESCO, G.; PERRETTI, G. Effect of crossflow microfiltration on the clarification and stability of beer from 100% low-b-glucan barley or malt. **Food Science and Technology**, v. 86, p. 55-61, 2017.

DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, 2013. DOI: 10.1039/c3cs35506c.

DU, F.; WANG, H. X.; NG, T. B. An amylase from fresh fruiting bodies of the monkey head mushroom *Hericium erinaceum*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 1, pg. 23-27, 2013.

DUARTE, A. *et al* Uso de diferentes doses de manipueira na cultura da alface em substituição à adubação mineral. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 3, p. 262-267, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662012000300005>.

EL-BANNA, T.E. *et al* 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

ELMARZUGI, N. A. *et al*. A amylase economic and application value. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v.3, n. 3, pg. 4890-4906, 2014.

FERNANDES, L. P. *et al*. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, p. 435, 2007.

GHASEMI, Y. *et al*. Halotolerant Amylase Production by a Novel Bacterial Strain, *Rheinheimera aquimaris*. Shiraz: **Research Journal of Microbiology**, v.05, n.02, p.144-149, 2010.

GOMES, D. I. *et al.* Utilização de enzimas industriais na avaliação da fibra insolúvel em detergente neutron em amostras com alto teor de amido. **Semina: Ciências Agrárias** [en linea] 2014, 35.

GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de alfa-amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas.** 2006. xiv, 76 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2006.

GONÇALVES, L. G. **Produção de amilases de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* e hidrólise enzimática do bagaço de mandioca visando a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*.** 2016. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro.

GU, B.; ADJIMAN, C. S.; XU, X. Y. The effect of feed spacer geometry on membrane performance and concentration polarisation based on 3D CFD simulations. **Journal of Membrane Science**, v. 527, p. 78-91, 2017. ISSN 0376-7388.

GUPTA, R.; *et al.* Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v.38, p. 1599-1616, 2003

GUZMÁN-MALDONADO, H., PAREDES-LOPES, O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. **Crit. Rev. Food Sc. Nut**, v. 35, p 373-403, 1995.

HABERT, A.C.; BORGES, C. P; NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas.** Rio de Janeiro: E-papers, 2006. 9 p.

HÖLKER U, HÖFER M, LENZ J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid state fermentation with fungi. **Appl. Microbiology Biotechnology**. 2004;64: 175-186.

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.

JONSSON, G.; BOESEN, C. E. 4 - Polarization Phenomena in Membrane Processes A2 - BELFORT, GEORGES. In: (Ed.). **Synthetic Membrane Process: Academic Press**, 1984. p.101-130. ISBN 978-0-12-085480-6.

KASTER, B. **Efeitos das condições operacionais na microfiltração do suco de maçã**. 2009. 83 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

KHOSRAVI, M.; *et al* Membrane process design for the reduction of wastewater color of Mazandaram pulppaper Industry, Iran. **Water Resour Manage**, v. 25, p. 2989-3004, 2011.

KWON, D. Y; *et al*. Experimental determination of critical flux in cross-flow microfiltration. **Separation and Purification Technology**, v.19, p.169-181, 2000.

KWON, B.; SHON, H.; CHO, J. Investigating the relationship between model organic compounds and ultrafiltration membrane fouling, **Desalination Water Treatment**, v. 8, p. 177 – 187, 2009.

LEE, Y.S.; *et al*. β -cyclodextrin production by the cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08: cloning, purification, and properties. **World Journal Microbiol Biotechnology**, v.29, p.865–873, 2013.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. v. 1. 2^a ed. 6. reimp. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1993, 262 p.

LINDEN, A.; *et al*. Differential regulation of a hyperthermophilic amylase with a novel (Ca, Zn) two-metal center by zinc. **J Biol Chem** 278:9875-9884, 2003.

LIRA, H. L. *et al*. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 33-37, 2009.

LOTTERMANN, M. T. **Purificação e Caracterização Estrutural de uma α -amilase de *Cryptococcus flavus* expressa em *Saccharomyces cerevisiae* “MFL”**. 2012, 64. Dissertação de Mestrado (Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

LOW, D., O’LEARY, R., PUJAR, N. S. Future of antibody purification. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 848, p. 48-63, 2007.

LUCARINI, A. C. **Purificação de amiloglicosidase produzida por *Aspergillus awaori* NR RL3112 por precipitação com etanol**. 1998, 179p. Dissertação (mestrado).São Paulo, 1998.

MACHADO, M. T. C. **Processos integrados para extração, clarificação e concentração de açúcares prebióticos a partir de resíduos de alcachofra**. 2015. 207p. (Tese) **Doutorado** (Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos- Universidade Estadual de Campinas, 2015.

MAGALHÃES, F. de S.; CARDOSO, V. L.; REIS, M. H. M. Clarificação De Extrato Aquoso De Pequi Utilizando Microfiltração. Simpósio de Tecnologia Ambiental e de Biocombustíveis De 23 a 27 de abril de 2018. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB**, Jaboticabal, v. 10, p. 109-113, 2018.

MARANGONI, A. B. **Avaliação da microfiltração como processo alternativo à pasteurização da cerveja artesanal**. 2018. 64 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2018.

MARDANI, T.; *et al.* **Immobilization of α -amylase on chitosanmontmorillonite nanocomposite beads**. *Biomac* (2018), doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.08.065.

MATIN, A., KHAN, Z., ZAIDI, M. Boyce, **Biofouling in reverse osmosis membranes for seawater desalination: phenomena and prevention**, *Desalination*, v. 281, p. 1 – 16, 2011.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIORANDO, T.; BRIÃO, V.B.; GIRARDELLI, L. **Eng Sanit Ambient** | v.22 n.3 | maio/jun 2017 | 481-490

MOLON, F.O *et al.* **Ultrafiltração de beta-galactosidase: viabilidade de processo**. 52º Congresso Brasileiro de Química. Recife- PE 2012.

MOKHTARI, S.; *et al.* Enhancing performance and surface antifouling properties of polysulfone ultrafiltration membranes with salicylate-alumoxane nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 393, p. 93–102, 2017.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MORGADO, H. S. **Produção e caracterização de amilase do fungo *Aspergillus awamori* e sua utilização em dietas para frangos de corte.** Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Goiás, 2013.

MOTA, V., F., T., B; **Biorreator com membranas anaeróbio de duplo estágio para o tratamento do vinhoto.** (Dissertação de mestrado em Saneamento, meio ambiente e Recursos Hídricos), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

MULDER, M. H. V. Chapter 2 Polarization phenomena and membrane fouling. In: RICHARD, D. N. e STERN, S. A. (Ed.). **Membrane Science and Technology: Elsevier, v. Volume 2**, 1995. p.45-84. ISBN 0927-5193.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology, center for membrane science and technology**, University of Twente, The Netherlands, 2000.

MULDER, J. **Basic Principles of Membrane Technology**. Springer Netherlands, 1996. ISBN 9789401708357.

NEVES, L. C. **Aplicação de microfiltração e ultrafiltração como pós-tratamento de efluente de lodo ativado em uma indústria de papel e celulose.** Irati, PR : [s.n], 2014. 77f. Dissertação (Mestrado) – área de concentração em Manejo Florestal de Recursos Florestais – Universidade Estadual do Centro-Oeste, PR.

NÓBREGA, R.; *et al.* **Purificação de Produtos Biotecnológicos.** 1ª ed., cap 5, Manole, 2005.

NOGUEIRA A. M. P., VENTURINI FILHO W. G. Clarificação de Caldo de Cana por Micro e Ultrafiltração: Comprovação de Viabilidade Técnica em Experimentos Preliminares. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 10, n. 1, p. 57-62, jan./mar. 2007

NOVOZYMES, novozymes.com 2017

NWAGU, T.N.; OKOLO, B.N. Extracellular Amylase Production of a Thermotolerant *Fusarium* sp. Isolated from Eastern Nigerian soil. Nsukka: **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, n.4, p.649-658, 2011

OLIVEIRA, R.C.; DOCE, R.C.; BARROS, S.T.D. Clarification of passion fruit juice by microfiltration: Analyses of operating parameters, study of membrane fouling and juice quality. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 432–439, 2012.

OLIVEIRA, T. F. **Tratamento de água de abastecimento público por sistema de separação por membranas de ultrafiltração: estudo de caso na ETA Alto da Boa Vista**, 2010, 95p. (Dissertação) Mestrado. (Engenharia Hidráulica e Sanitária). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

OLIVEIRA, T. S. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas utilizando resíduo agroindustrial (manipueira)**, 2017, 85. Dissertação de mestrado (Engenharia Química), UFS, São Cristóvão, 2017.

PALUDO, L. C. **Otimização da produção de enzimas amilolíticas por macromicetos para aplicação na indústria de alimentos**. 2018, 85. Dissertação de mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

PAM MEMBRANAS. **Manual de instalação, operação e manutenção**. Unidade de MF/UF/NF de bancada, 2012.

PASIN, T. M. **Prospecção, purificação e propriedades funcionais de uma glucoamilase de *Aspergillus japonicus*: aplicação do extrato enzimático em reciclagem de papel**. 2015. doi:10.11606/D.17.2016.tde-08092015-205130.

PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**, 1^a ed, Barueri – SP: Manole, 2008. 1-5; 95-97 p.

POLITZER, K.; *et al.* **Enzimas Industriais e Especiais** - Centro de Gestão e Estudos Estratégicos.

PRONER, M. C. **Caracterização De Membranas De Ultrafiltração Modificadas Pelo Método Mussel-inspired**, Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2018, 138 p.

PYLE, D. L. *Separations for biotechnology*. London: **Elsevier Science Publishers Ltd.**, 1990, 324p.

RANA, D.; MATSUURA, T. < **Surface modifications of Antifouling Membranes.pdf**> p. 2448–2471, 2010.

REINEHR, C. O. **Produção de lipases de *Aspergillus* spp. Por fermentação em estado sólido seguida de separação e concentração utilizando membranas**. Programa de pós-

graduação em engenharia de alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2015.

REIS, A. A. **Produção e caracterização de amilases bacterianas: α -amilase e ciclodextrina glucanotransferase (CGTase).** 2015. 108 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015.

RUIZ, S. P.; *et al.* **Biossíntese de enzimas industriais por Alicyclobacillus livres e imobilizados em diferentes matrizes e o emprego da ultrafiltração na concentração das enzimas.** XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática- ENZITEC 2016

SAGU, S.T.; *et al.* Extraction and purification of beta-amylase from stems of Abrus precatorius by three phase partitioning. **Food Chemistry**. v. 183, p. 144–153, 2015.

SANCHES, R. D. E. **Purificação e caracterização bioquímica da CGTase produzida por Paenibacillus campinasensis H69-3,** 2018. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, 2018.

SANTANA, J. R., **Aplicação Da Microfiltração Tangencial Na Recuperação Da Amilase.** Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Engenharia Química, 2018.

SANTOS, A. **Usos e impactos ambientais causados pela manipueira na microrregião sudoeste da bahia-Brasil,** 2008. Tese (doutorado), (Planificación Territorial y Gestión Ambiental), Universidade de Barcelona.2008.

SANTOS, M. F. dos. **Prospecção de bactérias produtoras de amilases para sacarificação de microalgas.** 2018. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, 2018.

SANTOS, W. L. dos. **Prospecção e avaliação das atividades biológicas dos peptídeos obtidos a partir da proteólise do caseinato de ruminantes.** 2018. 102 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SHAFIA, H. Z., *et al.* Organic fouling in surface modified reverse osmosis membranes: Filtration studies and subsequent morphological and compositional characterization, **Journal of Membrane Science**, v. 527, p. 152 – 163, 2017.

SHAH, I. J.; *et al.* Optimization for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using submerged fermentation technology. **BasiC Research Journal of Microbiology**, v. 1, n. 4, pg. 01-10, 2014.

SHELDON, R. A.; PELT, S. van. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, 2013. DOI: 10.1039/c3cs60075k.

SILVA, L. A. de F.; *et al.* Produção de amilase por fungo filamentosso endofítico em fermentação submersa. **Cad. Ciênc. Agrá.**, v. 9, n. 3, supl. 1, p. 49–53, 2017 - ISSN 2447-6218

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. α -Amylase. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering - Production, Isolation and Purification of Industrial Products**, 2017. DOI: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00001-4.

SHUKLA, K.S.; *et al.* Membrane filtration of chlorination and extraction stage bleach plant effluente in Indian paper Industry. **Clean Techn Eviron Policy**, v.15, p. 235-243, 2012.

SILVA, T. M., **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases do *Aspergillus nieveus***. 2008. Tese (doutorado) – Ribeirão Preto, 2009

SIVARAMAKRISHNAN, S.; *et al.* α - Amylases from microbial sources – an overview on recent developments. **Food Technology and Biotechnology**, Zabreg, v. 44, n. 2, p.173-184, 2006

SMITH, R. M. Encyclopedia of Separation Science, Ian D. Wilson (Editor-in-Chief), Edward R. Adlard (Managing Technical Editor), Michael Cooke, Colin F. Poole (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2000. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, n. 1–2, p. 243-244, 2004. ISSN 0021-9673.

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.

STURM, Pablo César. **Microfiltração: Filtração**. 2012. Disponível em: www.meiofiltrante.com.br.

SOUZA, S. D. O.; *et al.* 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.

SPOHNER, S.C.; *et al.* Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 202, p. 118–134, 2015.

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.

TAKAMINE, J. Enzyme of *Aspergillus oryzae* and the Application of its Amyloclastic Enzyme to the Fermentation Industry. New York: **The Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 1914.p. 824-828.

TIWARI, S. P.; *et al.* Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. **Journal of Global Biosciences**, v. 4, n. 1, pg. 1886-1901, 2016.

TORRES, L. M.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. **Ciência Rural** vol.42 no.7 Santa Maria July 2012 Epub June 19, 2012.

VENGADARAMANA, A.; BALAKUMAR, S; VASANTHY A. Production and Optimization of α -amylase by *Bacillus licheniformis* ATCC 6346 in Lab Bench-Scale Fermenter. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, 2 (1)p. 190-211, 2012.

VYAS, G.; SHARMA, N. Production and optimization of α -amilase from a novel termoalkalophilic *Bacillus sonorensis* GV2 isolated from mushroom compost. **Proc Indian Natn Sci Acad**, n 81, pg 1207-1221, 2015. DOI: 10.16943/ptinsa/2015/v81i5/48339.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Aspecto da produção industrial de enzimas. **Citino (Hestia)**, v. 1, n. 1, p. 30-36, 2011.

WESCHENFELDER, S. E.;*et al.* Oilfield produced water treatment by ceramic membranes: Preliminary process cost estimation. **Desalination** 360, p. 81-86, 2015.

WGM SISTEMAS, www.wgmsistemas.com.br/

WHITEHURST, R. J.; OORT, M. van. **Enzymes in food technology**. Blackwell Publishing Ltd., 2010.

WIJMANS, H. MEMBRANE SEPARATIONS | Concentration Polarization A2 - Wilson, Ian D. In: (Ed.). **Encyclopedia of Separation Science**. Oxford: Academic Press, 2000. p.1682- 1687. ISBN 978-0-12-226770-3.

WU, J.; GUAN, Y.; ZHONG, Q. Yeast mannoproteins improve thermal stability of anthocyanins at pH 7.0. Knoxville: **Food Chemistry**, v.172, p. 121–128, 2015.

ZHAO, X.; *et al.* Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkey*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 5, p. 405-412, 2008. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200700224>.

ZARE, M.; *et al.* CFD modeling and simulation of concentration polarization in microfiltration of oil–water emulsions; Application of an Eulerian multiphase model. **Desalination**, v. 324, p. 37-47, 2013. ISSN 0011-9164.

ZHANG, Q.; HAN, Y.; XIAO, H. **Microbial α -amylase: A biomolecular overview**. **Process Biochemistry**, 2016. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.11.012.