



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PAMERA DA SILVA SANTOS**

**PROSPECÇÃO, SELEÇÃO E APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS  
PROVENIENTES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*) NA  
PRODUÇÃO DE ETANOL POR SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO  
SIMULTÂNEAS DE MANIPUEIRA COM *Saccharomyces cerevisiae***

Salvador

2017

**PAMERA DA SILVA SANTOS**

**PROSPECÇÃO, SELEÇÃO E APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS  
PROVENIENTES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*) NA  
PRODUÇÃO DE ETANOL POR SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO  
SIMULTÂNEAS DE MANIPUEIRA COM *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof.Dr. Vitor Hugo Moreau

Salvador

2017

**PAMERA DA SILVA SANTOS**

**PROSPECÇÃO, SELEÇÃO E APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS  
PROVENIENTES DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*) NA  
PRODUÇÃO DE ETANOL POR SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO  
SIMULTÂNEAS DE MANIPUEIRA COM *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada como requisito para obtenção de título de  
Mestre em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade  
Federal da Bahia

Aprovada em 16 de Fevereiro de 2017.

Vitor Hugo Moreau da Cunha- Orientador \_\_\_\_\_  
Doutor em Química Biológica pela Universidade Federal do Rio de  
Janeiro  
Universidade Federal da Bahia

Samira Abdallah Hanna \_\_\_\_\_  
Doutora em Doenças Tropicais pela Universidade Estadual Paulista  
Júlio de Mesquita Filho  
Universidade Federal da Bahia

Marcelo Andres Umsza Guez \_\_\_\_\_  
Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade  
Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
Universidade Federal da Bahia

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo que me foi concedido. Obrigada Senhor, por me dar saúde e força pra chegar até aqui!

Aos meus pais, por apoiarem desde sempre minhas decisões e estarem comigo nos momentos que mais precisei ao longo dessa jornada.

Ao meu marido, por ter sido compreensivo nos períodos em que tive que ficar longe de casa e por sempre me acompanhar à UFBA (noites, finais de semana) quando precisei.

À minha filha, que fez minha caminhada muito mais feliz! O meu amor por você me impulsiona a seguir em frente, mesmo quando há obstáculos pelo caminho. Te amo!

Aos meus amigos, pelos conselhos e momentos de descontração, os quais me ajudaram a acalmar em momentos de pressão.

À UFBA que possibilitou a minha formação, cedendo a estrutura física necessária e os melhores professores.

Ao meu Orientador Vitor Hugo Moreau, pela paciência, apoio e confiança, fundamentais para que eu chegasse até aqui.

À professora Samira Abdallah Hanna, uma pessoa maravilhosa que me ajudou em todos os momentos que precisei, cedendo seus alunos e ensinamentos. Muito obrigada Sá!

Aos meus colegas do LABIMUNO e do Laboratório de Acarologia pela ajuda nos experimentos.

Aos meus colegas do LBI, por tantas ajudas e por todos os momentos de descontração e companheirismo.

A FAPESB e ao CNPQ pela concessão da bolsa e pelo incentivo financeiro e científico apostado em nossos projetos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse processo, deixo os meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A utilização de resíduos agroindustriais para obtenção de bioprodutos tornou-se uma prática cada vez mais valorizada, uma vez que além de agregar valor a uma matéria-prima subutilizada, também colabora com a prevenção de problemas ambientais associados à disposição dos mesmos no meio ambiente. A manipueira, resíduo líquido extraído da mandioca quando ela é prensada no processo de fabricação da farinha e altamente tóxico por conter alta concentração de ácido cianídrico em sua composição, pode ser aproveitada como matéria-prima amilácea para a obtenção de etanol de 2ª geração. Na produção de etanol a partir de manipueira é necessário o processo de hidrólise e sacarificação do amido presente, pois este carboidrato não é diretamente fermentável pela levedura necessitando de uma hidrólise prévia de suas cadeias, sendo fundamental o papel de algumas enzimas neste processo, como as amilases. O processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) se constitui como uma possibilidade para a obtenção de etanol a partir de amiláceos, uma vez que apresenta uma série de vantagens em relação aos processos realizados separadamente, como: menor complexidade e custo do processo, além de minimização dos riscos de contaminação e maiores rendimentos de hidrólise. Desta forma, este trabalho objetiva a seleção de bactérias amilolíticas que sejam capazes de crescer em condições de microaerofilia para que sejam testadas em processo de sacarificação e fermentação concomitantes da manipueira para produção de etanol. Dezoito morfotipos bacterianos foram isolados usando meio mínimo amido 1% (MMA 1%) como substrato, dos quais quatro morfotipos mostraram-se eficientes na produção de amilases em meio sólido, uma vez que apresentaram Índice Enzimático (IE) maior que 2. Entretanto, apenas um morfotipo apresentou eficiência na degradação de amido em meio líquido, sendo esta cepa identificada como pertencente ao gênero *Arthrobacter*, a qual foi testada na produção de etanol por sacarificação e fermentação concomitantes da manipueira, mostrando-se como uma cepa promissora no processo de sacarificação do amido presente na mandioca.

Palavras chaves: amilase; etanol; manipueira; biocombustíveis; fermentação; SSF

## ABSTRACT

Use of agro-industrial waste to obtain bioproducts has become an increasingly valuable practice, since beyond to add value to underutilized raw materials, it also helps to the prevention of environmental problems. The manipueira, liquid residue extracted from cassava during the process of manufacturing flour, can be approved such as material to obtain 2nd generation ethanol, despites its toxicity. In the production of ethanol from manipueira, it is necessary hydrolysis and saccharification of starch to take place, since manipueira starch is not fermentable by yeast, needing previous hydrolysis. Some enzymes are pivotal in this process, such as amylases. Simultaneous Saccharification and fermentation (SSF) is a process constituted as a possibility to obtain ethanol from starches, since it presents a series of advantages over separated processes, notoriously, lower complexity and cost, minimization of contamination risks, high hydrolysis yields, etc. The present work aims to perform selection of amyolytic microorganisms able to grow under microaerophilic conditions in order to be evaluated to perform concomitant saccharification and fermentation of manipueira, together *S. cerevisiae*, for the production of ethanol. Eighteen bacterial morphotypes were isolated using minimal media added by starch as only carbon source. Four morphotypes proved to be good amylase producers, but only one showed efficiency in the degradation of starch in liquid medium. Such strain was identified as belonging to the genus *Arthrobacter* and tested in the production of ethanol by concomitant saccharification and fermentation of manipueira.

Keywords: Amylase; Ethanol; Manipueira; Biofuels; Fermentation; SSF

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Aspecto da manipueira extraída em um sistema caseiro. ....	12
<b>Figura 2:</b> Emissões de gases de efeito estufa (GEE) evitadas no Brasil em 2012. ...	17
<b>Figura 3:</b> Esquematização do ciclo agro-bio-combustível-material-energia das biorrefinarias.....	18
<b>Figura 4:</b> Produção brasileira de etanol em 2012.....	20
<b>Figura 5:</b> Forma estrutural do amido .....	24
<b>Figura 6:</b> a) Estrutura química da amilose. b) Estrutura química da amilopectina....	25
<b>Figura 7:</b> Processo pré-fermentativo de amiláceos ( 2 vias alternativas). ....	32
<b>Figura 8:</b> Esquema das etapas de hidrólise e sacarificação do amido.....	33
<b>Figura 9:</b> Fermentação alcoólica .....	35
<b>Figura 10:</b> Esquema das etapas gerais realizadas no presente trabalho .....	38
<b>Figura 11:</b> Esquema do teste de antagonismo entre a cepa bacteriana e a levedura <i>Sachharomyces cerevisiae</i> . ....	49
<b>Figura 12:</b> Acessos bacterianos que apresentaram maiores IE para degradação de amido em meio sólido após 96h de crescimento. A) cepa LBI1404A, B) cepa LBI1414, C) LBI 1416, D) cepa 1401. ....	56
<b>Figura 13:</b> Crescimento bacteriano em MMA 1% a pH 7,0 e pH 5,5 em anaerobiose .....	56
<b>Figura 14:</b> Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. A- Marcador de peso molecular; B e C- Duplicatas do gene 16S rRNA da cepa 1401; D- Controle negativo .....	58
<b>Figura 15:</b> Árvore filogenética construída com base na sequência do gene 16S rRNA. Cepa 1401 identificada como <i>Arthrobacter sp.</i> .....	59
<b>Figura 16:</b> Dosagem de amido e açúcar redutor durante crescimento bacteriano em meio mínimo amido 1% em pH 6,7 .....	61

<b>Figura 17 :</b> Crescimento da cepa 1401 em placa contendo manipueira como substrato	63
<b>Figura 18:</b> Degradação de amido e aparecimento de açúcar redutor em caldo de fermentação contendo manipueira como substrato em pH 6,7	64
<b>Figura 19:</b> Manipueira autoclavada. Sólidos insolúveis ao fundo	65
<b>Figura 20:</b> Ausência de antagonismo entre a bactéria <i>Arthrobacter sp.</i> e a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
<b>Figura 21:</b> Consumo de açúcar redutor durante a fermentação alcoólica em manipueira pela <i>Sachharomyces cerevisiae</i> .	67
<b>Figura 22:</b> Liberação de gás carbônico após 24 horas de início do processo de fermentação alcoólica em manipueira	68
<b>Figura 23:</b> Sacarificação da manipueira pela bactéria e inóculo de levedura após 24 horas de crescimento bacteriano	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Concentração de alguns constituintes presentes da Manipueira .....	22
<b>Tabela 2:</b> Composição do meio YEPD .....	48
<b>Tabela 3:</b> Média dos Índices Enzimáticos dos isolados que apresentaram atividade amilásica relevante após 96 horas de crescimento em condições de anaerobiose ..	54
<b>Tabela 4:</b> Códigos atribuídos, morfologia e coloração de Gram dos isolados de mandioca que apresentaram os maiores IE após 96 horas de incubação. ....	55
<b>Tabela 5:</b> Aumento do número de leveduras ao longo da fermentação em manipueira.....	69

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo Geral .....	14
2.2. Objetivos específicos .....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
3.1 Biomassa e biorrefinaria .....	16
3.2 Etanol.....	19
3.3 Manipueira .....	21
3.4 Amido.....	23
3.5 Enzimas .....	26
3.5.1 Enzimas Amilolíticas .....	29
3.6 Hidrólise enzimática do amido .....	31
3.7 Fermentação alcoólica.....	34
3.8 Sacarificação e Fermentação Simultâneas para obtenção de etanol .....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	38
4.1 Coleta e preparação das amostras de mandioca ( <i>Manihot esculenta</i> ) .....	39
4.2 Plaqueamento e seleção das cepas bacterianas direcionado por substrato....	39
4.3 Verificação da atividade amilolítica em meio sólido .....	40
4.4 Identificação das cepas bacterianas pelo método de Gram.....	40
4.5 Determinação da capacidade de crescimento em meio líquido amido (MMA) 1% a pH 6,7 e pH 5,4.....	41
4.6 Identificação genética .....	42
4.6.1 Extração de DNA .....	42
4.6.2 Reação de PCR.....	42
4.6.3 Sequenciamento .....	43
4.7. Determinação de atividade amilolítica bacteriana em meio líquido contendo amido 1% como única fonte de carbono em pH 6,7 .....	44
4.7.1. Dosagem da concentração de amido em meio mínimo líquido contendo amido 1% como única fonte de carbono em pH 6,7 .....	44
4.7.2 Dosagem da concentração de açúcares redutores em meio mínimo líquido contendo amido 1% como única fonte de carbono em pH 6,7.....	45

4.7.3 Dosagem de atividade amilásica em meio mínimo líquido contendo amido 1% como única fonte de carbono em pH 6,7 .....	45
4.8 Determinação da capacidade de crescimento bacteriano em meio sólido com maniveira como substrato .....	47
4.9 Determinação de atividade amilolítica bacteriana em caldo de fermentação contendo maniveira como substrato .....	47
4.10 Teste de antagonismo entre bactérias e leveduras.....	48
4.11 Ensaios fermentativos.....	50
4.11.1 Fermentação apenas com a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em maniveira e em meio YEPD em pH 6,7 .....	50
4.11.2 Sacarificação e fermentação concomitantes de maniveira .....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
5.1 Seleção de microrganismos em meio sólido contendo amido como única fonte de carbono .....	53
5.2 Avaliação do potencial amilolítico em meio sólido .....	53
5.3 Caracterização das cepas através do método de Gram .....	55
5.4 Capacidade de crescimento das cepas bacterianas em meio líquido amido 1% a pH 6,7 e pH 5,5.....	55
5.5 Identificação genética .....	57
5.6 Avaliação da atividade amilolítica em MMA 1% a pH 6,7 .....	61
5.7 Capacidade de crescimento bacteriano em meio sólido com maniveira como sustrato ( pH 6,7) .....	62
5.8 Avaliação da atividade amilásica em caldo contendo maniveira como substrato ( pH 6,7) .....	63
5.9 Antagonismo entre bactéria ( <i>Arthrobacter sp.</i> ) e levedura ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	65
5.10 Ensaios fermentativos usando a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	67
5.11 Sacarificação da maniveira pela bactéria com consumo dos açúcares redutores pela levedura. ....	69
6. CONCLUSÕES.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## 1. INTRODUÇÃO

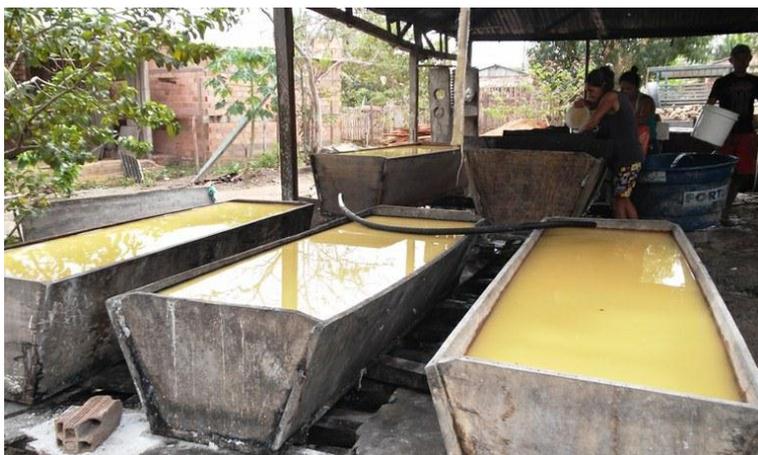
Atualmente a problemática ambiental é tema primordial e de grande relevância nas decisões econômicas. Neste contexto, o beneficiamento de resíduos agroindustriais para obtenção de bioprodutos tornou-se uma prática cada vez mais reconhecida, afinal a matéria-prima utilizada em tais processos provém de fontes renováveis. Dentre outras vantagens, o aproveitamento de resíduos provenientes da agroindústria ajuda a resolver problemas ambientais associados à disposição dos mesmos no meio ambiente, o que é de suma importância (CINELLI, 2012). O Brasil, por exemplo, produz uma média de 250 milhões de toneladas/ ano de lixo agrícola, portanto, a utilização adequada destes resíduos ajudaria a minimizar os problemas ambientais e energéticos associados a eles (ROBERTO et al., 1995; SOUZA e SANTOS, 2002). O desenvolvimento de processos biotecnológicos que aproveitem estes resíduos aparece com grande relevância devido à possibilidade de dar uma destinação final adequada aos rejeitos, ao mesmo tempo que agrega valor a uma matéria-prima subutilizada (CINELLI, 2012).

Um exemplo de cultura geradora de grande quantidade de resíduo é a da mandioca (*Manihot esculenta*), o que ocorre como consequência da alta produtividade da raiz ao redor do mundo. O Brasil, há pelo menos dez anos, situa-se entre os cinco maiores produtores mundiais de mandioca, também conhecida como macaxeira, aipim ou castelinha. Segundo Prado (2002), a mandioca é cultivada em todos os estados brasileiros, situando-se entre os nove primeiros produtos agrícolas do país em termos de área cultivada, e o sexto em produção. Em 2008, por exemplo, a produção mundial de mandioca totalizou 232,9 milhões de toneladas (FAO, 2010). No Brasil, além de ser utilizada como fonte de alimentação, a mandioca também é empregada como matéria-prima na agroindústria, sendo, portanto, produzida em todas as regiões do país (FELIPE et al., 2010). De acordo com o IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- a estimativa de produção da mandioca em 2014 no Brasil foi de 23,5 milhões de toneladas (IBGE, 2014).

Um dos principais produtos da mandioca é a farinha; seu uso é muito difundido em todo o país, fazendo parte da alimentação diária de muitos brasileiros. No entanto, moinhos de farinha de mandioca produzem expressivas quantidades de resíduos,

dentre eles, a manipueira, resíduo líquido extraído da mandioca quando ela é prensada no processo de fabricação da farinha. A manipueira é um líquido leitoso amarelo-claro (Figura 1), contendo açúcares, gomas, proteínas, linamarina, sais e outras substâncias (CEREDA, 2001).

**Figura 1:** Aspecto da manipueira extraída em um sistema caseiro.



Extraído de: Projeto incentiva o reaproveitamento da manipueira em cultivos agrícolas — Universidade Federal do Oeste do Pará

Por conter linamarina em sua composição, a manipueira torna-se altamente tóxica. Isto ocorre devido ao fato de a linamarina ser um glicosídeo cianogênico, o qual ao ser hidrolisado gera ácido cianídrico, que é tóxico (CEREDA et al., 1981). Além de tóxica, a manipueira se caracteriza como fonte poluidora por conter elevado teor de matéria orgânica (EMBRAPA, 2011); de acordo com Barana e Cereda (2001) para cada tonelada de raiz processada nas farinheiras são gerados 300 L de manipueira com uma demanda química de oxigênio (DQO) de  $60 \text{ g L}^{-1}$ .

Além disto, a manipueira restringe fisicamente os locais de produção da propriedade onde é descartada devido à formação de enormes volumes deste líquido (PAVLAK et al., 2007). No entanto, a manipueira apresenta potencialidade de aplicação, o que resolveria o problema do seu manejo e ainda geraria recursos econômicos com sua utilização (CAMILI et al., 2009).

Uma solução alternativa para minimizar os impactos ecológicos gerados pela manipueira e agregar valor à mesma é aproveitá-la como matéria-prima para a

obtenção de bioetanol, uma vez que a mesma contém amido e açúcares. Após a fermentação da manipueira, é possível obter a formação de 31,37g/L de etanol utilizando processo simples de hidrólise enzimática (CAMILLI e CABELLO 2007). Cabe salientar que no Brasil, a manipueira e a cultura da mandioca não pretendem substituir a cana-de-açúcar na produção de etanol, mas pode representar uma opção para pequenos produtores, podendo o etanol produzido através do beneficiamento da manipueira ser utilizado para auto sustento da propriedade, além de contribuir com benefícios sociais para comunidades rurais ou ocupação de nichos agrícolas, em regiões em que o cultivo da cana não é viável. Pode ser também uma opção para períodos de entressafra, em que as destilarias de álcool de cana-de-açúcar ficam ociosas (CARDONA e SÁNCHEZ, 2007).

Na produção de etanol a partir de manipueira é necessário o processo de hidrólise e sacarificação do amido presente, pois este carboidrato não é diretamente fermentável pelas leveduras, sendo necessária a hidrólise prévia de suas cadeias para a obtenção de glicose (SUMAN et al., 2011). As enzimas atuam como catalisadores dessa reação de hidrólise, sendo as amilases, como a glicoamilase e a  $\alpha$ -amilase, as principais enzimas utilizadas, desempenhando um papel fundamental no aproveitamento de diversas biomassas contendo amido para a produção de biocombustíveis e outros bioprodutos (CINELLI, 2012).

Recentemente o processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) tem sido bastante estudado para obtenção de etanol a partir de biomassa por apresentar uma série de vantagens em relação aos processos realizados separadamente como: menor complexidade e custo do processo, minimização dos riscos de contaminação e maiores rendimentos de hidrólise (VÁSQUEZ et al., 2007).

Nesse contexto, o presente estudo propõe-se a selecionar bactérias que sejam capazes de produzir expressivas quantidades de amilases em condições de microaerofilia, para posteriormente adaptá-las a condições de co-cultivo com a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, a fim de conseguir um processo de sacarificação fermentação e simultânea (SSF) da manipueira para produção de etanol.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Prospecção, seleção e aplicação de bactérias provenientes de mandioca (*Manihot esculenta*) para a produção de etanol por sacarificação e fermentação concomitantes de manipueira.

### 2.2. Objetivos específicos

- Selecionar bactérias a partir de tubérculo de mandioca (*Manihot esculenta*) com capacidade de utilizar amido como única fonte de carbono em condições de microaerofilia;
- isolar acessos bacterianos através da sua capacidade de produzir relevante quantidade de enzimas amilolíticas em meio sólido, utilizando para tal o cálculo de Índice Enzimático (IE);
- identificar a morfologia dos acessos bacterianos relevantes na produção de amilases através da técnica de Gram;
- avaliar a capacidade de crescimento, de consumo de amido e de produção de açúcares redutores por partes dos isolados em meio líquido amido 1 % (MMA), em condição de microaerofilia;
- Identificar geneticamente as cepas bacterianas que se destacaram na degradação do amido em meio líquido;
- avaliar a capacidade de crescimento bacteriano em caldo de fermentação com manipueira como substrato;

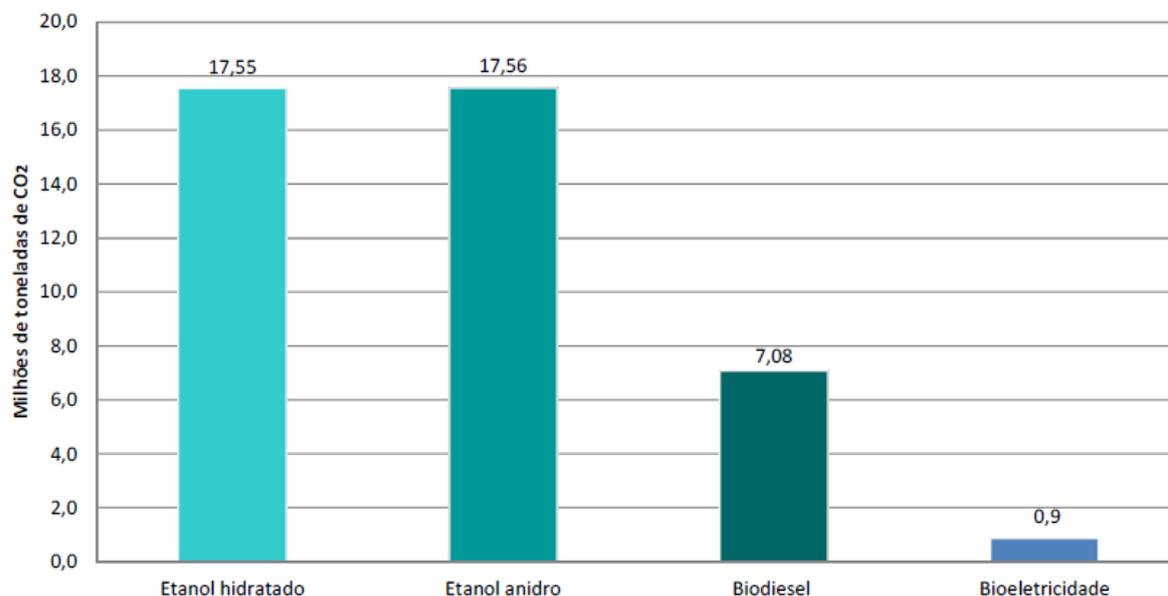
- avaliar a capacidade fermentativa da *Saccharomyces cerevisiae* comercial utilizando manipueira como substrato, avaliando-se parâmetros como: viabilidade celular, consumo de açúcar redutor e consumo de amido;
- avaliar a capacidade de crescimento concomitante entre o acesso bacteriano escolhido e a levedura com manipueira como meio de fermentação, avaliando-se parâmetros como: consumo de açúcar redutor e consumo de amido.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biomassa e biorrefinaria

A matriz energética do planeta está baseada, em sua maioria, na queima de combustíveis fósseis. No entanto, a energia derivada do petróleo se constitui como uma grave fonte poluidora do meio ambiente, gerando uma série de problemas à natureza, como por exemplo: aumento do efeito estufa, por conta da liberação de gases estufa durante a queima do petróleo; além de graves acidentes como o ocorrido na explosão da plataforma da British Petroleum no Golfo do México em 2010. Sendo assim, a busca por fontes alternativas de energia é uma realidade no cenário atual, em que biocombustíveis originados a partir do aproveitamento de resíduos e biomassa se constituem como uma opção interessante, uma vez que tais matérias-primas se caracterizam por serem fontes renováveis, de baixo custo e menos poluentes. A biomassa é o único material rico em carbono disponível no planeta além dos combustíveis fósseis e pode ser formada por carboidratos, lignina, proteínas, gorduras e numa menor extensão, por várias outras substâncias, tais como: vitaminas, terpenos, carotenóides, alcalóides, pigmentos e flavorizantes (Sheehan, 2009).

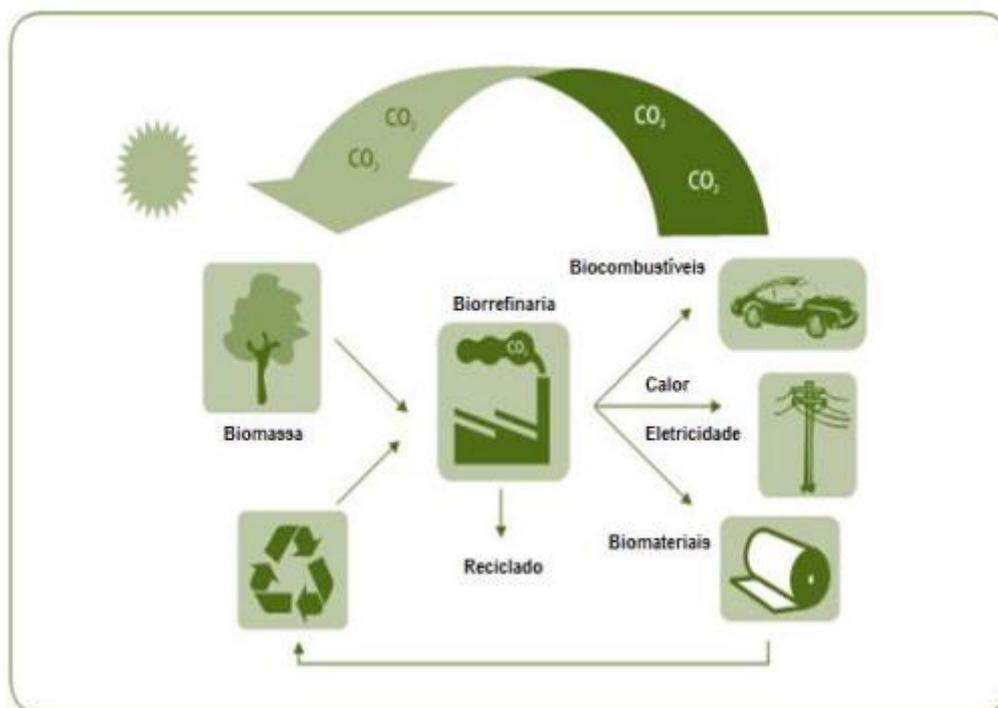
O uso de biocombustíveis na matriz energética nacional já proporciona uma significativa redução nas emissões de gases de efeito estufa (GEE). Na Figura 2, observam-se as emissões de GEE evitadas no Brasil em 2012, medidas em toneladas de CO<sub>2</sub> equivalente, decorrentes do uso de biocombustíveis renováveis (etanol anidro e hidratado e biodiesel), em detrimento de seus equivalentes fósseis, gasolina e diesel (BRASIL, 2013).

**Figura 2:** Emissões de gases de efeito estufa (GEE) evitadas no Brasil em 2012.

Extraído de: Brasil (2013).

É neste contexto de busca por novas fontes energéticas menos poluentes que está inserido o conceito de biorrefinaria. As biorrefinarias são instalações de processamento que convertem, sustentavelmente, a biomassa ou resíduos em cinco principais produtos: energia, insumos químicos, biocombustível, biomateriais e químicos. No biorrefino, a biomassa se caracteriza como a matéria orgânica renovável oriunda dos diversos setores da sociedade (lavouras, indústrias, esgotos, etc.) e constitui-se na própria matéria-prima do processo. A depender da origem, a biomassa pode advir de cinco setores diferentes: agrícola (lavouras dedicadas e resíduos); aquícola (algas); florestal (resíduos); industrial (sobras e resíduos dos processos) e domiciliar (esgoto e resíduos sólidos do município). O objetivo de uma biorrefinaria é, portanto, transformar tais materiais abundantes (biomassa e resíduos) em produtos úteis através de uma combinação de tecnologias e processos, agregando valor à cadeia produtiva dos mesmos (NREL, 2008). A Figura 3 mostra um esquema simplificado do ciclo de materiais e energia numa biorrefinaria.

**Figura 3:** Esquematização do ciclo agro-bio-combustível-material-energia das biorrefinarias.



Extraído de: ASSUNÇÃO, CARIOCA, et al., 2010

Um dos principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento e implantação das biorrefinarias é a crescente demanda por energia, combustível e materiais. Vale salientar que as biorrefinarias se constituem como uma forma de produção extremamente eficiente, na medida em que resíduos são utilizados na obtenção de energia, a qual poder ser utilizada na própria unidade industrial para auto sustento ou ser comercializada (CHERUBINI, 2010).

Como dito anteriormente, vários tipos de resíduos provenientes de atividades agrícolas podem servir como matéria-prima para obtenção de combustíveis em uma biorrefinaria. Desta forma, a manipueira, resíduo líquido (açucarado e amiláceo) proveniente da prensagem da mandioca no processo de fabricação da farinha, se constitui como matéria-prima passível de ser utilizada em uma biorrefinaria para produção de biocombustível. A partir de um processo prévio de hidrólise do amido

com posterior fermentação dos açúcares redutores, é possível a obtenção de bioetanol a partir da manipueira.

Atualmente, os combustíveis baseados em biomassa usados em transportes são identificados como biocombustíveis de primeira e de segunda geração. Os de primeira geração são aqueles produzidos a partir de matérias-primas usadas também como alimento para humanos e animais. O etanol produzido a partir da cana-de-açúcar é um exemplo de biocombustível de primeira geração. Por sua vez, os biocombustíveis de segunda geração são aqueles provenientes de resíduos, rejeitos ou de produtos não comestíveis, a exemplo das matérias-primas lignocelulósicas (RODRIGUES, 2011).

Os biocombustíveis de segunda geração vêm ganhando bastante interesse nos últimos anos, uma vez que as matérias primas utilizadas para a fabricação deste tipo de combustível não são usadas na alimentação humana. Neste contexto, o bioetanol proveniente da manipueira se constitui como biocombustível de segunda geração, sendo, portanto, o beneficiamento desta matéria-prima bastante vantajoso, uma vez que a mesma não serve para alimentação humana, é de baixo custo e se deixada no meio ambiente gera sérios problemas ambientais.

### 3.2 Etanol

O etanol ou álcool etílico é um líquido incolor, volátil e inflamável. Sua fórmula molecular é  $C_2H_5OH$  e é quimicamente classificado como um álcool, isto é, possui um grupo hidroxila (OH) ligado a um  $CH_2$ .

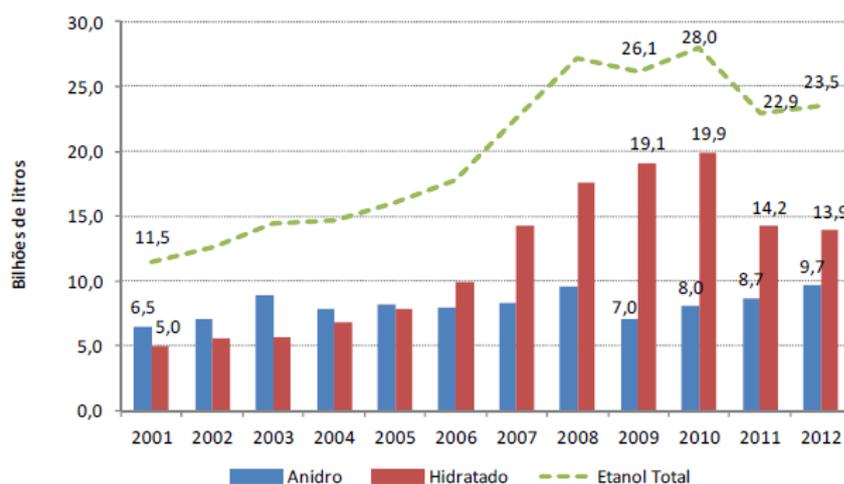
O etanol não ocorre naturalmente na natureza. Ele é produzido por síntese química, (obtido por hidrocarbonetos insaturados) e por processo de fermentação alcoólica. A via fermentativa, método mais utilizado no Brasil e no mundo consiste no processo em que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* quebra a glicose transformando-a em etanol, gás carbônico e energia. Convém salientar que a finalidade da fermentação alcoólica não é produzir o etanol, mas gerar energia para levedura sob a forma de ATP através do metabolismo anaeróbico da glicose. Tal energia é utilizada na

execução de diversos trabalhos fisiológicos (absorção, excreção e outros), biossíntese, crescimento e multiplicação das leveduras (CANOVA, 2011).

Atualmente, o Brasil é o produtor de bioetanol com maior capacidade competitiva do mundo, possuindo um mercado interno bem desenvolvido e cada vez mais estimulado pelo crescimento das vendas de veículos *flex*, os quais são movidos a gasolina e a etanol, ou com uma mistura dos dois. Sendo o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, devido às condições climáticas favoráveis, amplas chuvas durante a época certa e terras produtivas abundantes, o Brasil possui potencial para aumentar significativamente sua produção de etanol e desempenhar um papel importante na satisfação da demanda global futura, sem comprometer a produção de alimentos (CANILHA et al., 2011).

Segundo dados do Ministério de Minas e Energia, em 2012, foram produzidos 23,5 bilhões de litros de etanol no Brasil (volume 2,8% superior a 2011), sendo 9,7 bilhões de anidro e 13,9 de hidratado (BRASIL, 2013), conforme ilustra a Figura 4.

**Figura 4:** Produção brasileira de etanol em 2012.



Extraído de: Brasil (2013).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, sendo precedido apenas pelos Estados Unidos. Entretanto, enquanto a matéria-prima brasileira é a cana-de-

açúcar, os Estados Unidos utilizam o milho para produzir este biocombustível. Desta maneira, a cana-de-açúcar e o milho são as principais matérias-primas utilizadas na produção de bioetanol (HARUN et al., 2010).

Estudos indicam que o consumo mundial de álcool combustível será de 205 bilhões de litros em 2025 (KNOWTEC, 2013). Portanto, o estabelecimento de metas extremamente ambiciosas para aumento do consumo do etanol nos próximos anos, requer um aumento substancial da produção de etanol e, nesse sentido, estimula a pesquisa e o desenvolvimento de novas matérias-primas para a produção de etanol.

### **3.3 Manipueira**

A manipueira, que em tupi-guarani quer dizer “o que brota da mandioca”, é o resíduo líquido originado a partir do processo de prensagem da raiz da mandioca durante a fabricação da farinha. A composição química da manipueira é variável, dependendo da espécie da mandioca, das condições climáticas do local, o que ocasiona dados contrastantes na literatura. Um estudo realizado por Silva Júnior et al. (2012) demonstrou que a manipueira proveniente de uma casa de farinha localizada no Município de Tancredo, Bahia, apresentou uma composição de 3.456 mg L<sup>-1</sup> de potássio, 1.627 mg L<sup>-1</sup> de nitrogênio, 617 mg L<sup>-1</sup> de magnésio, 328 mg L<sup>-1</sup> de fósforo e 278 mg L<sup>-1</sup> de cálcio e 22 mg L<sup>-1</sup> de sódio. De acordo com Cereda (2001), a manipueira contém diversos constituintes (tabela 1), dentre eles o amido e açúcares, o que torna esse resíduo passível de ser aproveitado, principalmente como matéria-prima na produção de bioetanol.

**Tabela 1:** Concentração de alguns constituintes presentes da Manipueira

	Manipueira de farinheira	Manipueira de fecularia
Umidade (%)	92,77	91,53
<b>matéria seca</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Proteína	1,22	0,97
Amido	9,42	6,12
Matéria Graxa	0,50	0,11
Cinzas (500°C)	0,54	0,08
Fibras	0,30	0,10
pH	4,10	4,10
Acidez*	3,27	2,70
HCN <sup>P</sup>	463,76	80,00

Extraído de: CEREDA (2001).

Apesar de ser rica em macro e micronutrientes e poder ser utilizada como fertilizante, a manipueira pode causar danos tanto ao solo quanto às plantas, caso não seja usada corretamente (SANTOS et. al., 2010). Os problemas ambientais causados pela disposição inadequada da manipueira estão relacionados à sua composição química e ao grande volume de resíduo líquido gerado (CEREDA, 2001). Segundo Ribas et al. (2010), a presença de alguns compostos orgânicos tóxicos, como o cianeto, dificulta seu tratamento e, portanto, dificulta seu uso como fertilizante agrícola. O cianeto se caracteriza como uma substância altamente tóxica e letal, atuando nas células nervosas individualmente ou reagindo com a hemoglobina dos glóbulos vermelhos e formando a cianohemoglobina, a qual inibe a cadeia respiratória (NASU, 2008) e por esse motivo é considerado uma substância hemotóxica, acarretando em morte rápida. O potencial tóxico e poluente é agravado, principalmente, pelo fato de a linamarina (glicosídeo potencialmente hidrolisável a ácido cianídrico) ser muito solúvel em água. Existem relatos de morte de animais que beberam da água aonde ocorreram descargas da manipueira, sendo a morte de peixes também um fato comum (FIORETTO, 1987). A concentração de glicosídeos cianogênicos e ácido cianídrico variam de acordo com a idade das plantas, variedade cultivada, com o tipo de tecido vegetal e fatores ambientais como clima, solo, umidade e temperatura (CEREDA, 2001); cultivares com teor de ácido

cianídrico inferior a 50 mg de HCN Kg<sup>-1</sup> são consideradas mandiocas mansas, aquelas com teores acima de 50 e abaixo de 100 mg de HCN Kg<sup>-1</sup> são tidas como moderadas. As cultivares bravas apresentam teores acima de 100 mg de HCN Kg<sup>-1</sup> (CARVALHO, 1992). Além da característica tóxica, a manipueira se caracteriza como uma fonte de poluição orgânica, dado a alta Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) que possui. De acordo com Barana (2008) apud Santos (2009), mesmo que o processo de descontaminação do resíduo tenha uma eficiência de 90%, os 10% restantes ainda são algumas vezes superiores à atividade poluidora do esgoto doméstico. A poluição ambiental, proveniente da manipueira, pode se dá de diversas formas: através da eutrofização de corpos d'água e da manutenção de determinados microrganismos no local onde é descartada, uma vez que é rica em compostos nitrogenados (1.580mg.L<sup>-1</sup>) e fosfatados (112mg.L<sup>-1</sup>); através da poluição térmica dos corpos d'água pela alta temperatura da manipueira ao ser descartada; através da poluição física, com a redução da transparência da água, pela alta concentração de materiais particulados e dissolvidos presente na manipueira; e da poluição química, com enriquecimento do ecossistema por nutrientes, acidificação e redução dos teores de oxigênio (APRILE et al., 2004).

Portanto, a manipueira necessita de manejo adequado, caso contrário, sérios problemas ambientais podem ser gerados. Uma utilização mais nobre da manipueira consiste, por exemplo, no seu uso para a obtenção de bioetanol, prática esta que agregaria valor ao resíduo, além de contribuir com a redução da poluição ambiental gerada pelo mesmo.

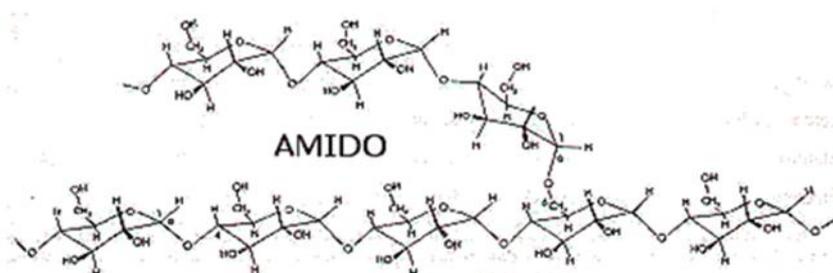
### **3.4 Amido**

O amido (Figura 5) é um dos polímeros mais abundantes na natureza, sendo o principal carboidrato sintetizado pelas plantas depois da celulose. Para os vegetais superiores funciona como substância de reserva, sendo armazenado nas raízes, tubérculo e no endosperma de grãos de plantas (BEMILLER, 1997). Ele é também a

fonte mais importante de carboidratos na alimentação humana, representando 80% a 90% de todos os polissacarídeos da dieta (WHO/FAO, 1998).

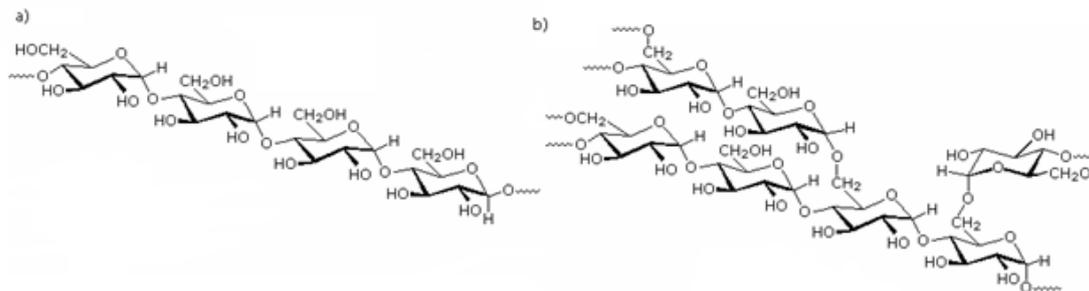
O amido é formado por resíduos de glicose, ligados entre si por ligações glicosídicas. Esta ligação é estável em pH alcalino, mas é hidrolisada em pH ácido. No final da cadeia polimérica está presente um aldeído latente que define a extremidade redutora do polímero (NELSON & COX, 2006). No amido, os resíduos de glicose se organizam na forma de dois tipos de polímero, os quais são muito semelhantes: a amilose e a amilopectina (Figuras 6a e 6b), e aparecem numa proporção de 25% e 75%, respectivamente. A amilose é formada por cadeias lineares helicoidais de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 na qual cada volta da espiral é formada por, aproximadamente, seis moléculas de glicose. Por sua vez, a amilopectina apresenta estrutura altamente ramificada possuindo resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 das quais partem ramificações unidas por ligações  $\alpha$ -1,6 a cada 25 resíduos de glicose, aproximadamente (LEHNINGER et al., 2002). As proporções em que tais estruturas aparecem dependem de alguns fatores, como: fontes botânicas, variedades de uma mesma espécie e, mesmo numa mesma variedade, podem variar de acordo com o grau de maturação da planta (ELIASSON, 2004; TESTER et al., 2004).

**Figura 5:** Forma estrutural do amido



Extraído de: NUNES et al., 2006

**Figura 6:** a) Estrutura química da amilose. b) Estrutura química da amilopectina



Extraído de: NUNES et al.,2006

O amido se apresenta nos vegetais sob a forma de grânulos intracelulares, constituindo depósitos de reserva de carboidrato formado nas folhas durante a assimilação fotossintética. O amido formado acumula-se nos cloroplastos durante o dia, servindo como fonte principal para a síntese de sacarose citosólica durante a noite. Essa sacarose é então transportada para os órgãos de armazenamento das plantas, como sementes, frutas, tubérculos e raízes (VANDEPUTTE & DELCOUR, 2004; TESTER et al., 2004). O tamanho, a forma e a estrutura dos grânulos de amido são característicos para as distintas espécies vegetais (REGULY, 1996). Quanto à permeabilidade, a superfície do grânulo é relativamente impermeável a moléculas grandes, como amilases, devido ao compacto empacotamento das cadeias de amilopectina (DENARDIN e SILVA, 2008). Os grânulos de amido são insolúveis; eles se hidratam muito pouco em água fria. Desse modo, eles podem ser dispersos na água, formando uma suspensão de baixa viscosidade. A capacidade de aumento de viscosidade (espessante) do amido é obtida apenas quando a suspensão de grânulos é cozida. Aquecendo-se uma suspensão de 5% dos principais grânulos de amidos nativos a 80°C, sob agitação, obtém-se uma dispersão de alta viscosidade que pode ser chamada de goma, ou processo de gelatinização. O amido presente nos vegetais pode ser hidrolisado à glicose, maltose e xaropes de oligossacarídeos de menores massas moleculares, os quais podem ser utilizados como substrato em processos fermentativos (VIEILLE & ZEIKUS, 2001).

O amido é largamente utilizado nas indústrias alimentícias, atuando na melhoria das propriedades funcionais dos alimentos e suprimindo a falta de oligossacarídeos,

dissacarídeos e monossacarídeos (GUZMÁN-MALDONADO & PAREDES LOPES, 1995). O amido, em tais indústrias, é convertido, enzimaticamente, em dextrinas, maltose, frutose e glicose. As dextrinas são utilizadas em formulações clínicas, como material para sacarificação enzimática, estabilizadores e espessantes; a maltose, por sua vez, é largamente utilizada em confeitarias, na fabricação de refrigerantes, cervejas, geleias e sorvetes; a frutose se destina à fabricação de refrigerantes, geleias e iogurtes; a glicose, além de ser utilizada na fabricação de pães, refrigerantes e cervejas, por exemplo, ainda serve de subsídio para a fabricação de etanol e outros bioprodutos. Convém ressaltar que o amido, além de ser utilizado nas indústrias alimentícias, também é usado em outras indústrias, como as de papel, tecido e embalagem, onde ele atua como aglutinante de fibras e como adesivo (SILVA, 2009).

### **3.5 Enzimas**

As enzimas são biocatalisadores, em sua grande maioria de caráter protéico, produzidos por células vivas, que aumentam a velocidade das reações químicas, uma vez que possuem a capacidade de diminuir a energia de ativação requerida para formar um complexo de transição ativado, o qual, por sua vez, dará origem a um produto, acelerando, portanto, a reação por um fator de  $10^8$  a  $10^{10}$ . Reações químicas podem ocorrer sem enzimas, entretanto, no caso das células, estas reações seriam tão lentas, que certamente seria impossível a vida sem enzimas. Uma vez sintetizada por uma célula, uma enzima poderá atuar de forma independente se condições apropriadas forem mantidas. Uma das principais características das enzimas é sua especificidade sobre o substrato, agindo sobre um número muito limitado de compostos e sem efeito sobre os outros (SANT'ANA JR, 2001). Por serem extremamente sensíveis, as enzimas necessitam de condições específicas para atuarem corretamente. Os fatores que influenciam sobre a eficiência da ação enzimática são a concentração de substrato, o pH e a temperatura. Devido às suas características, as enzimas são ativas em uma

faixa estreita de pH , sendo sensíveis às mudanças de acidez ou alcalinidade em seu meio (LEHNINGER,1976).

O homem vem explorando de forma natural a utilização de enzimas para a produção de alimentos e bebidas desde os primórdios das civilizações. Já no ano 6000 a.C, os sumérios e babilônios produziam bebidas alcoólicas através do processo de fermentação de cereais. Posteriormente, por volta do ano 2.000 a.C. os egípcios passaram a usar a fermentação no processo de fabricação de pão. Estas aplicações se davam de forma meramente práticas, sem nenhum conhecimento teórico das reações enzimáticas envolvidas. (WANDERLEY et al., 2011).

A evolução dos conhecimentos técnicos e científicos envolvidos nos processos de fermentação se deu ao longo dos anos subsequentes e propiciou a utilização de enzimas em diversos ramos de atuação da atividade humana.

No século XVII, por exemplo, Van Helmont considerava a transformação dos alimentos um processo químico mediado por “fermentos” (KIELING, 2002). Em 1814, Kirchoff demonstrou a conversão do amido em glicose utilizando as enzimas presentes no extrato de trigo. Em 1833, Johan Kjeldahl criou um método analítico para detectar nitrogênio no estado tri negativo em determinados compostos orgânicos. Tal método é largamente utilizado na determinação da proteína em alimentos já que a proteína é uma macromolécula feita de nitrogênio, contendo aminoácidos ligados uns aos outros. O método foi à base para o desenvolvimento da enzimologia quantitativa e biotecnologia geral (PARIZA, 2002). Em 1836, o fisiologista alemão Theodor Schwann foi o primeiro a isolar uma enzima proveniente de tecido animal e que estava presente no estômago humano, a qual ele chamou de pepsina.

Por volta de 1860 o cientista Von Liebig defendia a ideia de que a fermentação fosse resultado de um processo químico resultante da ação de materiais não vivos, o qual ele denominou de “fermentos”. Em contrapartida, Pasteur defendia a ideia de que a fermentação só ocorreria na presença de organismos viáveis (KIELING, 2002) Em 1876, William Kuhne propôs a utilização do termo enzima para designar as substâncias anteriormente conhecidas como “fermentos” (ENZIMAS, 2008) Somente em 1897 com o trabalho dos irmãos Buchner, que demonstraram que o extrato de

levedura livre de células podia converter glicose em etanol e dióxido de carbono exatamente como células de levedura vivas, o impasse entre Liebig e Pasteur foi resolvido. Em 1894, Emil Fisher descobriu que as enzimas da via glicolítica podem distinguir enantiómeros (formas D de L), propondo assim ao modelo “chave e fechadura” para explicar a interação entre enzima e substrato (ENZIMAS, 2009)

Em 1926, provou-se a natureza protéica das enzimas após isolar urease de extratos de feijão. A partir de então, centenas de enzimas foram classificadas, purificadas e isoladas. Entretanto, apenas em meados dos anos de 1950, foram possíveis grandes avanços na tecnologia das enzimas. O progresso da bioquímica deu origem a uma compreensão mais ampla da grande variedade de enzimas presentes nas células vivas e de seu modo de ação (ENZIMAS, 2009).

Desde o início da década de 1980, as enzimas vêm sendo submetidas à técnicas de modificação genética para aprimorar sua eficiência e a qualidade da produção a fim de se desenvolver novos produtos. Desde então, a utilização de enzimas em processos biotecnológicos vem se expandindo consideravelmente nos mais diferentes setores industriais, como nas indústrias farmacêuticas, saponáceas, lácteas, entre outros ( WANDRELEY, 2011).

A maioria das enzimas utilizadas em processos industriais é proveniente de microrganismos, como fungos e bactérias em crescimento sobre meios nutritivos adequados. As vantagens da obtenção de enzimas a partir de microrganismos são muitas, dentre elas: o tempo de geração dos microrganismos é bastante curto, o que propicia um aumento rápido de massa celular; exigem pequena disponibilidade de água e espaço e são capazes de crescer utilizando os mais variados substratos (OLIVEIRA et al., 2005).

As enzimas são codificadas inicialmente em grupos, definidos em função do tipo de reação em que atuam, sendo: (1) oxidoredutases, (2) transferases, (3) hidrolases, (4) liases, (5) isomerases e (6) ligases, como determinado pela International Union of Biochemistry. A nomenclatura ocorre, adicionando-se a terminação “ase” ao nome do substrato com o qual realizam reações; por exemplo, a enzima que controla a decomposição da uréia recebe o nome de urease; aquelas que controlam a hidrólise de proteínas denominam-se proteases,

enquanto que aquelas que hidrolisam o amido recebem o nome de amilase (PASTORE, 2010).

Atualmente, cerca de 3.000 enzimas identificadas constam na lista da EnzymeComission (EC). Entretanto, apenas 60 delas possuem aplicação industrial (WANDERLEY et al., 2011). Cerca de 80% das enzimas utilizadas na indústria correspondem a hidrolases (COELHO, 2008). As enzimas proteolíticas lideram a produção mundial em escala industrial, seguidas das enzimas amilolíticas, entre as quais as amilases, que hoje atingem uma média de 29% dessa produção (NGUYEN et al., 2002).

Convém lembrar que em muitos processos as enzimas podem substituir substâncias químicas, gerando benefícios para o meio ambiente por meio da biodegradabilidade e pelo menor consumo de energia, além de serem mais específicas em sua ação do que as substâncias químicas sintéticas. Os processos que empregam enzimas, portanto, produzem menos subprodutos residuais, propiciando a obtenção de produtos de melhor qualidade e diminuindo a probabilidade de poluição (WANDERLEY, 2011).

### *3.5.1 Enzimas Amilolíticas*

As amilases formam o principal grupo de enzimas envolvidas na hidrólise do amido, sendo utilizadas na indústria de alimentos, principalmente em panificação e biscoitaria; no pré-cozimento de cereais; nas indústrias de fermentação, para a produção de álcool e bebidas alcoólica; na fabricação de xaropes de glicose, via hidrólise pelas amilases; no preparo de gomas de dextrinas, usadas para acabamento de papéis e tecidos, dentre outros (BON; PEREIRA, 1999). As amilases hidrolisam moléculas de amido, mais especificamente hidrolisam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 que formam a molécula de amido, liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005). São enzimas utilizadas pelas plantas para degradar o amido, o qual é acumulado em alguns tipos de raízes, por

animais para degradar o amido presente nos alimentos e por microrganismos que utilizam o amido como fonte de carbono (Peixoto et al., 2003).

De acordo com sua forma de ação, as amilases se dividem em duas categorias, as endoamilases e as exoamilases. As endoamilases catalisam as hidrólises de forma aleatória no interior da molécula de amido. Esta ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos. As exoamilases, por sua vez, hidrolisam sucessivamente, as ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora da molécula, liberando glicose ou maltose. Para a conversão eficiente do amido em compostos de baixa massa molecular, é necessária uma ação coordenada das enzimas citadas anteriormente (GUZMAN-MALDONADO e PAREDES-LOPES, 1995).

Sendo disponíveis comercialmente, as amilases microbianas têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias que processam este polímero (PANDEY et al., 2005). O amido pode ser biodegradado pelas enzimas  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e amiloglicosidase.

#### 3.5.1.1 $\alpha$ -amilase

A enzima com código e nome sistemático EC 3.2.1.1;  $\alpha$ -1,4 glicano 4-glicano-hidroxilase, respectivamente, é comumente conhecida como  $\alpha$ -amilase. A alfa-amilase é uma endoenzima que cliva as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 internas da amilose e da amilopectina produzindo moléculas de cadeia de comprimento variáveis (REGULY, 1996). A clivagem ocorre de forma randômica, e não seletiva, sobre vários pontos da cadeia ao mesmo tempo, e o produto dessa hidrólise são oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose. A ação enzimática se caracteriza por rápida diminuição da opacidade e da viscosidade das dispersões de amido e uma maior fluidez das mesmas, quando levadas ao ponto de gelatinização do amido, a  $\alpha$ -amilase também é chamada de enzima dextrinizante e de liquefação (GOULD, 1975). Apesar de nos últimos anos as  $\alpha$ -amilases bacterianas terem recebido mais atenção dos pesquisadores devido à sua maior termoestabilidade, a liquefação do

amido catalisada por estas enzimas tem se constituído na etapa operacional mais cara do processo de sacarificação, principalmente por serem produzidas por fermentação submersa. Assim, no campo da biotecnologia, pesquisas sobre a produção de  $\alpha$ -amilases termoestáveis de menor custo são recomendadas (SOUZA et al., 1996). Existem diversas fontes de  $\alpha$ -amilases, a maioria microbiana, embora amilases de malte (cevada ou trigo) estejam disponíveis. Entre as amilases microbianas, os parâmetros ótimos geralmente são encontrados em intervalos de pH entre 4-7 entre 30-130 °C (PANDEY et al., 2005).

#### *3.5.1.2 $\beta$ -amilase*

A  $\beta$ -amilase é uma exoamilase que atua nas extremidades não redutoras finais de cadeias de amilose ou amilopectina. Esta hidrolisa o amido em duas unidades de glicose, produzindo maltose. A  $\beta$ -amilase não pode hidrolisar o amido além dos pontos de ramificação da amilopectina (SCIPIONI, 2011).

#### *3.5.1.3 Amiloglucosidase (Glucoamilase)*

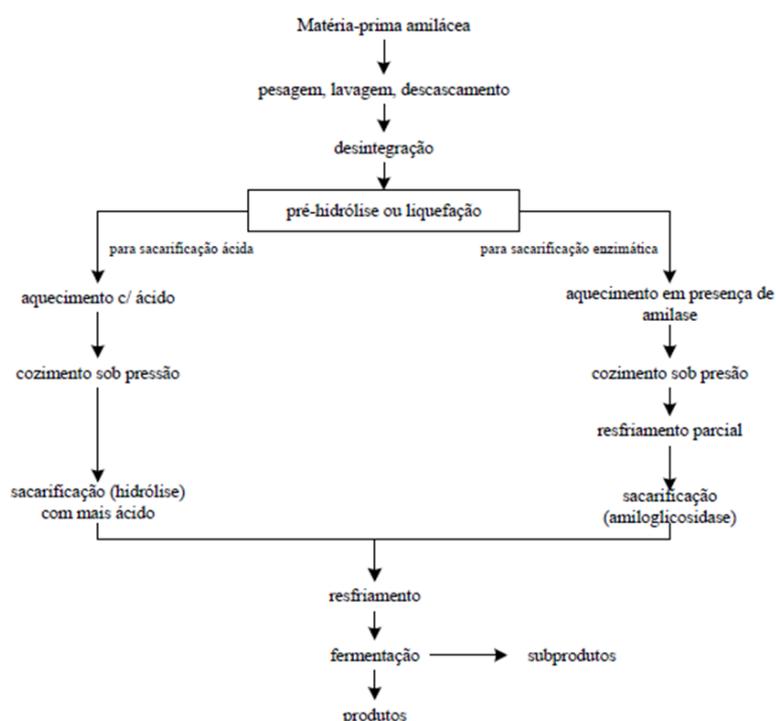
A amiloglucosidase é uma exoenzima que rompe as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 do amido a partir da extremidade não redutora até glicose (PANDEY et al., 2005). As glucoamilases são também chamadas de enzimas de sacarificação, pois conseguem hidrolisar completamente o amido em incubação por longo tempo (SILVA, 2009).

### **3.6 Hidrólise enzimática do amido**

O amido contido na manipueira, não está disponível à levedura alcoólica e necessita de uma transformação a mono e dissacarídeos fermentescíveis, que pode ser

realizada utilizando as amilases como catalisadoras no processo de hidrólise. Esta etapa é imprescindível para disponibilizar os açúcares redutores requeridos à fermentação (CAMILI et al., 2009). O amido pode ser hidrolisado por via química ou por via enzimática. Os hidrolisados por enzimas são os mais importantes amidos modificados comerciais. A hidrólise enzimática vem sendo mais privilegiada nos estudos atuais, em razão do caráter fortemente poluidor da hidrólise ácida (SUMERLY et al., 2002). A Figura 7 mostra um esquema de processo em duas vias alternativas, uma pela ação de um ácido e outra pela ação de uma enzima

**Figura 7:** Processo pré-fermentativo de amiláceos ( 2 vias alternativas).



Extraído de: Reguly, 1996

A hidrólise enzimática do amido começa com a quebra limitada das ligações glicosídicas produzindo entre 15 e 30% de açúcares de pequena massa molecular, chamados de dextrinas. Esta primeira etapa é catalisada pelas endoamilases, como a  $\alpha$ -amilase (LIU, 2005). As amilases são as enzimas capazes de hidrolisar as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 da molécula de amido; elas são produzidas por diversos

microrganismos procariotos e eucariotos que usam o amido como fonte de carbono (PEIXOTO et al., 2003).

O processo de hidrólise enzimática convencional do amido acontece após a etapa de gelatinização, na qual os grânulos de amido são dispersos em solução aquosa e aquecidos. Após a gelatinização, os grânulos de amido são hidrolisados através da ação de uma  $\alpha$ -amilase ( MAAREL et al., 2002). O cozimento do material amiláceo tem por objetivo a liberação do amido das células vegetais e a sua gelatinização, de maneira a permitir a ação do sistema enzimático usado na etapa posterior. As condições de cozimento dependem da matéria-prima empregada, sendo que, de um modo geral, a temperatura se situa entre 80°C e 150°C, com tempos de até 90 minutos (SCIPIONI, 2012). A granulação e a cristalinidade da molécula de amido são uma limitação à hidrólise do amido. Isso explica porque um cozimento deficiente causa sacarificação posterior incompleta (REGULY, 1996). Após a hidrólise, segue-se à etapa de sacarificação (Figura 8), onde o amido hidrolisado, constituído em sua maioria por oligossacarídeos, é transformado, principalmente, em açúcares de baixo peso molecular. O processo de sacarificação é realizado com ajuda de enzimas específicas, dependendo do tipo de hidrolisado desejado (REEVE ,1992). A principal enzima utilizada nesta etapa é a glicoamilase, a qual converte dextrinas em carboidratos de baixo peso molecular, assimiláveis pela levedura na etapa posterior, que é a fermentação.

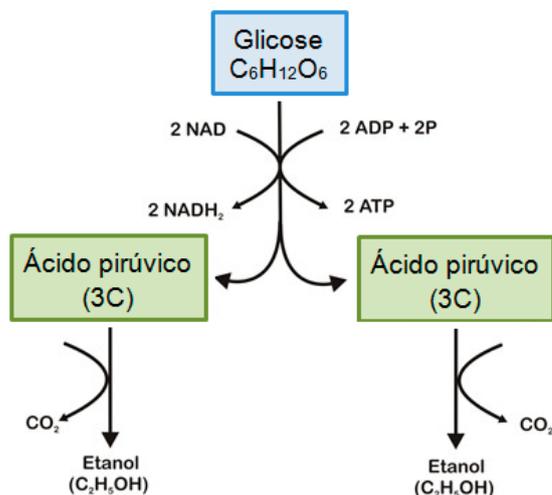
**Figura 8:**Esquema das etapas de hidrólise e sacarificação do amido.



### 3.7 Fermentação alcoólica

O processo de fermentação, de forma mais restrita, pode ser definido como o mecanismo anaeróbico de produção de energia que não envolve a cadeia respiratória. Entretanto, atualmente, esta definição tem sido mais ampliada pelo fato de alguns processos que são conduzidos utilizando-se o oxigênio e a cadeia respiratória, também serem classificados como processos fermentativos, citando como exemplo a produção de enzimas microbianas. Portanto, um novo conceito mais abrangente para fermentação consiste no processo que ocorre quando o microrganismo se reproduz, a partir de uma fonte apropriada de nutrientes, visando a obtenção de um bioproduto. Os processos fermentativos têm uma grande importância em vários setores de interesse para a sociedade, seja na indústria química, farmacêutica e na agricultura, bem como na indústria de alimentos. (EMBRAPA, 2012). Um exemplo de processo fermentativo é a fermentação alcoólica, a qual consiste na transformação bioquímica de glicídeos a etanol e CO<sub>2</sub>. Tal processo é realizado, principalmente, por células de leveduras e fungos amplamente distribuído na natureza e com capacidade de sobrevivência tanto em condições aeróbias ou anaeróbias. Esta característica classifica estes microrganismos como facultativos para o oxigênio (NELSON & COX, 2011). A levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* é, industrialmente, o principal agente biológico da fermentação alcoólica. Na ausência de oxigênio, esses microrganismos apresentam um desvio da via glicolítica (Embden-Meyerhof-Parnas) ao nível do piruvato, descarboxilando-o para formação de acetaldeído que posteriormente é reduzido a etanol (Figura 9).

**Figura 9:** Fermentação alcoólica



Extraído de: <https://blogdoenem.com.br/biologia-enem-fermentacao-alcoolica-lactica/>

No Brasil, grande parte do etanol produzido é obtido da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*. Vale ressaltar que a levedura metaboliza apenas sacarose, frutose e glicose (FREITAS, 1999), o que justifica a necessidade das etapas de hidrólise e sacarificação, quando a matéria-prima é composta por amido, a exemplo da manipueira. Para iniciar a fermentação, é necessário misturar o inóculo de leveduras à solução açucarada, mantendo as condições adequadas para o desenvolvimento dos microrganismos e produção do etanol. A temperatura, o pH, a disponibilidade de nutrientes e concentração da levedura são alguns itens que afetam o rendimento da fermentação e devem ser ajustados para que não haja desequilíbrio e pouca conversão em etanol no processo ( PAVLAK et al., 2007). Alguns subprodutos acabam sendo produzidos no processo fermentativo, tais como: glicerol, ácidos orgânicos e álcoois superiores, no entanto em menor quantidade que o etanol (CINELLI, 2012).

### 3.8 Sacarificação e Fermentação Simultâneas para obtenção de etanol

A nível industrial, os processos de hidrólise e fermentação do amido podem ocorrer de forma separada (SHF) ou de forma simultânea (SSF). No processo SHF, como as etapas de hidrólise e fermentação são realizadas separadamente, isto é, em reatores distintos, essas podem ocorrer em temperaturas e condições diferentes, mais próximas as condições ideais para cada enzima (KRISHNAN et al., 2000). Entretanto, o processo poderia ser realizado com as etapas de sacarificação e fermentação ocorrendo simultaneamente (SSF).

O processo clássico de obtenção de etanol a partir de materiais amiláceos compreende: moagem ou homogeneização, gelatinização do amido, hidrólise ácida ou enzimática do amido e fermentação das moléculas de glicose, em que as etapas de hidrólise e fermentação ocorrem separadamente (OLIVEIRA; SILVA, 1989). No entanto, hoje em dia, a etapa de gelatinização vem sendo suprimida e a de hidrólise está sendo otimizada (WELLER et al., 1983; FUJIO et al., 1984)

Recentemente, o processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) tem sido utilizado para substrato amiláceo (UEDA et al., 1981). Este método é eficaz porque aumenta a velocidade de hidrólise e reduz o custo de fermentação, diminuindo, desta forma, os custos de produção, uma vez que reduz-se o número de reatores no processo (OLIVEIRA; SILVA, 1989).

O processo de SSF é influenciado por quatro principais fatores, são eles: qualidade do substrato; qualidade do sistema enzimático; modo de interação entre enzima e substrato e o modo de interação entre enzima e o organismo fermentativo (PHILIPPIDIS *et al.*, 1992).

Dentre as principais vantagens do processo SSF para produção de etanol a partir de biomassas, pode-se citar a capacidade de converter rapidamente os açúcares redutores formados em etanol. Tal fato contribui para maiores taxas de rendimento do processo de produção de etanol, uma vez que ao ser consumido rapidamente, os açúcares não se acumulam no meio, evitando, desta forma, inibição do processo por *feedback negativo* (WYMAN et al., 1994).

Além disso, a presença de etanol no meio reacional dificulta o crescimento de microrganismos indesejáveis, além de permitir uma diminuição do stress osmótico inicial para a levedura, evitando uma solução de glicose concentrada (BOTHAST e SCHLICHER, 2005). Outro benefício do processo SSF está na economia financeira que o mesmo proporciona, uma vez que é necessária menor quantidade de equipamentos do que para o processo seqüencial, visto que não são necessários reatores de hidrólise (CARDONA e SÁNCHEZ, 2007).

Na literatura, diferentes trabalhos mostram a eficiência do processo de SSF em relação ao de SHF na produção de bioetanol e outros bioprodutos. O estudo de KAWAGUCHI *et al.* (2017), por exemplo, demonstraram rendimentos 6 vezes maiores na produção de ácido cafeico a partir do processo de SSF em relação ao de SHF utilizando *E.coli* como organismo fermentativo; tal fato deu-se pela redução do acúmulo de inibidores da fermentação.

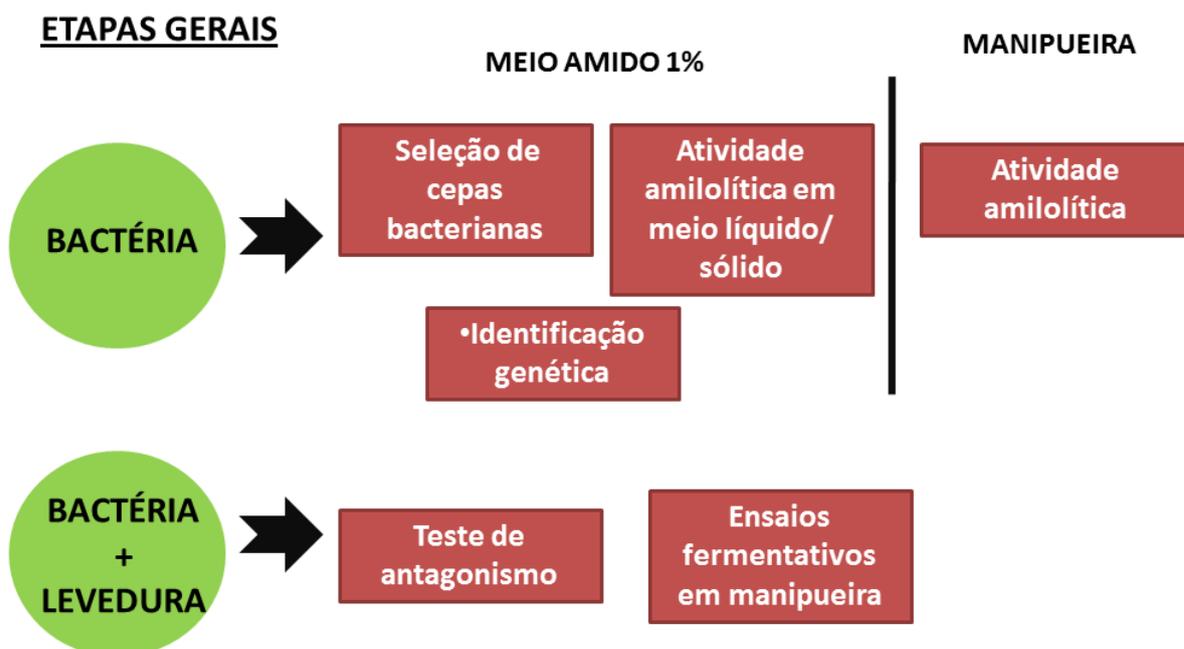
SANTOS *et al.* (2010) mostraram a eficiência do processo de SSF em relação ao processo ocorrido separadamente (SHF) na produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar, na medida em que o processo de SSF, além de utilizar menor quantidade de enzima, se completou em 32 horas a menos em comparação ao processo em SHF.

Outros estudos também demonstraram que maiores rendimentos de etanol foram obtidos com o processo de SSF em comparação com o processo de SHF (ALFANI *et al.*, 2000).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Na figura 10, encontra-se o esquema das etapas gerais do presente trabalho. Convém salientar que todos os crescimentos feitos neste estudo foram realizados em jarras de anaerobiose sob condição de 30°C.

**Figura 10:** Esquema das etapas gerais realizadas no presente trabalho



Como sugere o esquema acima, o trabalho foi dividido em duas etapas gerais; inicialmente trabalhou-se apenas com bactérias, em que foi realizada a seleção de bactérias produtoras de amilases em meio sólido contendo amido 1% como única fonte de carbono. Posteriormente, as bactérias que se destacaram na produção de amilases em meio sólido foram testadas quanto à capacidade de hidrolisar o amido em meio líquido ( meio contendo amido 1% como única fonte de carbono) e aquela que teve bom desempenho na hidrólise do amido em solução foi identificada geneticamente. A bactéria que se destacou na hidrólise do amido em meio contendo

amido 1% também teve sua atividade amilolítica testada em manipueira. Em um segundo momento, a bactéria que se destacou na hidrólise do amido, foi testada quanto à capacidade de crescimento em consórcio com a levedura comercial (teste de antagonismo). Por fim, ensaios fermentativos em consórcio entre bactéria e levedura foram realizados, onde avaliou-se parâmetros como consumo de amido e consumo de açúcar redutor.

#### **4.1 Coleta e preparação das amostras de mandioca (*Manihot esculenta*)**

As amostras de mandioca (*Manihot esculenta*) foram coletadas na fazenda Bem Bom, localizada no município de Santana (BA) e a manipueira foi cedida por uma casa de farinha localizada na Linha Verde, Mata de São João-BA; a manipueira utilizada neste estudo não recebeu nenhum tratamento, sendo congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  e autoclavada apenas no momento do uso.

Para a prospecção de bactérias amilolíticas, triturou-se a casca da mandioca, retirando-se, posteriormente, um grama deste triturado e adicionando-o a 3 mL de solução salina estéril. A suspensão (casca de mandioca + solução salina) foi homogeneizada no VORTEX por 3 minutos, aproximadamente. Após, foi realizada a diluição seriada do lavado a uma concentração de  $10^{-3}$ .

#### **4.2 Plaqueamento e seleção das cepas bacterianas direcionado por substrato**

O plaqueamento das amostras foi realizado em meio mineral amido (MMA) sólido, contendo:  $\text{NaNO}_3$  1,2g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  6g/L;  $\text{MgSO}_4$  0,2g/L;  $\text{CaCl}_2$  0,05g/L;  $\text{MnSO}_4$  0,01g/L; extrato de levedura 1g/L; amido 10g/L; ágar 10g/L. Foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  da diluição  $10^{-3}$  da casca de mandioca triturada no centro da placa de Petri. O espalhamento foi feito com o auxílio da alça de Drigalski. As placas foram, então, encubadas em jarras de anaerobiose a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após o crescimento, Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram isoladas por esgotamento com o

auxílio da alça de platina. As colônias aparentemente isoladas presentes no MMA foram repicadas separadamente em novas placas contendo MMA. As placas foram colocadas em jarra de anaerobiose durante 72 horas a 30°C.

As colônias isoladas foram conservadas em tubos contendo glicerol 20% a -20°C. Para cada isolado, os estoques foram feitos em duplicata.

### **4.3 Verificação da atividade amilolítica em meio sólido**

Para caracterização da atividade amilolítica em meio sólido, cada isolado foi inoculado sob a forma de spots em placas de MMA 1%, as quais foram incubadas a 30°C em jarra de anaerobiose. Após a incubação de 96h, a atividade amilolítica pôde ser determinada através da formação de halo transparente ao redor das colônias (indicativo de degradação do amido), o qual foi visualizado por revelação com lugol a 3%. Para cada isolado, os ensaios foram feitos em triplicatas. A atividade amilolítica foi estimada semi-quantitativamente usando-se o valor do Índice Enzimático (IE) que expressa a relação entre a medida do diâmetro médio do halo de degradação e do diâmetro médio da colônia (STAMFORD et al., 1998). Os diâmetros das colônias e dos halos foram medidos com o auxílio de uma régua milimetrada.

### **4.4 Identificação das cepas bacterianas pelo método de Gram**

Os microrganismos com os maiores IE em meio sólido foram identificados parcialmente a partir de suas características morfológicas em microscopia óptica (GUERREIRO e SILVEIRA, 1996). A técnica de coloração de Gram aliada à observação de lâminas a fresco foi utilizada para diferenciar os grupos de bactérias, bem como para verificar a pureza das culturas (FREITAS e PICOLI, 2007). Por meio de esfregaço, uma colônia de cada cepa cultivada em placas de MMA 1% foi

depositada sobre uma lâmina e feito um esfregaço com auxílio de alça. Após os esfregaços ficarem ao ar em uma superfície plana, foram então passados três vezes pela chama. Logo após esfriar, o esfregaço foi coberto durante um minuto com solução fenicada de cristal violeta. Escorreu-se o corante e cobriu-se o esfregaço com solução de lugol durante um minuto. Em seguida, lavou-se em água corrente e descorou-se com álcool 95° GL. Por fim, foi adicionado ao esfregaço a solução de fucsina básica por 30 segundos. As lâminas de Gram foram visualizadas em microscópio óptico Zeiss Axioplan em aumento de 1000x.

O método de Gram é um método de coloração que permite classificar bactérias em função das diferentes estruturas de parede celular a partir das colorações que estas adquirem após tratamento com os agentes químicos específicos.

#### **4.5 Determinação da capacidade de crescimento em meio líquido amido (MMA) 1% a pH 6,7 e pH 5,4.**

As cepas isoladas que apresentaram maiores IE em meio sólido foram testadas quanto à capacidade de crescimento em meio líquido contendo amido 1% como única fonte de carbono (MMA 1%). A determinação da capacidade de crescimento dos isolados foi estimada através da avaliação da densidade óptica, com comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro. Para tal, pré inóculos foram feitos inculando-se, por meio de alça, cada cepa isolada em 50 ml de meio amido 1%, os quais foram incubados a 30° C em jarra de anaerobiose por até 48 horas. Aquelas cepas que apresentaram crescimento satisfatório, isto é D.O de 0,8 em até 48 horas, foram selecionadas para ter seu crescimento acompanhado durante 72 horas em MMA 1% líquido com pH 6,7 e pH 5,5. (em que alíquotas foram retiradas a cada 24 horas). O pH de 6,7 foi utilizado por ser o pH da manipueira quando esta é recém formada nas casas de farinha e pelo fato de a levedura crescer bem em pH neutro, sendo portanto o pH inicial utilizado futuramente nos processos fermentativos. Por sua vez, o pH de 5,5 foi testado pelo fato de que ao final do processo fermentativo o pH tende a diminuir, principalmente por conta dos ácidos orgânicos gerados, sendo portanto necessária uma cepa bacteriana que resista em um pH levemente ácido, uma vez que haverá um consócio entre bactérias e

leveduras no processo de sacarificação e fermentação concomitantes da manipueira.

#### **4.6 Identificação genética**

A cepa que cresceu de forma satisfatória em meio líquido contendo amido como única fonte de carbono foi selecionada para identificação em nível molecular, por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA.

##### *4.6.1 Extração de DNA*

A extração do DNA foi realizada a partir do cultivo recente de bactérias incubadas sob anaerobiose, a 30°C, durante 20 horas, aproximadamente. Para o processo de extração foi utilizado o Kit da QIAGEN específico para extração de DNA genômico bacteriano em que foram seguidas as recomendações do fabricante.

Ao término da extração, o DNA obtido de cada amostra foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000-2000c).

##### *4.6.2 Reação de PCR*

A Reação em Cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para a amplificação da região 16S do rRNA. Os pares de iniciadores utilizados foram 8F forward (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e 1492R reverse (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') conforme descrito por Lebonah et al., (2014). As reações de PCR foram feitas em um volume final de 20µL, contendo 10µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 0.6µM de oligonucleotideo forward

e 0.6 $\mu$ M de oligonucleotídeo reverse, 20ng de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20 $\mu$ L. O programa de amplificação para região 16S consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 40 segundos; extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (*Applied Biosystems*).

#### 4.6.3 Sequenciamento

As amostras de PCR foram avaliadas em gel de agarose 2% e purificadas com Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.). A quantificação dos produtos purificados foi realizada utilizando um Nanodrop (ThermoFischer).

A reação de sequenciamento foi realizada na empresa BPI BIOTECNOLOGIA, localizada em Botucatu, SP. Para a reação utilizou-se o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Após, foi realizada a reação de precipitação do DNA por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio.

Posteriormente, o DNA precipitado foi direcionado para o processo de sequenciamento automático por eletroforese capilar no Sequenciador automático ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A montagem e o alinhamento das sequências obtidas foram realizadas através dos programas EMBOSS/Merger; Chromas Lite; MultAlin, obtendo-se a sequência consenso, a qual foi comparada com o banco de dados do NCBI através do algoritmo BLASTn.

Através do BLASTn, foi realizada uma busca de alta, média e baixa similaridade no banco de dados, utilizando-se para tal a fita consenso resultante do seqüenciamento. Posteriormente, para a construção da árvore filogenética, procedeu-se ao alinhamento das sequências escolhidas através do programa CLUSTAL-OMEGA. A árvore filogenética foi gerada a partir do pacote PHYLIP, usando-se o método fenético, técnica de Neighbor-Joining, matriz KIMURA e teste de bootstrap para 1000 repetições.

#### **4.7. Determinação de atividade amilolítica bacteriana em meio líquido contendo amido 1% como única fonte de carbono em pH 6,7**

A cepa que apresentou capacidade de crescimento em MMA 1% líquido foi selecionada para ensaios de caracterização da atividade amilolítica no mesmo meio.

Para tal, pré inóculos foram produzidos pelo repique, com alça, das colônias isoladas que estavam nas placas, em 50 ml de MMA 1%, e foram incubados a 30° C em jarras de anaerobiose até atingirem D.O de 0,8 a 600 nm. Então, duzentos microlitros deste pré inóculo foram repicados em frascos contendo 20 mL de MMA 1%, os quais foram incubados a 30°C em jarra de anaerobiose. Alíquotas de 500µL foram retiradas nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas. Desse total, 300 µL foram utilizados no teste de dosagem de amido, a fim de se acompanhar o consumo de amido pelas cepas e os 200 µL restantes foram centrifugados a 15000 x g durante 3 minutos a 5°C, em que o sobrenadante foi utilizado para dosagem de açúcar redutor e nos ensaios de caracterização de atividade de amilase. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

##### *4.7.1. Dosagem da concentração de amido em meio mínimo líquido contendo amido 1% como única fonte de carbono em pH 6,7*

A dosagem de amido consistiu em diluir 300 microlitros das alíquotas, retiradas nos tempos anteriormente mencionados, em 1200 microlitros de água destilada, agitando a mistura em VORTEX; posteriormente, 20 microlitros da diluição anterior foram adicionados a 1480 microlitros de lugol 2% e a mistura foi novamente agitada em VORTEX. A absorbância foi lida a 620nm. O branco do teste consistiu em uma mistura de 20 microlitros de água destilada em 1480 microlitros de lugol 2%. A dosagem de amido baseia-se na coloração azul desenvolvida quando há a formação do complexo amido-iodo. A concentração de amido foi aferida contra curva padrão de amido construída utilizando-se a mesma metodologia (BASTOS- NETTO, 2012).

#### *4.7.2 Dosagem da concentração de açúcares redutores em meio mínimo líquido contendo amido 1% como única fonte de carbono em pH 6,7*

Os açúcares redutores foram mensurados através da metodologia de dosagem em microplaca utilizando-se o reagente DNS (DEOTI et al., 2013). O ácido 3,5-dinitrosalicílico, “DNS”, em meio básico e à temperatura elevada, passa a 3-amino-5-nitrosalicílico, desenvolvendo uma coloração amarelo café que absorve a 490 nm (SOCCOL, 1992; DEOTI et al., 2013). O reativo de DNS foi obtido diluindo-se 5g de ácido dinitrosalicílico em 100 mL de NaOH sob aquecimento. Separadamente, 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio foram dissolvidos, também com aquecimento, em 250 mL de água destilada. Posteriormente, as duas soluções foram misturadas e o volume final foi completado com água destilada para 500 mL. Para a dosagem de açúcares redutores, 25  $\mu$ L do sobrenadante, convenientemente diluído, foram adicionados aos poços da microplaca; posteriormente, 25  $\mu$ L do reativo DNS também foram adicionados aos poços. A microplaca foi selada com filme plástico e sua base foi aquecida a 100° C durante 5 minutos em banho fervente. Após esse tempo, a base da microplaca foi resfriada no gelo para cessar a reação e em cada poço preenchido foram adicionados 330  $\mu$ L de água destilada. A absorbância foi lida a 490 nm. A concentração de glicose foi aferida utilizando-se uma curva padrão de glicose construída utilizando-se a mesma metodologia.

#### *4.7.3 Dosagem de atividade amilásica em meio mínimo líquido contendo amido 1% como única fonte de carbono em pH 6,7*

Os sobrenadantes obtidos dos crescimentos bacterianos nos tempos citados acima também foram utilizados para quantificar a atividade de alfa-amilase e glicoamilase no caldo de crescimento bacteriano.

#### 4.7.3.1 Atividade dextrinizante de alfa-amilase (FUWA, 1954)

A 80µl de tampão acetato de sódio (50 mmol. L<sup>-1</sup>, pH 5,5), foram adicionados 20µl de sobrenadante enzimático retirado nos tempos anteriormente citados e 100µl de solução de amido (0,5%). A mistura foi incubada a 40°C por 20 minutos e a reação interrompida com a adição de 200µl de ácido acético (1,0 mol. L<sup>-1</sup>) e 200µl da solução de iodo/iodeto (1% iodo em etanol absoluto, 10% iodeto de potássio e água destilada na proporção de 1v:1v:3v). O volume foi completado para 10 mL com água destilada, homogeneizado e a absorbância determinada a 660nm. O branco da reação constituiu-se de 80µl de tampão e 120 µl de água destilada. Controles foram feitos usando-se os mesmos reagentes dos testes para determinar o quanto de amido havia no início do teste, com a diferença de que os mesmos não ficavam incubados durante os 20 minutos a 40°C. A diferença entre a concentração de amido no controle e a concentração de amido após o tempo de incubação do ensaio indica o quanto de amido foi degradado nos 20 minutos de incubação resultantes da ação da a-amilase.

A quantidade de amido consumida foi calculada de acordo com uma curva padrão construída com quantidades crescentes de amido solúvel (0 - 0,5 mg.ml<sup>-1</sup>). Uma unidade (U) de atividade amilolítica dextrinizante foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1mg de amido por minuto de reação.

#### 4.7.3.2 Atividade sacarificante de glicoamilase (Bernfeld, 1955)

A 80µl de tampão acetato de sódio (50 mmol. L<sup>-1</sup>, pH 5,5), foram adicionados 20µl de sobrenadante enzimático, retirado nos tempos anteriormente citados, e 100µl de solução de amido (0,5%). Tal mistura foi encubada a 40°C durante 20 minutos. Após este tempo, 100µL da mistura de reação foram coletados e adicionados em tubo de ensaio contendo 1,0 ml do reagente DNS. A mistura foi fervida por 5 minutos em banho-maria a 96°C e a absorbância determinada a 550nm. O branco da reação

constituiu-se de 100  $\mu\text{L}$  de amido, 80  $\mu\text{L}$  de tampão e 20  $\mu\text{L}$  de água. Os controles, por sua vez, constituíram-se de 80  $\mu\text{L}$  de tampão, 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e 100  $\mu\text{L}$  de água. A partir dos controles, foi possível determinar o quanto de açúcar redutor havia na amostra no início do teste. A diferença entre o valor de açúcar redutor ao final do teste e o valor do controle indica a quantidade de açúcar redutor formada em 20 minutos devido à ação de glicoamilase.

A quantidade de açúcares redutores formados é calculada de acordo com uma curva padrão de glicose (MILLER, 1959). Uma unidade (U) de atividade sacarificante foi definida como a quantidade de enzima que libera 0,1 mg de açúcar redutor por minuto de reação.

#### **4.8 Determinação da capacidade de crescimento bacteriano em meio sólido com manipueira como substrato**

A cepa isolada que apresentou significativa capacidade de crescimento em meio amido líquido foi testada quanto à capacidade de crescimento em meio sólido contendo manipueira como substrato. Para tal, as bactérias foram reativadas em meio amido sólido (MMA) e mantidas a 30° por 24 horas sob condição de microaerofilia. Posteriormente, a cepa reativada foi repicada em placas contendo manipueira como substrato, através da técnica de estriamento por esgotamento. O meio sólido consistiu de 250 ml de manipueira autoclavada e 3,75g de ágar. As placas foram submetidas a 30° durante 48 horas, sob condição de microaerofilia.

#### **4.9 Determinação de atividade amilolítica bacteriana em caldo de fermentação contendo manipueira como substrato**

A cepa que apresentou maior atividade amilásica em meio líquido amido foi testada quanto à sua capacidade de hidrolisar o amido contido na manipueira, visando, futuramente, um consórcio com a levedura comercial *Sacharomyces cerevisiae* para produção de etanol a partir da manipueira.

Os pré inóculos foram produzidos pelo repique com alça das colônias isoladas em 50 mL meio mínimo amido e incubados a 30° C em jarras de anaerobiose até atingirem densidade ótica de 0,8 a 600 nm. Posteriormente, 200 µL deste pré inóculo foram repicados em frascos contendo 20 mL de manipueira, os quais foram incubados a 30°C em jarra de anaerobiose. Alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas para dosagem de açúcares redutores e dosagem de amido, segundo metodologia descrita nos itens 4.7.1 e 4.7.2.

#### 4.10 Teste de antagonismo entre bactérias e leveduras

Visando o consórcio entre bactérias e leveduras para atuarem juntas no processo de sacarificação e fermentação concomitantes da manipueira, foi realizado um teste de antagonismo para observar se a cepa bacteriana que se destacou na hidrólise do amido em meio mínimo e em manipueira inibiam o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e vice-versa.

As bactérias e as leveduras foram reativadas em meio amido 1% e meio YEPD (Tabela 2), respectivamente.

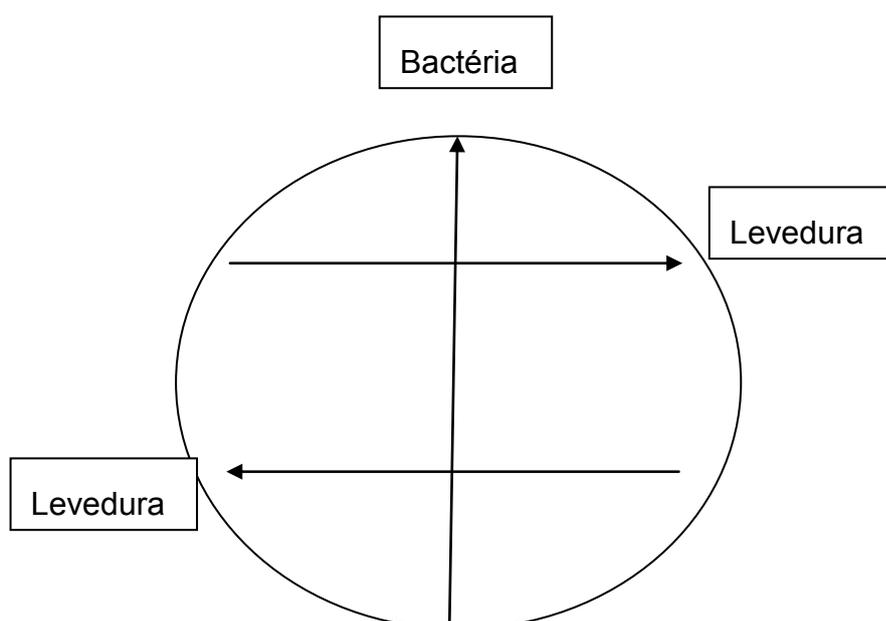
**Tabela 2:** Composição do meio YEPD

COMPONENTES	QUANTIDADE
Glicose	20g
Peptona	20g
Extrato de levedura	10g
Agar	15g
Água destilada	1000ml

Para reativação das bactérias, uma alçada de cultura foi repicada em novas placas de Petri contendo MMA 1% e incubadas em jarras de anaerobiose a 30°C por 24 horas. Por sua vez, as leveduras utilizadas no teste, as quais foram obtidas comercialmente (Fermento de pão da marca FLEISCHMANN), precisaram ser reativadas em água destilada estéril por cerca de 30 minutos. Posteriormente, a solução foi homogeneizada, transferindo-se 100 µL da mesma para o centro de uma placa de Petri contendo meio YEPD, espalhando a solução com o auxílio de uma alça de Drigalski. A placa contendo a levedura foi incubada a 30°C por 24 horas em jarra de anaerobiose e, posteriormente, foi realizado o isolamento de colônias da levedura através da técnica de esgotamento por estriamento.

Após 24 horas de crescimento de cada microorganismo, culturas de bactérias e leveduras foram transferidas, assepticamente, por meio de alças para placas contendo meio YEPD conforme o esquema mostrado na figura 11. Placas contendo cultura pura de cada microorganismo serviu como controle. As placas foram avaliadas após 48 horas de incubação a 30°C em jarra de anaerobiose, observando-se o crescimento da cultura e/ou formação de halo de inibição. Foram feitas duplicatas do ensaio.

**Figura 11:** Esquema do teste de antagonismo entre a cepa bacteriana e a levedura *Sachharomyces cerevisiae*



## 4.11 Ensaios fermentativos

### 4.11.1 Fermentação apenas com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em manipueira e em meio YEPD em pH 6,7

Inicialmente, as fermentações foram realizadas com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* obtidas comercialmente (Fermento biológico Fleischmann). Primeiramente o fermento foi reativado em 100 mL de água destilada estéril. Posteriormente, 100 µL da solução de água e fermento foram transferidos para placas contendo meio YEPD e espalhados com o auxílio de uma alça de Drigalski. Após 24 horas de crescimento a 30° sob condição de anaerobiose, uma alçada da colônia foi retirada e colocada em 50 mL de meio YEPD líquido. Após 24 horas de crescimento a 30° sob anaerobiose, alíquotas de 200 µL do crescimento foram retiradas e pipetadas em 20 mL dos seguintes meios: YEPD e manipueira a pH 6,7. O meio YEPD serviu como um controle, já que é um meio adequado para crescimento de levedura. As fermentações ocorreram em jarra de anaerobiose a 30°C. Alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas para medição da concentração de amido, açúcar redutor residual e contagem de células. Tais fermentações funcionaram como um controle, em que os resultados obtidos foram contrastados com os resultados obtidos na etapa de sacarificação e fermentação concomitantes em que participaram bactéria e levedura.

#### 4.11.1.1 Dosagem de amido e açúcares redutores durante o processo fermentativo

A dosagem de amido e de açúcares redutores durante as fermentações foram realizada conforme metodologia descrita no item 4.7.1 e 4.7.2.

#### 4.11. 1. 2 Contagem de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Conforme LEE (1981), a contagem de leveduras ocorreu através da utilização da Câmara de Neubauer. As análises foram realizadas durante a fermentação em que alíquotas de 100 microlitros foram retiradas nos tempos anteriormente mencionados e convenientemente diluídas em solução salina (10 vezes). Posteriormente, 100 microlitros da diluição foi misturada à 900 microlitros de solução de azul de metileno. Na câmara, contaram-se as células presentes nos quatro retículos centrais de cada um dos vinte e cinco campos, nos dois maiores campos da lâmina.

#### 4.11.2 Sacarificação e fermentação concomitantes de manipueira

A cepa bacteriana que mais de destacou na hidrólise do amido, foi selecionada para participar do processo de sacarificação e fermentação concomitantes de manipueira. Para tal, pré- inóculos bacterianos foram preparados da seguinte forma: retirou-se uma alçada da colônia bacteriana que estava em placa contendo MMA, inoculou-se em 50 mL de MMA líquido e aguardou-se até que a bactéria atingisse uma DO600 nm de 0,8. Após, inoculou-se 200  $\mu$ L do pré- inóculo em 20 mL de caldo de fermentação, o qual era composto de manipueira autoclavada com pH 6,7. O caldo contendo manipueira e bactéria foi incubado a 30°C em jarra de anaerobiose. A partir deste ponto, foram realizados dois experimentos:

Experimento 1) 200  $\mu$ L de inóculo contendo levedura crescida por 24 horas em meio YEPD a 30°C em jarra de anaerobiose foram transferidos para o caldo de fermentação composto por manipueira e cultura bacteriana com 24 horas de crescimento;

Experimento 2) 200  $\mu$ L de inóculo contendo levedura crescida por 24 horas em meio YEPD a 30°C em jarra de anaerobiose foram transferidos para o caldo de fermentação composto por manipueira e cultura bacteriana com 48 horas de crescimento.

Os testes foram feitos em triplicatas para cada experimento e a fermentação ocorreu em jarra de anaerobiose a 30°C. Alíquotas 900 µL foram retiradas assepticamente dos frascos onde estavam ocorrendo as fermentações nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, dos quais 300 µL foram utilizados no teste de dosagem de amido, 300 µL foram congelados para posterior contagem de células viáveis e 300 µL foram centrifugados a 15000 rcf durante 3 minutos, dos quais 25 µL do sobrenadante foram utilizados para dosagem de açúcar redutor e o restante foi congelado para posterior dosagem de etanol.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Seleção de microrganismos em meio sólido contendo amido como única fonte de carbono**

Dezoito morfotipos bacterianos provenientes da casca da mandioca capazes de crescer em anaerobiose com amido como única fonte de carbono foram selecionados. Os aspectos morfológicos destes isolados variaram desde colônias amareladas, opacas, com bordas irregulares e médias; até colônias brancas, leitosas e bordas irregulares (dados não mostrados). Os microrganismos selecionados foram armazenados e identificados como LBI 1401 a LBI 1418.

### **5.2 Avaliação do potencial amilolítico em meio sólido**

Os isolados microbianos foram inoculados sob a forma de spots, em triplicata, em meio contendo amido 1% como única fonte de carbono e tiveram sua capacidade amilolítica determinada através da formação de halos transparentes ao redor da colônia após a inundação da placa com lugol 3%. A presença do halo transparente ao redor da colônia indica que os microrganismos que formam a colônia são capazes de secretar amilases, as quais hidrolisam o amido existente no meio.

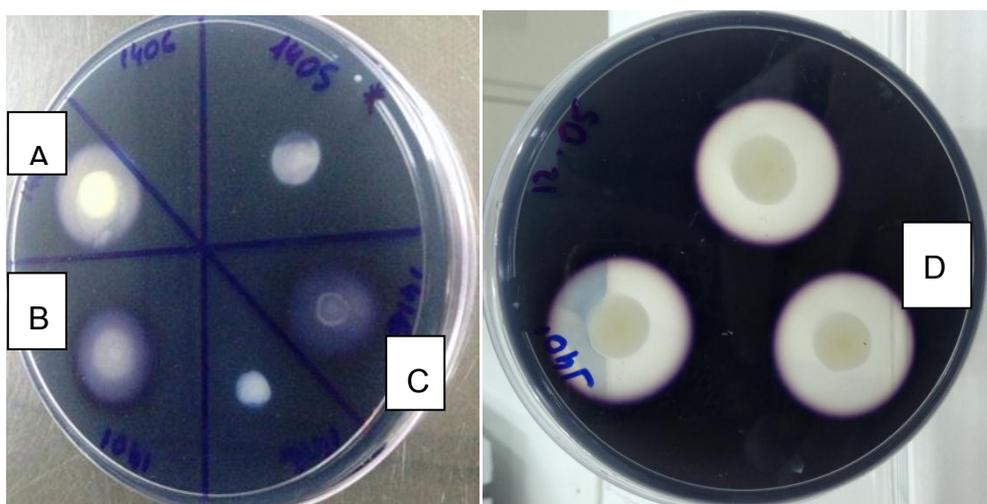
Após a medição do diâmetro dos halos e das colônias, foi possível determinar o Índice Enzimático (IE). Segundo Stanford (1998) uma cepa é considerada como uma potencial produtora de amilase quando o IE (DH/DC) é superior a 2. Na tabela 3 consta as cepas que apresentaram IE maior que 2 em meio sólido contendo amido como única fonte de carbono após 96 horas de crescimento.

CEPAS	IE 96H	DESVIO PADRÃO
1401	2,37	0,02
1404A	2,22	0,032
1416	2,2	0,021
1414	2,25	0,018

**Tabela 3:** Média dos Índices Enzimáticos dos isolados que apresentaram atividade amilásica relevante após 96 horas de crescimento em condições de anaerobiose.

Neste experimento, das 18 cepas isoladas, 4 apresentaram IE >2 após 96 horas de crescimento, sendo elas : LBI1401, LBI1404A, LBI1416, LBI1414( Figura 12). Este fato indica que tais cepas são eficientes na produção e secreção de amilases. Os valores encontrados foram um pouco inferiores àqueles descritos por Oliveira et al., (2007) que identificaram a atividade enzimática maior que 2,0 em 37% das cepas isoladas.

**Figura 12:** Acessos bacterianos que apresentaram maiores IE para degradação de amido em meio sólido após 96h de crescimento. A) cepa LBI1404A, B) cepa LBI1414, C) LBI 1416, D) cepa 1401.



Fonte: Autoria própria

### 5.3 Caracterização das cepas através do método de Gram

As cepas bacterianas que apresentaram maiores IE, foram analisadas de acordo com o método de coloração de GRAM. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 4.

**Tabela 4:** Códigos atribuídos, morfologia e coloração de Gram dos isolados de mandioca que apresentaram os maiores IE após 96 horas de incubação

CEPAS	GRAM	MORFOLOGIA
LBI 1401	+	COCOBACILO
LBI 1404A	+	BACILO ( Sugestivo <i>Bacillus sp.</i> )
LBI 1414	+	BACILO ( Sugestivo <i>Bacillus sp.</i> )
LBI 1416	-	BACILO

### 5.4 Capacidade de crescimento das cepas bacterianas em meio líquido amido 1% a pH 6,7 e pH 5,5

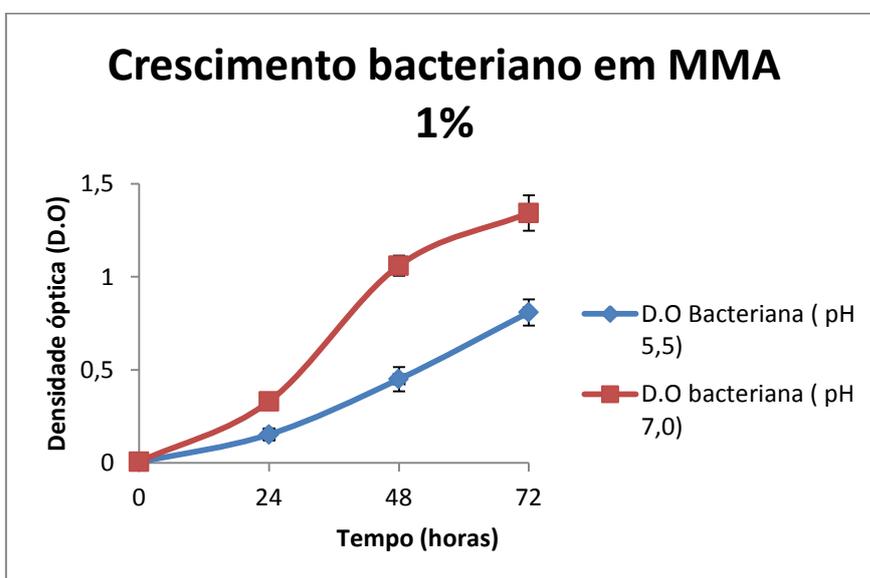
As cepas que apresentaram IE > 2 (LBI 1401; LBI 1404A; LBI 1414; LBI1416) foram testadas quanto à sua capacidade de crescimento em meio líquido contendo amido 1% como única fonte de carbono. Pré-inóculos foram produzidos como descrito em Material e Métodos e das quatro cepas analisadas, apenas a cepa LBI 1401 atingiu a DO de 0,8 em menos de 48 horas. Desta forma, a cepa 1401 foi escolhida para ter

seu crescimento acompanhado ao longo de 72 horas em MMA 1% líquido em pH 7,0 e pH 5,5.

Desta forma, 200  $\mu$ L de pré- inóculo, preparados conforme descrito em material e métodos, foram repicados em 20 mL de meio mínimo amido 1% e alíquotas foram retiradas a cada 24 horas, em que a o crescimento foi estimado através da medida da D.O a 600 nm de comprimento.

Através da figura 13, pode-se observar que, sob condição de anaerobiose a 30°C, a cepa bacteriana mostrou crescimento mais rápido em MMA 1% a pH 7,0, entretanto também foi capaz de crescer em pH 5,5. Isto indica que a cepa analisada possui capacidade de secretar enzimas amilolíticas no meio extracelular, utilizando o amido como fonte de carbono para seu crescimento.

**Figura 13:** Crescimento bacteriano em MMA 1% a pH 7,0 e pH 5,5 em anaerobiose



Fonte: Autoria própria

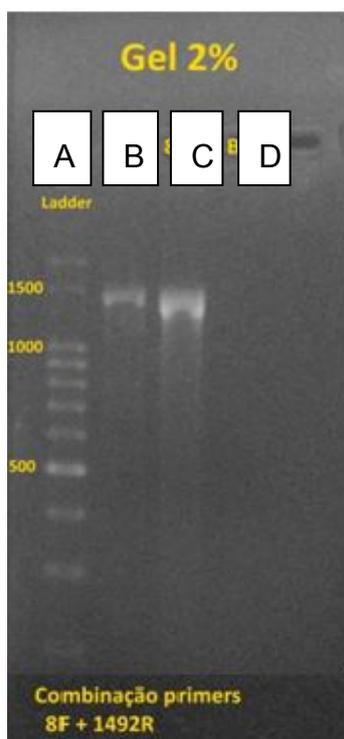
Desta forma, pode-se concluir que a cepa 1401, por ter capacidade de crescer em pH ácido de 5,5, se mostra como uma cepa capaz de participar de uma fermentação, afinal ela resistirá à diminuição do pH ao longo do processo fermentativo ( resultante da produção de ácidos orgânicos), abrindo perspectivas para que a cepa seja utilizada no consórcio com a levedura no processo de sacarificação e fermentação concomitantes da manipueira.

### **5.5 Identificação genética**

Uma vez que a cepa 1401 mostrou crescimento satisfatório em meio amido, a mesma foi selecionada para identificação a nível molecular.

A identificação foi realizada através da extração do DNA genômico. A amplificação parcial do gene ribossomal bacteriano 16S, gene altamente conservado e utilizado na identificação bacteriana (GRAY et al., 2001; DAMS et al., 1988; WOESE, 1987) foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR). As amostras de PCR foram avaliadas em gel de agarose 2% (Figura 14), purificadas e então sequenciadas.

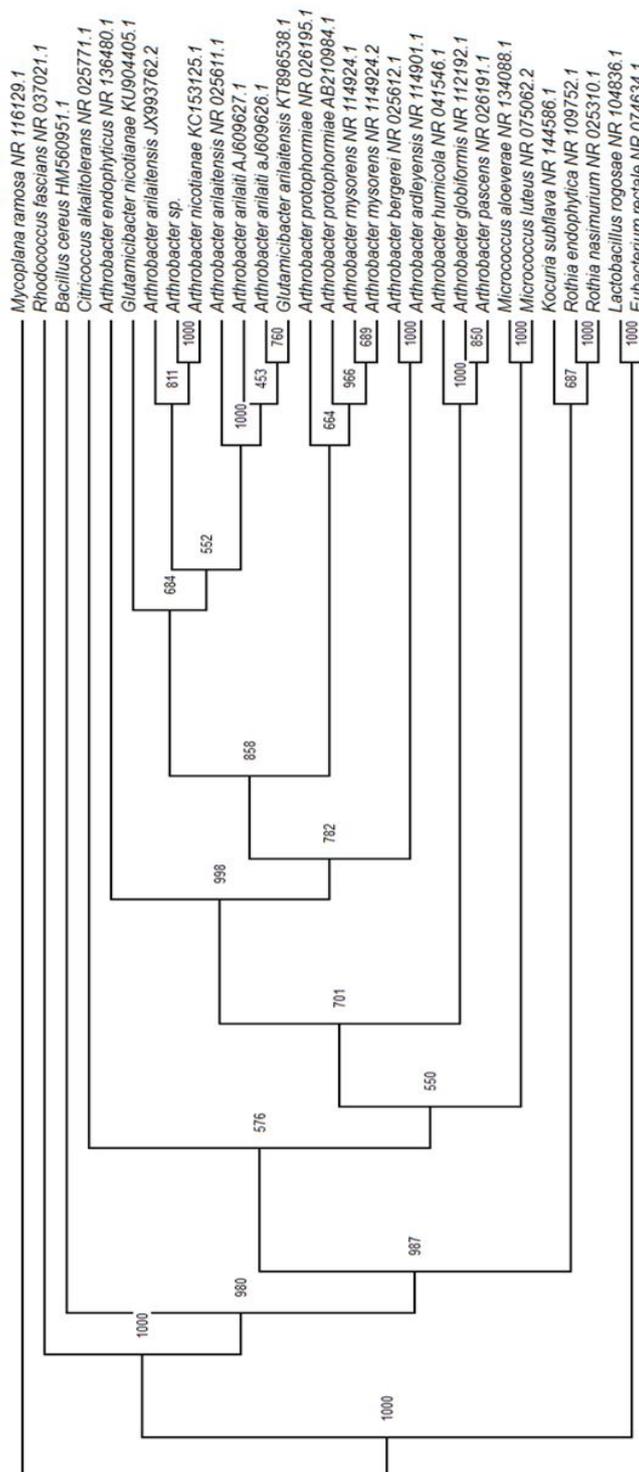
**Figura 14:** Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. A- Marcador de peso molecular; B e C- Duplicatas do gene 16S rRNA da cepa 1401; D- Controle negativo



Fonte: Autoria própria

A sequência do rRNA 16S das cepa 1401 revelou significativa homologia ( $P \geq 99\%$ ) com a sequência de *Arthrobacter nicotianae*, sendo possível designar a cepa 1401 como pertencente ao gênero *Arthrobacter*, tendo a espécie *Arthrobacter nicotianae* como a mais próxima, o que pode ser visto na árvore filogenética construída a partir de sequências do gene 16s rRNA de bactérias com alta, média e baixa similaridade em relação à sequência da cepa 1401( Figura 15).

**Figura 15:** Árvore filogenética construída com base na sequência do gene 16S rRNA. Cepa 1401 identificada como *Arthrobacter* sp.



Fonte: Autoria própria.

O gênero encontrado pertence ao filo das actinobactérias, as quais compreendem um grupo heterogêneo de bactérias, que filogeneticamente pertencem ao ramo das bactérias Gram-positivas com alto teor de G+C e que tem a capacidade de crescer em laboratório numa ampla faixa de pH ( pH 5,0- pH 9,0), fato esse observado no presente estudo em que a bactéria cresceu em pH 5,5 e 7,0. Neste grupo estão incluídos, além do gênero *Arthrobacter*, gêneros com diferentes características morfológicas, como: *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Microbispora*, entre outros (GARCIA, 2006)

Conforme relatado por Conn (1928), muitos estudos têm demonstrado que o gênero *Arthrobacter* representa uma fração numericamente importante das bactérias de solos de todas as partes do mundo, sendo encontrado também na água e em outros ambientes naturais, onde exercem várias funções importantes relacionadas com a remoção de produtos químicos. Alguns estudos relatam que várias espécies de *Arthrobacter* podem reduzir o cromo hexavalente, o qual causa sérios problemas ambientais e graves problemas de saúde no ser humano. Além disto, estas bactérias são também capazes de degradar pesticidas agrícolas e são importantes agentes de mineralização de matéria orgânica (PERRY E STALEY, 1997).

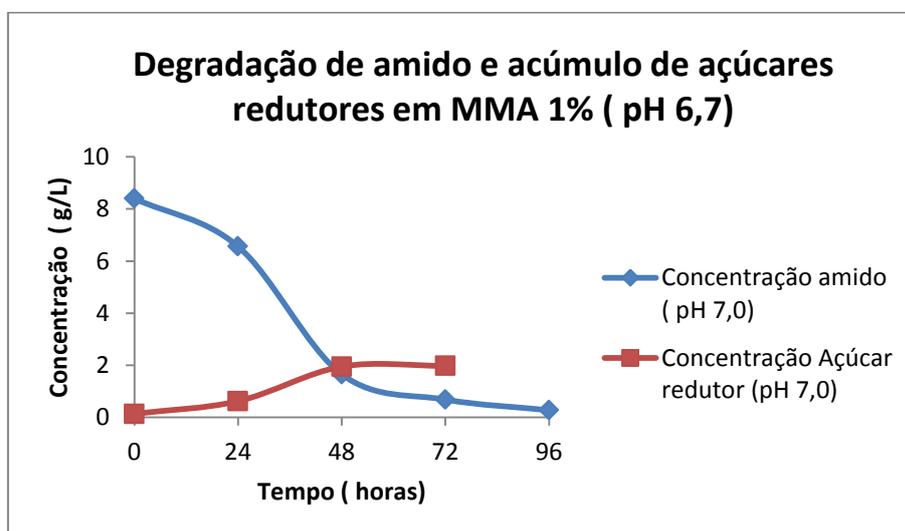
Frequentemente, as espécies do gênero *Arthrobacter* são generalizadas como aeróbias obrigatórias. Entretanto, a cepa do gênero *Arthrobacter* tratada no presente trabalho mostrou capacidade de crescer em condições de microaerofilia. Tal fato é corroborado pelos estudos de Eschbach (2003), o qual comprova a capacidade de crescimento de pelo menos duas espécies do gênero, *Arthrobacter globiformis* e *Arthrobacter nicotianae* em condições de anaerobiose, ao usarem o nitrato presente no meio como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória reduzindo-o a amônia via nitrito. Eschbach (2003) sugere que alterações na tensão de oxigênio ocorrem frequentemente nas camadas de solo, o habitat do gênero *Arthrobacter* e, portanto, algumas espécies desenvolveram métodos alternativos, independentes do oxigênio como estratégias de crescimento.

## 5.6 Avaliação da atividade amilolítica em MMA 1% a pH 6,7

Além da capacidade de crescimento, monitorou-se também a capacidade de degradar amido no meio e, conseqüentemente, o acúmulo de açúcares redutores. A quantidade de amido e de açúcares redutores presente no meio foi calculada a partir de uma reta padrão construída a partir de soluções de amido e de glicose de concentração conhecida, respectivamente.

Desta forma foi possível calcular a quantidade de amido e de glicose presente no meio de crescimento bacteriano (MMA 1%) ao longo de 72 horas, como mostrado na figura 16.

**Figura 16** : Dosagem de amido e açúcar redutor durante crescimento bacteriano em meio mínimo amido 1% em pH 6,7.



Fonte: Autoria própria

De acordo com o gráfico, percebe-se que a bactéria foi bastante eficiente em degradar o amido presente no meio líquido contendo amido 1%, uma vez que após 48 horas de crescimento, aproximadamente 80 % de todo o amido já havia sido

degradado. Também com 48 horas de cultivo, houve o máximo de acúmulo de açúcar redutor no meio (aproximadamente 2g/L), o qual manteve-se em quantidade estável após este tempo. A partir de tais dados é possível concluir que conforme o microrganismo se reproduz, o mesmo é capaz de secretar enzimas amilolíticas no meio, as quais promovem a hidrólise do amido presente, com concomitante produção de açúcares redutores, provavelmente dextrinas, maltose, isomaltose e/ou glicose, açúcares estes que servem como fonte de energia para o próprio microrganismo (SPIER, 2005). Nas primeiras 48 horas de crescimento, o açúcar se acumula no meio, provavelmente por ser o período lag do crescimento da bactéria, em que a mesma encontra-se em fase de adaptação ao meio, consumindo pouco açúcar. Após 48 horas de crescimento, observa-se que a taxa de açúcar redutor se mantém estável, provavelmente pelo fato de a bactéria estar em fase de crescimento exponencial, em que as taxas de produção e consumo de açúcar ficam equivalentes.

### **5.7 Capacidade de crescimento bacteriano em meio sólido com manipueira como substrato ( pH 6,7)**

A bactéria *Arthrobacter sp.*, que se mostrou eficiente na degradação do amido tanto em meio sólido quanto em solução, foi testada quanto à capacidade de crescimento em meio sólido com manipueira como substrato. Após 48 horas de crescimento, sob condição de anaerobiose a 30°, foi possível a visualização da formação das colônias bacterianas (Figura 17), indicando, portanto a capacidade da cepa 1401 em crescer em manipueira como substrato.

**Figura 17:** Crescimento da cepa 1401 em placa contendo manipueira como substrato



Fonte: Autoria própria

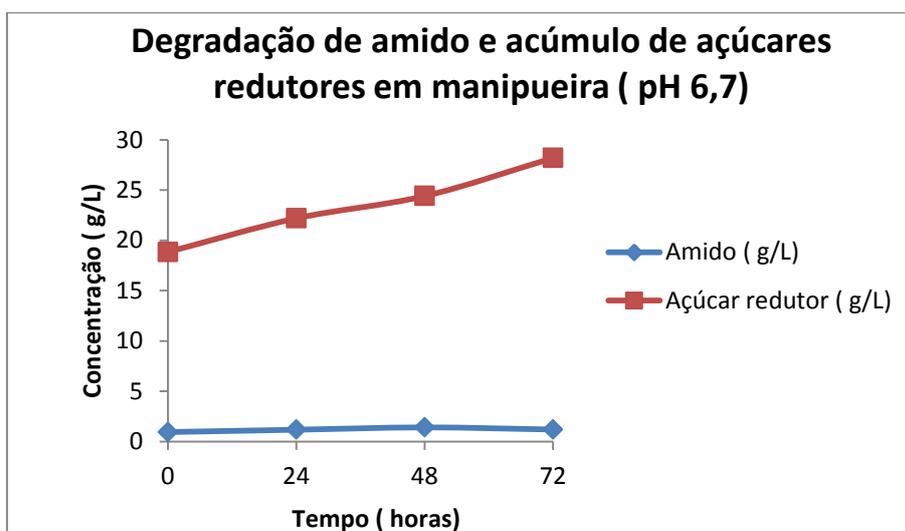
O excelente desenvolvimento da bactéria em placas contendo manipueira pode ser explicado pelo fato de que este resíduo é rico em macro e micronutrientes como por exemplo, compostos nitrogenados ( $1.580\text{mg.L}^{-1}$ ) e fosfatados ( $112\text{mg.L}^{-1}$ ), além de glicose e outros componentes essenciais para o metabolismo celular de microorganismos (APRILE et al., 2004). Tal fato, aliado à capacidade de hidrolisar o amido em solução, abre perspectivas para o uso da cepa 1401 como agente sacarificante no processo de fermentação para produção de bioetanol a partir de manipueira.

### **5.8 Avaliação da atividade amilásica em caldo contendo manipueira como substrato ( pH 6,7)**

Uma vez que foi comprovada a capacidade de crescimento da cepa 1401 em placas contendo manipueira como substrato, foi analisada a capacidade da mesma em degradar o amido presente em caldo de fermentação constituído por manipueira. Para tal, seguiu-se a metodologia descrita em material e métodos (item 4.7) e alíquotas do crescimento bacteriano foram retiradas nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas. Através da figura 18 é possível constatar que ao longo do crescimento houve

um discreto aumento da quantidade de açúcar redutor presente no meio, enquanto que a concentração de amido manteve-se, praticamente, constante.

**Figura18:** Degradação de amido e aparecimento de açúcar redutor em caldo de fermentação contendo manipueira como substrato em pH 6,7



Fonte: Autoria própria

O fato da quantidade de amido na manipueira ter sido pequena, aproximadamente 2g/L, pode ser explicada pelo fato de que apenas o amido solúvel é mensurado no teste. Vale ressaltar que grande parte do amido contido na manipueira se encontra insolúvel, decantando-se no fundo do recipiente juntamente com outros sólidos insolúveis (Figura 19).

**Figura 19:** Manipueira autoclavada. Sólidos insolúveis ao fundo



Fonte: Autoria própria

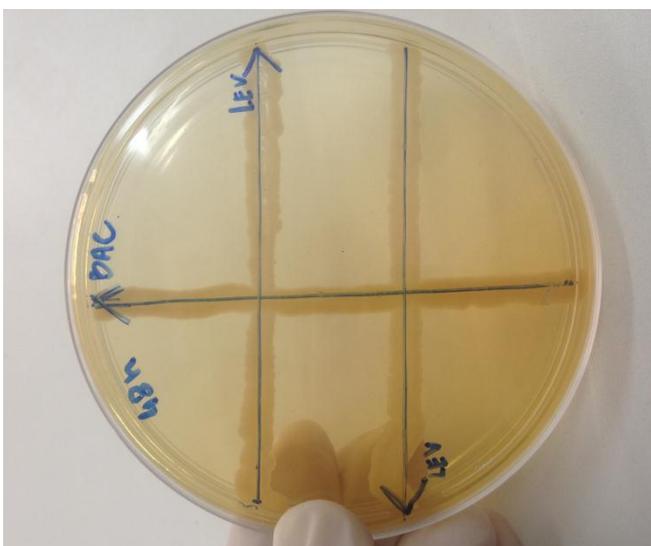
Outra ocorrência observada no gráfico diz respeito à quantidade de amido, a qual se mantém praticamente constante ao longo das 72 horas, o que poderia levar a uma interpretação equivocada de que o amido não estaria sendo degradado; de fato, a taxa de consumo de amido na manipueira é muito inferior à taxa de consumo de amido no meio amido 1%, isto porque a quantidade de açúcar redutor na manipueira é muito alta, cerca de 20 g/L (figura 18), e, portanto, a bactéria usa preferencialmente o açúcar ao amido. Entretanto, pode-se observar no gráfico da figura 19 que a quantidade de açúcar redutor se eleva ao longo das 72 horas de crescimento, chegando a 28g/L. Isto pode ser explicado pelo fato de que a bactéria, ao produzir amilases, liberando-as no meio, degrada parte do amido solúvel existente, o qual é clivado em dextrinas e outros açúcares de baixo peso molecular, aumentando, desta forma, a quantidade de açúcares redutores na solução. Por outro lado, na medida em que o amido vai sendo clivado em dextrinas e outros açúcares de baixo peso molecular, como glicose, o amido que estava insolúvel, torna-se solúvel, até que o coeficiente de solubilidade seja atingido, o que explica as taxas constantes de amido ao longo do crescimento bacteriano.

### **5.9 Antagonismo entre bactéria (*Arthrobacter sp.*) e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)**

O resultado do teste de antagonismo entre a cepa identificada, *Arthrobacter sp.*, e a *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismos candidatos ao consórcio no processo de

sacarificação e fermentação concomitantes de manipueira, mostrou que não houve inibição do crescimento nem da bactéria e nem da levedura quando ambas foram colocadas para crescer juntas na mesma placa ao longo de 48 horas de cultivo a 30°C sob anaerobiose (Figura 20).

**Figura 20:** Ausência de antagonismo entre a bactéria *Arthrobacter sp.* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Autoria própria

De acordo com Cherubin (2003), diferentes linhagens, tanto de levedura quanto de bactérias, podem afetar de maneira distinta o crescimento ou a viabilidade de outro microrganismo presente no cultivo, devido à competição por nutrientes. Entretanto, pode-se notar que no presente estudo, a competição pelo substrato não impediu o crescimento em consórcio de ambos os microrganismos testados. Além disso, nenhum dos microrganismos testados apresentaram substâncias inibidoras que impedissem o crescimento do outro, conforme relatado no estudo de Lima (2002), onde foi observado que todas as linhagens de bactérias testadas apresentaram atividade bacteriocinogênica em diferentes graus por serem capazes de sintetizar e

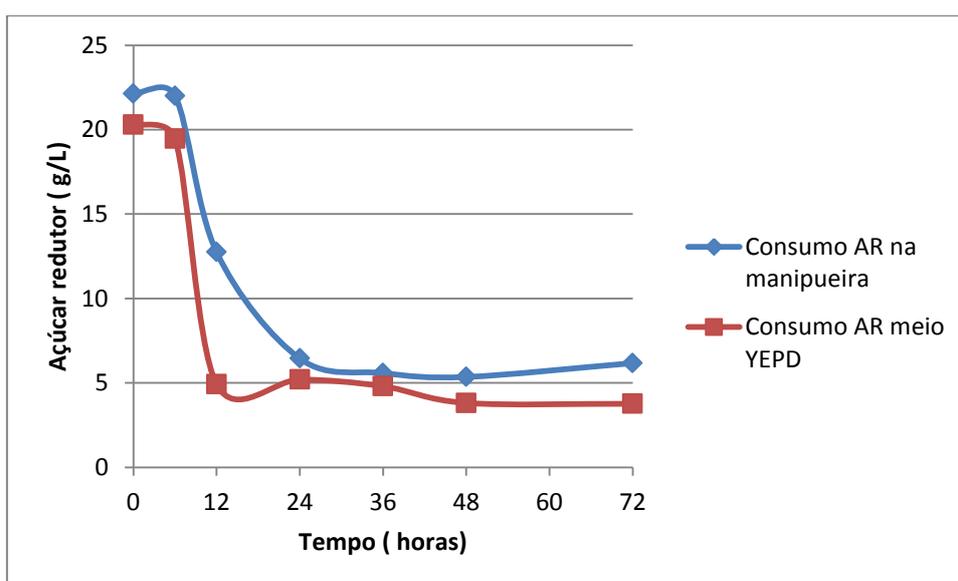
liberar inibidores letais para outras bactérias produzindo halos de inibição do crescimento.

Desta forma, o consórcio entre a bactéria *Arthrobacter sp.* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo de sacarificação e fermentação concomitante de manipueira se mostra extremamente viável, onde a bactéria atuará como agente sacarificante e a levedura como agente fermentador.

### 5.10 Ensaio fermentativos usando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A seguir são apresentados os resultados dos parâmetros medidos no decorrer das fermentações, as quais ocorreram em dois substratos diferentes: manipueira e meio YEPD. Na figura 21 estão apresentados a evolução do consumo de açúcar redutor pela *Saccharomyces cerevisiae* ao longo das fermentações na manipueira e no meio YEPD.

**Figura 21:** Consumo de açúcar redutor durante a fermentação alcoólica em manipueira pela *Sachharomyces cerevisiae*.



Fonte: Autoria própria

A manipueira mostrou-se como um substrato adequado para o processo fermentativo, uma vez que é rica em açúcar redutor, aproximadamente 20 g/L , e após 24 horas de fermentação, aproximadamente 75% de todo o açúcar havia sido consumido e ao final da fermentação havia menos de 5g/L de açúcar no mosto( figura 21). A taxa de consumo de açúcar relatada no presente trabalho usando manipueira como substrato fermentativo foi superior aos resultados descrito por Santana (2007), em que a maior taxa de consumo de açúcar em substrato fermentativo ocorreu após 36 horas do início da fermentação. Além disto, os valores de açúcar residual encontrados neste estudo, aproximadamente 5g/L, foram equivalentes aos descritos por AQUARONE e ZANCANARO JR (1983) em que encontraram, ao final da fermentação, uma quantidade de 5g /L de açúcar residual em mosto de uva.

No meio YEPD, o consumo máximo de açúcar se deu nas primeiras 12 horas, em que mais de 80% do açúcar foi consumido. O consumo de açúcar mais rápido no meio YEPD era esperado, uma vez que este é um meio adequado para o cultivo de leveduras, servindo, portanto, como tratamento controle.

De maneira geral, as primeiras 24 horas se mostraram cruciais para o processo fermentativo em manipueira, pois foi neste período que ocorreu a maior taxa de consumo de açúcar e grande produção de espuma, resultante da liberação de gás carbônico intrínseca ao processo ( Figura 22).

**Figura 22:** Liberação de gás carbônico após 24 horas de início do processo de fermentação alcoólica em manipueira



Fonte: Autoria própria

Além da taxa de consumo de açúcar redutor, a contagem das células de *Saccharomyces cerevisiae* foi acompanhada ao longo da fermentação em manipueira. Os resultados são descritos na tabela 5.

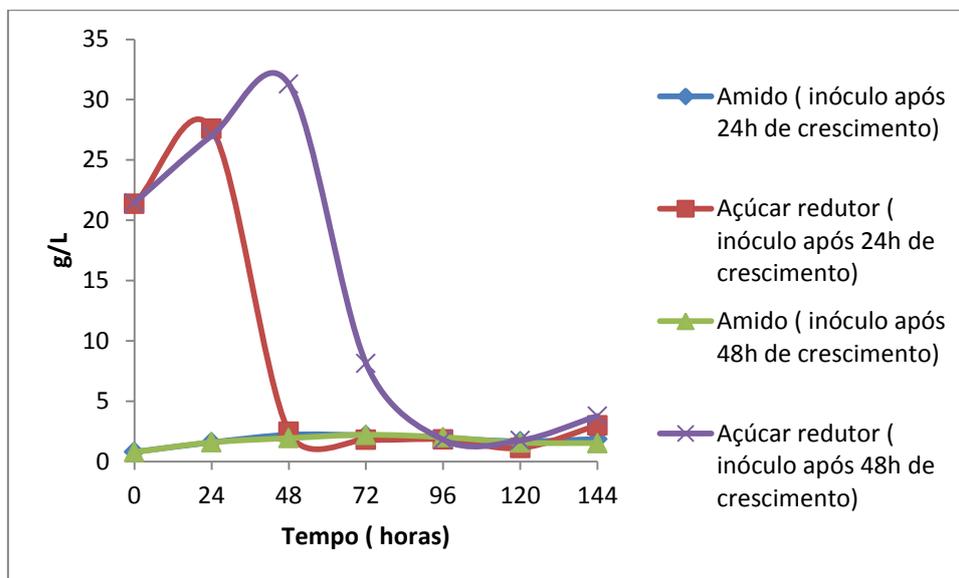
**Tabela 5:** Aumento do número de leveduras ao longo da fermentação em manipueira

TEMPO (HORAS)	N ° Céls. Levedura
0	$32 \times 10^6$
6	$212 \times 10^6$
12	$160 \times 10^7$
24	$190 \times 10^7$
48	$199 \times 10^7$
72	$324 \times 10^7$
96	$300 \times 10^7$

### 5.11 Sacarificação da manipueira pela bactéria com consumo dos açúcares redutores pela levedura.

Os resultados dos experimentos de sacarificação e consumo de açúcar redutor com manipueira como substrato estão ilustrados na figura 23.

**Figura 23:** Sacarificação da manipueira pela bactéria e inóculo de levedura após 24 horas de crescimento bacteriano.



Fonte: Autoria própria

A partir da figura acima é possível observar que antes do inóculo da levedura, em ambos os casos, a quantidade de açúcar redutor aumenta. Este fato acontece, provavelmente, devido à degradação do amido presente na manipueira por parte da bactéria, acumulando açúcar redutor na manipueira, fornecendo assim mais substrato para que a levedura transforme-o em etanol.

Pode-se constatar que o inóculo da levedura após 24 horas de crescimento bacteriano se mostrou mais adequado, uma vez que 24 horas após o inóculo havia menos de 5g/L de açúcar redutor no meio, o que representa um consumo de mais de 90% da quantidade inicial de açúcar. Por sua vez, o experimento em que a levedura foi inoculada 48 horas após o crescimento bacteriano mostrou-se menos eficiente, pois 24 horas após o inóculo da levedura, ainda havia mais de 5g/L de açúcar redutor no caldo de fermentação.

## 6. CONCLUSÕES

A busca por novas fontes renováveis de energia se faz cada vez mais necessária nos dias atuais e é neste cenário que a manipueira aparece como uma matéria-prima de grande relevância, uma vez que é um resíduo rico em açúcares e amido, passível de ser fermentado para obtenção de etanol

Neste trabalho foram realizados os procedimentos de prospecção, seleção e aplicação de bactérias para produção de etanol por sacarificação e fermentação concomitantes de manipueira.

Ao total, 18 morfotipos bacterianos capazes de crescer em anaerobiose foram isolados da casca de mandioca, dos quais 4 se destacaram como produtores de amilases em meio sólido contendo amido como única fonte de carbono, na medida em que conseguiram degradar o amido de forma eficiente ( IE maior que 2), mostrando-se como cepas de interesse industrial.

A maioria das cepas que se apresentaram como boas produtoras de amilases possuíam morfologia de bacilo e cocobacilo.

De todas as cepas que se apresentaram como boas produtoras de amilases em meio sólido, apenas uma (1401) foi eficiente em crescer e degradar o amido em solução em menos de 48 horas, acumulando, desta forma, açúcares redutores na solução. Por tal motivo, esta cepa se caracteriza como de grande interesse industrial. Tal cepa foi identificada geneticamente como sendo pertencente ao gênero *Arthrobacter*.

A cepa estudada foi não somente capaz de crescer em meio amido em anaerobiose, mas também em manipueira. Além disto, foi capaz de degradar o amido presente na manipueira, acumulando açúcares redutores na solução. Este fato abriu perspectivas para que tal cepa fosse usada no consórcio com a levedura para produzir etanol a partir da manipueira, uma vez que além de degradar o amido e acumular açúcar (sendo, portanto, um agente sacarificante), a cepa estudada não

apresentou qualquer antagonismo em relação ao crescimento conjunto com a levedura.

Em relação ao processo fermentativo, a levedura se mostrou eficiente no consumo de açúcar redutor presente na manipueira. Em relação ao processo em consórcio, foi possível verificar que o açúcar redutor se acumulou no meio com a presença da bactéria, o que, provavelmente, resultaria em um aumento da produção de etanol. Entretanto, para que tal fato seja confirmado, faz-se necessário a quantificação de etanol presente nos diferentes tempos de fermentação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, M. R. Produção e utilização de farinha de mandioca comum enriquecida com adição das próprias folhas desidratadas para consumo alimentar. 2006. 84p. Dissertação ( Mestrado em Agronomia)- Faculdade de Ciências Agronômicas Botucatu, São Paulo.
- APRILE, F. M.; PARENTE, A. H.; BOUVY, M. Análise dos resíduos industriais do processamento da farinha de mandioca na bacia do rio t cia do rio tapacurá (Pernambuco – Brasil). *Bioikos*, PUC-Campinas, 18 (1): 63-69, 2004.
- AQUARONE, E.; ZACANARO JÚNIOR, O. Vinagres. In: AQUARONE, E., LIMA, U. A., BORZANI, W. (coords): Alimentos e bebidas produzidos por fermentação - Biotecnologia. São Paulo: E. Blücher, v. 5, 1983. p. 104- 122, 243 p
- ASSUNÇÃO, F. C. R. et al. Química verde no Brasil: 2010-2030. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos - CGEE, 2010.
- BAI, F. W., ANDERSON, W. A. e MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *BiotechnologyAdvances*, v.26, n.1, p.89-105. 2008.
- BARANA, A. C.; CEREDA, M. P. Avaliação do tratamento de manipueira de farinhas em biodigestores fase acidogênica e metanogênica. *EnergianaAgricultura*, v. 4, n. 15, p. 69-81, 2001.
- BEMILLER, J. N. Starch modification: changes and prospects. *Starch/Starker*, v. 49, n.4, p. 127-131, 1997.
- BERNFELD, P.  $\alpha$  and  $\beta$  amylases. *Methods in Enzymology*, 1955. V1, p.149-158.
- BON, E. P. S.; PEREIRA Jr., N. Tecnologia enzimática. Rio de Janeiro: E.P.S. Bon, 1999. 110 p.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia (MME). **Análise de conjuntura dos biocombustíveis**. Empresa de Pesquisa Energética - EPE, Brasília-DF, 2013, 49p.
- CAMILI, E.A.; CABELLO,C. Produção de etanol de manipueira tratada com processo de flotação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA MANDIOCA, 12., 2007, Paranavaí. *Revista Raízes e Amidos Tropicais*. Botucatu: CERAT/UNESP, v. 03. p. 01-04, 2007.
- CAMILI, E.E.; PINTO, P. H. M.; URBANO, L. H.; SUMAN, P. A.; CABELLO, C. Obtenção de etanol utilizando resíduo líquido (manipueira) secado ao sol obtido em indústria de processadores de farinha de mandioca. IN: Congresso Brasileiro de Mandioca, 13, 2009, Botucatu.

Cardona, C. A.; Sánchez, O. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, n. 98, p. 2415 – 2457, 2007.

CARVALHO, F.C. Disponibilidade de resíduos agroindustriais e do beneficiamento de produtos agrícolas. *Informações Econômicas*. p. 20, 1992.

CEREDA, M. P. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. *Série Culturas de tuberosas amiláceas latinoamericanas*, São Paulo: Fundação Cargill, 2001.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas. *Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas*. Fundação Cargill, set. 2003.

CEREDA, M.P.; BRASIL, O.G. & FIORETTO, A.M.C. Micro-organismos com respiração resistente ao cianeto isolados de líquido residual de fecularia. *Phyton*, 41(2):197-201, 1981.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass in stead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 06 Março 2010. 1412-1421

CHERUBIN, R. A. Efeito da viabilidade de levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. 2003. 124p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CINELLI, B. A. Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial. 2012. 183p. Dissertação ( Mestrado em Engenharia Química)- Pós Graduação e pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

CLARK, S. C.; HAYES, P. M.; HENSON, C. A. Effects of single nucleotide polymorphisms in  $\beta$ -amylase1 alleles from barley on functional properties of the enzymes. *Plant physiology and biochemistry*, v. 41, p. 798-804, 2003.

COELHO, M.A.Z. *Tecnologia Enzimática*. FAPERJ; Petrópolis, RJ: EPUB, 2008. 288p.

Conn, H.J. (1928) A type of bacteria abundant in productive soils, but apparently lacking in certain soils of low productivity. *N.Y. State Agric. Exp. stn. Tech. Bull.* 138, 3- 26.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. *Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com*

ELIASSON, A.C. *Starch in food – Structure, function and applications*. New York: Boca Raton, CRC, 2004. 605p.

EMBRAPA, 2011. Disponível em <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2011/junho/2a-semana/manipueira-um-liquido-precioso/>. Acesso em 05/05/2015.

EMBRAPA. Disponível em [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia\\_de\\_alimentos/arvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s4737dnfr3b.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s4737dnfr3b.html). Acesso em 07/10/2016.

ENZIMAS. As Enzimas nos Alimentos. Aditivos e Ingredientes: Editora Insumos. 2008. Disponível em: <[http://www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/materias/80.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/80.pdf)>. Acesso em: 30 out. de 2016

ENZIMAS. Enzimas em Panificação. Aditivos e Ingredientes: Ed. 36, N°62°A, Editora Insumos. 2009. Disponível em: <[http://www.insumos.com.br/aditivos\\_e\\_ingredientes/materias/118.pdf](http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/118.pdf)>. Acesso em: 30 out. 2016.

ENZIMAS. Enzimas: Ferramentas indispensáveis num mundo vivo. Disponível em: <http://www.cib.org.br/pdf/fbci12port.pdf> Acesso em: 30 out. 2016

ESCHBACH, M.; MOBITZ, H.; ROMPF, A.; JAHN, D. Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate. *FEMS Microbiology Letters*, Germany,, V.223, p. 228- 230, 2003.

FELIPE, F. I.; ALVES, L. R. A.; CAMARGO, S. G. C. Panorama e perspectivas para a indústria de fécula de mandioca no Brasil. *Revista Raízes e Amidos Tropicais*, Botucatu, v. 6, n. 1, p. 134-146, 2010

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, **Faostat**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> acesso em 26/10/2015.

FREITAS, G. C. Fermentação de diferentes fontes de amido por *Klebsiella oxytoca* etanológica. 1999. Dissertação ( Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

FIORETTO, A.M.C. Viabilidade de cultivo de *Trichosporon* spp. em manipueira. Botucatu, UNESP/Faculdade de Ciências Agrônômicas, 1987. 96 p. (artigo de capítulo de livro).

GARCIA, C.E. Isolamento e Identificação de Actinobactérias em Solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) da Amazônia Central por ARDRA e Seqüenciamento do Gene 16S Rrna. 2006. 106 f. Tese ( Doutorado em Ciência de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

GASQUES, J. G.; BASTOS, E. T. 2003. Crescimento da Agricultura. *Boletim de Conjuntura*, nº 60. Disponível em

<[http://www.agriculturasamazonicas.ufpa.br/.../José\\_Garcia\\_Gasques\\_&\\_Eliana\\_Tel est.](http://www.agriculturasamazonicas.ufpa.br/.../José_Garcia_Gasques_&_Eliana_Tel_est.)>. Acesso em junho de 2015.

GOULD, Barry J. Enzyme Biotechnology, Chichester, A. Wiseman Ed. Ellis Horwood Ltda. Publ. 1975.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H. ; GOSWAMI, V. K. ; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -Amylases: a Biotechnological Perspective. Process Biochemistry. Jan. 2003. p. 1-18. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em Junho de 2015.

GUZMAN-MALDONADO, H.; PAREDES-LOPES, O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. Crit. Rev. Food Sc. Nut, v. 35, p.373-4-3, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em<[www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br)>acessoem 26/10/2015.

KIELING, D. D. Enzimas – Aspectos Gerais. Trabalho (Disciplina de Engenharia Bioquímica)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

KRISHNAN, M. S., TAYLOR, F., DAVISON, B. H. e NGHIEM, N. P. Economic analysis of fuel ethanol production from corn starch using fluidized-bed bioreactors. Bioresource Technology, v.75, n.2, p.99-105. 2000BAI et al., 2008.

LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. Biotechnology and Bioengineering Symposium, n. 11, 1981, p. 641-649.

LEHNINGER, A. L. Enzimas. Bioquímica: tradução da 2<sup>a</sup>. edição americana, supervisão: José Reinaldo Magalhães. São Paulo, Edgard Blucher, 1976.

LOBINAH, D.E; DILEEP, A; Chandrasekhar, K et al. "DNA Barcoding on Bacteria: A Review," Advances in Biology, vol. 2014, Article ID 541787, 9 pages, 2014.

LIMA, G. M. S. Ocorrência de bacteriocinas e caracterização molecular de linhagens de *Zymomonas mobilis*. 2002. 85p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) - Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002

LIU, S. H.; Chou, W. I.; Sheu, C. C.; Chang, M. D.T.Improved secretory production of glucoamylase in *Pichia pastoris* by combination of genetic manipulations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 326, p. 817-824, 2005.

MAAREL, M. J. E. C.; VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155,2002.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N.; Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2000, 68, 61.

NASU, Érica das Graças Carvalho. Composição química da manipueira e sua potencialidade no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro no oeste do Paraná. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2008.

National Renewable Energy Laboratory (NREL). Disponível em <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinary.html>. Acesso em Junho de 2016.

NELSON, D.L.; COX, M. M (2006). **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4ª Ed. São Paulo: Sarvier. 1100 p.

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABO, J. M.; CLAEYSSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, A. Purification and Characterization of Amylolytic Enzymes from Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, n. 3, p. 345-352, 2002.

NUNES, A; FARIA, A.P.S.; STEINMACHER, F. R; VIEIRA, J.T.C. Processos enzimáticos e biológicos na panificação. (Universidade Federal de Santa Catarina), Florianópolis. 2006. p.6-10.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L, A.; ANDRADE, J. S.; JUNIOR, C. Produção de Amilase por Rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato: **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, 2007. p.61-66.

OLIVEIRA, C.; MULLER, F.; SEGATO, M. Departamento de Engenharia Química e de Alimentos. Aplicações de enzimas em produtos de limpeza. In: Trabalhos de graduação do grupo de processos biotecnológicos da UFSC. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2005. Disponível em: Acesso em: 2 abr. 2015.

OLIVEIRA, E. G. N.; SILVA, R. S. S. “ Obtenção de etanol à partir de malto- dextrina de mandioca pelo processo de sacarificação simultânea à fermentação ( SSF) ” . **Semina**, Londrina, vol. 10, p. 34- 40, 1989.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzym e Technology**. 1a ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760 p.

PARIZA, M. W. e JOHNSON. E. A. Histórico das Enzimas. Workshop – As Enzimas Industriais na Produção de Alimentos. 2002. Disponível em: Acesso em: 29 de Junho de 2016

PASTORE, M. G. Uso de Enzimas nas Indústrias de Alimentos. 2010. UNICAMP. Disponível em: <[http://www.anbio.org.br/palestras/palestra\\_glaucia.ppt](http://www.anbio.org.br/palestras/palestra_glaucia.ppt)>. Acesso em 30 out. 2016.

PAVLAK, M. C.; ZUNIGA, A. D.; LIMA, T. L. A.; PINEDO, A. A.; CARREIRO, S. C.; FLEURV, C. S.; SILVA, D. L. Aproveitamento da farinha do mesocarpo do babaçu ( *Orbignya martiana*) para obtenção de etanol. **Evidência, Joaçaba**, v.7, n.1, p. 7- 24, 2007.

PEIXOTO, S. C.; JORGE, G. A.; TERENCE, H. F. ; POLIZELI, M. L. T. M. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **Int. Microbiol.**, v. 6., p.269-273, 2003.

PERRY JJ, STALEY JT. 1997. Microbiology: dynamics and diversity. Harcourt Brace College Publishers (Eds).

PRADO, F.C. Desenvolvimento de bioprocesso em escala semipiloto para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido a partir do bagaço de mandioca. 2002, 81f. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

Projeto incentiva o reaproveitamento da manipueira em cultivos agrícolas — Universidade Federal do Oeste do Pará. (n.d.). Retrieved from [http://www.ufopa.edu.br/divulgacao\\_cientifica/projeto-incentiva-o-reaproveitamento-da-manipueira-em-cultivos-agricolas](http://www.ufopa.edu.br/divulgacao_cientifica/projeto-incentiva-o-reaproveitamento-da-manipueira-em-cultivos-agricolas)

REEVE, A. Starch hydrolysis: processes and equipment. In: SCHENK, F.W.; HEBEDA, R.E. **Starch hydrolysis product: worldwide technology, production, and applications**. New York: New York: VCH Publishers, 1992. p.79-120.

REGULY, Júlio Carlos. Biotecnologia dos processos fermentativos: Matérias-primas Agrícolas, processos e produtos. Pelotas: Universitária/UFPEL, 1996. 1v.330p.

RIBAS, M. M. F.; CEREDA, M. P.; VILLAS-BOAS, R. L. Use of cassava wastewater treated anaerobically with alkaline agents as fertilizer for maize (*Zea mays*, L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.55-62, 2010.

ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; VITOLO, M.; SATO, S.; SILVA, S. S. Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agroindustrial residues. **Bioresource Technology**, Essex, n.51, p.255-257, 1995.

RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorrefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Quim. Nova**, v. 34, n. 7, 1242-1254, 2011.

SANTANA, B. C. Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol. 2007. 104f. **Dissertação** ( Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2007.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. **Produção de Enzimas microbianas**. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). *Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p.351-362..

SANTOS, A. Usos e impactos ambientais causados pela manipueira na microrregião sudoeste da Bahia-Brasil. *Problemas sociales regionales em América Latina: estudo de casos*. Barcelona: Universitat de Barcelona, (2009)11-25

SANTOS, M. H. V.; ARAUJO, A. C.; SANTOS, D. M. R.; LIMA, N. S. L.; LIMA, C. L. C.; SANTIAGO, A. D. Uso da manipueira como fonte de potássio na cultura da alface (*Lactuca sativa* L.) cultivada em casa- de- vegetação. **Acta Suntiurum, Maringá**, v. 32, n. 4, p. 729- 733, 2010.

SANTOS, M. M.; ROSA, A. S.; DAL'BOIT, S.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; **Bioresour.Technol.**, v. 93, p. 261-270, 2004.

SCIPIONI, G. C. Otimização do processo de sacarificação do amido de batata (*Solanum Tuberosum* L.) utilizando enzimas amilolíticas. 2011. Dissertação ( Mestrado)- Universidade Federal de Santa Maria, RS.

Sheehan JJ (2009) Biofuels and the conundrum of sustainability. *Curr Opin Biotechnol* 20: 318–324

SILVA JÚNIOR, J. J.; COELHO, E. F.; SANTA'ANA, A. V.; SANTANA JÚNIOR, E. B.; PAMPONET, A. J. M. Uso da manipueira na bananeira 'Terra Maranhão' e seus efeitos no solo e na produtividade. **Irriga**, v.17, p.353-363, 2012.

SILVA, Gabriel Henrique da. **Processo em batelada e contínuo de material amiláceo para a produção de etanol**: Boletim Técnico da Petrobrás. 23.ed. Rio de Janeiro, 1980. 49-57p.

SILVA, T. M. Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niger*. 2009. Tese (Doutorado), Ribeirão Preto.

SOCCOL, C.R.; ROJAN, P.J.; PATEL, A.K.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. **Glucoamylase**. In: *Enzyme Technology*. New Delhi: AsiatecPublishers Inc., 2005. p.221-230.

SOUZA, E.L. Produção e Caracterização de  $\alpha$ -Amilase Produzida por *Rhizopus* sp. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 39, n.4, p. 831-839, dez, 1996.

SPIER, M.R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Produção de  $\alpha$ -Amilase por *Aspergillus* em Fermentação no Estado Sólido de Amido de Mandioca e Bagaço de Cana-de-Açúcar. VI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. *Anais Enzitec* 2004. Rio de Janeiro: **Enzitec**. v. 1. 2004. p.116-116.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Enzymatic Activity of micro-organisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizuserosus* L. Urban) (*Pachyrhizuserosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 382-385, 1998.

SUMAN, P. A.; URBANO, L. H.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol à partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 33, n.4, p. 379- 384, 2011.

SUMERLY, R. et al. **Hidrólise do amido**. p. 377- 448. In: CULTURAS DE TUBEROSAS AMILÁCEAS LATINO AMERICANAS. Tecnologia, uso e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. Fundação Cargill, jan. 2002. v. 3.

UEDA, S.; ZENIN, C. T.; MONTEIRO, D. D.; PARK, Y. K. Production of etanol from raw cassava starch by a nonconventional fermentation method. **Biotechnol.Bioeng.**, v. 23, p. 291- 9, 1981.

VÁSQUEZ, M.P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M.B.; PEREIRA Jr., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-140, issues 12, 2007.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hiperthermophilic enzymes: Source, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiol. Mol. Biol. Ver.**, v. 65, p. 1- 43, 2001.

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

WELLER, C.L.; STEIMBERG, M. P.; RODDA, E. D. Fuel ethanol from raw corn by Aspergillihidrolizis with concurrent yeast fermentation. **Biotechnol.Bioeng, Symp**, v. 13, p.437- 47, 1983.

WHO/FAO. Carbohydrates in human nutrition. Rome: FAO, 1998, (FAO food and nutrition paper no. 66).