ALESSANDRA APARECIDA RABALHO

ISOLAMENTO DE LINHAGENS MICROBIANAS TERMOFÍLICAS AMILOLÍTICAS, PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DAS AMILASES NA HIDRÓLISE DO AMIDO DE MANDIOCA

ALESSANDRA APARECIDA RABALHO

ISOLAMENTO DE LINHAGENS MICROBIANAS TERMOFÍLICAS AMILOLÍTICAS, PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DAS AMILASES NA HIDRÓLISE DO AMIDO DE MANDIOCA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos).

Orientadora: Profª Drª Eleni Gomes
Co-orientadora: Profª Drª Célia M. L. Franco

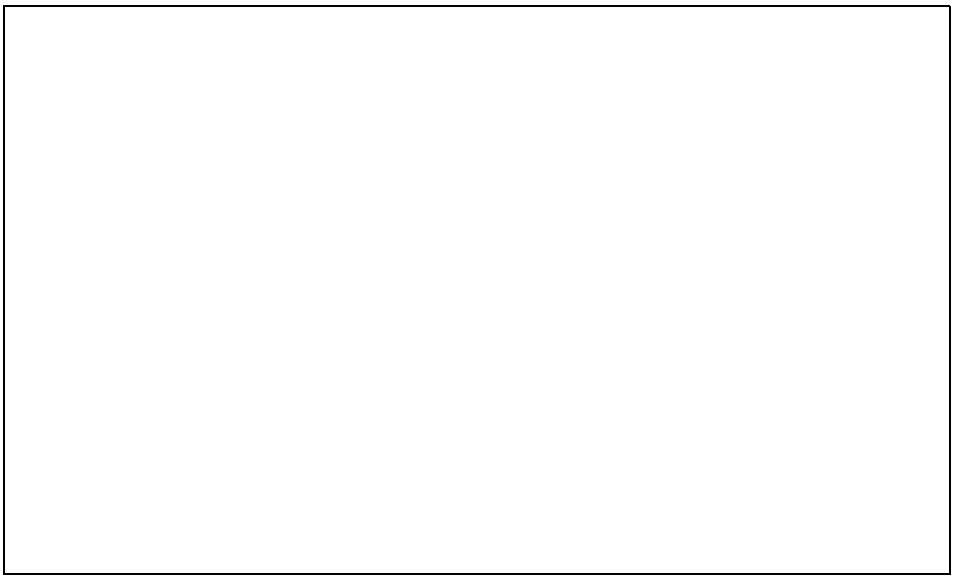
São José do Rio Preto
2002

Rabalho, Alessandra Aparecida.
Isolamento de linhagens microbianas termofílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca / Alessandra Aparecida Rabalho. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2002
183 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eleni Gomes
Co-orientador: Célia Maria Landi Franco
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Enzimas. 2. Enzimas microbianas. 3. Amilases. 4. Microrganismos termofílicos. 5. Bactérias. 6. Bactérias termofílicas. 7. Fungos. 8. Fungos termofílicos. 9. Fermentação. 10. Xaropes. I. Gomes, Eleni. II. Franco, Célia Maria Landi. III. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.15



ALESSANDRA APARECIDA RABALHO

ISOLAMENTO DE LINHAGENS MICROBIANAS TERMOFÍLICAS AMILOLÍTICAS, PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DAS AMILASES NA HIDRÓLISE DO AMIDO DE MANDIOCA

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: _____

Profª Drª Eleni Gomes

2º Examinador: _____
Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez

3º Examinador: _____
Prof. Dr. Claudio Cabello

São José do Rio Preto, 23 de setembro de 2002

DADOS CURRICULARES

ALESSANDRA APARECIDA RABALHO

NASCIMENTO	27.04.1976 - JABOTICABAL/SP
FILIAÇÃO	João Rabalho Odete da Silva Rabalho
1996/1999	Curso de graduação em Ciências Biológicas, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista (UNESP)
2000	Início do curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos), nível de mestrado, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Meu Senhor e meu Deus, eu Te louvo e agradeço, porque me incluíste nos Teus planos; porque me destes um espírito livre e repleto de sonhos, com esperança e força suficientes para tentar concretizá-los. Por estar ao meu lado a cada dia, divido Contigo a glória desta conquista.

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, João e Odete,
às minhas irmãs Angela e Andréa,
e aos meus sobrinhos Vinícius, Júnior e Guilherme,
porque são o que há de mais maravilhoso em minha vida.

Ao meu grande amor Fabrício, meu referencial para continuar vivendo intensamente.

AGRADECIMENTOS

A minha gratidão a todos que me apoiaram e incentivaram e cuja convivência foi de extrema importância para o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço especialmente à Profa. Dra. Eleni Gomes, pela confiança, pelo constante apoio e por me proporcionar crescimento e amadurecimento científico. Seu exemplo de amor e dedicação ao ensino e à pesquisa me incitou a seguir seus passos.

À Profa. Dra. Célia Maria Landi Franco, pela co-orientação e pelas valiosas dicas que permitiram o aperfeiçoamento deste estudo.

Aos Professores integrantes da banca examinadora, Prof. Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez e Prof. Dr. Claudio Cabello, pela acurada análise da pró-forma, pelas críticas e sugestões que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Aos Professores da Pós-Graduação pelos ensinamentos transmitidos no decorrer do curso, em especial ao Prof. Dr. Crispin H. Garcia-Cruz, pelo constante incentivo e aos Profs. Drs. Fernando Leite Hoffmann e Vanildo Del Bianchi, pelas correções e sugestões realizadas no Exame Geral de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva pela amizade e prestatividade com que me auxiliou nos pequenos problemas e dúvidas do dia-a-dia.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, especialmente a Rosemar, Nadia, Oscar, Rosana e Nancy, pela simpatia no atendimento e contribuição para finalização deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca, especialmente a Elza Satto, pela presteza no serviço de comutação bibliográfica.

Aos funcionários e técnicos dos Departamentos de Química e Biologia, especialmente ao Claudinei Nobile e Paulo Maziero, pela convivência agradável e pela dedicação com que desempenharam suas funções, contribuindo para o bom andamento da rotina do laboratório.

Ao Banco do Brasil, em nome do Sr. Hélio Schultz, pela pesquisa e disponibilização dos dados de comércio de enzimas no Brasil.

À FAPESP, processo 99/12840-4, pelo auxílio financeiro.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação pelo incentivo constante e amizade, especialmente à Erika, Riana, João Cláudio, Marô, Graziela, Ana Lúcia, Giane, Luísa, Juan, Silvia e Silvia (Mulher).

Aos estagiários e pós-graduandos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas, especialmente ao Hamilton Cabral pela prontidão com que sempre esclareceu pequenas dúvidas que surgiram ao longo deste estudo.

Aos queridos amigos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada: Caio, Carla, Daniela, Dênis, Eduardo, Fabiana, Gisele, Heloiza, Márcia Maria, Márcia Rizzatto, Maricy, Mirlene, Natalia, Simone, Tatiana, Tony, Kivia e Ana Paula pela convivência agradável, pelos constantes ensinamentos e auxílio na resolução dos problemas diários. Vocês foram a família que me acompanhou de perto.

À Valquíria Barco Damiano, pela serenidade com que instruiu e acompanhou meus primeiros passos na Microbiologia e, principalmente, pelo exemplo de profissionalismo e conduta.

À Solange Xavier dos Santos e Denise Prado do Amaral Voltarelli, pela amizade sincera, pelo apoio nos momentos difíceis e pelas discussões sobre trabalho, profissão e vida, que tanto contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Às amigas Elaine Priscilla e Luísa Jorge porque, apesar da distância, nunca estiveram ausentes nos momentos em que mais precisei.

À Silvia R. Viodres, pelo ternura com que me ajudou a compreender e superar os momentos de aflição.

Aos amigos Morgana e Airton Rocca, que acreditaram, apoiaram e deram força para a concretização desta conquista.

Aos queridos Sr. Loreto Tomasetto e Sra. Aparecida Tomasetto, por terem me acolhido como filha em suas vidas.

Aos meus pais, João e Odete, às minhas irmãs, Andréa e Angela e aos meus sobrinhos, Vinícius, Júnior e Guilherme pelo amor imensurável, pelo constante estímulo e pela alegria que proporcionam à minha vida. Tenho a grata felicidade de fazer parte desta maravilhosa família, vocês foram a chave para a realização deste sonho.

Ao meu querido Fabrício, por todo amor, carinho e dedicação. Sem sua presença e apoio constantes tudo teria sido mais difícil.

À Deus que, na sua infinita misericórdia, me ofereceu juntamente com as dificuldades a força para superá-las.

"Vida devotada a atividade criadora em ciência é vida feliz. Nenhum outro modo de vida é igual ou superior em felicidade. ... Eu creio que o trabalho científico, juntamente com outras formas de trabalho criador, é o principal propulsor da evolução do espírito humano. A evolução do espírito humano dá significado à evolução humana e à evolução universal."

Theodosius Dobzhansky, 1970

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS 14

LISTA DE TABELAS 17

RESUMO 18

ABSTRACT 19

INTRODUÇÃO 20

1. Estrutura e utilização do amido 20

2. O complexo amilolítico 22

3. Microrganismos termofílicos 26

4. Produção e características das amilases microbianas 29

5. Uso de subprodutos e resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos 33

6. Produção de xaropes 36

7. Produção enzimática brasileira 39

OBJETIVOS 43

MATERIAL E MÉTODOS 44

1. Meios de Cultivo 44

1.1. Meio nutriente 44

1.2. Meio para isolamento das linhagens 44

1.3. Meio para manutenção das culturas selecionadas 44

1.4. Meios para a seleção das linhagens produtoras de amilases 45

1.4.1. Meio para fermentação submersa 45

1.4.2. Meio para fermentação semi-sólida 45

1.5. Meios para estudo da produção de amilases pelas linhagens selecionadas 45
1.5.1. Meios para fermentação submersa 45
1.5.1.1. Meio nutriente enriquecido 45
1.5.1.2. Meio nutriente-mandioca e nutriente-milho 45
1.5.1.2.1. Processamento da mandioca 46
1.5.1.2.2. Resíduo de milho 47
1.5.1.3. Resíduo líquido de mandioca 48
1.5.1.4. Resíduo líquido de milho 48
1.5.2. Meios para fermentação semi-sólida 49
1.5.2.1. Farelo de mandioca 49
1.5.2.3. Farelo de trigo 49
2. Seleção dos microrganismos 49
2.1. Coletas 49
2.2. Isolamento das culturas 51
2.3. Avaliação da hidrólise do amido em meio sólido 52
2.4. Avaliação do crescimento a 60°C 52
3. Seleção das linhagens produtoras de amilases 53
3.1. Pré-inóculo 53
3.2. Fermentação submersa 53
3.3. Fermentação semi-sólida 54
4. Efeito do tempo de cultivo na produção de amilases pelas linhagens selecionadas 55
4.1. Pré-inóculo 55
4.2. Fermentação submersa 56
4.3. Fermentação semi-sólida 56
5. Métodos de avaliação da atividade enzimática de amilase 57

5.1. Medida da atividade de α-amilase (reação dextrinizante) 57
5.2. Medida da atividade de amilase através da dosagem do açúcar redutor liberado 58
5.3. Medida da atividade de glicoamilase 59
6. Dosagem de açúcares redutores 60
7. Identificação das linhagens microbianas 60
8. Caracterização das enzimas 60
8.1. Determinação do pH ótimo 61
8.2. Determinação da temperatura ótima 61
8.3. Estabilidade frente à variação de pH 61
8.4. Estabilidade frente à variação de temperatura 62
9. Efeito dos íons Ca^{2+} na atividade das amilases bacterianas 62
10. Estudo da hidrólise do amido de mandioca utilizando solução enzimática bruta 62
10.1. Hidrólise do amido de mandioca em duas etapas 62
10.2. Efeito do tempo e concentração da enzima fúngica na hidrólise do amido de mandioca em etapa única 64
10.3. Análise cromatográfica dos produtos de hidrólise presentes nos hidrolisados obtidos a partir da hidrólise em duas etapas 65
10.4. Perfil de açúcares liberados na hidrólise do amido em solução a 1% 65
10.5. Perfil de viscosidade dos amidos de mandioca natural e tratado com solução enzimática bruta 66

RESULTADOS E DISCUSSÃO 67
1. Coleta e isolamento das linhagens 67
2. Teste de hidrólise do amido em meio sólido 76
3. Avaliação do crescimento a 60ºC 77

4. Fermentação submersa e semi-sólida para seleção das linhagens produtoras de amilases 78
5. Efeito do tempo de cultivo na produção de amilases pelas linhagens selecionadas em meios à base de resíduos e subprodutos agro-industriais 88
5.1. Linhagem bacteriana $A4_1$-b 89
5.2. Linhagem bacteriana $A4_4$-f 93
5.3. Linhagem bacteriana $A4_4$-i 96
5.4. Linhagem bacteriana $A4_5$-2 100
5.5. Linhagem bacteriana $A4_7$-1 103
5.6. Linhagem bacteriana A11-4 106
5.7. Linhagem bacteriana A13-8 109
5.8. Linhagem bacteriana A13-22 112
5.9. Linhagem fúngica A13-36 115
6. Identificação das linhagens microbianas 123
6.1. Linhagens bacterianas 123
6.2. Linhagem fúngica 124
7. Caracterização físico-química das enzimas produzidas pelas linhagens selecionadas 124
8. Efeito dos íons Ca^{2+} na atividade das amilases bacterianas 133
9. Estudo da hidrólise do amido de mandioca utilizando solução enzimática bruta 136
9.1. Hidrólise do amido de mandioca em duas etapas 136
9.2. Efeito do tempo e concentração da enzima fúngica na hidrólise do amido de mandioca em etapa única 138
9.3. Análise cromatográfica dos açúcares presentes nos hidrolisados 141
9.3.1. Hidrólise do amido de mandioca em duas etapas 141

9.4. Perfil de viscosidade dos amidos de mandioca natural e tratado com solução enzimática bruta 150

CONCLUSÕES 152

1. Sugestões para estudos futuros 153

REFERÊNCIAS BIBILIOGRÁFICAS 154

APÊNDICE A 166

APÊNDICE B 170

APÊNDICE C 175

APÊNDICE D 178

APÊNDICE E 183

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 – Representação da estrutura primária da amilose. 21

Figura 2 – Representação da estrutura primária da amilopectina. 21

Figura 3 – Representação esquemática da estrutura da amilopectina e modelo de ação de algumas amilases. 23

Figura 4 – Comércio de enzimas, importação e exportação no Brasil, nos períodos de 1997, 1998, 2000 e 2001. 42

Figura 5 – Fluxograma do processamento da mandioca. 47

Figura 6 – Representação esquemática dos procedimentos realizados para a coleta e isolamento das linhagens microbianas termofílicas amilolíticas. 52

Figura 7 – Representação esquemática dos procedimentos realizados para obtenção da solução enzimática bruta em fermentação submersa. 54

Figura 8 – Representação esquemática dos procedimentos realizados para obtenção da solução enzimática bruta em fermentação semi-sólida. 55

Figura 9 – Representação esquemática dos procedimentos realizados para obtenção do hidrolisado de amido de mandioca pelo uso das soluções enzimáticas fúngica e bacteriana (20 U/g amido), em duas etapas, durante duas horas. 63

Figura 10 – Representação esquemática dos procedimentos realizados para obtenção do hidrolisado de amido de mandioca pelo uso de solução enzimática fúngica (20, 30 e 40 U/g amido), em etapa única, durante uma, duas e três horas. 64

Figura 11 – Distribuição das linhagens selecionadas com relação aos tipos de amilases detectadas em fermentação submersa (meio nutriente). 78

Figura 12 – Distribuição das linhagens selecionadas com relação aos tipos de amilases detectadas em fermentação semi-sólida (farelo de trigo). 79

Figura 13 – Distribuição das linhagens selecionadas com relação às atividades de α-amilase (Dextri), amilases (AR) e glicoamilase (Glico) detectadas em fermentação submersa (meio nutriente). 79

Figura 14 – Distribuição das linhagens selecionadas com relação às

atividades de α-amilase (Dextri), amilases (AR) e glicoamilase (Glico) detectadas em fermentação semi-sólida (farelo de trigo). 80

Figura 15 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_1$-b em fermentação submersa. 90

Figura 16 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_1$-b em fermentação semi-sólida. 92

Figura 17– Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_4$-f em fermentação submersa. 94

Figura 18 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_4$-f em fermentação semi-sólida. 95

Figura 19 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_4$-i em fermentação submersa. 97

Figura 20 – Efeito do tempo de cultivo sobre produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_4$-i em fermentação semi-sólida. 99

Figura 21 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_5$-2 em fermentação submersa. 101

Figura 22 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_5$-2 em fermentação semi-sólida. 102

Figura 23 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_7$-1 em fermentação submersa. 104

Figura 24 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_7$-1 em fermentação semi-sólida. 105

Figura 25 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana A11-4 em fermentação submersa. 107

Figura 26 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana A11-4 em fermentação semi-sólida. 108

Figura 27 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana A13-8 em fermentação submersa. 110

Figura 28 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana A13-8 em fermentação semi-sólida. 111

Figura 29 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana A13-22 em fermentação submersa. 113

Figura 30 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana A13-22 em fermentação semi-sólida. 114

Figura 31 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem fúngica A13-36 em fermentação submersa. 116

Figura 32 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem fúngica A13-36 em fermentação semi-sólida. 118

Figura 33 – Caracterização físico-química da enzima bruta do *Bacillus* sp $A4_1$-b. 129

Figura 34 – Caracterização físico-química da enzima bruta da linhagem bacteriana $A4_4$-f. 130

Figura 35 – Caracterização físico-química da enzima bruta do *Bacillus* sp A13-22. 131

Figura 36 – Caracterização físico-química da enzima bruta do fungo *Mucor* sp A13-36. 132

Figura 37 – Efeito da concentração de íons cálcio na atividade enzimática, dosada pela reação dextrinizante, do *Bacillus* sp A13-22. 133

Figura 38 – Cromatografia descendente em papel *Whatman* n°1 dos produtos de hidrólise do amido de mandioca a 25% tratados com as soluções enzimáticas brutas do *Bacillus* sp A13-22 e *Mucor* sp A13-36, em duas etapas. 142

Figura 39 – Cromatografia de papel descendente dos produtos de hidrólise do amido de mandioca a 1%, em diferentes tempos, pela ação do extrato enzimático bruto do *Bacillus* sp A13-22. 145

Figura 40 – Cromatografia de papel descendente dos produtos de hidrólise do amido de mandioca a 1%, em diferentes tempos, pela ação do extrato enzimático bruto do *Mucor* sp A13-36. 147

Figura 41 – Açúcares redutores liberados pela ação enzimática após diferentes tempos de hidrólise do amido de mandioca a 1% pela solução enzimática bruta do *Bacillus* sp A13-22 e *Mucor* sp A13-36. 149

Figura 42 – Viscosidade das soluções durante a liquefação do amido de mandioca natural e tratado com as soluções enzimáticas do *Bacillus* sp A13-22 e do *Mucor* sp A13-36, monitoradas pelo rápido visco analisador (RVA). 150

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Características físico-químicas das amilases produzidas por diferentes espécies microbianas termofílicas e termodúricas 30

Tabela 2 – Exportações e importações de enzimas do mercado brasileiro, no período de 2000 e 2001 41

Tabela 3 – Locais de coleta e tipo de amostra coletada para isolamento das linhagens microbianas termofílicas 50

Tabela 4 – Origem das linhagens coletadas e hidrólise do amido em meio sólido 69

Tabela 5 – Crescimento das linhagens selecionadas em meio líquido, contendo amido como fonte de carbono, a 60°C por 24 horas 77

Tabela 6 – Avaliação da atividade de amilase produzida em fermentação submersa (meio nutriente) e semi-sólida (farelo de trigo) 82

Tabela 7 – Análise morfológica e colorações para identificação das linhagens microbianas 124

Tabela 8 – Teores de açúcares redutores, reação com iodo e valores DE dos hidrolisados de amido de mandioca utilizando solução enzimática bruta dos *Bacillus* sp A13-22 e *Mucor* sp A13-36 136

Tabela 9 – Teores de açúcares redutores, reação com iodo e valores DE dos hidrolisados de amido de mandioca utilizando 20 U/g amido da solução enzimática bruta do *Mucor* sp A13-36, em diferentes tempos de hidrólise 139

Tabela 10 – Teores de açúcares redutores, reação com iodo e valores DE dos hidrolisados de amido de mandioca utilizando diferentes concentrações de solução enzimática bruta do *Mucor* sp A13-36, durante três horas de hidrólise 140

RESUMO

Sabe-se que uma variedade de microrganismos produzem um ou mais tipos de amilases para degradar os amiláceos presentes no ambiente e que as amilases produzidas por microrganismos termofílicos apresentam características mais termoestáveis do que aquelas produzidas por mesófilos. Essas amilases termoestáveis são de grande interesse na indústria de processamento de amido, uma vez a temperatura do gelatinização do mesmo, etapa importante do processo, fica em torno de 70ºC. Além disso, os processos que ocorrem em altas temperaturas, têm menor risco de contaminação por mesófilos e a diminuição da viscosidade do meio permite trabalhar com elevadas concentrações de substrato.

No presente trabalho foram isoladas, a partir de amostras de solos, compostagens e resíduos agro-industriais, 339 linhagens microbianas termofílicas (326 bacterianas e 13 fúngicas) capazes de crescer a 55ºC em meio contendo amido como única fonte de carbono. As 163 linhagens (162 bactérias e 1 fungo) que se destacaram quanto à produção de amilases e à velocidade de crescimento em meio sólido, foram selecionadas e submetidas às fermentações submersa (meio nutriente) e semi-sólida (farelo de trigo). As atividades enzimáticas foram determinadas pelo método dextrinizante (α-amilase), pela quantificação da glicose (glucoamilase) e de açúcares redutores liberados a partir da hidrólise do amido. Das linhagens testadas, nove mostraram-se boas produtoras de α-amilase em fermentação submersa e/ou semi-sólida, fato pelo qual foram selecionadas para produção de amilases em meios formulados a partir de resíduos líquidos da extração de mandioca e milho (fermentação submersa) e sólidos, constituídos de farelos de mandioca, milho e trigo (fermentação semi-sólida). Quatro linhagens se destacaram, sendo suas enzimas brutas caracterizadas quanto às propriedades físico-químicas. As enzimas produzidas pelo *Bacillus* sp A13-22 e pelo *Mucor* sp A13-36 produziram amilases com temperatura ótima de 70 e 80ºC e pH ótimo de 6,5 e 4,5, respectivamente. Tais enzimas, aplicadas na hidrólise do amido de mandioca a 25%, produziram xaropes com elevados DE, sugerindo seu potencial para uso comercial.

Palavras-chave: microrganismos, termofilia, amilase, xarope.

ABSTRACT

It is known that some microorganisms produce one or more amylase types that degrade organic compound present in the environment. The amylases produced by thermophilic microorganisms present characteristics more thermostable than those produced by mesophilics. Since starch gelatinization temperature is around 70ºC, the thermostable amylases are very important to starch processing industry. Besides, the processes that happen in high temperatures have less risk of contamination for the mesophilic microorganisms, the decrease of the viscosity of the media and allows to work with high substrate concentrations. In the present work thermophilic microorganisms (326 bacteria and 13 fungi) were isolated from soil samples, decaying agricultural waste and agriculture-industrial residues. They are able to grow at 55ºC in media containing starch as only carbon source. 163 strains (162 bacteria and 1 fungus) that showed high amylase production and fast growth in solid media were selected and submitted to the submerged (nutrient media) and semi-solid (wheat bran) fermentations. The enzymatic activities were determined by dextrinogenic method (α-amylase), by the quantification of the glucose (glucoamylase) and of the reducing sugars released from the starch hydrolysis. Among the tested strains, nine have shown high α-amylase production in submerged and/or semi-solid fermentations and because of this they were selected for amylase production in medium formulated with liquid wastes of extraction starch from the cassava and corn (submerged fermentation), and solid wastes constituted of cassava, corn, and wheat brans (semi-solid fermentation). Among these strains, four were selected and their crude enzymes were characterized regarding to their physicochemical properties. The strains *Bacillus* sp A13-22 and *Mucor* sp A13-36 produced amylases with optimum temperature of 70 and 80 ºC and optimum pH of 6.5 and 4.5, respectively. Such enzymes, when applied in the hydrolysis process of cassava starch, produced syrups with high DE, suggesting a good potential for commercial use.

Keywords: microorganisms, thermophilic, amylase, syrup.

INTRODUÇÃO

1. Estrutura e utilização do amido

O amido faz parte da dieta fundamental do homem desde os tempos da pré-história. A facilidade com que é hidrolisado e assimilado, o torna um dos elementos mais importantes na alimentação humana. Em quase todas as partes do mundo, certos cereais, fundamentalmente o arroz e o trigo, cuja composição de amido corresponde a 75%, constituem a base alimentar da população. Grande parte do amido consumido está na forma de componente de vegetais, mas o amido refinado ou modificado ocupa um lugar de destaque na indústria de processamento de alimentos. Depois da celulose, o amido é o polissacarídio mais abundante na natureza e mais o importante comercialmente. É sintetizado principalmente em vegetais superiores, através de fotossíntese e constitui a principal fonte de reserva glicídica destes (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995; VIHINEN e MÄNTSÄLÄ, 1989).

Quimicamente, o amido é uma mistura de dois polissacarídeos muito semelhantes, a amilose e a amilopectina, em proporções que variam entre as diferentes espécies de origem e de acordo com o grau de maturação da planta. A amilose **(Fig. 1)** é formada de cadeias lineares helicoidais de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas α-1,4, na qual cada volta

da espiral é formada por aproximadamente seis unidades de glicose. A amilopectina **(Fig. 2)** apresenta estrutura altamente ramificada, possuindo cadeias de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas α-1,4 das quais partem ramificações unidas por ligações α-1,6 a cada 25 resíduos de glicose, aproximadamente (LASZLO et al., 1986).

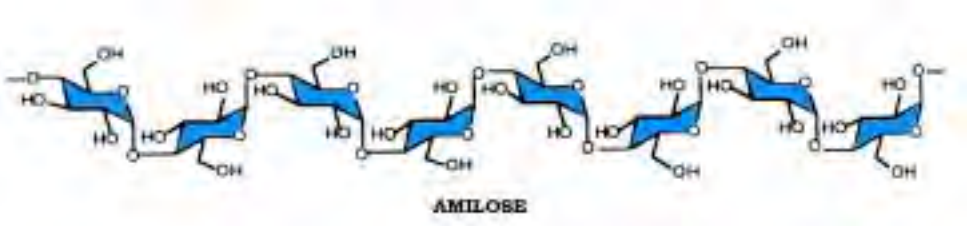


Figura 1 – Representação da estrutura primária da amilose.

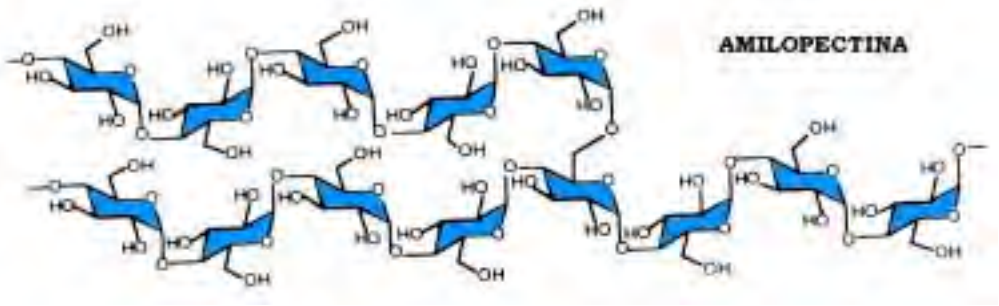


Figura 2 – Representação da estrutura primária da amilopectina.

Grande parte do amido processado industrialmente é destinado a propósitos alimentares, sendo responsável por melhorar as propriedades funcionais de alguns produtos alimentícios e por suprir uma numerosa quantidade de oligo, di e monossacarídeos. Nas indústrias de alimentos, o amido é empregado na produção de hidrolisados que funcionam como adoçantes em refrigerantes e doces, assim como, espessante em alimentos semi sólidos. Cerca de um terço da produção de amido é utilizada em outros tipos de indústrias, principalmente as indústrias de papel, tecido e embalagens que utilizam o amido como aglutinante de fibras e como adesivo. Entretanto, o maior uso do amido processado é para a produção de glicose, a qual pode ser subseqüentemente convertida por fermentação em etanol, gás

hidrogênio e antibiótico; por isomerização, em frutose, e por hidrogenação química, em sorbitol (BIGELIS, 1993).

2. O complexo amilolítico

Os amidos são facilmente hidrolisados por ácidos minerais, mas a aplicação de biocatalisadores nestes processos, tem conduzido ao uso de enzimas em substituição às substâncias químicas na produção de uma variedade de produtos à base de glicose (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995).

As enzimas são proteínas simples ou conjugadas com outros grupamentos, que catalisam reações químicas que de outra maneira ocorreriam em velocidades baixas (LEHNINGER et al., 1995). Com base no local de ação, são considerados dois tipos de enzimas: enzimas intracelulares (atuação dentro da célula) e enzimas extracelulares (atuação fora da célula). A principal função das enzimas extracelulares é a de executar as alterações necessárias à penetração dos nutrientes para o interior das células. As enzimas intracelulares sintetizam o material celular e também realizam reações catabólicas que suprem as necessidades energéticas da célula (PELCZAR et al., 1981).

As enzimas que são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas dos polissacarídeos que compõem o grânulo de amido, amilose e amilopectina, são denominadas enzimas amilolíticas ou amilases. Conforme seu modo de ação, as enzimas amilolíticas podem ser divididas em duas grandes categorias: endoamilases, que hidrolisam ligações glicosídicas ao acaso ao longo das cadeias de amilose e amilopectina, e as exoamilases que hidrolisam, sucessivamente, ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora das mesmas (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995). A degradação do complexo amilolítico é descrita, resumidamente, na **Figura 3** (VIHINEN e MÄNTSÄLÄ, 1989).

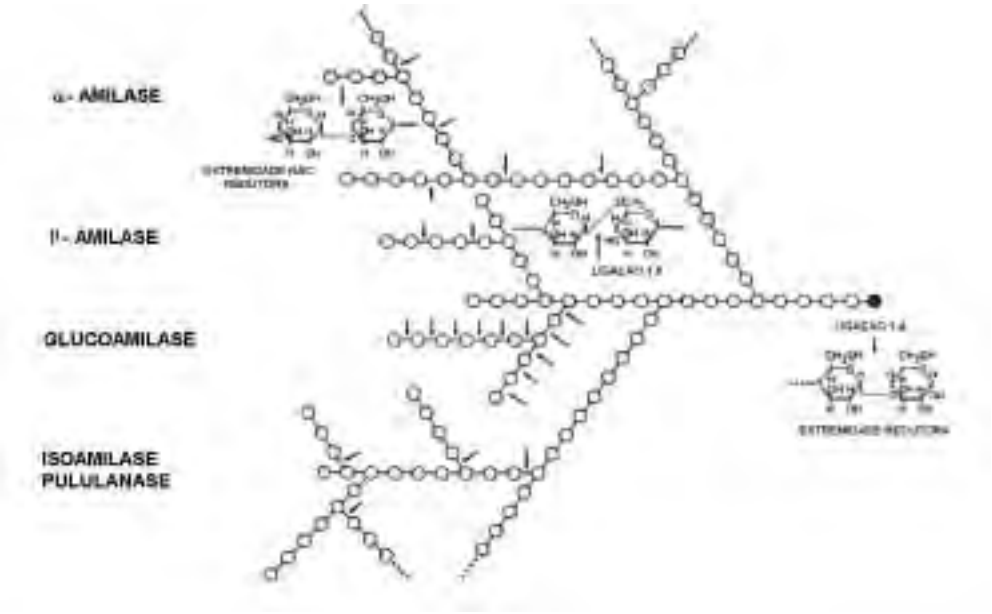


Figura 3 – Representação esquemática da estrutura da amilopectina e modelo de ação de algumas amilases. Os círculos representam unidades de glicose, e as flechas representam a posição que as enzimas amilolíticas podem hidrolisar (VIHINEN e MÄNTSÄLÃ, 1989).

Para que ocorra uma conversão eficiente das macromoléculas do amido a compostos de baixo peso molecular, é necessário a ação coordenada de muitas enzimas cujas especificidades são descritas a seguir (VIHINEN e MÄNTSÄLÄ, 1989; ANTRANIKIAN et al., 1995):

α-amilases (EC 3.2.1.1 1,4-α-D-glicano glicanoidrolase) correspondem a endoamilases, que atuam ao acaso ao longo das cadeias de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α-1,4 e liberando malto-oligossacarídeos. Também chamadas de enzimas dextrinizantes, estas enzimas são divididas em duas categorias, de acordo com o grau de hidrólise do substrato: α-amilases sacarificantes que hidrolisam 50 a 60% do substrato e as liqueficantes, que quebram cerca de 30 a 40% do substrato;

β-amilases (EC 3.2.1.2 1,4-α-D-glicano maltoidrolase) são exo-enzimas que hidrolisam a penúltima ligação α-1,4 a partir de extremidade não redutora da molécula liberando maltose, não sendo capazes de hidrolisar ligações α-1,6 dos substratos ramificados;

α-D-glicosidases (EC 3.2.1.20 α-D-glicosídeo glicoidrolase) são extensamente distribuídas entre os microrganismos, incluindo fungos, leveduras e bactérias. Estas enzimas são exo-hidrolases que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo α-1,4 e/ou α-1,6 de oligossacarídeos de cadeia curta, geralmente formados pela ação de outras amilases;

Exo-1,4-α-D-Glicanases (EC 3.2.1.60/3.2.1.98) são exoamilases que ao invés de liberar sucessivas unidades de maltose, como é o caso da β-amilase, liberam, por exemplo, maltotetrose e maltohexose como os maiores produtos da ação da enzima sobre o amido;

Ciclomaltodextrina D-Glicotransferases (EC 2.4.1.19 1,4-α-D-(1,4-D-Glicano) transferase "cyclizing") são exoamilases capazes de hidrolisar amido por uma série de complexas reações, a oligossacarídeos cíclicos não redutores (ciclodextrina);

Glicoamilases (EC 3.2.1.3 1,4-α-D-glicano glicoidrolase) são exoamilases que produzem β-D-glicose a partir da extremidade não-redutora da cadeia de amilose, amilopectina e glicogênio através da hidrólise das ligações glicosídicas α-1,4 removendo sucessivas unidades de glicose. As glicoamilases hidrolisam também ligações do tipo α-1,6, mas com uma velocidade muito menor. Também chamadas de enzimas de sacarificação, são capazes de hidrolisar completamente amido em incubações por longos períodos;

Pululanases (EC 3.2.1.41 α-dextrina-6-glicanohidrolase) são enzimas desramificantes que quebram as ligações α-1,6 do pululano, um polissacarídio linear que consiste de maltotrioses unidas por ligações glicosídicas α-1,6 e que não pode ser degradado por α ou β-amilase. O produto dessa hidrólise corresponde às maltotrioses. Dentro dessa categoria, estão também as **isopululanases (EC 3.2.1.57 pululano-4-glicanohidrolase)** que são enzimas que quebram também as ligações glicosídicas α-1,4 do pululano mas que não têm nenhuma atividade sobre o amido. O produto da ação dessas enzimas é a isopanose;

Isoamilases (EC 3.2.1.68 glicogênio-6-glicanohidrolase) hidrolisam as ligações α-1,6 da amilopectina, glicogênio e oligossacarídeos, mas não hidrolisa a ligação α–1,6 do pululano.

As amilases são amplamente distribuídas na natureza e, além de serem as responsáveis pela reciclagem do carbono contido nos amiláceos em geral, exercem um importante papel na indústria de processamento de amido (GUZMAN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995).

Um dos processos que utiliza as amilases é o de conversão do amido em: dextrinas, que são utilizadas em formulações clínicas, como material para sacarificação enzimática, estabilizadores, espessantes, etc.; maltose, usada em confeitarias, refrigerantes, cervejaria, fermentações para produção de etanol, fabricação de geléias e sorvetes; glicose, usada em refrigerantes, na panificação, cervejarias e fermentações para produção de etanol; e frutose, usada em refrigerantes, geléias, iogurtes e frutas enlatadas (GLAZER e NIKAIDO, 1995).

Além da indústria de alimentos, segundo Glazer e Nikaido (1995), a indústria têxtil tem utilizado as amilases para a remoção da pasta de amido aplicada ao fio com a finalidade de aumentar a resistência do mesmo à fricção durante o processamento. Essa pasta, quando não totalmente removida, dificulta o processamento final das roupas (tingimento, clareamento ou outro tipo de acabamento).

As α-amilases têm sido determinadas em sementes de cereais, raízes, organismos animais e em microrganismos (GOTO et al., 1998). Em função de sua grande aplicação na indústria, essas enzimas têm sido alvo de intensas pesquisas enfocando principalmente, sua produção, especificidade e mecanismos de ação (KILIKIAN, 1996).

As glicoamilases podem ser derivadas de uma grande variedade de plantas, animais e microrganismos. No entanto, a maioria das glicoamilases ocorre em fungos (VIHINEN e MÄNTSÄLÃ, 1989). Esta enzima é capaz de hidrolisar completamente o amido se incubada por longos períodos. É usada principalmente na produção de xarope de glicose, xarope de milho com alto teor de frutose (HFCS), indústria panificadora, fermentação de cervejas de

baixas calorias e na completa hidrólise de amido de sementes para produção de etanol (JAMES e LEE, 1997).

3. Microrganismos termofílicos

O uso de enzima como catalisador para a biotransformação é um procedimento bem estabelecido e que tem sido objeto de numerosos trabalhos e revisões. A maioria das enzimas utilizadas em tais processos é obtida de organismos mesofílicos e, apesar das muitas vantagens que apresentam, sua aplicação é restrita pelo seu limite de estabilidade à temperatura, pH e forças iônicas extremas (HOUGH e DANSON, 1999).

Uma das mais surpreendentes propriedades dos microrganismos é sua habilidade em adaptar-se a ambientes extremos, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão e concentração de sal ultrapassam valores considerados como padrão para a maioria dos organismos (LASA e BERENGUER, 1993). Microrganismos termofílicos têm sido encontrados em habitats termais naturais ou artificiais espalhados pelo mundo todo. Ambientes naturais e antropogênicos, incluindo efluentes industriais e efluentes de pilhas de carvão, têm sido fontes para isolamento de novas linhagens (KRISTJANSSON e HREGGVIDSSON, 1995).

A temperatura tem grande influência no funcionamento de moléculas e estruturas biológicas. Em função disso, a maioria dos organismos atualmente conhecidos pode crescer somente dentro de uma faixa estreita de temperatura. Entretanto, a existência de ambientes geotérmicos estáveis tem permitido a seleção ou a persistência, de microrganismos que não apenas resistem, mas também requerem altas temperaturas para sobreviver. Estes organismos são chamados de termófilos ou termofílicos. Dependendo da sua faixa de temperatura de crescimento, os organismos termofílicos foram arbitrariamente divididos em três classes (BROCK, 1978): moderadamente termófilos, com crescimento ótimo em temperaturas entre 45-60°C; extremamente termofílicos, com crescimento entre 60-95°C; e hipertermofílicos, cuja temperatura ótima de crescimento supera 90°C.

Os processos metabólicos e a função biológica específica destes microrganismos são mediadas por enzimas e proteínas que atuam sob condições extremas de temperatura (NIEHAUS et al., 1999).Uma correlação positiva entre a termofilia do organismo fonte e a termoestabilidade das proteínas intra e extracelulares tem sido freqüentemente demonstrada (ANDRADE et al., 1999).

Como seria de se esperar, a diversidade taxonômica dos organismos cai com o aumento de temperatura (BROCK, 1978; 1985). Assim, a maioria dos eucariotos são mesófilos, mas poucos destes, restritos a escassos fungos e algas, poderiam ser incluídos dentre os moderadamente termofílicos. O mesmo acontece com procariotos, embora entre estes haja mais grupos com espécies capazes de desenvolvimento em temperaturas superiores a 45°C. Seguindo esta redução na diversidade, apenas poucos grupos de procariotos poderiam ser classificados com extremamente termofílicos ou hipertermofílicos, sendo descritos essencialmente representantes do Domínio Archae, excetuando dois gêneros de bactérias, *Thermotoga* e *Aquifex* (HUBER et al., 1986).

Fungos termofílicos possuem temperatura mínima de crescimento em torno de 20ºC e temperatura máxima em torno de 50°C, sendo que formas termotolerantes apresentam faixa de crescimento entre 20 e 55°C, aproximadamente. Talvez pelo moderado grau de termofilia e pela simplicidade do ambiente em que são encontrados, os fungos termofílicos não recebam muita atenção e publicidade (MAHESHWARI et al., 2000).

Embora microrganismos termofílicos tenham no seu citoplasma altas concentrações de substâncias termoestabilizantes tais como poliaminas (espermina, espermidina, termina), permanece a regra essencial que a termoestabilidade reside em propriedades intrínsecas de cada componente celular. Sabe-se há muito tempo que as membranas de termofílicos são constituídas por lipídeos contendo ácidos graxos saturados e com formas metiladas, os quais permitem um grau de fluidez dentro da faixa de temperatura de crescimento do organismo (BROCK, 1978). Também, um alto conteúdo de G+C no DNA de termofílicos tem sido descrito como o principal elemento para adaptação à termofilia, embora a existência de mesófilos com

esta propriedade (por exemplo, *Streptomyces* spp), e a recente descrição de hipertermofílicos com baixo conteúdo de G+C (HUBER et al., 1986) deixa incerta a relevância desse fator.

O papel das proteínas na adaptação dos termofílicos é extremamente importante. Uma única mutação na seqüência de aminoácidos de uma proteína pode promover o aparecimento de uma forma termo-sensível da mesma, impossibilitando a linhagem mutada de crescer na mesma temperatura da linhagem selvagem (FONTANA, 1991). Assim, todas as evidências atuais indicam que o aumento da estabilidade de enzimas termófilas não pode ser atribuído a determinantes únicos, mas é resultado de várias mudanças nos aminoácidos com efeitos cumulativos na estabilidade em relação à estrutura de proteínas homólogas de mesófilos (MATSUMURA et al., 1986).

De acordo com Legin et al. (1997), organismos termofílicos produzem enzimas que, em geral, são mais termoestáveis que aquelas produzidas por mesofílicos.

A habilidade de catálise em temperaturas elevadas, atribuída às enzimas termofílicas, implica em muitas vantagens para sua aplicação em reatores ou fermentadores industriais, tais como a diminuição do risco de contaminação por microrganismos mesofílicos, que são a maioria entre a população à temperatura ambiente; aumento da taxa de difusão e solubilidade, redução da viscosidade e da tensão superficial dos componentes envolvidos em um determinado processo (HOUGH e DANSON, 1989).

Apesar dessas vantagens que as enzimas termofílicas oferecem para o uso rotineiro na indústria, a aplicação biotecnológica de termófilos tem sido muito limitada até agora. As razões para esta contradição são muitas, mas a principal delas está relacionada com o escasso número de linhagens termofílicas para a pesquisa de enzimas termoestáveis específicas, disponíveis em coleções (AQUINO, 2000).

4. Produção e características das amilases microbianas

As amilases são produzidas por quase todos os organismos eucariotos e por muitos procariotos. Em ambos os grupos, estas enzimas surgem como uma das principais responsáveis pela obtenção de energia para as funções metabólicas, a partir do amido como fonte de carbono. Porém, na maioria dos eucariotos, estas enzimas atuam em tecidos ou órgãos específicos, relacionados à nutrição do organismo, o que inviabiliza, na maioria dos casos, a sua extração e purificação para uso comercial. Neste contexto, os microrganismos surgem como uma alternativa simples e barata para a produção de enzimas, uma vez que requerem condições muitas vezes mínimas de nutrição e manutenção, apresentam alta eficiência na produção, além de secretarem as enzimas para o meio extracelular.

Na produção de amilases por fungos e bactérias, o efeito da fonte de carbono na indução e repressão é muito importante como fonte de regulação da biossíntese. Amido e amiláceos têm sido descritos como os substratos mais adequados para a alta produtividade de amilases (GHOSH et al., 1991; ALI e HOSSAIN, 1991; KILIKIAN, 1996), podendo ser aproveitados resíduos agrícolas ou de processamento de amido, os quais contêm quantidades residuais de amido suficientes para esse fim.

Inúmeros trabalhos têm reportado a produção de amilases por microrganismos termofílicos. Estes dados indicam que fungos e bactérias são capazes de produzir diferentes tipos de amilases termoestáveis e termofílicas, as quais apresentam características físico-químicas variadas. Na **Tabela 1**, são dados exemplos dos tipos de amilases microbianas e de suas características.

Tabela 1 – Características físico-químicas das amilases produzidas por diferentes espécies microbianas termofílicas e termodúricas

LINHAGEM	T(°C) CRESCIMENTO	pH ÓTIMO	pH ESTABILIDADE	T(°C) ÓTIMA	T(°C) ESTABILIDADE	TIPO AMILASE	REFERÊNCIA
Archaea *Pyrococcus furiosus*	98	5,0-6,0	ND	105-115	ND	α-Glicosidase	COSTANTINO et al., (1990)
Archaea *Pyrococcus furiosus*	98	5,0 5,6	ND ND	100	105 98	Pululanase α-Amilase	BROWN e COSTANTINO (1990)
Archaea *Pyrococcus furiosus* DSM 3638	98	5,0	3,5-8,0	100	40-140	Amilases	KOCH et al., (1991)
Fungo *Aspergillus terreus* GTC 826	ND	4,0	3,0-7,0	60	40-60	Glicoamilase	ALI e HOSSAIN, (1991)
Fungo *Aspergillus terreus* NA 170	28 (45)	5,0	3,0-7,0	60	30-75	Glicoamilase	HOSH et al., (1991)
Archaea *Pyrococcus woesei*	95	5,5	ND	100	40-130	α-Amilase	KOCH et al. (1991)
Archaea *Thermogota maritima*	ND	5,0-6,0	4,5-7,0	90-95	40-100	Amilases	SCHUMANN et al., (1991)
Archaea *Pyrococcus furiosus* *Thermococcus litoralis*	90 85	5,5	4,3-7,8	ND	70-120	Amilases Pululanases	BROWN e KELLY, (1993)
Archaea *Pyrococcus furiosus*	ND	6,5-7,5	ND	100	40-120	α-Amilase	LADERMAN et al., (1993)
Archaea *Fervidobactirium* sp.	90-100	5,5-6,5	ND	90-100	ND	Amilases Pululanase	CANGANELLA et al., (1994)

Tabela 1 – Características físico-químicas das amilases produzidas por diferentes espécies microbianas termofílicas e termodúricas (continuação)

LINHAGEM	T(°C) CRESCIMENTO	pH ÓTIMO	pH ESTABILIDADE	T(°C) ÓTIMA	T(°C) ESTABILIDADE	TIPO AMILASE	REFERÊNCIA
Eubactéria *Bacillus* sp TS-23	50	7,5-9,4 8,8-9,6	ND ND	65 ND	45-70 (máx.) 70-75 (máx.)	Amilases Pululanase	LIN et al., (1994)
Archaea *Thermococcus profundus* DT5432	80	5,5-6,0	5,5-9,8	80	80-90	α-Amilase	CHUNG et al., (1995)
Thermus sp	50-60°C	5,5-6,5	4-10	70	ND	α-Amilase	SHAW et al., (1995)
Eubactéria *Thermosipho* sp BI 430	60	6,0	4,6-8,0	60	56-80		
Archaea *Thermococcus funicolans* ST557	80	4,5	4,0-6,3	ND	50-95		
T. hidrothermalis AL662	80	5,6	4,8-7,8	85	75-95		
Thermococcus sp BI 533	80	6,0	4,5-6,8	84	76-95	Amilase α-glicosidase Pululanase	LEGIN et al., (1997)
Isolado BI 534	80	4,5	4,2-6,0	80	65-87		
Thermococcus sp ST 552	80	6,2	4,6-7,8	ND	74-95		
Isolado ST 553	80	5,0	4,2-8,0	90	50-93		
Thermococcus sp BI 560	80	5,5	4,8-6,5	ND	72-95		
Thermococcus sp AL 655	80	5,0	4,0-6,1	70	65-80		

Tabela 1 – Características físico-químicas das amilases produzidas por diferentes espécies microbianas termofílicas e termodúricas (continuação)

LINHAGEM	T(°C) CRESCIMENTO	pH ÓTIMO	pH ESTABILIDADE	T(°C) ÓTIMA	T(°C) ESTABILIDADE	TIPO AMILASE	REFERÊNCIA
Thermococcus sp ST 701	80	5,0	4,3-6,3	80	60-95	Amilase α-glicosidase Pululanase	LEGIN et al., (1997)
Eubactéria *Thermoactinomyces* sp	ND	5,0-5,5	ND	75-80	ND	Amilase Pululanase	YALLOP et al., (1997)
Archaea *Thermococcus hidrothermalis*	80	5,5	5,0-6,2	95	40-120	Pululanase	GANTELET e DUCHIRON, (1998)
Fungo *Aspergillus tamarii*	30	4,5-6,0	4,0-7,0	50-55	50-65	α-Amilase Glicoamilase	MOREIRA et al., (1999)
Eubactéria *Bacillus* sp WN11	ND	5,5	5,0-8,0	75-80	105	Amilase	MAMO et al., (1999)
Eubactéria *Bacillus* sp WN11	60	5,5	5,5-9,0	75-80	ND	α-Amilase	MAMO e GESSESSE, (1999)
Eubactéria *Bacillus* sp US100	50 e 37	5,6	4,5-8,0	82	110 (PS)	α-Amilase	ALI et al., (1999)
Eubactéria *Bacillus clausii* BT-21	ND	9,5	ND	55	ND	Amilases formadoras de malto-oligossacarídeos	DUEDAHL-OLESEN et al., (2000)
Fungo Thermomyces lanuginosus	ND	4,6 5,0	ND	70	ND	Glicoamilase α-Amilase	RONASZEK et al., (2000)

ND = não determinado; PS = presença de substrato

5. Uso de subprodutos e resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos

De um modo geral, a preocupação em relação à utilização mais eficiente dos resíduos agro-industriais, vem aumentando a cada ano. Resíduos como o bagaço de cana-de-açúcar, casca/polpa de café e maçã, polpa de beterraba e resíduos do processamento de mandioca, entre outros, são gerados em grandes quantidades (PANDEY et al., 2000). Entretanto, estão sendo desenvolvidos vários processos que utilizam estes resíduos como substrato para produção de substâncias químicas e produtos de maior valor comercial como etanol, proteína de biomassa microbiana, cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos, etc. (PANDEY, 1992, 1994; PANDEY et al., 1988, 2000).

A aplicação de resíduos agro-industriais em bioprocessos, por um lado fornece substratos alternativos e, por outro, ajuda a solucionar os problemas de poluição que sua disposição no ambiente poderia causar. Com o advento de inovações biotecnológicas, principalmente na área de tecnologia de enzimas e fermentação, muitos caminhos novos têm sido abertos para sua utilização (PANDEY, et al., 2000).

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de mandioca e o segundo em processamento, logo após a Tailândia. As principais transformações industriais dessa raiz são para a produção de farinha e extração do amido (ALVAREZ, 1997).

O processo de produção de farinha corresponde a uma atividade de significativa importância tanto no setor agro-industrial como no aspecto social, tanto pela fixação do homem no campo como pela produção do principal alimento energético para milhões de pessoas no país. Essa atividade produz também, durante as diversas fases do processamento, uma quantidade considerável de materiais que são atualmente descartados como resíduos ou sub-utilizados.

Devido à composição química e de acordo com a destinação final, esses materiais geram elevadas cargas poluidoras que causam impactos

negativos ao meio ambiente. Considerando apenas a parte sólida, é inaceitável que um material com cerca de 70% de amido, 15% de fibras e um poder calorífero em torno de 4000 kcal/kg, em base seca, seja subutilizado ou simplesmente disposto no ambiente, sem nenhuma utilidade. Com essas características, se esses excedentes fossem manejados com tecnologias apropriadas, poderiam resultar em um reaproveitamento de praticamente todo o material descartado como matéria-prima de outros processos, o que não vem ocorrendo atualmente em grande parte das fábricas desse setor (DEL BIANCHI, 1998).

Este mesmo autor estima uma produção anual brasileira desses resíduos, de cerca de 1,5 milhão de toneladas de materiais extraídos durante a lavagem das raízes, 100 a 200 mil toneladas de outros materiais excedentes gerados durante o processo, além de 8 a 14 mil toneladas de fécula de mandioca descartadas junto com a água da prensagem das raízes, em relação aos resíduos sólidos. É ainda relatado o uso estimado de cerca de 15 a 40 milhões de metros cúbicos de água para a lavagem das raízes, que, após o processo, correspondem a aproximadamente 40 mil toneladas de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) ou o equivalente à carga poluidora diária de uma cidade de dois milhões de habitantes, e a extração de até seis milhões de metros cúbicos de um líquido obtido através da prensagem da massa ralada de mandioca, com aproximadamente 480 mil toneladas de DBO ou o equivalente à carga poluidora diária de uma cidade de 24 milhões de habitantes.

Existem inúmeras oportunidades que poderiam ser implementadas para o aproveitamento desses resíduos, de modo a proporcionar maiores rentabilidades financeiras para as próprias empresas ou para suas possíveis futuras subsidiárias, como as produções de compostos de aroma, ácidos orgânicos, cogumelos e hidrolisados para aplicação em bioprocessos (PANDEY et al., 2000).

O milho ocupa posição estratégica na agropecuária e na economia brasileira, sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial desse grão, com produção inferior somente à dos Estados Unidos e à da China (ABIMILHO,

2000a). Cerca de 81% do total produzido internamente é consumido sob a forma de ração animal (CONAB, 1999).

O processo industrial de moagem úmida é o segundo maior setor de consumo do grão após a alimentação animal, utilizando 12% do total produzido (ABIMILHO, 2000b). Este, envolve transformações químicas, bioquímicas e operações mecânicas com o objetivo de separar o grão do milho em suas frações relativamente puras: germe, fibra, amido e glúten (SINGH et al., 1997).

Os produtos primários de moagem úmida são amidos alimentícios e industriais, os quais podem ser convertidos em xaropes e etanol. Os co-produtos incluem o óleo de milho e os produtos destinados à produção de rações animais, tais como, o glúten de milho, farelo do glúten de milho, farelo do germe de milho, fibras e licor de maceração, sendo os últimos, sólidos solúveis removidos durante a maceração e concentrados por evaporação. O licor resultante da maceração, usualmente vendidos na base de 50% de sólidos, é rico em vitaminas, especialmente do complexo B. Além de ser usado em rações, o licor também é aplicado na produção de antibióticos e produtos farmacêuticos e fermentos. Combinados com outros ingredientes esses itens na formulação de rações específicas de acordo com a destinação dos animais (ABIMILHO, 2000c,d).

O trigo não se destaca na agropecuária brasileira. Uma vez que a planta é originária de climas temperados, é cultivada mais intensamente na região sul e raramente na região sudeste do país. Grande parte da produção é destinada ao processamento para obtenção da farinha, entre outros produtos. Nesse contexto, o farelo é classificado como um subproduto, podendo ser definido como produto obtido no processamento, composto de pericarpo, partículas finas de germe e das demais camadas internas dos grãos e outros resíduos resultantes do processamento industrial.

O farelo de trigo é usado principalmente como ração animal ou como componente da dieta alimentar humana devido à grande quantidade de fibras. Esse resíduo tem baixo valor comercial e é rico em nutrientes, o que o torna um substrato ideal para o cultivo de microrganismos, para obtenção dos mais variados bioprodutos (FABRIANE e LINTAS, 1989).

6. Produção de xaropes

O termo 'hidrolisados de amido' engloba todos os produtos resultantes do fracionamento do amido, independente do catalisador utilizado ou o grau deste fracionamento. São incluídos nesta denominação um importante número de produtos diferentes como a glicose, maltose, maltotetrose, frutose, ciclodextrinas, dextrinas, etc. (TEAGUE e BRUMM, 1992).

O mercado para esses produtos tem aumentado significativamente nas últimas décadas por serem substituintes do açúcar comum (sacarose) na indústria de bebidas, além das novas aplicações dos hidrolisados na indústria de alimentos, devido às suas propriedades funcionais (NAGODAWITHANA e REED, 1993; WOODS e SWINTON, 1995).

A literatura disponível sobre a produção de xaropes, de modo geral, se refere basicamente de produtos à base de amido de milho, mas outras fontes amiláceas como trigo, arroz, cevada, batata, batata doce e mandioca também podem servir como matéria prima.

A intensidade de hidrólise é definida pelo valor Equivalente em Dextrose (DE), que se refere à porcentagem de açúcares redutores, calculados como glicose. Esta classificação, contudo, apresenta algumas limitações visto que dois produtos hidrolisados por métodos diferentes podem ter o mesmo valor DE, embora diferentes composições de sacarídeos e diferentes propriedades (BROOKS e GRIFFI, 1987).

Normalmente, as indústrias que detêm a produção de xaropes de amido em países como o Brasil, são multinacionais e utilizam o amido de milho como matéria prima em seu país de origem. Segundo Hebeda (1987), o amido de milho é usado exclusivamente como matéria prima para a produção de xaropes nos Estados Unidos. Isso se deve, basicamente aos custos favoráveis, disponibilidade e propriedades de armazenamento do milho, além dos rendimentos gerados pela produção de amido e pelos co-produtos como o óleo e a ração animal.

Em um levantamento realizado, Alvares (1997) verificou que quatro produtores de hidrolisados estão presentes no Brasil: Refinação de Milho do

Brasil, Cargill, Companhia Lorenz e Imasa Brasil LTDA, sendo que apenas a Companhia Lorenz produz hidrolisados (amidos modificados, maltodextrinas, etc.) exclusivamente de fécula de mandioca.

Existem três processos básicos de conversão de amido usados na produção de adoçantes de amido (SIMMS, 1985; HOBBS, 1986; HEBEDA, 1987):

Conversão ácida: consiste na quebra de ligações α-1,4 e α-1,6 das moléculas de amido de uma maneira aleatória, usando temperaturas e pressões elevadas, em meio fortemente ácido. O grau de conversão, que é a extensão na qual a molécula de amido é quebrada, é determinado pela pressão, temperatura, tempo de residência e concentração do catalisador. Esse processo é utilizado na produção de xaropes variando na faixa de 20-45 DE;

Conversão ácido-enzimática: inicialmente, é utilizado o mesmo processo de conversão ácida até que se consiga um xarope de 10 a 20 DE. Esse estágio é seguido de hidrólise enzimática onde uma ou mais enzimas são adicionadas à solução de amido liqüefeito. Como as enzimas são muito seletivas nas ligações do amido nas quais atuam, a variação das enzimas e quantidades a serem utilizadas pode resultar em diferentes tipos de xaropes;

Conversão dual-enzimática: utiliza-se enzimas para os dois estágios de liquefação e sacarificação do amido. Durante a gelatinização do amido são adicionadas enzimas liquefantes, as quais produzem hidrolisados de baixo DE, do mesmo modo que a hidrólise ácida, mas sob condições mais controladas e menos severas. O segundo estágio é realizado utilizando enzimas adequadas para aumentar a quantidade do açúcar desejado, como xaropes com altos teores de glicose ou maltose.

Atingido o DE e o perfil de carboidratos desejados, através da utilização de ácidos e/ou enzimas, as proteínas residuais do amido e qualquer tratamento enzimático são removidas, geralmente, através de centrifugação e filtração à vácuo. Após filtração, o líquido passa através de

uma coluna de carvão ativado para a remoção de cor e sabor, inerentes ao amido, ou substâncias produzidas durante a hidrólise. A maioria dos xaropes são apenas refinados, mas podem também ser desmineralizados de acordo com aplicações específicas, como nos xaropes com alto teor de glicose. Colunas trocadoras de íons são usadas para remover traços de flavor e compostos coloridos, além de cinzas e sais solúveis não removidos na filtração ou tratamento com carbono. Após o estágio de refino, o xarope é evaporado até nível de sólidos desejado, que geralmente varia de 70-80% de sólidos secos (HOBBS, 1986).

A necessidade de aumentar a produtividade, diversificar e melhorar a qualidade dos produtos têm impulsionado o desenvolvimento de processos catalisados por enzimas, que na maioria das vezes, tem substituído o processo ácido (HEBEDA et al., 1988).

O ácido não é um catalisador específico para a hidrólise do amido, de modo que reações indesejáveis podem ocorrer, resultando na formação de subprodutos difíceis de serem removidos do produto final, como compostos coloridos, além da diminuição do flavor. A hidrólise aleatória sobre as ligações α-1,4 e α-1,6 também dificulta o controle dos produtos finais que podem apresentar o mesmo valor DE, porém com perfis de carboidratos e propriedades funcionais diferentes. Contudo, segundo Crabb e Mitchinson (1997), ao longo dos últimos 30 anos, a maioria dos processos tem seguido o método original (hidrólise ácida a 140°C ou mais) com adição de uma α-amilase previamente ao cozimento, com isso aperfeiçoando o processo e o produto.

Por sua vez, a hidrólise enzimática é muito mais específica que a ácida e a introdução de enzimas visando a substituição da conversão ácida, mesmo que parcialmente, tem colaborado muito para minimizar a formação de cor, produtos de degradação e perda de flavor, resultando em produtos de melhor qualidade e reduzindo custos de refino (HEBEDA, 1987).

As enzimas que atuam de algum modo na produção de xaropes de amido são a α-amilase bacteriana, glicoamilase, β-amilase, pululanase, isolamilase e α-amilase fúngica. A glicose-isomerase também é utilizada na

isomerização da glicose em frutose para a produção de xaropes com altos teores de frutose.

A produção industrial de glicose tem início com a liquefação do amido, geralmente realizada em dois passos: um primeiro estágio de 5 a 15 minutos a 105-107°C, seguido de um segundo estágio de 60 a 80 minutos a 95-98°C, em concentrações de amido de no máximo 38% e pH com valores entre 5,8 e 6,2. As α-amilases termoestáveis, derivadas geralmente de *Bacillus licheniformis* e *B. stearothermophilus*, são adicionadas ao processo gerando, ao final da liquefação, um hidrolisado claro, negativo ao teste com iodo e com valor DE aproximadamente de 10 a 18 (BRUMM, 1998). O objetivo da liquefação é converter uma suspensão concentrada de amido granular purificado em uma solução de solúveis, ou seja, dextrinas com comprimentos de cadeias curtos (CRABB e MITCHINSON, 1997).

Após a liquefação, o amido é então resfriado a 60°C, e o pH é ajustado para 4 a 5,2 para o passo de sacarificação, realizado pela adição de enzimas sacarificantes. O processo de remoção de resíduos de glicose simples de um oligossacarídeo solúvel é chamado sacarificação, e em sua forma mais simples, é catalisado por uma glicoamilase. Normalmente são utilizadas enzimas produzidas por espécies do gênero *Aspergillus* (por exemplo, *A. niger* e *A. awamori*), as quais podem ser obtidas em grandes quantidades nos processos de fermentação. Tais enzimas apresentam pH ótimo em torno de 4,2 e são estáveis a 60°C (CRABB e MITCHINSON, 1997).

7. Produção enzimática brasileira

O Brasil, por suas características climáticas e territoriais, ocupa no mundo uma posição privilegiada tanto em termos de biodiversidade quanto a sua capacidade de gerar recursos renováveis em grande escala, sendo deste modo, referência mundial para a busca de linhagens microbianas de interesse biotecnológico, do mesmo modo que suas espécies animais e vegetais. Apesar disso, ainda não se explora suficientemente a nossa biodiversidade em termos de pesquisas nacionais, ficando o país, muitas

vezes, na dependência da importação de microrganismos melhorados geneticamente para o desenvolvimento de processos, os quais são adaptados a outros ambientes e raramente desenvolvem-se bem aqui, pois além dos fatores genéticos, os fatores ambientais, como o clima e o substrato, devem ser levados em consideração.

Em termos de produção e uso de enzimas, existe abundância de matéria prima a ser utilizada em processos fermentativos, a qual compõe uma enorme quantidade e variedade de biomassa passível de ser transformada, por via enzimática, em produtos úteis diversificados de maior valor comercial. Contudo, o Brasil não se encontra em uma boa posição quanto ao uso de enzimas, estimando-se que o mercado brasileiro seja bem restrito em relação ao mercado mundial.

Dados sobre o comércio de enzimas, fornecidos pela Secretaria de Comércio do Banco do Brasil, são apresentados na **Tabela 2** e ilustrado na **Figura 4.**

Esses dados indicam que a quantidade de enzimas produzidas no país está longe daquela requerida para suprir suas necessidades. Neste contexto, a descoberta de novas linhagens produtoras de enzimas de interesse industrial poderia vir a contribuir para minimizar essas diferenças, além de contribuir com o desenvolvimento da tecnologia enzimática no país.

Em função disso, foi desenvolvido um projeto no qual buscou-se o isolamento e seleção de linhagens microbianas termofílicas capazes de produzir amilases termofílicas e termoestáveis, em meios à base de resíduos amiláceos.

Tabela 2 – Exportações e importações de enzimas do mercado brasileiro, no período de 2000 e 2001

	MONTANTE							
	2000				2001			
ENZIMAS	IMPORTAÇÕES		EXPORTAÇÕES		IMPORTAÇÕES		EXPORTAÇÕES	
	(kg)	US$ FOB	(kg)	US$ FOB	(kg)	US$ FOB	(kg)	US$ FOB
α-Amilase	323.892	2.686.857	11.460	175.121	353.813	2.613.577	35.027	210.856
Outras amilases e seus concentrados	357.859	2.558.498	184.377	2.399.132	589.584	3.652.013	208.842	2.359.724
Coalho e seus concentrados	263.238	2.064.384	377.804	1.636.243	157.383	1.172.052	384.855	1.862.456
Estreptoquinase	92	110.328	-	-	-	-	-	-
Bromelina	474	23.677	-	-	625	22.045	-	-
Papaína	11.523	152.780	18.652	239.154	12.597	210.979	8.540	124.587
Lisozima e seu cloridrato	2.516	160.049	-	-	2.320	184.419	-	-
Outras proteases e seus concentrados	436.488	3.163.946	48.987	334.886	343.979	3.472.169	15.966	186.639
Outras enzimas e seus concentrados	406.857	7.395.902	660.686	4.407.263	849.427	10.145.812	642.832	4.487.140
	1.802.939	**18.316.421**	**1.301.966**	**9.191.799**	**2.309.728**	**21.473.066**	**1.296.062**	**9.231.402**

Fonte: Secretaria de Comércio do Banco do Brasil

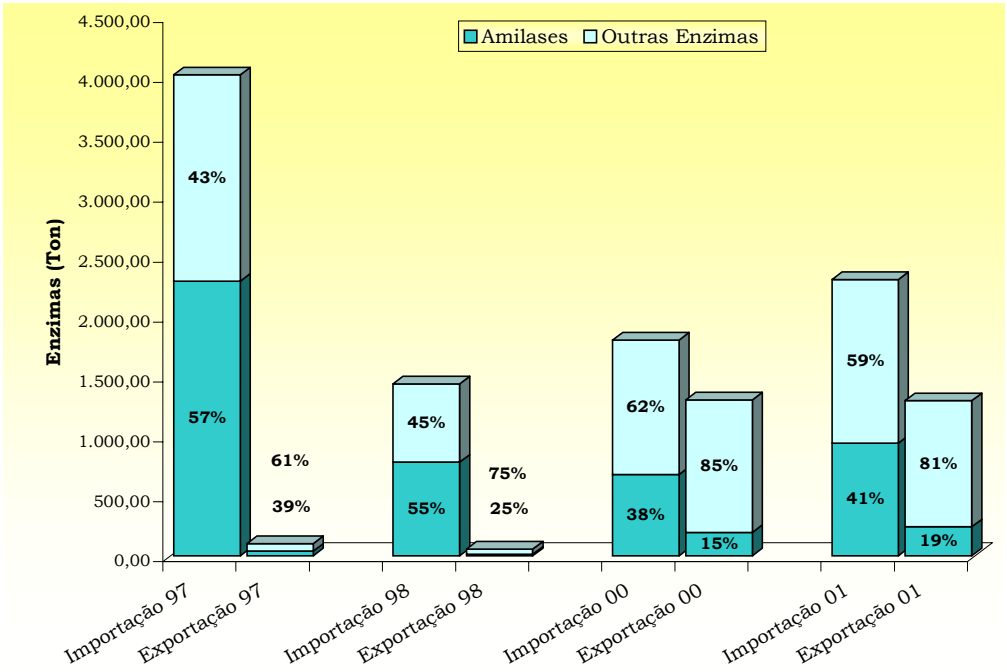


Figura 4 – Comércio de enzimas, importação e exportação no Brasil, nos períodos de 1997, 1998, 2000 e 2001.

OBJETIVOS

a) Isolar e selecionar linhagens microbianas termofílicas produtoras de amilases termofílicas e termoestáveis a partir de amostras de solo, compostagem, resíduos industriais, etc.;

b) produzir enzimas amilolíticas pelas linhagens selecionadas em meio líquido e em meio composto por resíduos agrícolas e agro-industriais;

c) caracterizar as enzimas produzidas;

d) aplicar a enzima bruta das linhagens selecionadas na hidrólise do amido de mandioca.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Meios de cultivo

1.1. Meio nutriente

Foi utilizado o meio nutriente conforme descrito por Mandels e Sternberg (1976) com pequena modificação: 1% de amido solúvel; 0,14% de $(NH_4)_2SO_4$; 0,20% de K_2HPO_4; 0,02% de $MgSO_4.7H_2O$ e 0,10% de solução de micronutrientes (5 mg/L $FeSO_4.7H_2O$; 1,6 mg/L $MnSO_2.H_2O$; 1,4 mg/L $ZnSO_4.7H_2O$; 2,0 mg/L $CoCl_2$).

1.2. Meio para isolamento das linhagens

Foi utilizado o meio nutriente acrescentando-se 3% de ágar (a porcentagem maior de ágar que a usual de 2% serviu para diminuir a fluidez do meio a temperaturas mais altas).

1.3. Meio para manutenção das culturas selecionadas

As culturas de fungos foram mantidas em meio de BDA (batata, dextrose, ágar) e as culturas de bactérias em meio NA (peptona, extrato de carne, glicose e ágar), ambos acrescidos de 0,5% de amido solúvel.

1.4. Meios para a seleção das linhagens produtoras de amilases

1.4.1. Meio para fermentação submersa

Para a produção das enzimas foi utilizado o meio composto por 1% de amido solúvel, 0,1% de KH_2PO_4, 0,5% K_2HPO_4, 0,05% de $MgSO_4.7H_2O$, 0,2% de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2% de extrato de carne e 0,05% de solução de micronutrientes (5 mg/L $FeSO_4.7H_2O$; 1,6 mg/L $MnSO_4.H_2O$; 1,4 mg/L $ZnSO_4.7H_2O$; 2,0 mg/L $CoCl_2$), com pH ajustado para 6,5 para o cultivo das linhagens bacterianas e 5,5 para as linhagens fúngicas.

1.4.2. Meio para fermentação semi-sólida

Para fermentação semi-sólida foi utilizado o meio composto de 5 g de farelo de trigo esterilizado umedecido com 10 mL de solução de sais composta por 0,1% de $MgSO_4.7H_2O$ e 1% de $(NH_4)_2SO_4$.

1.5. Meios para estudo da produção de amilases pelas linhagens selecionadas

1.5.1. Meios para fermentação submersa

1.5.1.1. Meio nutriente enriquecido

Para estudo do efeito do tempo de cultivo na produção de amilases foi utilizado o meio nutriente (item 1.4.1.) enriquecido com 0,5% de extrato de levedura e 0,2% de peptona.

1.5.1.2. Meio nutriente-mandioca e nutriente-milho

Para esses ensaios foi utilizado o meio nutriente (item 1.5.1.1.) substituindo-se o amido por 1% de farelo de mandioca e farelo de milho,

obtidos do processamento de mandioca e do resíduo da extração de gérmen de milho, respectivamente.

1.5.1.2.1. Processamento da mandioca

Realizou-se o processamento da mandioca no intuito de se obter substratos para as fermentações semi-sólida (farelo de mandioca) e submersa (água de decantação do polvilho doce) pelas linhagens selecionadas.

A mandioca, cerca de 4 Kg, foi adquirida no comércio local. No laboratório as raízes foram lavadas, descascadas e picadas. As cascas (periderme) foram submetidas à secagem em estufa a 50°C e reservadas para uso na fermentação semi-sólida.

As raízes desprovidas da periderme foram trituradas com auxílio de um liqüidificador doméstico. A polpa obtida foi lavada por várias vezes com água destilada até a completa remoção do caldo (leite de amido). Uma prensa, confeccionada com tecido de algodão poroso, foi usada para separar a parte sólida da água de lavagem (manipueira).

A manipueira foi acondicionada em fracos que foram mantidos em câmara fria, a 5°C por aproximadamente quatro horas, para decantação do polvilho.

O polvilho decantado foi separado da fração líquida, sendo esta reservada para uso como resíduo líquido, e submetido à secagem em estufa a 50°C por 24 horas.

A polpa seca foi triturada e peneirada (malha granulométrica de 2,5 mm), separando-se o farelo (granulometria ≥ 2,5 mm) da farinha (granulometria < 2,5 mm). O farelo foi utilizado como substrato para fermentação semi-sólida e a farinha foi utilizada como fonte de carbono alternativa para fermentação submersa.

O processamento está esquematizado na **Figura 5**:

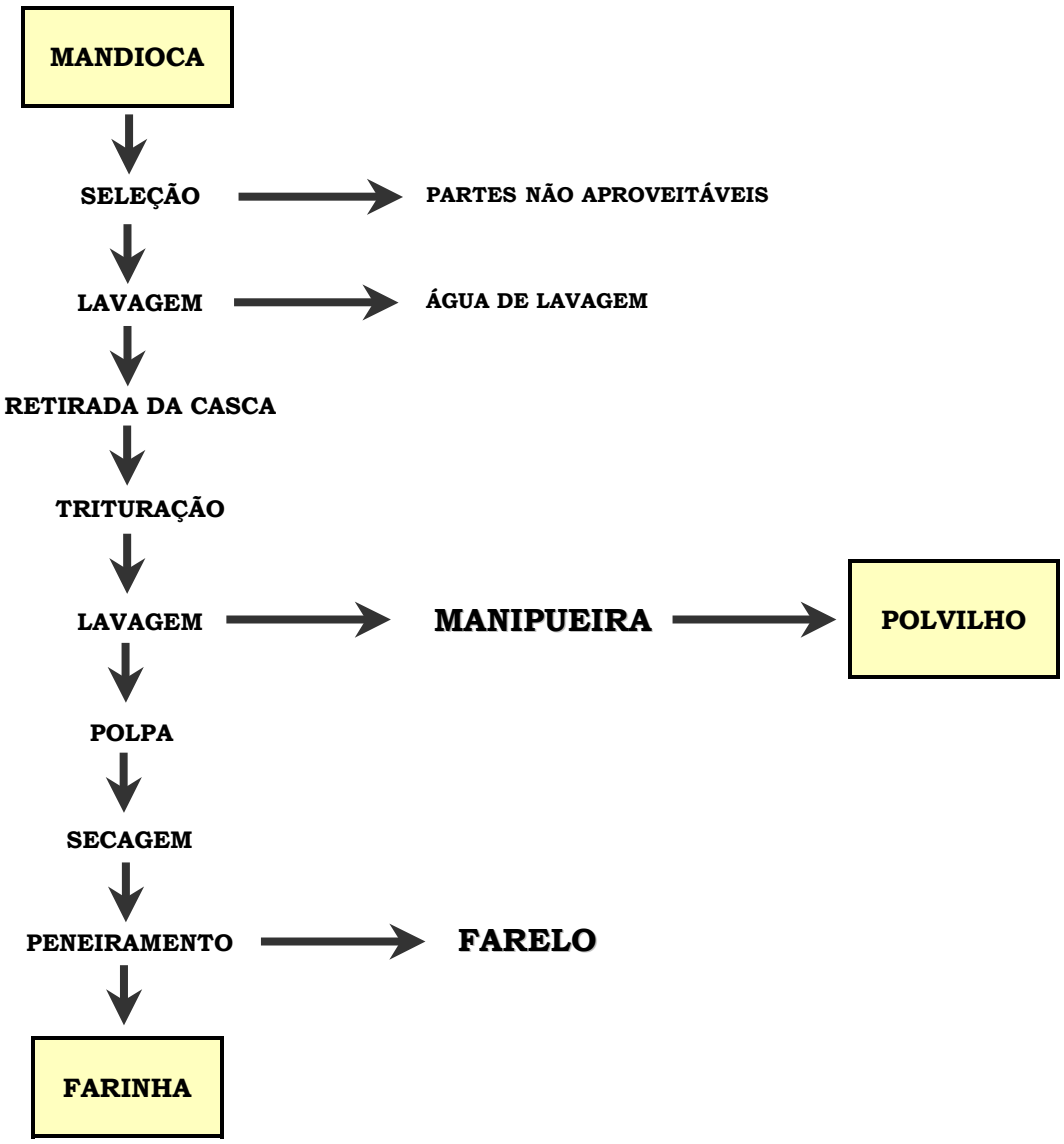


Figura 5 – Fluxograma do processamento da mandioca.

1.5.1.2.2. Resíduos de milho

Foi considerado resíduo de milho toda a fração resultante do processamento dos grãos após a maceração e retirada do gérmen. O material foi fornecido pelo departamento de Engenharia de Alimentos do IBILCE/UNESP. É importante ressaltar que o material em questão não constitui um resíduo descartado pelas indústrias de processamento de amido, pois trata-se de um material rico em amido, fibras e proteínas. Esse

material contém também resíduos de ácido lático e dióxido de enxofre usados na fase inicial da moagem.

O resíduo foi filtrado e a fração sólida foi submetida à secagem em estufa a 50ºC, trituração em liqüidificador e peneiramento (peneira com malha granulométrica de 2,5 mm), separando-se o farelo (granulometria ≥ 2,5 mm) da farinha (granulometria < 2,5 mm). O farelo foi utilizado como substrato para fermentação semi-sólida e a farinha foi utilizada como fonte de carbono alternativa para fermentação submersa.

1.5.1.3. Resíduo líquido de mandioca

Foi utilizado como resíduo líquido de mandioca, a água de decantação do polvilho, obtida pelo processamento da mandioca descrito no item 1.5.1.2.1.

Para uso na fermentação submersa, o resíduo foi acrescido de 0,2% de $(NH_4)_2SO_4$, 0,05% de $MgSO_4.7H_2O$ e 0,05% de solução de micronutrientes (item 1.1.), sendo o pH corrigido com K_2HPO_4 ou KH_2PO_4 a 5,5, ou 6,5 para as linhagens fúngicas ou bacterianas, respectivamente.

1.5.1.4. Resíduo líquido de milho

Foi utilizada a fração líquida da matéria residual do processamento de milho para extração do gérmen, como descrito no item 1.5.1.2.2, sendo esta diluída 10 vezes e acrescida de 0,2% de $(NH_4)_2SO_4$, 0,05% de $MgSO_4.7H_2O$ e 0,05% de solução de micronutrientes (item 1.1.), sendo o pH corrigido com K_2HPO_4 ou KH_2PO_4 a 5,5 ou 6,5 para as linhagens fúngicas ou bacterianas, respectivamente.

1.5.2. Meios para fermentação semi-sólida

1.5.2.1. Farelo de mandioca

Para fermentação semi-sólida, foram utilizados 5 g de farelo de mandioca (item 1.5.1.2.1.), em frascos de 125 mL. O meio foi umedecido com 10 mL de solução de sais (item 1.4.2).

1.5.2.2. Farelo de milho

Foram utilizados 5 g de farelo de milho, em frascos de 125 mL, constituído da fração sólida da matéria residual do processamento do milho para extração do gérmen (item 1.5.1.2.2.). O meio foi umedecido com 10 mL de solução de sais (item 1.4.2).

1.5.2.3. Farelo de trigo

Foi utilizado farelo de trigo como descrito no item 1.4.1.

2. Seleção dos microrganismos

2.1. Coletas

Visando a obtenção de microrganismos amilolíticos termofílicos, vinte coletas foram realizadas em locais que ao mesmo tempo forneciam amido como uma das fontes de carbono disponíveis e temperaturas elevadas. Foram coletadas amostras de compostagem de esterco animal, solos agrícolas cultivados, matéria orgânica em decomposição e em um frigorífico de frangos. Na **Tabela 3**, são mostrados os locais de coleta, o número de coletas realizados em cada local, o tipo de material coletado e o número de identificação das amostras.

Tabela 3 – Locais de coleta e tipo de amostra coletada para isolamento das linhagens microbianas termofílicas

Coleta	N.º de coletas	Local de Coleta	Material Coletado
A1	2	Faz. Caporusso Guariba – SP	– solo das hortas (com esterco animal) – esterco bovino em compostagem – solo de canteiro de mandioca
A2	1	Pantanal – MT	– água de rios
A3	3	Canteiro IBILCE/UNESP	– Folhas e raiz de mandioca em decomposição – solo de plantação de mandioca – matéria orgânica vegetal em decomposição
A4	3	Frango Sertanejo Guapiaçu – SP	– água do escaldador de frango(1, 2, 3) e depenadeira (4) restos alimentares contidos na moela (5), pró-ventrículo (6) e papo (7) de frangos
A5	2	Sítio Três-Marias Nova Europa – SP	– cama de frango em compostagem – solo de horta – folhas em decomposição
A6	1	Chácara Santa Cruz SJRP – SP	– bagaço de cana em compostagem – esterco bovino em compostagem – solo das hortas (com esterco animal) – folhas de hortaliças em decomposição
A7	1	Estância Santa Rosa Neves Paulista – SP	– raiz de milho – monte de palha de café – solo das hortas e plantação de milho
A8	1	Chácara 3E / Pirajá- Neves Paulista - SP	– esterco bovino em compostagem – solo das hortas – folhas em decomposição
A9	1	Fábrica de farinha Região Botucatu – SP	– água de decanto de amido – amido decantado – fibra sedimentada – casca de mandioca
A10	1	Fazenda Dois Morros Campinópolis – MT	– solo de plantação de milho, abacaxi, banana e gengibre – bucha: monte com material em decomposição – palhada de arroz após colheita
A11	1	Chácara São Joaquim Guariba – SP	– esterco bovino em compostagem
A12	1	Matadouro Municipal Guariba – SP	– esterco bovino em compostagem
A13	1	Chácara Baldan Guariba – SP	– cama de frango – esterco bovino em compostagem – solo de plantação de mandioca
A14	1	Chácara. Della Corte Guariba – SP	– bagaço de cana – solo com restos de esterco bovino misturado com cevada

2.2. Isolamento das culturas

Foi seguido o procedimento de Da Silva (1992), esquematizado na **Figura 6**. Aproximadamente 0,5 g de amostras de solos sombreados e agrícolas, de matéria orgânica em decomposição, resíduos amiláceos e compostagem ou 2 mL de resíduos líquidos de indústrias, foram transferidos diretamente para tubos contendo 5 mL de meio nutriente. As amostras foram incubadas a 55ºC por aproximadamente 24 horas. Por semeadura em superfície, 0,1 mL do material foi transferido para placas de Petri contendo o meio de seleção, as quais foram incubadas a 55ºC até o surgimento das colônias de bactérias e fungos.

Foram selecionados todos os tipos morfológicos existentes nas placas, com base na cor, forma, elevação e brilho das colônias. Os fungos foram separados com base no aspecto do micélio e cor dos esporos e outras características do anverso e reverso das colônias.

Cada colônia foi reinoculada por estrias de esgotamento em meio de seleção, até a obtenção de culturas puras. Após essa purificação, foi realizado um exame microscópico para análise do tamanho, forma e outras características celulares e também para constatar a pureza das culturas. Cada cultura recebeu uma identificação baseada no local e material de coleta, sendo estocada em câmara fria em tubos contendo meio inclinado cobertos com óleo mineral estéril e vedados com parafilme.

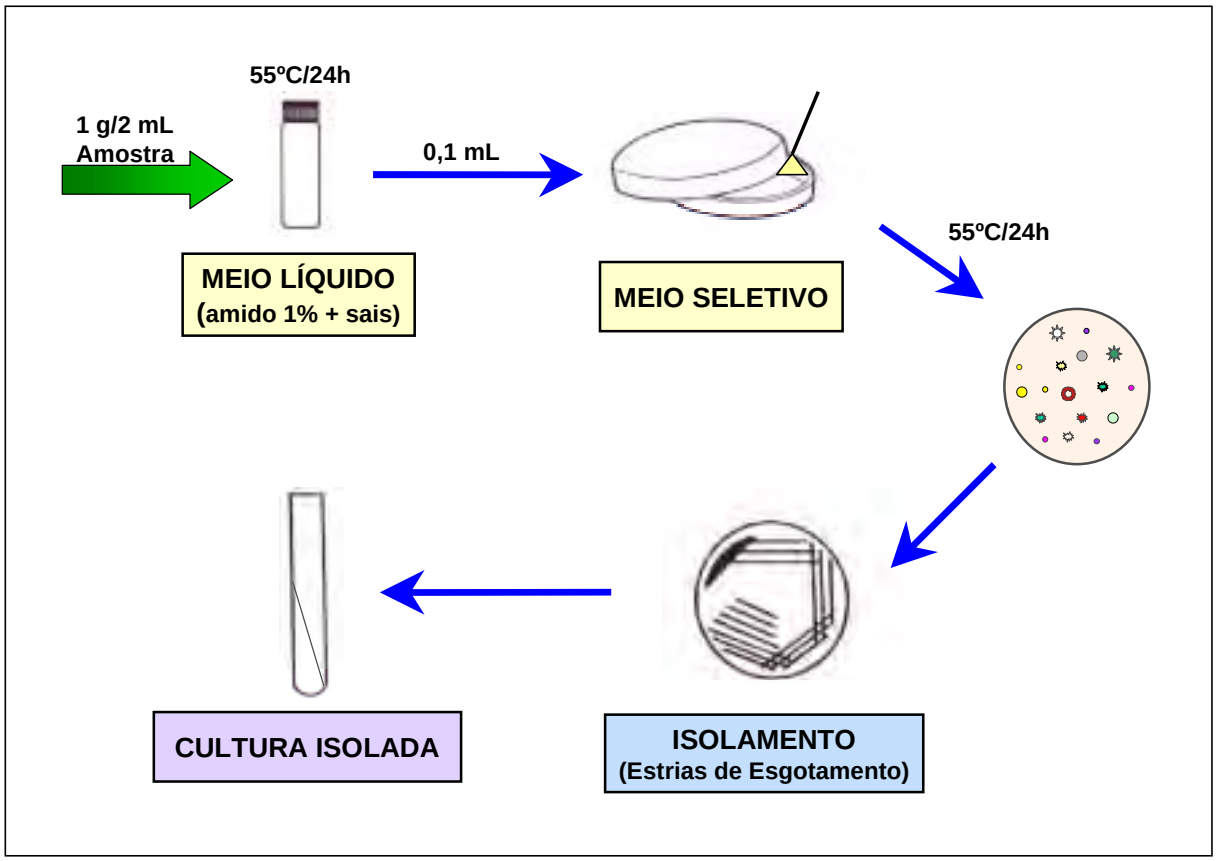


Figura 6 – Representação esquemática do procedimento realizado para a coleta e isolamento das linhagens microbianas termofílicas amilolíticas.

2.3. Avaliação da hidrólise do amido em meio sólido

A hidrólise do amido foi avaliada inoculando-se as culturas purificadas em pontos, em placa de Petri contendo meio de seleção. Após 24 horas de incubação, o diâmetro de cada colônia foi medido e a placa foi inundada com solução de iodo. O halo claro formado ao redor das colônias foi medido e utilizado como referência da intensidade de hidrólise do amido e da quantidade de enzima liberada ao meio.

2.4. Avaliação do crescimento a 60ºC

As amostras foram isoladas em meio sólido a 55°C, uma vez que acima dessa temperatura ocorreu liquefação do meio à base de ágar utilizado. Para avaliação da capacidade de crescimento a 60°C as linhagens

foram inoculadas em 5 mL de meio líquido (item 1.1) e incubadas até crescimento visível ou, no máximo, por 48 horas.

3. Seleção das linhagens produtoras de amilases

3.1. Pré-inóculo

O pré-inóculo foi obtido por inoculação de 10 mL do meio nutriente (item 1.4.1) com duas alças de células ou esporos obtidas a partir de cultura estoque. A fermentação foi realizada em frascos de 50 mL, com agitação de 200 rpm a 55ºC por períodos de 24 a 48 horas, dependendo da velocidade de crescimento de cada cultura.

3.2. Fermentação submersa

O procedimento realizado para avaliação da produção de amilases em fermentação submersa é esquematizado na **Figura 7**. As linhagens foram inoculadas com 2,0 mL do pré-inóculo em 25 mL de meio de produção contidos em frascos de 125 mL. Os cultivos foram realizados sob agitação de 200 e 100 rpm, para bactérias e fungos respectivamente, a 55ºC, durante 48 horas. Em alguns casos, a incubação ocorreu a 50 ou 60ºC.

Para estimativa do crescimento bacteriano, o meio de fermentação foi submetido à leitura de absorbância a 600 nm, em espectrofotômetro, contra um branco constituído de meio de cultura sem inóculo.

O meio de cultivo fermentado foi centrifugado a 10000 ×g por 20 minutos, a 10ºC. O sobrenadante livre de células foi utilizado como solução enzimática bruta.

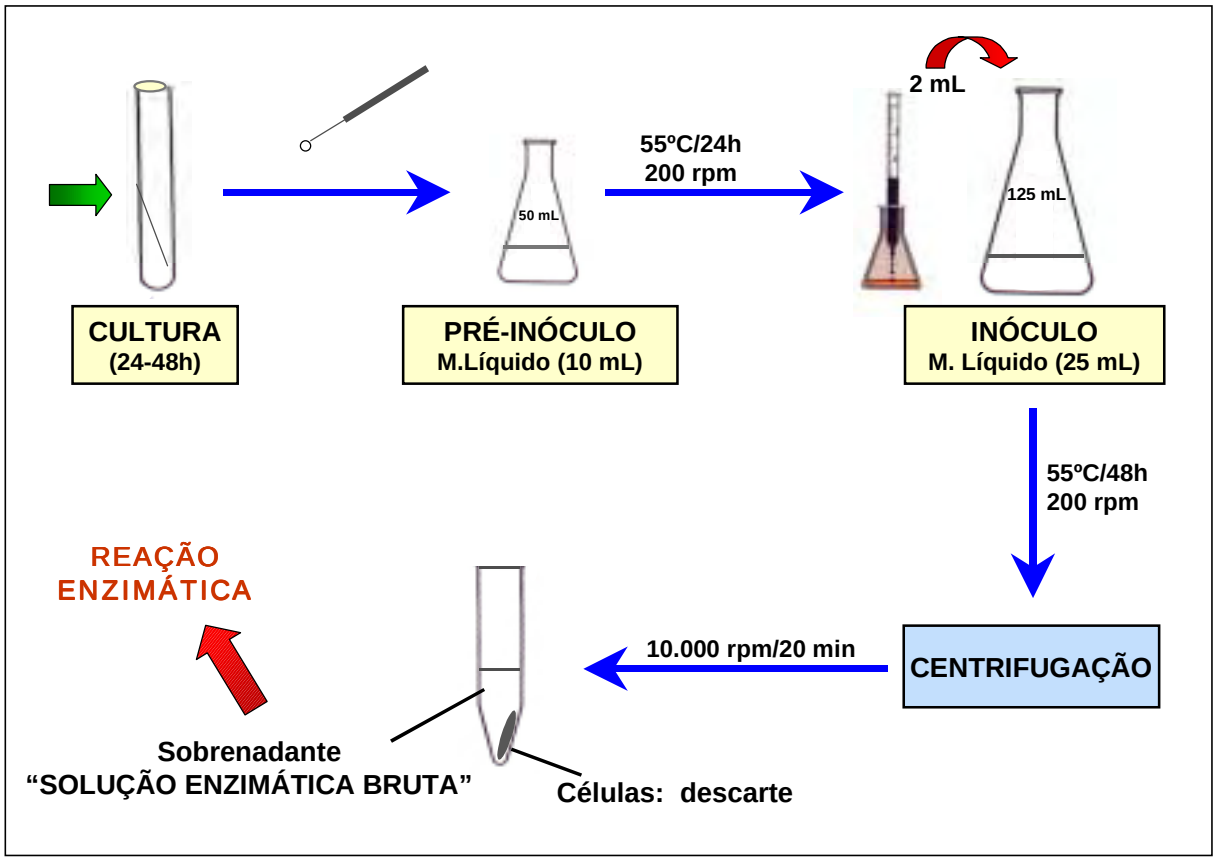


Figura 7 – Representação esquemática do procedimento realizado para obtenção da solução enzimática bruta em fermentação submersa.

3.3. Fermentação semi-sólida

O procedimento realizado para obtenção da solução enzimática bruta em fermentação semi-sólida é esquematizado na **Figura 8**. Todo o crescimento celular de um tubo de ensaio foi suspendido, com auxílio de uma alça de inoculação, em 10 mL de solução de sais nutrientes. A suspensão de células foi vertida em 5 g de substrato esterilizado, contidos em frascos de 250 mL. O material foi homogeneizado e mantido em estufa a 55ºC por aproximadamente 96 horas. Algumas linhagens foram cultivadas a 50 ou a 60ºC. Durante o período de incubação, quantidades adicionais de água destilada esterilizada foram acrescentadas ao meio, sempre que necessário, para manter a umidade do mesmo .

Para extração da solução enzimática bruta foram acrescentados 30 mL de água destilada ao substrato fermentado, de modo a se obter um volume de suspensão próximo àquele obtido pela fermentação submersa.

Após 30 minutos sob agitação moderada (aproximadamente 60 rpm) o meio foi filtrado em gaze hidrófila. O filtrado foi centrifugado a 10000 ×g, por 20 minutos a 10°C. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

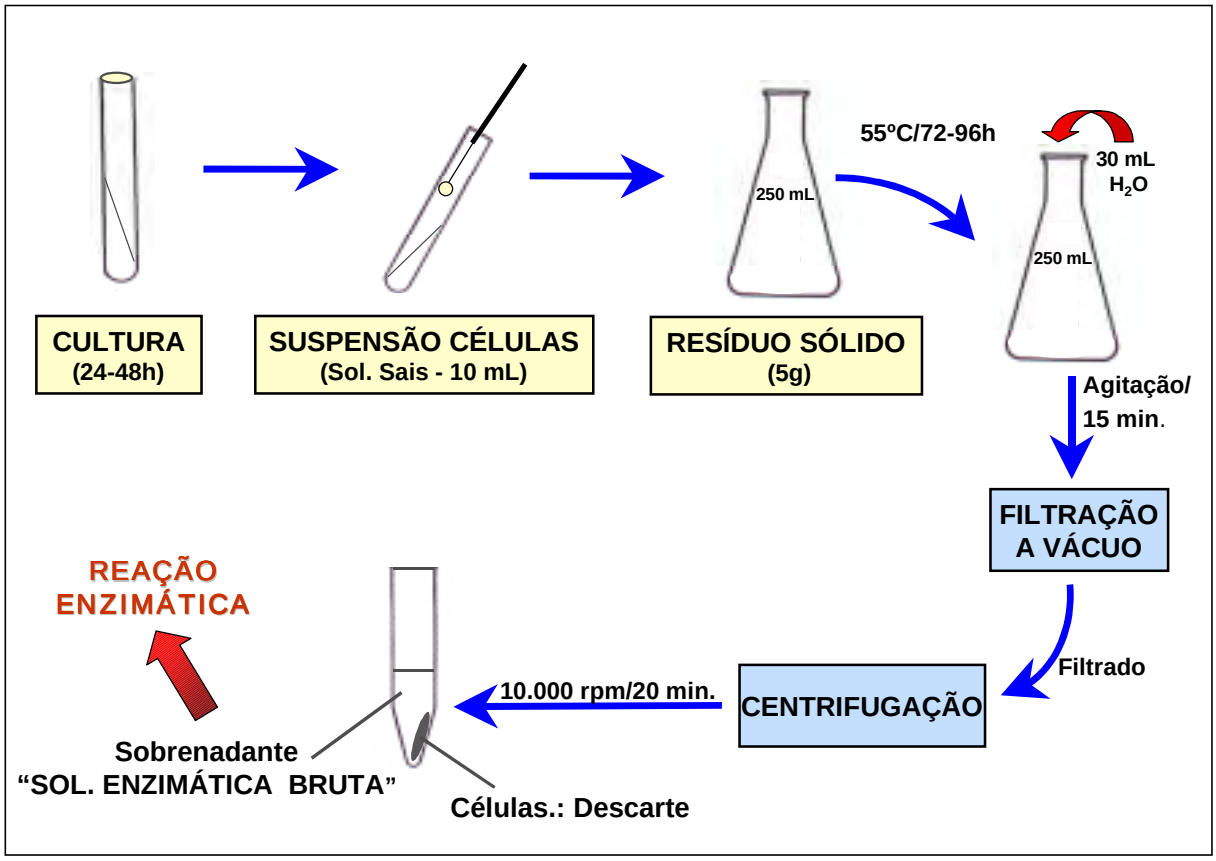


Figura 8 – Representação esquemática do procedimento realizado para obtenção da solução enzimática bruta em fermentação semi-sólida.

4. Efeito do tempo de cultivo na produção de amilases pelas linhagens selecionadas

4.1. Pré-inóculo

Para obtenção do pré-inóculo foi utilizado o meio nutriente enriquecido (1.5.1.1), procedendo-se como descrito no item 3.1.

Com a finalidade de minimizar possíveis interferências nos resultados o mesmo pré-inóculo de uma determinada linhagem foi utilizado nos diferentes meios de cultivo.

4.2. Fermentação submersa

Para estudo do efeito do tempo de cultivo na produção de amilases foram utilizados os meios nutriente enriquecido (item 1.5.1.1), nutriente-mandioca e nutriente-milho (item 1.5.1.2.), resíduo líquido de mandioca (item 1.5.1.3) e resíduo líquido de milho (item 1.5.1.4). Para cada meio foram preparadas séries de cinco frascos contendo 25 mL de meio, para cultivo de 24 a 120 horas. Cada frasco foi inoculado com 2 mL de pré-inóculo (item 4.1), sendo o cultivo realizado sob agitação de 200 rpm a 50°C, para bactérias, e 100 rpm a 45°C, para a linhagem fúngica. A cada 24 horas foi retirado um frasco de cada meio para determinação da atividade enzimática.

Para estimativa de crescimento do inóculo em meio nutriente enriquecido, após a incubação nos diferentes tempos, procedeu-se como descrito no item 3.2. Para os demais meios não foi realizado esse controle por estes apresentarem partículas sólidas (meios nutrientes milho e mandioca) ou por não serem translúcidos (resíduos líquidos de milho e mandioca).

A solução enzimática bruta das linhagens bacterianas foram obtidas como descrito no item 3.2., e da linhagem fúngica foi obtido a partir de filtração a vácuo do meio de cultura fermentado.

4.3. Fermentação semi-sólida

Para fermentação semi-sólida utilizou-se séries de cinco frascos para cada meio (farelos de mandioca, milho e trigo) para cultivo de 24 a 120 horas.

Uma vez que cada frasco de meio deve ser inoculado com todo crescimento microbiano de um tubo de ensaio, diferenças de crescimento em cada tubo de cultura poderiam causar diferenças na quantidade de inóculo e, consequentemente, diferenças na produção em cada cultivo.

Para minimizar tal interferência, a suspensão de células ou esporos foi preparada com o crescimento de vários tubos de cultivo. Para cada linhagem, os diferentes substratos receberam 10 mL do mesmo inóculo.

Depois de homogeneizados, os cultivos foram mantidos em estufa B.O.D. a 50°C (linhagens bacterianas) ou 45°C (linhagem fúngica), sendo retirado um frasco de cada meio a cada 24 horas.

Para obtenção da solução enzimática bruta das linhagens bacterianas procedeu-se como descrito no item 3.3. A linhagem fúngica não foi submetida a centrifugação, sendo a solução enzimática bruta obtida por filtração a vácuo.

5. Métodos de avaliação da atividade enzimática

5.1. Medida da atividade de α-amilase (reação dextrinizante)

A atividade de α-amilase foi determinada medindo-se a diminuição da capacidade de ligação entre o amido e o iodo de uma solução de amido tratada com uma solução enzimática bruta seguindo o método descrito por Fuwa (1954), com modificações. Para as soluções enzimáticas obtidos a partir da fermentação submersa, a mistura para reação foi constituída de 0,7 mL de solução de amido solúvel a 0,3% (p/v), em tampão acetato 0,25 M, pH 5,0 e 0,3 mL de solução enzimática bruta, convenientemente diluída. Para as soluções enzimáticas obtidas a partir da fermentação semi-sólida, utilizou-se 0,9 mL de solução de amido solúvel a 0,3% (p/v) em tampão acetato 0,25 M, pH 5,0 e 0,1 mL da solução enzimática bruta convenientemente diluída. Após incubação a 60ºC, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 4,0 mL de solução de HCl 0,2 M, sendo em seguida foi adicionados 0,5 mL de reativo de Iodo (KI 0,30% + I_2 0,03%). Após homogeneização a mistura de reação foi diluída com 10 mL de água destilada.

O controle foi preparado conforme o processo descrito, porém em duas etapas: o controle do substrato (amido) foi preparado substituindo-se a enzima pelo volume equivalente em água destilada e o controle da enzima, substituindo-se a solução de amido pelo volume equivalente de tampão

acetato. Em espectrofotômetro, a absorbância foi determinada a 600 nm contra um branco constituído de água destilada.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 10 mg de amido em 10 minutos nas condições de ensaio, calculada segundo a equação:

$$U/mL = [(C - Abs) \div C] \times Qs \div 10 \times fd \div Ve$$

onde: U = unidade de enzima;

C = controle (soma da absorbância do controle do amido e do controle da enzima);

Abs = absorbância da amostra;

Qs = quantidade de substrato, em mg, utilizada na reação;

10 = fator de referência de hidrólise de amido (10 mg);

fd = fator de diluição;

Ve = volume de enzima utilizado na reação.

5.2. Medida da atividade de amilase através da dosagem do açúcar redutor liberado

A atividade de amilase foi determinada também através da dosagem do açúcar redutor liberado pela incubação da enzima com amido 0,5% (p/v).

Para as soluções enzimáticas obtidas a partir da fermentação submersa a mistura de reação foi constituída de 0,5 mL de solução de amido solúvel a 0,5% (p/v) em tampão acetato 0,25 M, pH 5,0 e 0,5 mL de solução enzimática bruta, convenientemente diluída. Para as soluções enzimáticas obtidas a partir da fermentação semi-sólida, utilizou-se 0,9 mL de solução de amido solúvel a 0,5% (p/v) em tampão acetato 0,25 M, pH 5,0 e 0,1 mL da solução enzimática bruta convenientemente diluída. Após 10 minutos de incubação a 60°C, o açúcar redutor liberado pela ação enzimática foi dosado pelo método do DNS, descrito por Miller (1959) (item 6).

O controle foi preparado conforme o processo descrito, em duas etapas: o controle do substrato (amido) foi preparado substituindo-se a enzima pelo volume equivalente em água destilada e o controle da enzima, substituindo-se a solução de amido pelo volume equivalente de tampão acetato.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um µmol de glicose, por minuto, nas condições de ensaio.

5.3. Medida da atividade de glicoamilase

Para a determinação da atividade glicoamilase, utilizou-se mistura de reação constituída de 0,5 (ou 0,9) mL de solução de amido solúvel a 0,5% (p/v) em tampão acetato 0,25 M, pH 5,0 e 0,5 (ou 0,1) mL de solução enzimática bruta, convenientemente diluída. Após incubação a 60°C, por 10 minutos, as amostras foram resfriadas em banho de gelo. A glicose liberada foi quantificada por reação de acoplamento com glicose oxidase (BERGMEYER e BERNT, 1974) utilizando o kit comercial *Glicose Enz-Color| Biodiagnóstica*, utilizando uma curva padrão linear de concentração de glicose.

O controle foi preparado conforme o processo descrito, em duas etapas: o controle do amido foi preparado substituindo-se a enzima pelo volume equivalente em água destilada e o controle da enzima, substituindo-se a solução de amido pelo volume equivalente de tampão acetato. A leitura da absorbância foi realizada a 500 nm contra um branco preparado como descrito, substituindo-se o volume de amostra por água destilada.

Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade necessária para liberar um µmol de glicose por minuto, nas condições de ensaio.

6. Dosagem de açúcares redutores

A dosagem de açúcares redutores foi realizada pelo método DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico) proposto por Miller (1959), com modificações. A mistura de reação foi constituída de 1,0 mL da amostra devidamente diluída e 1,0 mL do reagente DNS. Após homogeneização e incubação durante 8 minutos em banho de ebulição a mistura de reação foi resfriada em banho de gelo e diluída com 10 mL de água destilada. A leitura foi realizada a 540 nm contra um branco preparado como descrito, substituindo-se o volume de amostra por água destilada. A conversão dos valores de absorbância em μg foi feita através da equação de regressão obtida pela curva padrão de glicose (100 a 900 μg).

7. Identificação das linhagens microbianas

Para identificação das linhagens bacterianas foram realizados testes morfológicos, tais como coloração de Gram, coloração de esporos, avaliação da forma e tamanhos das células e presença de catalase.

A linhagem fúngica foi examinada quanto à morfologia da colônia e microestruturas obtidas por microcultivo.

8. Caracterização das enzimas

As enzimas obtidas a partir do cultivo das linhagens escolhidas como melhores produtoras foram caracterizadas quanto ao pH e temperatura ótimos de atividade e quanto à estabilidade às variações de pH e temperatura, em ausência de substrato.

8.1. Determinação do pH ótimo

Na determinação do pH ótimo das enzimas trabalhou-se na faixa de pH de 3,0 a 10,0. Para isso, foram preparadas diferentes soluções tampão a 0,25 M, a saber: tampão acetato de sódio (pH 3,0 a 5,0), tampão citrato-fosfato (pH 5,0 a 7,0), tampão tris-HCl (pH 7,0 a 8,5) e tampão glicina-NaOH (pH 8,5 a 10,0).

A atividade enzimática foi realizada pelo método dextrinizante (item 5.1.) utilizando-se 0,7 mL de solução de amido solúvel da marca *Reagen* a 0,3% (p/v) e 0,3 mL da solução enzimática bruta convenientemente diluída.

8.2. Determinação da temperatura ótima

Para determinação da temperatura ótima realizou-se a reação enzimática dextrinizante como descrito anteriormente (item 5.1.), utilizando o pH ótimo de cada enzima e temperaturas de incubação que variaram de 55 a 85°C.

8.3. Estabilidade frente à variação de pH

Para verificação da estabilidade da enzima à variação do pH foram utilizados os tampões McIlvaine na faixa de pH de 3,0 a 8,0 e Glicina-NaOH de 8,0 a 10,0 ambos a 0,25M. Para isso, 0,5 mL da solução enzimática bruta foi misturada a 0,5 mL das diferentes soluções tampão, nos diferentes pH. A mistura foi incubada, em tubos de rosca, em estufa B.O.D., por 24 horas a 25°C.

Determinou-se a atividade residual pelo método dextrinizante (item 5.1) utilizando 0,7 mL de solução de amido 0,3% (em pH e temperatura ótimos, determinados para cada linhagem), e 0,3 mL da mistura enzima+tampão convenientemente diluída.

8.4. Estabilidade frente à variação de temperatura

Para verificar a estabilidade das enzimas frente à variação de temperatura, a solução enzimática bruta de cada linhagem foi submetida à incubação, em tubos de rosca, em temperaturas de 50 a ± 95°C (ebulição), com intervalos de 5°C, durante uma hora.

Mediu-se a atividade enzimática residual pela reação enzimática dextrinizante (item 5.1), realizada em pH e temperatura ótimos de cada enzima.

9. Efeito dos íons Ca^{2+} na atividade das amilases bacterianas

Estudou-se o efeito dos íons cálcio na atividade das amilases do *Bacillus* sp A13-22. Para isto, a solução enzimática bruta obtida a partir do cultivo em fermentação submersa foi submetida à reação enzimática dextrinizante (item 5.1.) em presença de Ca^{2+}, utilizando-se $CaCl_2$ em concentrações que variaram de 10 a 200 ppm.

10. Estudo da hidrólise do amido de mandioca utilizando solução enzimática bruta

10.1. Liquefação do amido de mandioca em duas etapas

A **Figura 9** esquematiza o procedimento realizado para liquefação do amido de mandioca em duas etapas. Suspensões de amido de mandioca 25% (p/p), base seca, foram submetidas à ação de enzimas das soluções enzimáticas brutas obtidas do *Bacillus* sp A13-22 e do *Mucor* sp A13-36. Os ensaios foram realizados no pH ótimo das respectivas enzimas (determinados no item 8.1.), em frascos Erlenmeyer de 50 mL com tampa de rosca.

Na primeira etapa, a suspensão de amido foi incubada com um volume de solução enzimática bruta equivalente a 10 U de atividade da enzima por grama de amido, totalizando um peso final de 10 g

(aproximadamente 10 mL), durante uma hora em banho-maria, com agitação constante, a 85 °C. Ao final da primeira etapa, os hidrolisados foram autoclavados durante 15 minutos a 120°C, resfriados a 85 °C e acrescidos de um volume de enzima equivalente a 10 U/g de amido inicial. Quando a atividade enzimática das respectivas soluções enzimáticas foram diferentes o volume final foi acertado com água destilada, de modo a permitir comparação dos hidrolisados. A segunda etapa de hidrólise ocorreu nas mesmas condições de agitação, temperatura e tempo de incubação da primeira.

Os produtos finais de hidrólise foram analisados quanto aos teores de açúcares redutores (MILLER, 1959), reação com reativo de iodo (KI 0,3% + I_2 0,03%) e análises cromatográficas em papel (item 10.3.).

O DE (equivalente em dextrose) foi determinado a partir dos açúcares redutores presentes no hidrolisado, expressos como dextrose e calculados como porcentagem de matéria seca total (peso seco de amido inicial).

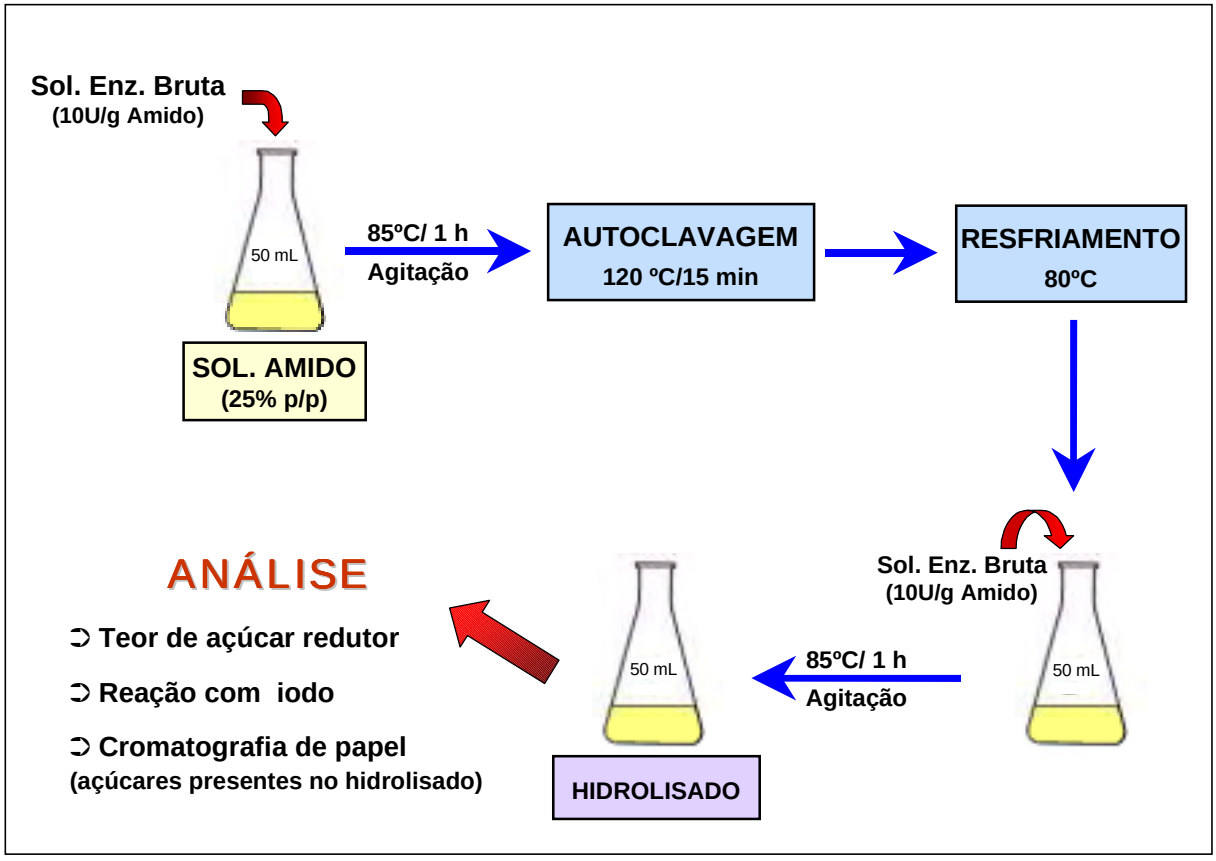


Figura 9 – Representação esquemática do procedimento realizado para obtenção do hidrolisado de amido de mandioca pelo uso das soluções enzimáticas fúngica e bacteriana (20 U/g amido), em duas etapas, durante duas horas.

10.2. Efeito do tempo e concentração da enzima fúngica na hidrólise do amido de mandioca em etapa única

A **Figura 10** esquematiza o procedimento realizado para obtenção do hidrolisado de amido de mandioca em etapa única variando-se a concentração da solução enzimática fúngica e o tempo de incubação. Suspensões de amido 25% (p/p), base seca, foram incubadas com um volume de solução enzimática fúngica equivalente a 20 U/g de amido, totalizando um peso final de 10 g, durante meia, uma, duas e três horas em banho com agitação constante a 85 °C.

Fixando-se o tempo de hidrólise em uma hora, o efeito da concentração de enzima na hidrólise do amido de mandioca foi estudado utilizando-se volumes de solução enzimática bruta fúngica equivalentes a 20, 30 e 40 U/g de amido. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições de temperatura e agitação mencionadas anteriormente.

Os produtos finais de hidrólise foram analisados quanto aos teores de açúcares redutores e reação com reativo de iodo (KI 0,3% + I_2 0,03%). O DE foi calculado como descrito anteriormente (item 10.1).

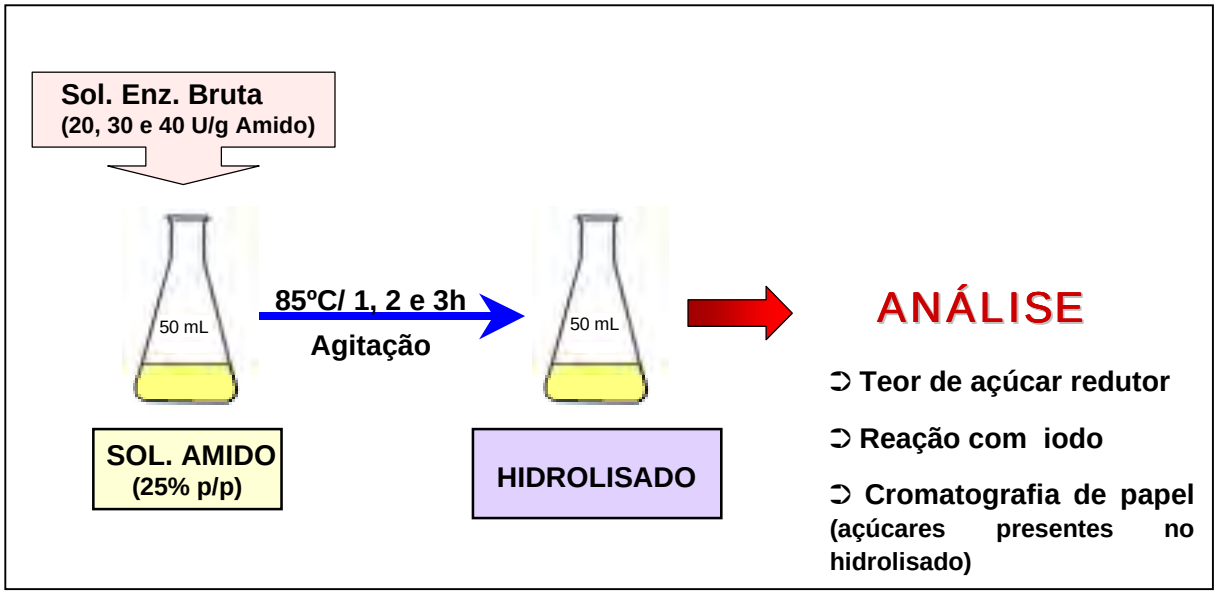


Figura 10 – Representação esquemática dos procedimentos realizados para obtenção do hidrolisado de amido de mandioca pelo uso de solução enzimática fúngica (20, 30 e 40 U/g amido), em etapa única, durante uma, duas e três horas.

10.3. Análise cromatográfica dos produtos de hidrólise presentes nos hidrolisados obtidos a partir da hidrólise em duas etapas

Os produtos da hidrólise enzimática (descrita no item 10.1.) foram estudados por cromatografia de papel descendente (TREVELIN et al., 1950), utilizando-se o papel *Watman* n°1 e como solvente de corrida a mistura de acetato de etila, isopropanol e água na proporção 6:3:1. A corrida deu-se por 12 horas em sala climatizada com temperatura de aproximadamente 25°C. Após a corrida, o papel foi seco a temperatura ambiente realizando-se em seguida a revelação por mergulho do cromatograma seco em mistura de acetona e solução saturada de nitrato de prata, seguida de lavagem com hidróxido de sódio alcoólico 0,5 N e tiossulfato de sódio a 10%. Glicose, maltose, maltotriose, maltotetrose, maltohexose e maltoheptose, todos da marca *Sigma*, foram utilizados como padrões.

10.4. Perfil de açúcares liberados na hidrólise do amido em solução a 1%

Com intuito de analisar o perfil de açúcares redutores liberados nos primeiros 30 minutos de hidrólise, o amido de mandioca a 1% (p/p) foi hidrolisado com um volume de solução enzimática fúngica e bacteriana equivalente a 20 U/g de amido inicial, em pH ótimo para cada enzima, totalizando um peso final de 10 g.

A hidrólise foi realizada em banho-maria a 85°C sob agitação contínua, sendo retiradas alíquotas de 50 µL da suspensão a cada 5 minutos, as quais foram analisadas quanto ao teor de açúcares redutores e aplicadas em papel *Whatman* n° 1 para desenvolvimento da cromatografia de papel descendente (item 10.3).

10.5. Perfil de viscosidade dos amidos de mandioca natural e tratado com solução enzimática bruta

A ação das enzimas sobre o amido de mandioca também foi acompanhada utilizando-se um rápido visco analisador (modelo RVA-4, *Newport Scientific*, Austrália). Suspensões de amido (9% p/p, 27,5 g peso total), natural e com enzima (20 U/g), foram equilibradas a 30°C por um minuto, aquecidas a 95°C a uma razão de 6°C/minuto, mantidas a 95°C por 5,5 minutos, resfriadas a 50°C a uma razão de 6°C/minuto e finalmente mantidas a 50°C por dois minutos, conforme sugestão do fabricante. A suspensão foi agitada a 160 rpm durante todo experimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Coleta e isolamento das linhagens

Foram realizadas vinte coletas **(Tab. 3)** das quais foram isoladas 339 linhagens microbianas termofílicas capazes de crescer em meio seletivo com amido como única fonte de carbono. Destas, 326 corresponderam a bactérias e 13 a fungos.

O isolamento de linhagens bacterianas a partir de amostras de solo tem sido freqüente (SOARES et al., 1999; SOARES et al., 2001; GOMES et al., 2001). Isso é possível pela presença de esporos que conferem a estes microrganismos resistência às condições desfavoráveis que estes locais podem oferecer. A busca em solos cultivados com plantações como a de mandioca e milho, que têm o amido como substância de reserva, aumenta a possibilidade de se encontrar linhagens amilolíticas, uma vez que o tipo de microrganismo que está presente na microflora do solo está relacionado com as oportunidades nutricionais oferecidas pelo ambiente naquele momento.

Da mesma forma, pode-se justificar a busca por linhagens amilolíticas termofílicas em compostagens de matéria orgânica como a cama de frango e o esterco bovino, devido às características que estas apresentam: excretas com possível presença de resíduos de amido provenientes da dieta

alimentar destes animais e a alta temperatura alcançada no interior dos montes.

A indústria "Frango Sertanejo" foi escolhida para coletas pois sabia-se previamente que os frangos criados em granjas possuem dieta rica em resíduos de amido. Desta forma, a possibilidade de se encontrar microrganismos amilolíticos aderidos ao corpo, penas e excretas destes animais era bastante grande. Frente a estas informações, a iniciativa de se coletar em resíduos da indústria foi uma das soluções encontradas na busca de microrganismos termofílicos, uma vez que somente estes resistiriam a temperatura de aproximadamente 70ºC que é atingida pela água dos escaldadores e das depenadeiras de frango. A presença dos mesmos em resíduos alimentares contidos na moela, pró-ventrículo e papo também era possível devido à existência de formas esporuladas.

Em amostras de águas de rios não foi encontrado nenhum microrganismo termofílico, embora a presença dos mesmos nesse ambiente seja possível em caso de lixiviação de esporos provenientes dos solos adjacentes.

A maior proporção de bactérias, em relação aos fungos, isoladas no presente trabalho, corrobora os dados de Soares et al. (1999), cuja proporção de bactérias pectinolíticas isoladas em *screening* ultrapassou 90% dos fungos filamentosos.

Essa discrepância pode estar relacionada à maior velocidade de crescimento das bactérias, o que acaba por inibir o crescimentos dos fungos na mesma placa de Petri. Por outro lado, deve-se considerar que, a presença de bactérias termofílicas no ambiente é maior que a de fungos termofílicos, além da termofilia de fungo ser menos intensa que a de bactérias (MAHESHWARI et al., 2000).

A identificação de cada linhagem, bem como o local em que foram coletadas são mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Origem das linhagens coletadas e hidrólise do amido em meio sólido

	LINHAGEM	MATERIAL COLETADO	DIÂMETRO COLÔNIA (cm)	HALO (cm)
1	A1-1*	Compostagem de esterco bovino	1,5	0,3
2	A1-2*	Compostagem de esterco bovino	1,7	0,2
3	A1-3	Compostagem de esterco bovino	0,8	AH
4	A1-4	Compostagem de esterco bovino	0,5	AH
5	A1-5	Solo de horta	0,7	0,2
6	A1-6	Solo de horta	0,5	0,2
7	A1-7	Solo de horta	0,7	AH
8	A1-8	Solo de horta	0,5	HDC
9	A1-9	Solo de plantação de mandioca	0,5	HDC
10	A1-10	Solo de plantação de mandioca	0,3	HDC
11	A1-11	Compostagem de esterco bovino	0,3	0,1
12	A1-12	Compostagem de esterco bovino	0,5	0,3
13	A1-13	Compostagem de esterco bovino	1,0	0,1
14	A1-14	Compostagem de esterco bovino	0,5	AH
15	A1-15	Compostagem de esterco bovino	0,6	0,1
16	A1-16	Compostagem de esterco bovino	0,3	AH
17	A1-17	Compostagem de esterco bovino	0,2	AH
18	A1-18	Compostagem de esterco bovino	0,3	AH
19	A1-19	Compostagem de esterco bovino	0,2	AH
20	A1-20	Solo de plantação de mandioca	0,2	AH
21	A1-21	Solo de plantação de mandioca	0,3	HDC
22	A1-22	Solo de plantação de mandioca	0,2	AH
23	A1-23	Compostagem de esterco bovino	0,4	AH
24	A1-24	Compostagem de esterco bovino	0,5	AH
25	A1-25	Compostagem de esterco bovino	0,4	HDC
26	A1-26	Compostagem de esterco bovino	1,0	0,2
27	A1-27	Compostagem de esterco bovino	0,4	0,1
28	A3-1	Solo de canteiro de mandioca	0,6	AH
29	A3-2	Solo de canteiro de mandioca	0,5	AH
30	A3-3	Solo de canteiro de mandioca	0,4	AH
31	A3-4	Solo de canteiro de mandioca	0,8	0,3
32	A3-5	Folhas de mandioca	0,5	AH
33	A3-6	Folhas de mandioca	0,4	AH
34	A3-7	Solo de canteiro de mandioca	0,2	AH
35	A3-8	Solo de canteiro de mandioca	0,3	0,2
36	A3-9	Solo de canteiro de mandioca	0,4	HDC
37	A3-10	Solo de canteiro de mandioca	0,2	AH
38	A3-11	Mandioca em decomposição	0,6	0,1
39	A3-12	Mandioca em decomposição	0,5	0,2
40	A3-13	Mandioca em decomposição	0,2	AH
41	A3-14	Mandioca em decomposição	0,5	AH
42	A3-15	Mandioca em decomposição	0,6	AH
43	A3-16	Mandioca em decomposição	0,4	HDC
44	A3-17	Mandioca em decomposição	0,7	AH
45	A3-18	Caule de mandioca em decomposição	0,7	0,1
46	A3-19	Caule de mandioca em decomposição	0,5	0,1
47	A3-20	Caule de mandioca em decomposição	0,5	0,2
48	$A4_1$-1	Água do escaldador de frangos	0,3	HDC
49	$A4_1$-2	Água do escaldador de frangos	0,9	AH
50	$A4_1$-a	Água do escaldador de frangos	0,2	HDC
51	$A4_1$-b	Água do escaldador de frangos	0,4	0,6

Tabela 4 – Origem das linhagens coletadas e hidrólise do amido em meio sólido (continuação)

	LINHAGEM	MATERIAL COLETADO	DIÂMETRO COLÔNIA (cm)	HALO (cm)
52	$A4_1$-c	Água do escaldador de frangos	0,8	HDC
53	$A4_1$-d	Água do escaldador de frangos	0,8	0,6
54	$A4_1$-e	Água do escaldador de frangos	0,6	0,6
55	$A4_1$-f	Água do escaldador de frangos	0,6	AH
56	$A4_1$-g	Água do escaldador de frangos	0,4	AH
57	$A4_1$-h	Água do escaldador de frangos	0,5	AH
58	$A4_2$-1	Água do escaldador de frangos	0,3	AH
59	$A4_2$-2	Água do escaldador de frangos	0,5	HDC
60	$A4_2$-a	Água do escaldador de frangos	0,8	AH
61	$A4_2$-b	Água do escaldador de frangos	0,6	AH
62	$A4_2$-c	Água do escaldador de frangos	0,8	AH
63	$A4_2$-d	Água do escaldador de frangos	0,7	AH
64	$A4_3$-1	Água do escaldador de frangos	0,2	AH
65	$A4_3$-a	Água do escaldador de frangos	0,6	AH
66	$A4_3$-b	Água do escaldador de frangos	0,4	AH
67	$A4_3$-c	Água do escaldador de frangos	0,3	AH
68	$A4_4$-a	Água da depenadeira de frangos	0,3	0,5
69	$A4_4$-b	Água da depenadeira de frangos	0,6	0,5
70	$A4_4$-c	Água da depenadeira de frangos	0,5	AH
71	$A4_4$-d	Água da depenadeira de frangos	0,4	AH
72	$A4_4$-e	Água da depenadeira de frangos	0,5	0,5
73	$A4_4$-f	Água da depenadeira de frangos	1,0	0,5
74	$A4_4$-g	Água da depenadeira de frangos	0,3	AH
75	$A4_4$-h	Água da depenadeira de frangos	0,3	0,1
76	$A4_4$-i	Água da depenadeira de frangos	1,0	0,5
77	$A4_4$-j	Água da depenadeira de frangos	0,3	AH
78	$A4_4$-l	Água da depenadeira de frangos	0,3	AH
79	$A4_4$-m	Água da depenadeira de frangos	0,2	AH
80	$A4_5$-1	Restos alimentares de moela	0,3	AH
81	$A4_5$-2	Restos alimentares de moela	0,2	0,5
82	$A4_5$-a	Restos alimentares de moela	0,7	0,6
83	$A4_5$-b	Restos alimentares de moela	0,5	0,7
84	$A4_6$-1	Restos alimentares do pró-ventrículo	0,4	AH
85	$A4_6$-a	Restos alimentares do pró-ventrículo	0,2	AH
86	$A4_6$-b	Restos alimentares do pró-ventrículo	0,3	AH
87	$A4_6$-c	Restos alimentares do pró-ventrículo	1,5	0,3
88	$A4_6$-d	Restos alimentares do pró-ventrículo	1,8	0,3
89	$A4_6$-e	Restos alimentares do pró-ventrículo	0,2	AH
90	$A4_6$-f	Restos alimentares do pró-ventrículo	0,5	0,5
91	$A4_6$-g	Restos alimentares do pró-ventrículo	0,3	AH
92	$A4_6$-h	Restos alimentares do pró-ventrículo	0,3	AH
93	$A4_6$-i	Restos alimentares do pró-ventrículo	0,5	AH
94	$A4_6$-j	Restos alimentares do pró-ventrículo	0,3	AH
95	$A4_6$-k	Restos alimentares do pró-ventrículo	0,4	AH
96	$A4_6$-l	Restos alimentares do pró-ventrículo	0,2	AH
97	$A4_7$-1	Restos alimentares do papo	3,0	0,4
98	A5-1	Compostagem de cama de frango	0,7	0,3
99	A5-2	Compostagem de cama de frango	0,4	AH
100	A5-3	Compostagem de cama de frango	0,5	AH
101	A5-4	Compostagem de cama de frango	0,3	AH
102	A5-5	Compostagem de cama de frango	0,4	0,2
103	A5-6	Compostagem de cama de frango	0,5	0,2

Tabela 4 – Origem das linhagens coletadas e hidrólise do amido em meio sólido (continuação)

	LINHAGEM	MATERIAL COLETADO	DIÂMETRO COLÔNIA (cm)	HALO (cm)
104	A5-7	Solo de horta	0,2	AH
105	A5-8	Solo de horta	0,2	AH
106	A5-9	Compostagem de cama de frango	1,0	0,1
107	A5-10	Compostagem de cama de frango	0,6	AH
108	A5-11	Compostagem de cama de frango	0,5	AH
109	A5-12	Solo de horta	0,2	AH
110	A5-13	Compostagem de cama de frango	0,7	0,5
111	A5-14	Compostagem de cama de frango	0,7	0,3
112	A5-15	Compostagem de cama de frango	0,3	AH
113	A5-16	Solo de horta	0,2	AH
114	A5-17	Solo de horta	0,5	AH
115	A5-18	Solo de horta	0,2	AH
116	A5-19	Solo de horta	0,2	AH
117	A5-20	Solo de horta	0,3	AH
118	A5-21	Serrapilheira	0,2	AH
119	A5-22	Serrapilheira	0,2	AH
120	A5-23	Serrapilheira	0,3	AH
121	A5-24	Serrapilheira	0,4	AH
122	A5-25	Solo de horta	0,4	0,2
123	A5-26	Serrapilheira	0,3	AH
124	A5-27	Compostagem de esterco bovino	0,2	AH
125	A5-28	Compostagem de esterco bovino	0,2	AH
126	A5-29	Solo de horta	0,2	AH
127	A5-30	Solo de horta	0,3	AH
128	A5-31	Solo de horta	0,4	AH
129	A5-32	Compostagem de esterco bovino	0,5	AH
130	A5-33	Compostagem de esterco bovino	0,2	AH
131	A5-34	Compostagem de esterco bovino	0,3	AH
132	A5-35	Compostagem de esterco bovino	0,2	AH
133	A5-36	Compostagem de esterco bovino	0,2	AH
134	A5-37	Compostagem de cama de frango	0,7	0,2
135	A5-38	Compostagem de cama de frango	0,6	0,2
136	A5-39	Compostagem de cama de frango	0,5	0,2
137	A5-40	Compostagem de cama de frango	0,5	AH
138	A5-41	Compostagem de cama de frango	0,3	0,2
139	A5-42	Compostagem de cama de frango	0,2	AH
140	A5-43	Compostagem de cama de frango	0,1	AH
141	A5-44	Compostagem de cama de frango	0,2	AH
142	A5-45	Compostagem de cama de frango	0,3	AH
143	A5-46	Compostagem de cama de frango	0,3	AH
144	A5-47	Solo de horta	0,5	AH
145	A5-48	Solo de horta	0,2	AH
146	A5-49	Compostagem de cama de frango	0,4	AH
147	A5-50	Compostagem de cama de frango	0,5	0,3
148	A5-51	Compostagem de cama de frango	0,3	AH
149	A5-52	Compostagem de cama de frango	0,5	0,3
150	A5-53	Compostagem de cama de frango	0,2	0,2
151	A5-54	Compostagem de cama de frango	0,2	AH
152	A5-55	Compostagem de cama de frango	0,3	AH
153	A5-56	Compostagem de cama de frango	0,4	AH
154	A5-57	Compostagem de esterco bovino	0,4	AH
155	A5-58	Compostagem de esterco bovino	0,3	0,2

Tabela 4 – Origem das linhagens coletadas e hidrólise do amido em meio sólido (continuação)

	LINHAGEM	MATERIAL COLETADO	DIÂMETRO COLÔNIA (cm)	HALO (cm)
156	A5-59	Compostagem de esterco bovino	0,3	AH
157	A5-60	Compostagem de esterco bovino	0,2	AH
158	A5-61	Compostagem de cama de frango	0,3	AH
159	A5-62	Compostagem de cama de frango	0,1	AH
160	A5-63	Compostagem de cama de frango	0,3	AH
161	A5-64	Compostagem de cama de frango	0,3	HDC
162	$A6_1$-1*	Bagaço de cana em compostagem	0,2	HDC
163	$A6_1$-2	Bagaço de cana em compostagem	0,2	HDC
164	$A6_1$-3	Bagaço de cana em compostagem	0,3	AH
165	$A6_2$-1	Compostagem de esterco bovino	0,5	0,3
166	$A6_2$-2	Compostagem de esterco bovino	0,2	AH
167	$A6_2$-3	Compostagem de esterco bovino	0,3	AH
168	$A6_2$-4	Compostagem de esterco bovino	0,2	AH
169	$A6_2$-5	Compostagem de esterco bovino	0,5	HDC
170	$A6_2$-6	Compostagem de esterco bovino	0,2	AH
171	$A6_2$-7	Compostagem de esterco bovino	0,3	0,1
172	$A6_2$-8	Compostagem de esterco bovino	0,3	HDC
173	$A6_3$-1	Solo de horta	0,4	AH
174	$A7_1$-1	Raiz de milho	0,3	AH
175	$A7_1$-2	Raiz de milho	0,2	AH
176	$A7_1$-3	Raiz de milho	0,5	HDC
177	$A7_1$-4	Raiz de milho	0,4	AH
178	$A7_1$-5	Raiz de milho	0,3	AH
179	$A7_2$-1	Palha de café	0,2	AH
180	$A7_3$-1	Solo plantação milho	0,5	HDC
181	$A7_3$-2	Solo plantação milho	0,3	HDC
182	$A7_3$-3	Solo plantação milho	0,5	HDC
183	$A7_3$-4	Solo plantação milho	0,4	HDC
184	$A8_1$-1	Compostagem de esterco bovino	0,4	HDC
185	$A8_1$-2	Compostagem de esterco bovino	0,3	AH
186	$A8_1$-3	Compostagem de esterco bovino	0,4	AH
187	$A8_2$-1	Solo de horta	0,2	AH
188	$A8_2$-2	Solo de horta	0,5	HDC
189	$A8_2$-3	Solo de horta	0,3	AH
190	$A8_3$-1	Folhas em decomposição	0,5	HDC
191	$A9_2$-1	Água de decanto de amido	0,3	AH
192	$A9_2$-2	Água de decanto de amido	0,2	AH
193	$A9_3$-1	Amido decantado	0,5	0,2
194	$A9_3$-2	Amido decantado	0,2	AH
195	$A9_3$-3	Amido decantado	0,2	AH
196	$A9_4$-1	Fibra sedimentada	0,4	AH
197	$A9_4$-2	Fibra sedimentada	0,3	AH
198	$A9_4$-3	Fibra sedimentada	0,5	AH
199	$A9_5$-1	Casca de mandioca	0,8	0,3
200	$A9_5$-2	Casca de mandioca	0,5	0,2
201	$A9_5$-3	Casca de mandioca	0,6	0,2
202	$A9_5$-4	Casca de mandioca	0,3	0,1
203	$A10_1$-1	Solo de plantação de milho	0,5	AH
204	$A10_1$-2*	Solo de plantação de milho	0,4	AH
205	$A10_1$-3	Solo de plantação de milho	0,3	AH
206	$A10_1$-4	Solo de plantação de milho	0,5	0,2
207	$A10_1$-5	Solo de plantação de milho	0,6	HDC

Tabela 4 – Origem das linhagens coletadas e hidrólise do amido em meio sólido (continuação)

	LINHAGEM	MATERIAL COLETADO	DIÂMETRO COLÔNIA (cm)	HALO (cm)
208	$A10_1$-6	Solo de plantação de milho	0,3	HDC
209	$A10_1$-7	Solo de plantação de milho	0,2	HDC
210	$A10_1$-8	Solo de plantação de milho	0,4	AH
211	$A10_1$-a	Solo de plantação de milho	0,3	0,1
212	$A10_1$-c	Solo de plantação de milho	0,6	0,2
213	$A10_1$-h	Solo de plantação de milho	0,4	HDC
214	$A10_1$-i	Solo de plantação de milho	0,4	0,2
215	$A10_3$-1	Solo de plantação de abacaxi	0,3	AH
216	$A10_3$-a	Solo de plantação de abacaxi	0,3	0,1
217	$A10_4$-1	Solo de plantação de banana	0,3	AH
218	$A10_4$-2	Solo de plantação de banana	0,6	0,7
219	$A10_4$-3	Solo de plantação de banana	0,4	0,2
220	$A10_4$-4	Solo de plantação de banana	0,2	HDC
221	$A10_4$-a	Solo de plantação de banana	0,3	HDC
222	$A10_4$-b	Solo de plantação de banana	0,3	0,1
223	$A10_4$-d	Solo de plantação de banana	0,3	AH
224	$A10_4$-e	Solo de plantação de banana	0,5	AH
225	$A10_5$-1	Palhada de arroz após colheita	0,3	0,1
226	$A10_5$-2	Palhada de arroz após colheita	0,4	0,1
227	$A10_5$-3	Palhada de arroz após colheita	0,3	0,2
228	$A10_5$-4	Palhada de arroz após colheita	1,0	0,5
229	$A10_5$-5*	Palhada de arroz após colheita	1,0	HDC
230	$A10_5$-6*	Palhada de arroz após colheita	0,3	HDC
231	$A10_5$-7	Palhada de arroz após colheita	0,4	AH
232	$A10_5$-8*	Palhada de arroz após colheita	0,6	0,4
233	$A10_5$-9	Palhada de arroz após colheita	1,2	0,9
234	$A10_5$-10*	Palhada de arroz após colheita	1,5	HDC
235	$A10_5$-a	Palhada de arroz após colheita	0,2	0,1
236	$A10_5$-b	Palhada de arroz após colheita	0,3	0,5
237	$A10_5$-c	Palhada de arroz após colheita	0,5	0,5
238	$A10_5$-d	Palhada de arroz após colheita	0,3	0,1
239	$A10_5$-e	Palhada de arroz após colheita	0,5	HDC
240	$A10_7$-b	Bucha vegetal em decomposição	0,6	HDC
241	A11-1	Compostagem de esterco bovino	0,6	0,1
242	A11-2	Compostagem de esterco bovino	0,4	0,1
243	A11-3	Compostagem de esterco bovino	0,5	HDC
244	A11-4	Compostagem de esterco bovino	0,3	0,1
245	A11-5	Compostagem de esterco bovino	0,5	0,2
246	A11-6	Compostagem de esterco bovino	2,5	0,4
247	A11-7	Compostagem de esterco bovino	0,3	0,2
248	A11-8	Compostagem de esterco bovino	0,5	0,1
249	A11-9	Compostagem de esterco bovino	0,3	HDC
250	A11-10	Compostagem de esterco bovino	1,0	HDC
251	A11-11	Compostagem de esterco bovino	0,3	AH
252	A11-12	Compostagem de esterco bovino	0,5	AH
253	A11-13	Compostagem de esterco bovino	0,5	AH
254	A11-14	Compostagem de esterco bovino	0,3	0,1
255	A11-15	Compostagem de esterco bovino	0,4	0,3
256	A11-16	Compostagem de esterco bovino	0,5	0,2
257	A11-17	Compostagem de esterco bovino	0,3	0,3
258	A11-18	Compostagem de esterco bovino	0,2	0,1
259	A11-19	Compostagem de esterco bovino	0,3	AH

Tabela 4 – Origem das linhagens coletadas e hidrólise do amido em meio sólido (continuação)

	LINHAGEM	MATERIAL COLETADO	DIÂMETRO COLÔNIA (cm)	HALO (cm)
260	A11-20	Compostagem de esterco bovino	0,5	AH
261	A11-21	Compostagem de esterco bovino	0,4	AH
262	A11-22	Compostagem de esterco bovino	0,2	AH
263	A11-23	Compostagem de esterco bovino	0,2	0,1
264	A11-24	Compostagem de esterco bovino	1,5	HDC
265	A12-1	Compostagem de esterco bovino	0,3	0,1
266	A12-2	Compostagem de esterco bovino	0,4	AH
267	A12-3	Compostagem de esterco bovino	0,3	HDC
268	A12-4	Compostagem de esterco bovino	0,5	AH
269	A12-5	Compostagem de esterco bovino	0,5	HDC
270	A12-6	Compostagem de esterco bovino	0,3	0,1
271	A12-7	Compostagem de esterco bovino	0,3	HDC
272	A12-8	Compostagem de esterco bovino	3,5	0,4
273	A12-9	Compostagem de esterco bovino	0,5	0,2
274	A12-10	Compostagem de esterco bovino	0,3	AH
275	A12-11	Compostagem de esterco bovino	2,0	0,4
276	A12-12	Compostagem de esterco bovino	0,3	0,1
277	A12-13	Compostagem de esterco bovino	3,7	0,1
278	A12-14	Compostagem de esterco bovino	0,5	0,1
279	A12-15	Compostagem de esterco bovino	0,5	0,2
280	A12-16	Compostagem de esterco bovino	0,4	AH
281	A12-17	Compostagem de esterco bovino	0,2	AH
282	A12-18	Compostagem de esterco bovino	0,7	HDC
283	A12-19	Compostagem de esterco bovino	0,3	0,1
284	A12-20	Compostagem de esterco bovino	1,0	0,3
285	A13-1	Compostagem de cama de frango	0,2	AH
286	A13-2	Compostagem de cama de frango	3,0	0,3
287	A13-3	Compostagem de cama de frango	0,2	AH
288	A13-4	Compostagem de cama de frango	0,5	0,2
289	A13-5	Compostagem de cama de frango	0,8	HDC
290	A13-6	Compostagem de cama de frango	3,8	0,5
291	A13-7	Compostagem de cama de frango	0,5	AH
292	A13-8	Compostagem de cama de frango	2,5	0,3
293	A13-9	Compostagem de cama de frango	3,0	0,3
294	A13-10	Compostagem de cama de frango	0,2	HDC
295	A13-11	Compostagem de cama de frango	0,5	HDC
296	A13-12	Compostagem de cama de frango	0,4	HDC
297	A13-13	Compostagem de cama de frango	0,3	AH
298	A13-14	Compostagem de cama de frango	0,2	AH
299	A13-15	Compostagem de cama de frango	0,5	HDC
300	A13-16	Compostagem de cama de frango	0,7	0,3
301	A13-17	Compostagem de esterco bovino	3,1	0,2
302	A13-18	Compostagem de esterco bovino	1,2	0,3
303	A13-19	Compostagem de esterco bovino	1,0	0,3
304	A13-20	Compostagem de esterco bovino	1,5	0,2
305	A13-21	Compostagem de esterco bovino	1,5	0,2
306	A13-22	Compostagem de esterco bovino	0,5	0,1
307	A13-23	Compostagem de esterco bovino	0,4	0,1
308	A13-24	Compostagem de esterco bovino	0,5	0,3
309	A13-25	Compostagem de esterco bovino	1,4	0,1
310	A13-26	Compostagem de esterco bovino	0,5	HDC
311	A13-27	Compostagem de esterco bovino	0,4	HDC

Tabela 4 – Origem das linhagens coletadas e hidrólise do amido em meio sólido (continuação)

	LINHAGEM	MATERIAL COLETADO	DIÂMETRO COLÔNIA (cm)	HALO (cm)
312	A13-28	Compostagem de esterco bovino	0,8	0,2
313	A13-29	Compostagem de esterco bovino	0,2	AH
314	A13-30	Compostagem de esterco bovino	0,3	0,1
315	A13-31	Solo de plantação de mandioca	0,3	HDC
316	A13-32	Solo de plantação de mandioca	0,5	0,4
317	A13-33*	Solo de plantação de mandioca	0,5	0,4
318	A13-34*	Solo de plantação de mandioca	1,0	0,5
319	A13-35*	Solo de plantação de mandioca	0,6	HDC
320	A13-36*	Solo de plantação de mandioca	0,5	0,3
321	A13-37*	Solo de plantação de mandioca	0,3	HDC
322	A14-1	Bagaço de cana	0,2	0,1
323	A14-2	Bagaço de cana	0,5	0,2
324	A14-3	Bagaço de cana	0,2	0,1
325	A14-4	Bagaço de cana	0,3	0,1
326	A14-5	Bagaço de cana	0,9	HDC
327	A14-6	Bagaço de cana	0,2	AH
328	A14-7	Bagaço de cana	0,6	0,2
329	A14-8	Bagaço de cana	0,4	HDC
330	A14-9	Solo com esterco animal/cevada	0,3	HDC
331	A14-10	Solo com esterco animal/cevada	0,5	0,3
332	A14-11	Solo com esterco animal/cevada	0,2	AH
332	A14-12	Solo com esterco animal/cevada	0,5	0,1
334	A14-13	Solo com esterco animal/cevada	0,5	0,2
335	A14-14	Solo com esterco animal/cevada	1,0	0,2
336	A14-15	Solo com esterco animal/cevada	0,3	HDC
337	A14-16	Solo com esterco animal/cevada	0,3	HDC
338	A14-17	Solo com esterco animal/cevada	0,2	HDC
339	A14-18	Solo com esterco animal/cevada	0,2	HDC

HDC = hidrólise na dimensão da colônia; AH = ausência de hidrólise; * = linhagens fúngicas

2. Teste de hidrólise do amido em meio sólido

As linhagens isoladas e purificadas foram submetidas a testes de hidrólise do amido em meio sólido **(Tabela 4)**. Das 339 linhagens termofílicas isoladas, 123 produziram amilases extracelulares evidenciadas em nítidos halos ao redor das colônias, enquanto 59 produziram halos muito sutis, o quais foram discriminados na tabela como hidrólise na dimensão da colônia (HDC). As demais, apesar de se desenvolverem bem no meio com amido como única fonte de carbono, não mostraram indícios de excreção de amilases além dos limites da colônia, sendo designadas AH (ausência de hidrólise).

A presença de crescimento de microrganismos em meio que possui amido como única fonte de carbono sugere que todos os microrganismos isolados produzem amilase extracelular, uma vez que a molécula de amido, por apresentar alto peso molecular, não entra na célula microbiana. Dessa forma, pode-se sugerir que todos os microrganismos isolados produziram amilases extracelulares porém, para algumas linhagens, estas não difundiram-se no meio de cultura, podendo ter ficado adsorvidas à parede celular ou no espaço periplasmático destes. Inúmeros trabalhos têm demonstrado a presença de enzimas ligadas à células, como no caso de *Klebsiella oxytoca* e *Clostridium* sp, ou no espaço periplasmático, como *Bacteroides* sp (SALYERS et al., 1996).

Nos experimentos, além da avaliação da produção de amilase em placa, também foi considerada a velocidade de crescimento do microrganismo, uma vez que a temperatura de 55°C desfavorece a manutenção de placas e tubos por períodos de incubação prolongados devido a perda de água do meio sólido por evaporação. Das linhagens testadas, 176 levaram mais de 24 horas para o surgimento de colônias visíveis. Estas culturas, portanto, foram consideradas pouco adequadas para os estudos de produção de amilases.

3. Avaliação do crescimento a 60ºC

As linhagens que apresentaram melhor crescimento a 55ºC, independentemente do tamanho do halo de hidrólise apresentado em placa, foram testadas quanto ao crescimento a 60ºC. Das linhagens testadas, 17 linhagens bacterianas apresentaram um bom crescimento nessa temperatura, sendo que quatro delas, mostraram maior intensidade e velocidade de crescimento **(Tab. 5)**.

A faixa de variação para o crescimento de microrganismos termofílicos geralmente varia de 45 a 60ºC, sendo essa a razão para o isolamento das linhagens a 55ºC e a verificação de seu possível crescimento a 60ºC, visto que, que na maioria das vezes, as amostras foram coletadas em locais onde a temperatura superavam estes limites.

Tabela 5 – Crescimento das linhagens selecionadas em meio líquido, contendo amido como fonte de carbono, a 60°C por 24 horas

	LINHAGEM	CRESCIMENTO
1	A3-4	++
2	A3-18	+
3	$A4_5$-a	++
4	$A4_7$-1	++
5	A5-1	+
6	A5-9	+
7	A5-13	++
8	A5-14	+
9	A5-37	+
10	A5-64	+
11	$A10_4$-2	+
12	$A10_5$-4	+
13	$A10_5$-9	+
14	A12-2	+
15	A12-3	+
16	A13-10	+
17	A13-21	+

4. Fermentação submersa e semi-sólida para seleção das linhagens produtoras de amilases

Para seleção das melhores linhagens produtoras de amilases, foram testadas 163 linhagens em fermentação semi-sólida (farelo de trigo) e 162 em fermentação submersa (meio nutriente líquido). Como nem sempre ocorre uma relação direta entre a produção de enzimas extracelulares em placa e a produção em meio líquido ou sólido (SOARES et al., 1999), foram testadas as linhagens que melhor cresceram em meio seletivo, independente da produção ou não de halo. Os resultados obtidos são mostrados na **Tabela 6**.

Verificou-se que em fermentação submersa, 18 linhagens (11%) das 162 testadas, produziram atividade amilolítica detectada pelos três métodos de avaliação; 72 linhagens (45%) tiveram atividade enzimática detectada por dois dos métodos; 62 linhagens (38%) produziram atividade amilolítica em apenas um dos métodos de avaliação e 10 linhagens (6%) não apresentaram atividade enzimática detectada em nenhum dos três métodos de avaliação. Esses dados estão representados na **Figura 11**.

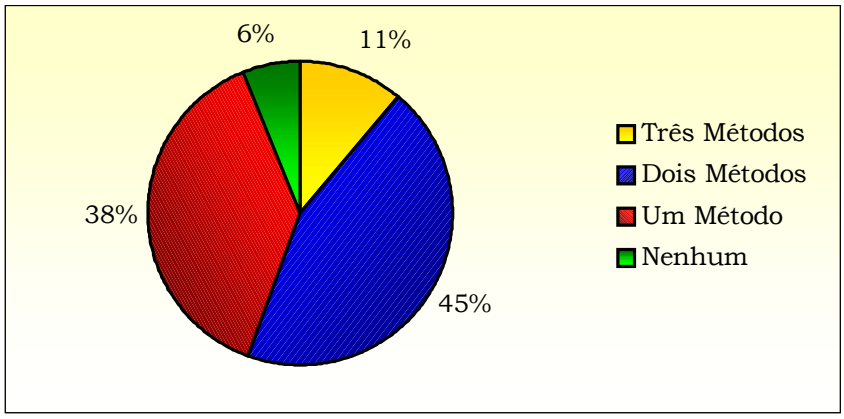


Figura 11 – Distribuição das linhagens selecionadas com relação aos tipos de amilases detectadas em fermentação submersa (meio nutriente).

Em fermentação semi-sólida, 90 linhagens (55%), das 163 linhagens testadas, produziram amilolítica detectada pelos três métodos de avaliação; 56 linhagens (34%) produziram atividade enzimática detectada por dois dos métodos de avaliação; 14 linhagens (9%) produziram atividade detectada por

um dos métodos e 3 linhagens (2%) não tiveram atividade amilolítica detectada por nenhum dos métodos de avaliação **(Fig. 12)**.

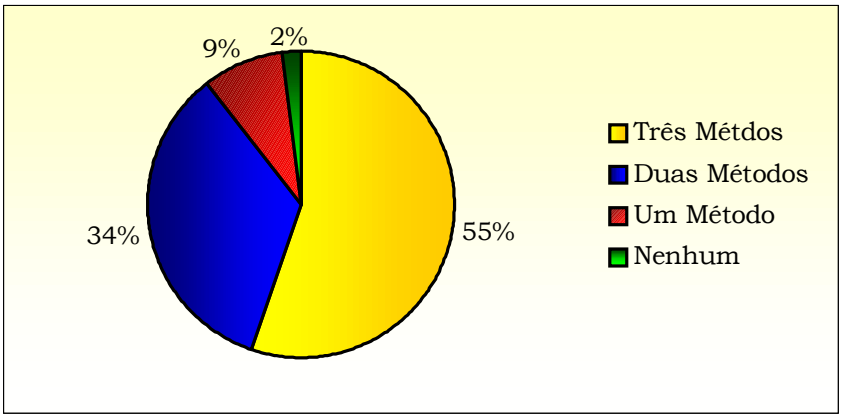


Figura 12 – Distribuição das linhagens selecionadas com relação aos tipos de amilases detectadas em fermentação semi-sólida (farelo de trigo).

Com relação ao tipo de enzima produzida, em fermentação submersa, 132 linhagens (81,5%) apresentaram atividade preponderante dextrinizante, 84 linhagens (52%) atividade preponderante amilolítica dosada pela liberação de açúcares redutores e 54 linhagens (33%) apresentaram atividade preponderante de glicoamilase **(Fig. 13)**.

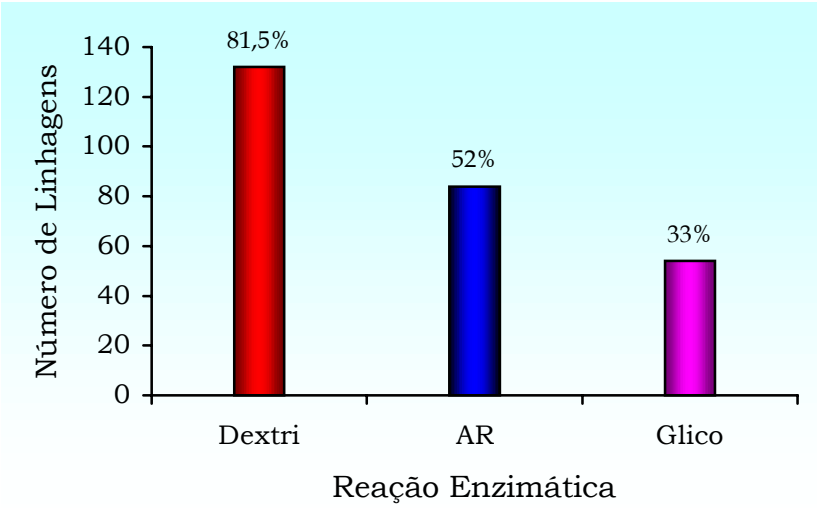


Figura 13 – Distribuição das linhagens selecionadas com relação às atividades de α-amilase (Dextri), amilases (AR) e glicoamilase (Glico) detectadas em fermentação submersa (meio nutriente).

Em fermentação semi-sólida, 152 linhagens (93,2%) apresentaram atividade preponderante dextrinizante, 150 linhagens (92%) apresentaram

atividade preponderante amilolítica pela liberação de açúcares redutores e 108 linhagens (66,3%) apresentaram indícios de atividade preponderante de glicoamilase **(Fig. 14)**.

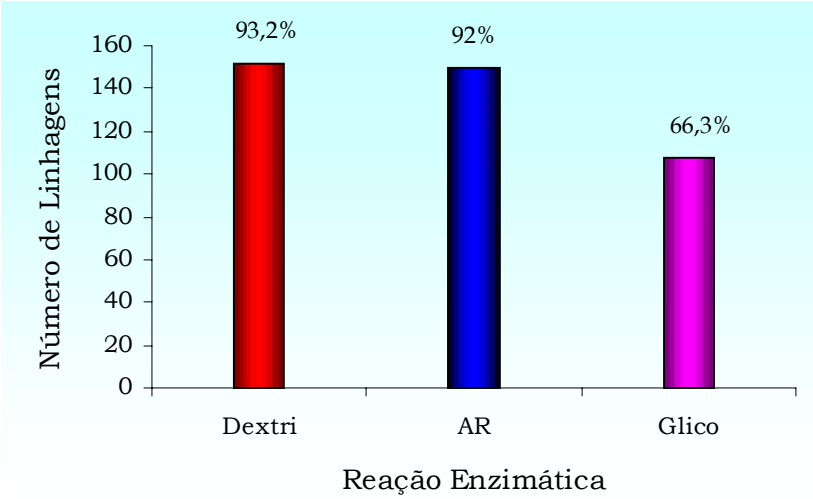


Figura 14 – Distribuição das linhagens selecionadas com relação às atividades de α-amilase (Dextri), amilases (AR) e glicoamilase (Glico) detectadas em fermentação semi-sólida (farelo de trigo).

Diante do exposto, nota-se que a enzima com maior atividade em ambas as fermentações foi a α-amilase, sendo o farelo de trigo o meio em que houve maior expressão de todas as enzimas.

As linhagens que apresentaram maior atividade dextrinizante (α-amilase) em fermentação submersa, foram: A3-16 (1,5 U/mL), $A4_4$-h (1,59 U/mL), A5-13 (1,48 U/mL), A5-14 (2,11 U/mL), $A9_31$ (1,60 U/mL) e $A10_5$-b (2,52 U/mL); e em meio fermentação semi-sólida foram: $A4_1$-b (26,13 U/mL), $A4_4$-f (23,57 U/mL), $A4_4$-i (21,43 U/mL), $A4_5$-2 (25,38 U/mL), A47-1 (30 U/mL) e A5-41 (14,59 U/mL).

As linhagens que produziram maior atividade amilolítica pela quantificação dos açúcares redutores liberados em fermentação submersa, foram: $A4_4$-f (3,36 U/mL), $A4_7$-1 (3,57 U/mL), A11-20 (3,79 U/mL), A12-13 (4,01 U/mL), A13-9 (2,40 U/mL) e A14-13 (2,28 U/mL); e em fermentação semi-sólida foram: $A4_1$-b (55,69 U/mL), $A4_4$-h (19,05 U/mL), $A4_7$-1 (21,27 U/mL), A12-9 (19,42 U/mL), A13-22 (25,98 U/mL) e A13-23 (19,96 U/mL).

Quanto à expressão de glicoamilase, todas as linhagens testadas apresentaram atividade muito baixa ou esta não foi detectada. Isto já era esperado uma vez que as linhagens testadas consistiam quase que exclusivamente de bactérias, e relatos na literatura mencionam fungos como bons produtores (VIHINEN e MÄNTSÄLÃ, 1989).

Os dados da atividade de α e possivelmente uma β-amilase pelas linhagens testadas mostraram-se promissores quando comparados com dados da literatura. Mulimani et al. (2000), em seus experimentos com fungo *Gibberella fujikuroi*, em fermentação semi-sólida, obtiveram 42 U/g de substrato, quando a atividade enzimática foi quantificada pela dosagem dos açúcares redutores liberados. Utilizando os mesmos substrato e método de quantificação, as melhores linhagens estudadas produziram de 14,6 a 55,7 U/mL, o que corresponde a produção de 87,6 a 334,2 U/g de farelo de trigo. Pelo mesmo método, porém em fermentação submersa, utilizando amido como fonte de carbono, Canganela et al. (1994) obtiveram 13,0 e 0,8 U/mL para as linhagens de Tys e Ty de *Fervidobacterium* sp, respectivamente, enquanto Lin et al. (1994) obtiveram, 12,3 U/mL para *Bacillus* sp. Em nossos experimentos em fermentação submersa, as melhores produções foram de 2,28 a 4,01 U/mL, bem abaixo dos dados de literatura.

Das linhagens testadas, $A4_1$-b, $A4_4$-i e $A4_7$-1 foram as melhores produtoras de enzimas amilolíticas quando cultivadas em meio semi-sólido, seguidas pelas linhagens $A4_4$-f, $A4_5$-2, A11-4, A13-8 e A13-22. Estas linhagens além de serem boas produtoras, são de fácil manuseio e têm crescimento rápido a 55°C, tanto em meio líquido como em meio sólido, justificando-se assim a escolha das mesmas para dar continuidade ao trabalho. Entre os fungos, novos testes foram feitos, selecionando-se a linhagem A13-36 para a realização dos ensaios de produção.

Analisando-se a **Tabela 6** verifica-se que, na maioria das vezes, as linhagens apresentaram um bom crescimento no meio de cultivo utilizado, o qual possui o amido como única fonte de carbono e energia (estimativa do crescimento bacteriano pela leitura da absorbância a 600 nm do meio de fermentação, item 3.2 - material e métodos).

Tabela 6 – Avaliação da atividade amilolítica produzida em fermentação submersa (meio nutriente) e semi-sólida (farelo de trigo)

	Linhagem	T (ºC) Cresc.	Hidrólise do Amido em Placa		Crescimento em M. Líquido (Abs. 600 nm)	Atividade Enzimática (U/mL)					
						Dextrinizante		Amilase (AR)		Glicoamilase	
			Diâmetro Colônia (cm)	Halo (cm)		F. Submersa	F. S.Sólida	F. Submersa	F. S.Sólida	F. Submersa	F. S.Sólida
1	A1-1	50	1,5	0,3	NA	NA	0,279	NA	0,856	**NA**	ND
2	A1-5	55	0,7	0,2	0,604	0,146	0,426	0,0988	0,583	ND	0,011
3	A1-6	55	0,5	0,2	1,008	0,145	0,219	ND	2,010	ND	0,004
4	A1-8	55	0,5	HDC	1,137	0,181	0,129	ND	0,917	ND	0,004
5	A1-9	55	0,5	HDC	1,469	0,146	0,536	ND	1,835	ND	0,006
6	A1-11	55	0,3	0,1	0,879	0,103	2,008	1,065	2,498	ND	0,002
7	A1-12	55	0,5	0,3	1,821	0,491	2,004	ND	3,405	ND	0,004
8	A1-13	55	1,0	0,1	1,560	0,040	0,662	0,047	4,509	ND	0,010
9	A1-14	55	0,5	AH	1,180	0,119	0,343	ND	ND	0,006	0,015
10	A1-15	55	0,6	0,1	0,817	0,134	0,663	ND	1,660	ND	ND
11	A1-21	55	0,3	0,1	1,204	0,247	0,662	ND	1,027	ND	0,008
12	A1-24	55	0,5	AH	1,586	0,112	0,577	ND	2,542	ND	0,001
13	A1-25	55	0,4	HDC	1,460	0,059	0,674	ND	1,1160	ND	ND
14	A1-26	55	1,0	0,2	1,344	0,295	0,505	0,635	2,691	ND	0,017
15	A1-27	55	0,4	0,1	1,265	0,077	0,677	ND	1,638	ND	ND
16	A3-4	60	0,8	0,3	1,371	0,247	0,156	0,466	2,107	ND	0,04
17	A3-8	55	0,3	0,2	1,408	0,573	4,205	0,888	ND	0,008	0,001
18	A3-9	55	0,4	HDC	1,319	0,292	0,679	ND	1,366	ND	ND
19	A3-11	55	0,6	0,1	1,134	0,079	0,668	ND	1,325	ND	ND
20	A3-12	55	0,5	0,2	1,650	0,175	0,348	1,963	1,349	ND	0,005
21	A3-14	55	0,5	AH	1,342	0,268	0,669	ND	3,604	ND	0,003
22	A3-15	55	0,6	AH	1,500	0,178	0,622	0,463	2,789	ND	0,001
23	A3-16	55	0,4	HDC	0,624	1,496	1,595	0,894	ND	0,002	ND
24	A3-17	55	0,7	AH	1,552	0,438	0,851	0,979	4,608	ND	ND
25	A3-18	60	0,7	0,1	2,060	0,026	0,648	0,256	2,788	ND	0,003
26	A3-19	55	0,5	0,1	1,528	0,245	0,673	ND	0,439	ND	0,001
27	A3-20	55	0,5	0,2	1,341	0,277	0,396	0,399	1,105	ND	0,002
28	$A4_1$-2	55	0,9	AH	0,666	0,031	0,676	ND	1,369	ND	0,004
29	$A4_1$-b	55	0,4	0,6	0,224	0,190	26,129	ND	55,692	0,002	0,006
30	$A4_1$-d	55	0,8	0,6	0,564	0,763	4,199	0,685	ND	0,006	ND
31	$A4_1$-e	55	0,6	0,6	0,583	0,411	4,209	0,770	0,282	0,007	ND
32	$A4_2$-2	55	0,5	HDC	1,761	0,029	0,662	ND	1,327	ND	ND

Tabela 6 – Avaliação da atividade amilolítica produzida em fermentação submersa (meio nutriente) e semi-sólida (farelo de trigo) (continuação)

	Linhagem	T (ºC) Cresc.	Hidrólise do Amido em Placa		Crescimento em M. Líquido (Abs. 600 nm)	Atividade Enzimática (U/mL)					
			Diâmetro Colônia (cm)	Halo (cm)		Dextrinizante		Amilase (AR)		Glicoamilase	
						F. Submersa	F. S.Sólida	F. Submersa	F. S.Sólida	F. Submersa	F. S.Sólida
33	$A4_4$-a	55	0,3	0,5	0,352	0,527	0,522	1,350	0,573	0,004	0,007
34	$A4_4$-b	55	0,6	0,5	0,613	0,149	0,421	ND	ND	0,002	0,010
35	$A4_4$-e	55	0,5	0,5	1,657	0,143	0,370	0,330	1,527	ND	0,009
36	$A4_4$-f	55	1,0	0,5	0,482	ND	23,571	3,356	0,928	0,006	0,002
37	$A4_4$-h	55	0,3	0,1	0,432	1,587	1,219	ND	ND	ND	ND
38	$A4_4$-i	55	1,0	0,5	1,025	ND	21,429	1,549	19,054	0,002	0,013
39	$A4_5$-2	55	0,2	0,5	0,266	0,373	25,385	ND	16,834	0,002	0,016
40	$A4_5$-a	60	0,7	0,6	0,411	1,454	ND	ND	ND	ND	ND
41	$A4_5$-b	55	0,5	0,7	1,881	0,047	0,655	0,851	ND	ND	ND
42	$A4_6$-c	55	1,5	0,3	0,672	0,466	4,160	2,272	2,137	0,010	ND
43	$A4_6$-d	55	1,8	0,3	0,535	0,596	4,177	ND	0,262	ND	ND
44	$A4_6$-f	55	0,5	0,5	0,710	1,162	4,211	0,589	2,041	0,006	ND
45	$A4_7$-1	60	3,0	0,4	1,028	0,827	30,000	3,571	21,275	0,003	0,005
46	A5-1	60	0,7	0,3	1,189	1,035	4,245	ND	0,856	ND	0,002
47	A5-5	55	0,4	0,2	1,890	0,052	0,150	0,216	1,344	ND	0,001
48	A5-6	55	0,5	0,2	1,841	0,265	0,290	0,096	2,076	ND	0,011
49	A5-9	60	1,0	AH	0,342	1,073	4,296	ND	ND	ND	0,002
50	A5-13	60	0,7	0,5	0,556	1,478	1,366	0,269	1,870	0,003	ND
51	A5-14	60	0,7	0,3	0,571	2,114	1,546	0,358	2,816	0,003	0,011
52	A5-25	55	0,4	0,2	0,471	0,288	0,656	ND	1,077	0,003	0,031
53	A5-37	60	0,7	0,2	1,440	0,030	6,726	0,140	4,367	ND	0,002
54	A5-39	55	0,5	0,2	1,997	0,023	0,283	0,070	0,915	ND	0,004
55	A5-41	55	0,3	0,2	1,728	0,186	14,593	ND	8,451	0,002	0,031
56	A5-50	55	0,5	0,3	0,773	0,250	ND	0,215	ND	ND	ND
57	A5-52	55	0,5	0,3	0,463	0,174	ND	0,236	ND	ND	0,002
58	A5-53	55	0,2	0,2	1,524	0,118	0,147	0,213	0,485	ND	0,003
59	A5-64	60	0,3	HDC	1,039	0,160	0,272	ND	1,840	ND	0,014
60	$A6_2$-5	55	0,5	HDC	1,373	0,139	0,408	0,130	ND	ND	0,002
61	$A6_2$-7	55	0,3	0,1	0,369	0,226	0,114	0,432	1,265	ND	0,009
62	$A6_2$-8	55	0,3	HDC	0,968	0,146	0,486	ND	0,400	ND	0,004
63	$A7_1$-4	55	0,4	AH	1,415	0,009	0,211	ND	0,386	ND	0,001
64	$A7_3$-1	55	0,5	HDC	1,097	0,185	0,194	ND	0,747	ND	0,004

Tabela 6 – Avaliação da atividade amilolítica produzida em fermentação submersa (meio nutriente) e semi-sólida (farelo de trigo) (continuação)

	Linhagem	T (ºC) Cresc.	Hidrólise do Amido em Placa		Crescimento em M. Líquido (Abs. 600 nm)	Atividade Enzimática (U/mL)					
			Diâmetro Colônia (cm)	Halo (cm)		Dextrinizante		Amilase (AR)		Glicoamilase	
						F. Submersa	F. S.Sólida	F. Submersa	F. S.Sólida	F. Submersa	F. S.Sólida
65	$A7_3$-2	55	0,3	HDC	1,086	0,141	0,157	ND	0,737	ND	ND
66	$A7_3$-3	55	0,5	HDC	1,274	0,270	0,215	ND	0,914	ND	ND
67	$A7_3$-4	55	0,4	HDC	1,409	0,026	0,103	ND	0,958	ND	ND
68	$A8_1$-1	55	0,4	HDC	1,097	0,251	0,200	0,135	1,412	ND	ND
69	$A8_1$-3	55	0,4	AH	0,428	0,196	0,451	ND	0,940	ND	0,002
70	$A8_2$-2	55	0,5	HDC	1,369	ND	0,146	ND	0,585	ND	ND
71	$A9_2$-2	55	0,2	AH	1,751	0,116	0,416	ND	0,380	ND	0,006
72	$A9_3$-1	55	0,5	0,2	1,915	1,599	0,122	0,267	0,864	0,001	ND
73	$A9_5$-1	55	0,8	0,3	1,501	0,519	0,089	0,237	0,823	ND	ND
74	$A9_5$-2	55	0,5	0,2	1,686	0,123	0,237	0,454	0,898	0,002	ND
75	$A9_5$-3	55	0,6	0,2	2,142	0,145	0,469	ND	ND	ND	0,010
76	$A10_1$-4	55	0,5	0,2	1,908	0,158	0,131	ND	0,632	ND	ND
77	$A10_1$-a	55	0,3	0,1	0,469	0,142	0,123	0,172	0,896	ND	0,002
78	$A10_1$-c	55	0,6	0,2	1,854	0,192	0,374	ND	0,524	ND	0,003
79	$A10_3$-a	55	0,3	0,1	0,526	0,088	0,099	0,148	0,423	ND	0,005
80	$A10_4$-2	60	0,3	0,1	2,015	0,438	0,634	ND	0,346	ND	ND
81	$A10_4$-3	55	0,4	0,2	0,894	0,197	0,212	0,052	0,187	ND	0,019
82	$A10_4$-a	55	0,3	HDC	1,261	0,170	0,217	0,160	1,807	ND	ND
83	$A10_5$-9	60	1,2	0,9	0,738	0,163	0,068	0,214	0,921	ND	ND
84	$A10_5$-a	55	0,2	0,1	1,447	ND	0,079	ND	0,321	ND	0,001
85	$A10_5$-b	55	0,3	0,5	1,803	2,521	0,113	0,327	1,203	0,007	0,003
86	$A10_5$-d	55	0,3	0,1	0,628	0,391	0,141	0,252	0,609	ND	0,002
87	$A10_7$-b	55	0,6	HDC	1,613	0,026	4,827	0,267	17,777	ND	ND
88	A11-1	55	0,6	0,1	0,071	0,194	5,984	ND	10,280	0,002	0,021
89	A11-2	55	0,4	0,1	0,044	ND	11,702	ND	12,521	0,022	0,028
90	A11-3	55	0,5	HDC	0,062	ND	11,165	ND	11,171	0,002	0,025
91	A11-4	55	0,3	AH	1,058	ND	14,137	ND	17,433	0,004	0,033
92	A11-5	50	0,5	0,2	1,578	ND	1,680	1,438	ND	ND	0,012
93	A11-6	50	2,5	0,4	1,537	ND	0,766	0,397	ND	ND	0,003
94	A11-7	50	0,3	0,2	1,821	0,123	0,601	ND	ND	ND	0,014
95	A11-8	50	0,5	0,1	1,380	0,019	0,387	ND	ND	ND	ND
96	A11-9	50	0,3	HDC	1,568	ND	ND	ND	0,324	ND	ND

Tabela 6 – Avaliação da atividade amilolítica produzida em fermentação submersa (meio nutriente) e semi-sólida (farelo de trigo) (continuação)

	Linhagem	T (ºC) Cresc.	Hidrólise do Amido em Placa		Crescimento em M. Líquido (Abs. 600 nm)	Atividade Enzimática (U/mL)					
			Diâmetro Colônia (cm)	Halo (cm)		Dextrinizante		Amilase (AR)		Glicoamilase	
						F. Submersa	F. S.Sólida	F. Submersa	F. S.Sólida	F. Submersa	F. S.Sólida
97	A11-10	50	1,0	HDC	1,011	0,132	0,138	1,532	5,624	ND	ND
98	A11-11	50	0,3	AH	0,885	0,039	0,115	0,625	7,623	ND	ND
99	A11-12	50	0,5	AH	1,242	0,085	0,080	1,340	3,360	ND	ND
100	A11-13	50	0,5	AH	1,494	0,016	ND	ND	3,999	ND	ND
101	A11-14	50	0,3	0,1	1,534	ND	1,206	ND	ND	ND	ND
102	A11-15	50	0,4	0,3	1,670	0,281	ND	0,726	4,992	0,007	ND
103	A11-16	50	0,5	0,2	1,305	0,137	0,526	1,262	6,246	ND	ND
104	A11-17	50	0,3	0,3	1,634	0,271	0,088	1,734	7,584	ND	ND
105	A11-18	50	0,4	0,1	0,571	0,180	0,392	0,431	ND	ND	ND
106	A11-19	50	0,3	AH	0,820	0,121	0,121	1,441	4,536	ND	ND
107	A11-20	50	0,5	AH	1,630	0,298	0,176	3,790	8,650	ND	ND
108	A11-21	50	0,4	AH	0,531	0,071	0,547	0,726	3,726	ND	ND
109	A11-22	50	0,2	AH	1,543	0,069	0,271	ND	6,786	ND	0,005
110	A11-23	50	0,2	0,1	0,760	0,144	0,333	1,273	7,878	ND	0,025
111	A11-24	55	1,5	HDC	0,055	0,027	7,085	0,0,35	9,350	0,002	0,38
112	A12-1	50	0,3	0,1	1,422	0,008	1,241	ND	16,967	ND	0,041
113	A12-2	60	0,4	AH	0,572	0,025	6,168	ND	11,290	0,003	0,034
114	A12-3	60	0,3	HDC	0,887	ND	1,470	ND	13,592	0,003	0,028
115	A12-5	50	0,5	AH	1,633	0,121	ND	ND	ND	ND	ND
116	A12-6	55	0,3	0,1	1,730	ND	10,508	ND	17,711	0,004	0,029
117	A12-8	50	3,5	0,4	0,631	ND	1,692	1,168	16,345	ND	0,025
118	A12-9	50	0,5	0,2	1,534	ND	2,098	ND	19,420	0,022	0,066
119	A12-11	50	2,0	0,4	1,493	ND	0,783	ND	ND	ND	0,012
120	A12-12	50	0,3	0,1	1,535	0,332	ND	1,055	ND	0,071	0,007
121	A12-13	55	3,7	HDC	0,704	ND	6,054	4,013	9,195	0,021	0,032
122	**A12-14**	50	0,5	0,1	0,821	0,145	ND	ND	ND	0,006	0,030
123	A12-15	50	0,5	0,2	1,152	ND	1,618	0,149	11,371	ND	ND
124	A12-16	50	0,4	AH	0,792	0,146	ND	ND	ND	ND	0,010
125	A12-17	50	0,2	AH	1,413	ND	1,566	ND	4,832	ND	0,004
126	A12-18	50	0,7	HDC	1,391	ND	0,715	0,946	4,232	ND	ND
127	A12-19	55	0,3	0,1	0,115	ND	5,078	ND	11,783	0,003	0,020
128	A12-20	55	1,0	0,3	0,050	ND	7,790	ND	14,772	0,004	0,021

Tabela 6 – Avaliação da atividade amilolítica produzida em fermentação submersa (meio nutriente) e semi-sólida (farelo de trigo) (continuação)

	Linhagem	T (ºC) Cresc.	Hidrólise do Amido em Placa		Crescimento em M. Líquido (Abs. 600 nm)	Atividade Enzimática (U/mL)					
			Diâmetro Colônia (cm)	Halo (cm)		Dextrinizante		Amilase (AR)		Glicoamilase	
						F. Submersa	F. S.Sólida	F. Submersa	F. S.Sólida	F. Submersa	F. S.Sólida
129	A13-2	55	3,0	0,3	0,047	0,105	12,054	0,037	15,621	0,004	0,045
130	A13-4	50	0,5	0,2	1,290	0,192	2,126	1,026	15,101	ND	0,008
131	A13-5	55	0,8	HDC	0,680	ND	11,544	ND	12,148	0,003	0,0032
132	A13-8	55	2,5	0,3	0,054	ND	9,152	ND	17,744	0,004	0,045
133	A13-9	55	3,0	0,3	1,236	ND	11,872	2,398	16,023	0,004	0,037
134	A13-10	60	0,2	HDC	1,230	0,078	4,118	ND	10,560	0,003	0,034
135	A13-11	55	0,5	HDC	0,477	0,009	6,835	ND	10,526	0,003	0,035
136	A13-12	55	0,4	HDC	0,354	0,242	5,137	ND	13,503	0,003	0,032
137	A13-13	50	0,3	0,1	1,503	ND	ND	0,578	14,035	0,014	0,030
138	A13-16	50	0,7	0,3	1,761	ND	3,506	1,890	17,677	0,05	0,026
139	A13-17	55	3,1	0,2	0,093	0,088	11,528	ND	15,423	0,004	0,031
140	A13-18	50	1,2	0,3	1,377	ND	2,166	ND	18,941	ND	0,017
141	A13-19	55	1,0	0,3	0,470	0,077	3,103	2,009	9,928	0,002	0,036
142	A13-20	50	1,5	0,2	1,205	ND	2,008	1,068	17,611	ND	0,021
143	A13-21	60	1,5	0,2	0,786	0,063	5,642	ND	9,739	0,002	0,034
144	A13-22	55	0,5	0,1	0,660	0,063	13,237	ND	26,232	0,007	0,038
145	A13-23	55	0,4	0,1	0,835	0,021	3,494	ND	19,963	0,004	0,043
146	A13-24	55	0,5	0,3	1,249	ND	10,161	3,848	10,682	0,002	0,046
147	A13-26	55	0,5	HDC	0,399	0,332	1,232	ND	12,359	0,003	0,038
148	A13-27	55	0,4	HDC	0,431	0,307	10,926	ND	5,431	0,001	0,037
149	A13-28	55	0,8	0,2	0,071	0,235	0,732	ND	12,303	0,003	0,037
150	A13-30	50	0,3	0,1	0,670	ND	1,850	1,421	13,436	ND	0,014
151	A14-3	50	0,2	0,1	0,943	0,868	2,175	1,957	6,597	ND	ND
152	A14-4	50	0,3	0,1	0,729	ND	ND	ND	9,771	ND	0,023
153	A14-5	50	0,9	HDC	1,635	ND	2,457	ND	9,783	ND	0,029
154	A14-7	50	0,6	0,2	1,792	ND	0,950	1,961	10,116	ND	0,006
155	A14-8	50	0,4	HDC	1,176	ND	2,141	2,025	14,544	ND	0,006
156	A14-9	50	0,3	HDC	1,491	ND	3,393	1,572	19,87	ND	ND
157	A14-10	50	0,5	0,3	1,705	ND	3,370	ND	9,095	ND	ND
158	A14-12	50	0,5	0,1	1,487	ND	0,560	2,218	15,279	ND	0,006
159	A14-13	50	0,5	0,2	1,666	ND	1,266	2,276	6,897	ND	0,011
160	A14-14	50	1,0	0,2	1,352	0,198	1,937	0,957	5,840	ND	0,007

Tabela 6 – Avaliação da atividade amilolítica produzida em fermentação submersa (meio nutriente) e semi-sólida (farelo de trigo) (continuação)

	Linhagem	T (ºC) Cresc.	Hidrólise do Amido em Placa		Crescimento em M. Líquido (Abs. 600 nm)	Atividade Enzimática (U/mL)					
			Diâmetro Colônia (cm)	Halo (cm)		Dextrinizante		Amilase (AR)		Glicoamilase	
						F. Submersa	F. S.Sólida	F. Submersa	F. S.Sólida	F. Submersa	F. S.Sólida
161	A14-15	50	0,3	HDC	0,282	0,166	0,299	1,65	2,793	ND	ND
162	A14-16	50	0,2	HDC	0,621	ND	0,180	1,552	7,195	ND	ND
163	A14-17	50	0,2	HDC	0,284	0,163	0,220	1,045	3,065	ND	ND

HDC = hidrólise na dimensão da colônia; AH = ausência de halo; NA = não analisada; ND = não detectada

Levando-se em consideração que o aumento da biomassa só se torna possível a partir da hidrólise do amido presente no meio, pode-se inferir que as amilases estão sendo produzidas pelo microrganismo e o amido está sendo consumido. Este fato pode ser comprovado pela ausência de amido residual ou redução acentuada desse polímero no meio de cultura, demonstrados pela reação negativa dos meios de cultivo com iodo **(APÊNDICE A)**.

Considerando-se que as amilases estejam sendo produzidas, há duas possíveis explicações para a baixa atividade ou a não detecção destas no meio líquido. A primeira, seria a produção de enzimas que ficassem adsorvidas à parede celular do microrganismo ou retidas no espaço periplasmático (cepas Gram negativas), conforme mencionado anteriormente (item 2.). A segunda, seria a produção de enzimas extracelulares e a posterior desnaturação das mesmas, após o término de sua função catalítica, por fatores do próprio metabolismo microbiano, como produção de proteases, ou pela falta estabilidade durante as condições de cultivo (ausência cofatores, temperatura, pH, etc.). Diante disso, fatores como tempo de cultivo, fonte de nitrogênio e alterações provocadas no meio pelo metabolismo microbiano devem ser levados em consideração.

Novos ensaios foram realizados para o estudo do efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases, além do uso de meios líquidos e sólidos à base de resíduos e subprodutos agro-industriais.

5. Efeito do tempo de cultivo na produção de amilases pelas linhagens selecionadas em meios à base de resíduos e subprodutos agro-industriais

Foram testadas nove linhagens, selecionadas na etapa anterior do trabalho, sendo oito bactérias e um fungo, quanto à produção de amilases em fermentação submersa (meio nutriente; meio nutriente-mandioca; resíduo líquido de mandioca; meio nutriente-milho e resíduo líquido de processamento de milho) e semi-sólida (farelo de trigo, farelo de mandioca e

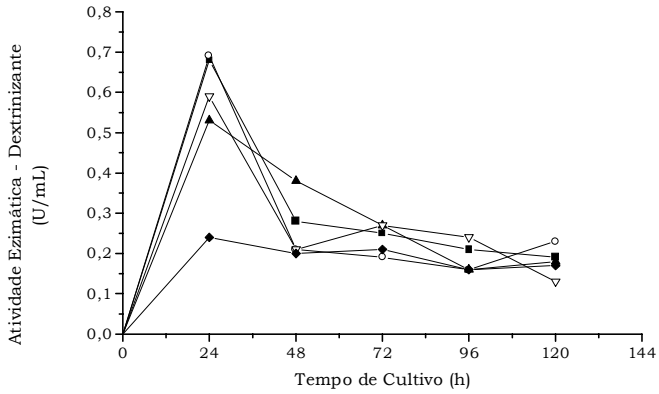
farelo de milho). Os resultados estão apresentados, respectivamente, nos **APÊNDICES B** e **C**, e nas **Figuras 15** a **32**. As análises dos resultados foram realizadas por linhagem e discutidas posteriormente.

5.1. Linhagem bacteriana $A4_1$-b

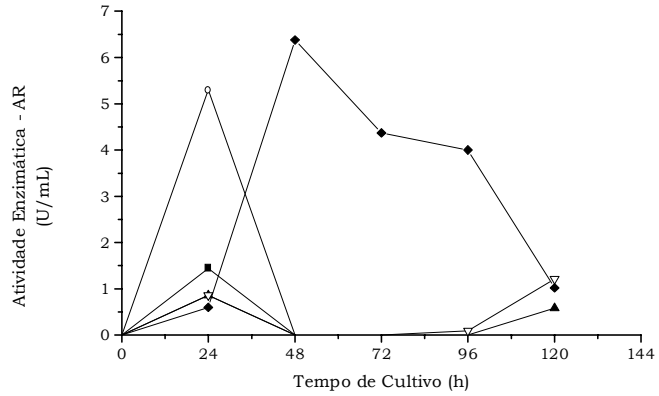
As **Figuras 15** e **16** ilustram, respectivamente, as produções enzimáticas em fermentação submersa e semi-sólida, pela linhagem bacteriana $A4_1$-b. Analisando-se os gráficos da **Figura 15**, pode-se verificar que, quando avaliado pelo método dextrinizante **(Fig. 15 A),** o pico de produção enzimática ocorreu em 24 horas de cultivo, sendo as maiores produções verificadas nos meios nutriente (0,68 U/mL) e nutriente-mandioca (0,69 U/mL). A análise da atividade amilolítica, através da dosagem dos açúcares redutores liberados pela hidrólise enzimática do amido **(Fig.15 B)**, revela que os picos de atividade ocorreram em 24h de cultivo para os meios nutriente, nutriente-mandioca e resíduo líquido de mandioca; em 48 horas para o resíduo líquido de milho e em 120 horas para o meio nutriente-milho, sendo que a maior produção de atividade enzimática ocorreu no resíduo líquido de milho (6,38 U/mL). Quanto à glicoamilase **(Fig. 15 C)**, as maiores produções também foram detectadas durante as primeiras 24 horas nos meios nutriente (0,18 U/mL) e nutriente-mandioca (0,22 U/mL) e em 48 horas no meio nutriente-milho (0,25 U/mL).

Ainda com relação à fermentação submersa, pode-se verificar pelo método dextrinizante que, de modo geral, ocorre um pico de produção enzimática em 24 horas, havendo um declínio gradual na atividade da enzima até 120 horas. Já para a atividade de amilase, avaliada pela liberação de açúcares redutores e glicoamilase, após o pico de produção segue-se uma queda abrupta destas atividades. Em alguns meios, nota-se um novo pico de atividade após 96 horas de cultivo.

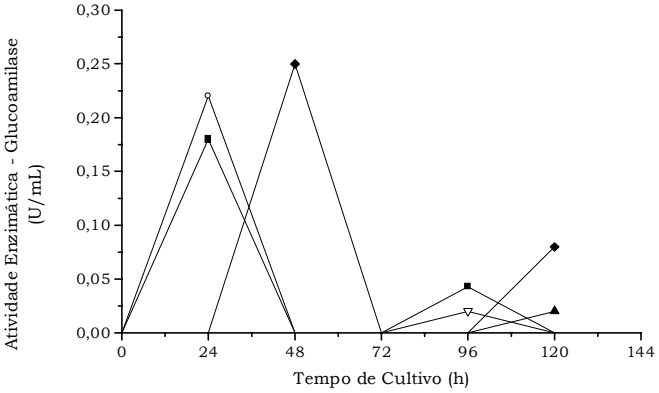
Embora o pico de maior atividade enzimática, determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados, tenha ocorrido em resíduo líquido de milho, em 48 horas de fermentação, sugere-se que o melhor meio



A



B



C

Figura 15 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_1$-b em fermentação submersa. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

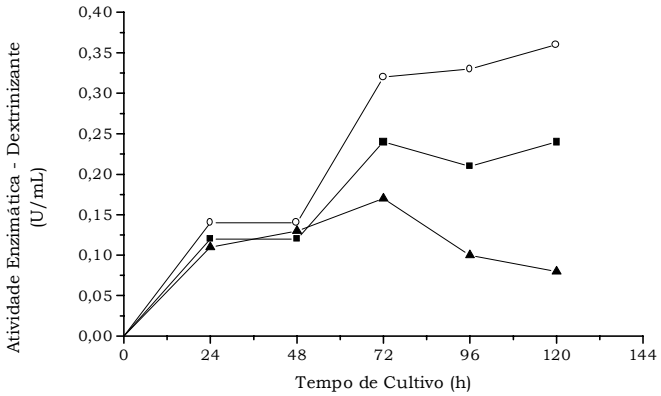
Legenda: —■— meio nutriente; —○— meio nutriente-mandioca; —▲— resíduo líquido de mandioca; —▽— meio nutriente-milho; —◆— resíduo líquido de milho.

para produção de amilases pela linhagem $A4_1$-b, em fermentação submersa, foi o meio nutriente-mandioca, em 24 horas de cultivo, uma vez que foram detectadas atividades enzimáticas pelos três métodos, o que indica a presença de α-amilase, glicoamilase e possivelmente outras enzimas do complexo amilolítico.

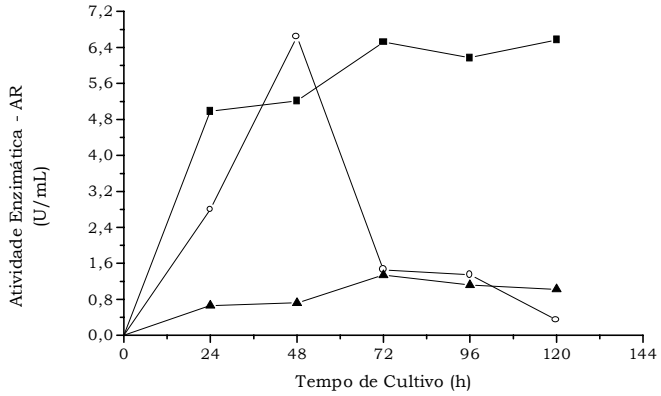
É importante destacar que a linhagem $A4_1$-b apresentou atividade enzimática, avaliada pela liberação de açúcares redutores, bastante alta se comparada às atividades dextrinizante e de glicoamilase. Dado que a linhagem não produziu atividade destas enzimas em grandes quantidades, pode-se supor que houve produção uma β-amilase, com liberação de maltose, ou outra enzima do complexo amilolítico que libere açúcares redutores diferentes da glicose.

A **Figura 16** ilustra a produção enzimática em fermentação semi-sólida, pela linhagem $A4_1$-b. Pode-se verificar que pelo método dextrinizante **(Fig. 16 A)**, os picos de produção de α-amilase aparecem entre 72 e 120 horas, e que o melhor meio de produção foi o farelo de mandioca, com 0,36 U/mL, em 120 horas. Quando expressa em unidades de enzima por grama de substrato inicial usado (peso úmido) tem-se 2,16 U/g. Note-se que a produção de α-amilase por fermentação semi-sólida foi menor que em fermentação submersa. Pelo método de liberação de açúcares redutores **(Fig. 16 B)**, verifica-se que houve uma variação de tempo de produção máxima da enzima entre os meios de cultivo usados, sendo a maior produção obtida na fermentação do farelo de mandioca (6,64 U/mL ou 39,84 U/g) em 48 horas de cultivo, seguida pelo farelo de trigo (6,57 U/mL ou 39,42 U/g) em 72 horas de cultivo. Quanto à glicoamilase **(Fig. 16 C)**, a maior produção foi obtida no farelo de trigo, em 24 horas (0,31 U/mL ou 1,86 U/g). As quantidades desta enzima obtidas por fermentação semi-sólida foram, de modo geral, maiores do que aquelas obtidas em fermentação submersa.

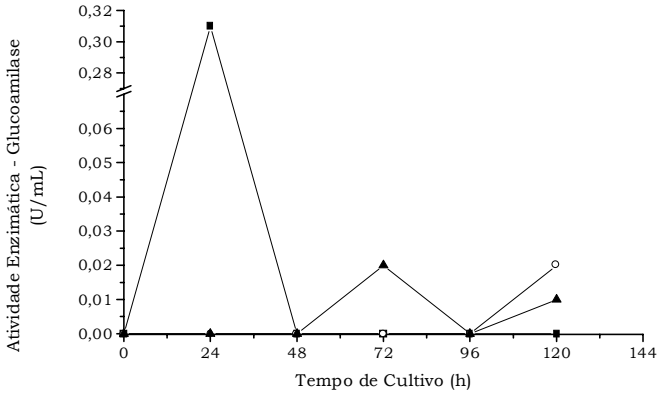
Baseados nos dados apresentados, pode-se sugerir que o melhor meio de produção de amilases pela linhagem $A4_1$-b, em fermentação semi-sólida, foi farelo de trigo, sendo que a produção de glicoamilase foi maior nas primeiras 24 horas de fermentação, enquanto que para a dextrinizante, os picos variaram entre 72 a 120 horas.



A



B



C

Figura 16 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_1$-b em fermentação semi-sólida. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

Legenda: —■— farelo de trigo; —○— farelo de mandioca; —▲— farelo de milho.

5.2. Linhagem bacteriana $A4_4$-f

A **Figura 17** mostra a produção enzimática da linhagem bacteriana $A4_4$-f em fermentação submersa, nos diferentes meios de cultivo.

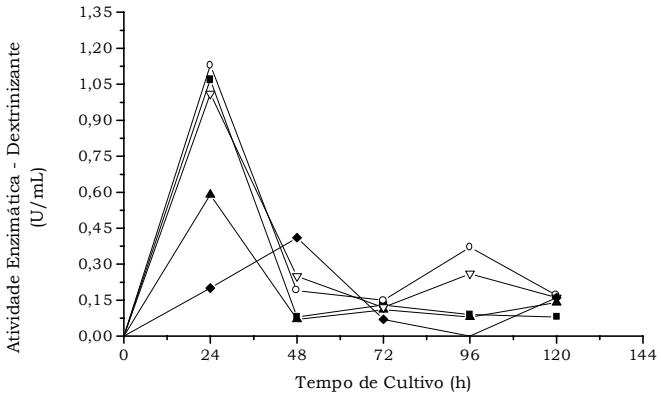
Pelo método dextrinizante **(Fig. 17 A)**, os picos de produção ocorreram em 24 horas de cultivo em todos os meios, excluindo-se o resíduos líquido de milho cujo pico de produção ocorreu em 48 horas de cultivo. As maiores produções foram obtidas nos meios nutriente-mandioca (1,12 U/mL), nutriente (1,07 U/mL) e nutriente-milho (1,0 U/mL).

Quando a atividade enzimática foi determinada pela dosagem dos açúcares redutores liberados **(Fig. 17 B)**, a maior atividade foi determinada em 24 horas de cultivo nos meios nutriente-milho (3,51 U/mL) e nutriente (2,38 U/mL). Quando o meio de fermentação foi o nutriente-mandioca, além do pico de 24 horas (3,56 U/mL), foi obtido um segundo pico de produção após 120 horas de cultivo (4,12 U/mL).

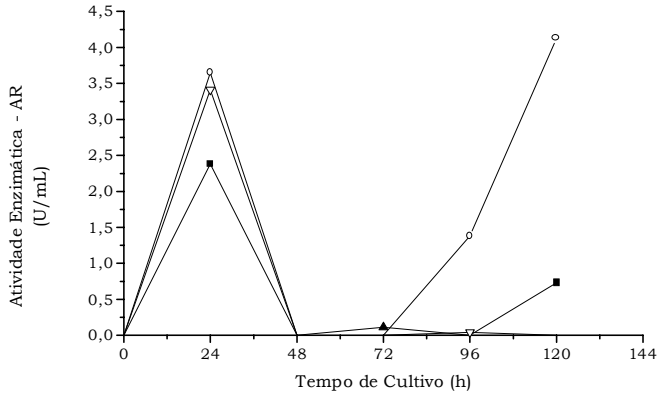
Quanto à atividade de glicoamilase **(Fig. 17 C)**, excluindo-se o resíduo líquido de milho, que deteve a maior produção, com pico em 120 horas de cultivo (0,16 U/mL), os demais meios testados a atividade desta enzima foi detectada apenas em 24 horas de cultivo.

A **Figura 18**, mostra a produção de amilases pela linhagem $A4_4$-f em fermentação semi-sólida. Pode-se verificar que, para a atividade dextrinizante **(Fig. 18 A)**, o maior produção ocorreu em farelo de mandioca em 24 horas de cultivo (1,7 U/mL ou 10,2 U/g), sendo bastante reduzida nos demais meios.

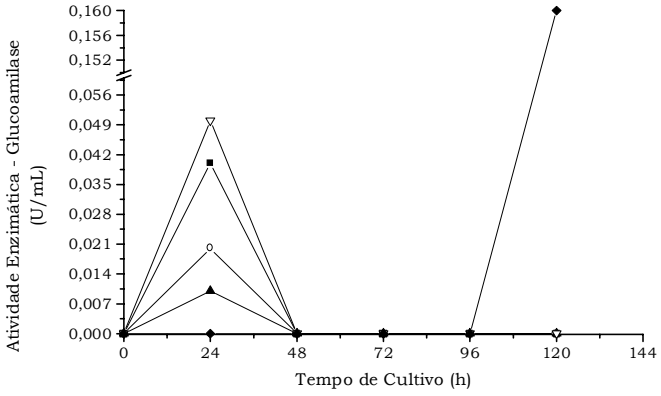
Quando a atividade amilolítica foi determinada pela liberação de açúcares redutores **(Fig. 18 B)**, a maior produção também foi obtida em farelo de mandioca (4,41 U/mL ou 26,46 U/g), em 24 horas. Em farelo de trigo verificou-se atividade apenas em 120 horas de cultivo (0,3 U/mL ou 1,8 U/g) e no farelo de milho, foram observados dois picos, sendo um em 24 horas (0,57 U/mL ou 3,42 U/g) e outro em 96 horas (0,77 U/mL ou 4,62 U/g).



A



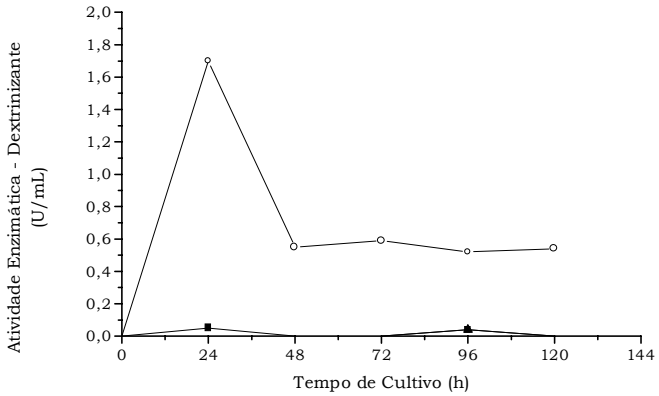
B



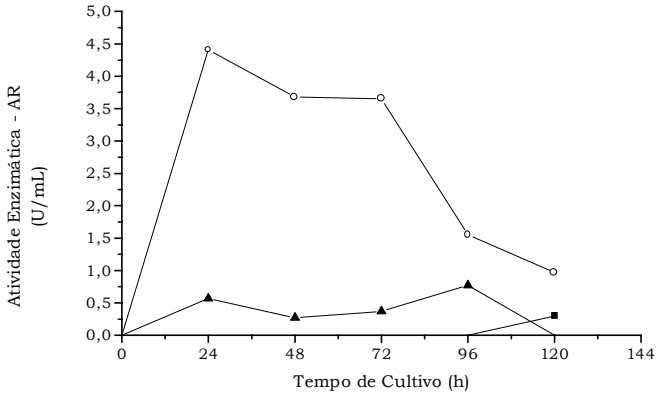
C

Figura 17 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_4$-f em fermentação submersa. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

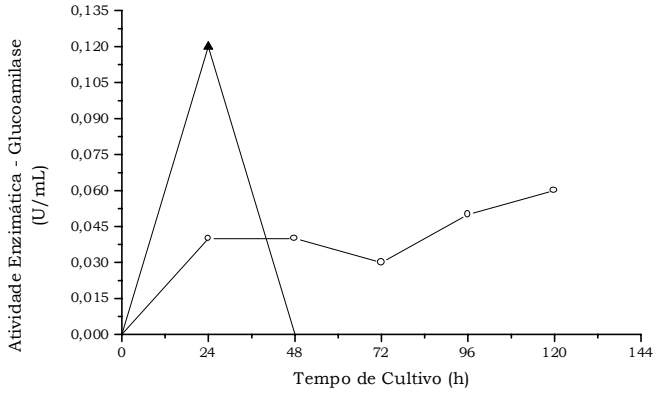
Legenda: —■— meio nutriente; —○— meio nutriente-mandioca; —▲— resíduo líquido de mandioca; —▽— meio nutriente-milho; —◆— resíduo líquido de milho.



A



B



C

Figura 18 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_4$-f em fermentação semi-sólida. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

Legenda: —■— farelo de trigo; —○— farelo de mandioca; —▲— farelo de milho.

Quanto à atividade de glicoamilase **(Fig. 18 C)**, a maior produção foi verificada no farelo de milho, em 24 horas de cultivo (0,12 U/mL), não sendo detectada nos demais tempos analisados. Em farelo de mandioca foram detectadas atividade em todos os tempos analisados, com pico em 120 horas (0,06 U/mL).

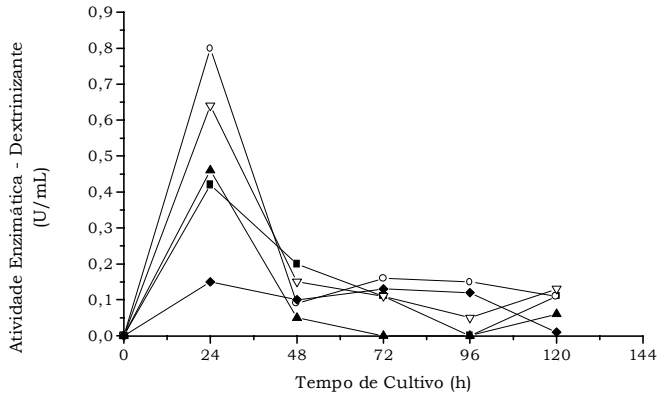
Os dados indicaram que o melhor meio para produção de amilases pela linhagem $A4_4$-f em fermentação submersa foi o meio nutriente-mandioca, em 24 horas de cultivo e para fermentação semi-sólida, o melhor substrato foi o farelo de mandioca, também em 24 horas de cultivo.

5.3. Linhagem bacteriana $A4_4$-i

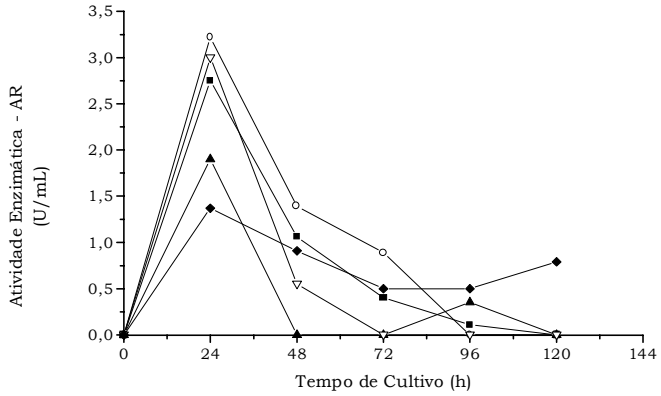
Na **Figura 19** é mostrada a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_4$-i em fermentação submersa, nos diferentes meios de cultivo.

Para a atividade dextrinizante **(Fig. 19 A)** e àquela medida pela liberação de açúcares redutores **(Fig. 19 B)**, os picos de produção em todos os meios ocorreram em 24 horas, sendo as maiores atividades obtidas no meio nutriente-mandioca, cujas produções foram de 0,80 e 3,22 U/mL, respectivamente.

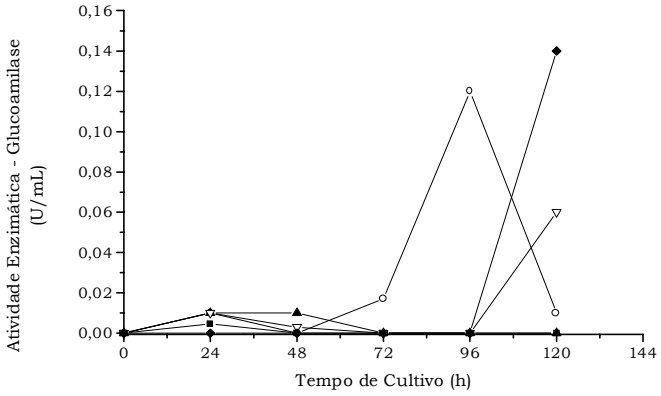
Conforme mostrado na **Figura 19 C,** a atividade de glicoamilase foi máxima em 96 de cultivo em meio nutriente-mandioca e em 120 horas, em meio nutriente milho e de resíduo líquido de milho, sendo a maior produção obtida neste último (0,14 U/mL).



A



B



C

Figura 19 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_4$-i em fermentação submersa. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

Legenda: —■— meio nutriente; —○— meio nutriente-mandioca; —▲— resíduo líquido de mandioca; —▽— meio nutriente-milho; —◆— resíduo líquido de milho.

A **Figura 20** mostra as produções de amilases pela linhagem $A4_4$-i nos diferentes meios, em fermentação sólida.

Pode-se verificar que para a atividade dextrinizante **(Fig. 20 A)**, o melhor tempo de produção foi 48 horas, quando foi utilizado como substrato o farelo de trigo (0,42 U/mL ou 2,52 U/g) e farelo de mandioca (0,23 U/mL ou 1,38 U/g), e 24 horas quando o meio de fermentação foi composto de farelo de milho (0,13 U/mL ou 0,78 U/g).

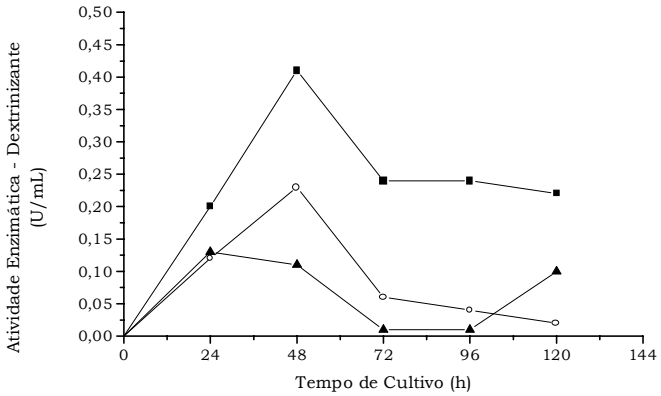
Os teores de açúcares redutores liberados pela hidrólise enzimática do amido **(Fig. 20 B)**, indicam que o farelo de trigo proporcionou alta produção de amilases quando comparado aos demais meios, com pico de produção obtido em 72 horas (15,93 U/mL ou 95,58 U/g), sendo observada uma queda na atividade após esse período.

Nos demais meios, a enzima foi detectada em todos os tempos analisados, sendo as maiores produções obtidas em 24 horas de cultivo no farelo de milho (1,11 U/mL ou 6,66 U/g) e em 120 horas no farelo de mandioca (0,95 U/mL ou 5,7 U/g).

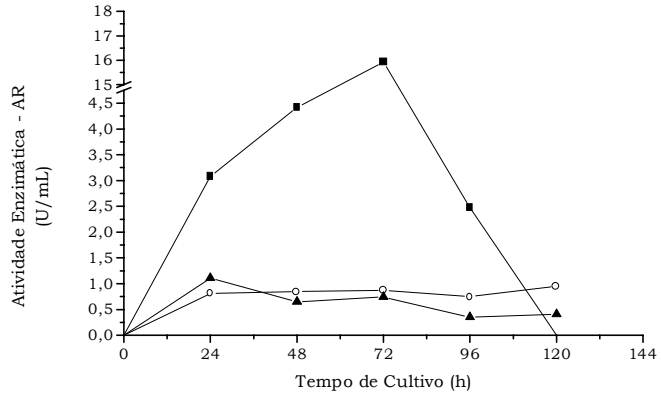
A produção de glicoamilase **(Fig. 20 C)** só foi detectada nos farelos de milho e mandioca, com maior produção no primeiro, após 96 horas de cultivo (0,19 U/mL ou 1,14 U/g).

Da mesma forma que o observado para a linhagem $A4_1$-b, a alta atividade enzimática, estimada pela liberação de açúcares redutores, e as atividades relativamente baixas de α-amilase e glicoamilase sugerem a presença de β-amilase ou outra enzima do complexo amilolítico capaz de liberar açúcares redutores diferentes da glicose.

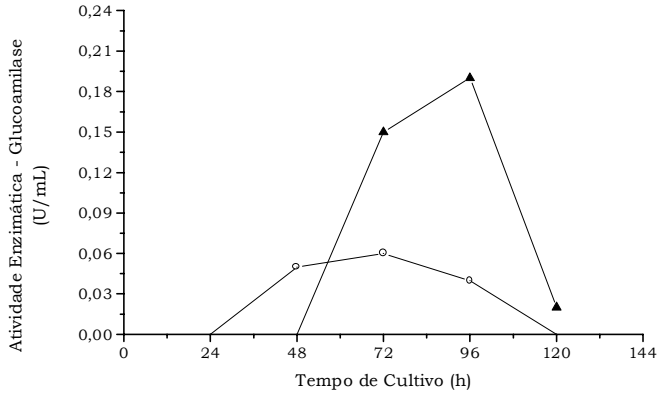
Os dados mostrados sugerem que o melhor meio de cultivo para fermentação submersa foi o nutriente-mandioca, em 24 horas, e para fermentação semi-sólida foi farelo de trigo, em períodos de 48 a 96 horas.



A



B



C

Figura 20 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_4$-i em fermentação semi-sólida. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

Legenda: —■— farelo de trigo; —○— farelo de mandioca; —▲— farelo de milho.

5.4. Linhagem bacteriana $A4_5$-2

A **Figura 21** representa a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_5$-2 em fermentação submersa, nos diferentes meios de cultivo. A produção de α-amilase, determinada pelo método dextrinizante, **(Fig. 21 A)** atingiu o valor máximo em 24 horas nos meios nutriente-mandioca, nutriente-milho e resíduo líquido de mandioca, em 48 horas no meio nutriente e em 72 horas em resíduo líquido de milho. Os valores de atividade foram muito próximos entre si (máximo de 0,62 U/mL, no meio nutriente), com exceção do resíduo líquido de milho, no qual foi determinada cerca da metade da atividade dos demais meios. Quando a atividade enzimática foi dosada pela quantificação dos açúcares redutores liberados após incubação com amido **(Fig. 21 B)**, observou-se um perfil de atividade, em função do tempo de fermentação, semelhante ao da dextrinizante **(Fig. 21 A)** para os meios nutriente, nutriente mandioca e nutriente-milho.

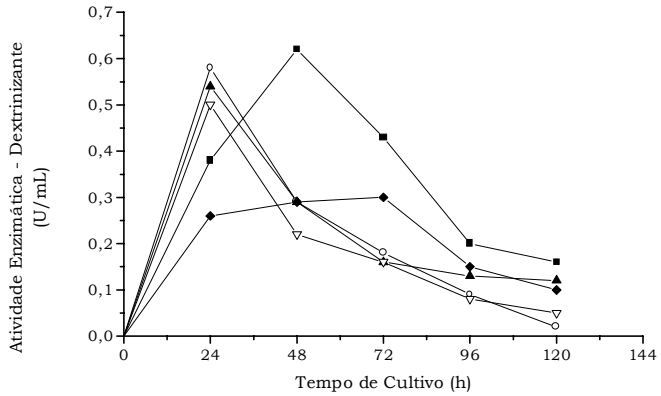
A maior produção foi obtida no resíduo líquido de milho, cujo pico de atividade enzimática ocorreu em 24 horas de cultivo (3,09 U/mL).

O pico de produção de glicoamilase **(Fig. 21 C)** ocorreu no resíduo líquido de milho, em 72 horas de cultivo (0,38 U/mL). Nos demais meios, a atividade desta enzima foi bastante reduzida.

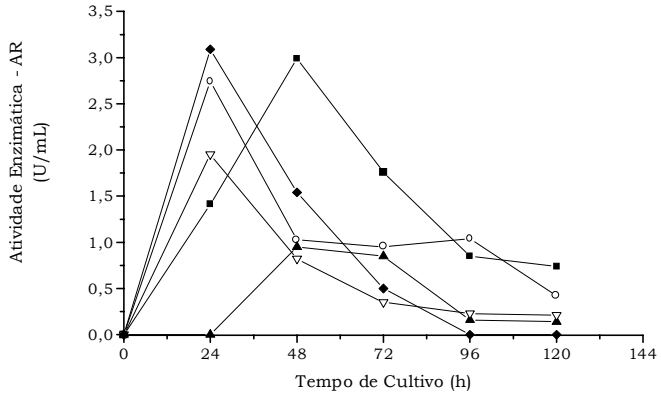
A **Figura 22**, mostra os resultados das produções de amilases pela linhagem $A4_5$-2, em fermentação semi-sólida. Observa-se que a maior produção de α-amilase ocorreu em meio à base de farelo de trigo, cujo pico de produção ocorreu em 72 horas (0,59 U/mL ou 3,54 U/g), sendo este mantido até 96 horas **(Fig. 22 A)**.

A produção máxima de amilase capaz de liberar açúcares redutores **(Fig. 22 B)** foi obtida também em farelo de trigo (5,73 U/mL ou 34,32 U/g), em 72 horas, seguida pelo farelo de milho com produção de 5,46 U/mL (27,12 U/g), em 24 horas.

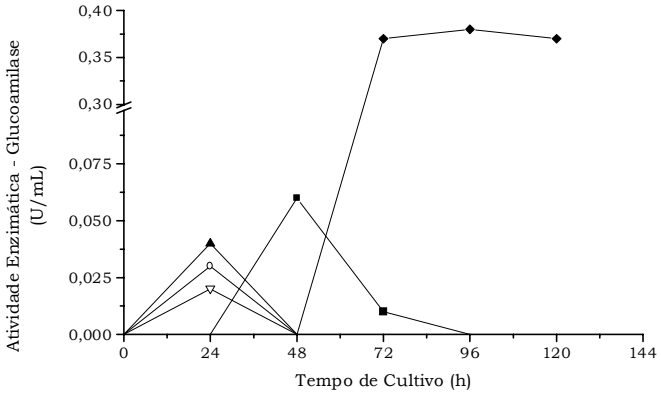
A atividade de glicoamilase **(Fig. 22 C)** foi detectada em baixas quantidades apenas no farelo de trigo, cujo pico de produção (0,07 U/mL) foi obtido em 72 horas de cultivo.



A



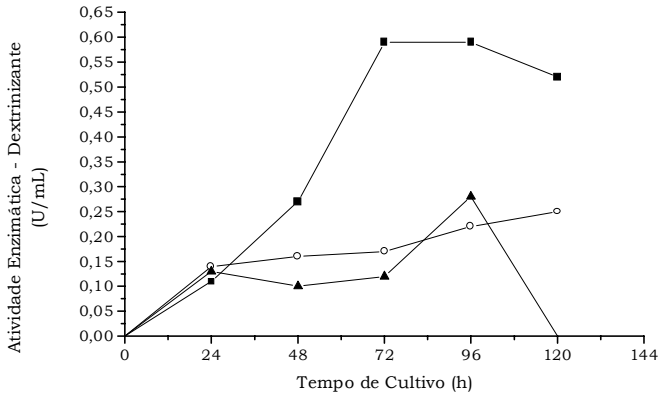
B



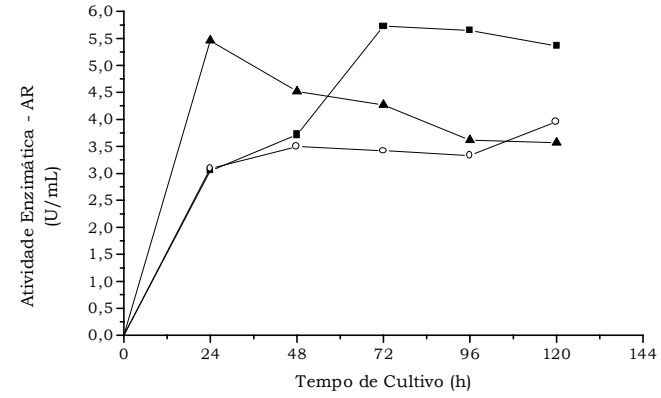
C

Figura 21 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_5$-2 em fermentação submersa. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

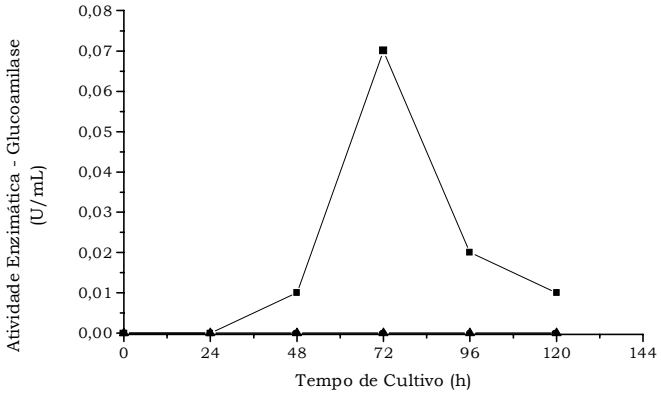
Legenda: —■— meio nutriente; —○— meio nutriente-mandioca; —▲— resíduo líquido de mandioca; —▽— meio nutriente-milho; —◆— resíduo líquido de milho.



A



B



C

Figura 22 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_5$-2 em fermentação semi-sólida. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

Legenda: —■— farelo de trigo; —○— farelo de mandioca; —▲— farelo de milho.

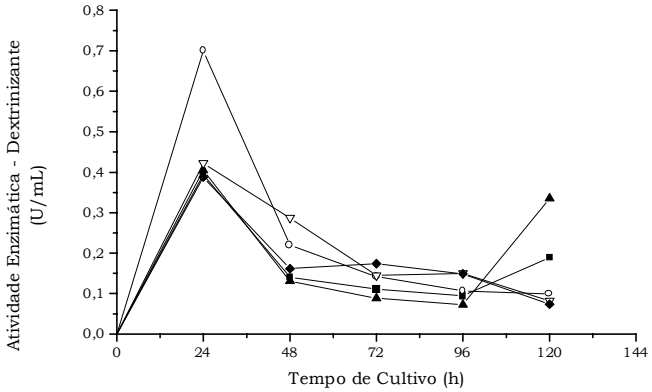
Diante do exposto, pode-se inferir que, para fermentação submersa, o meio nutriente foi o melhor meio para a produção de amilases pela linhagem $A4_5$-2, em 24 horas de cultivo, embora o resíduos líquido de milho tenha detido a maior atividade de glicoamilase. Para fermentação semi-sólida, as maiores produções foram obtidas em farelo de trigo, em 72 horas de cultivo.

5.5. Linhagem bacteriana $A4_7$-1

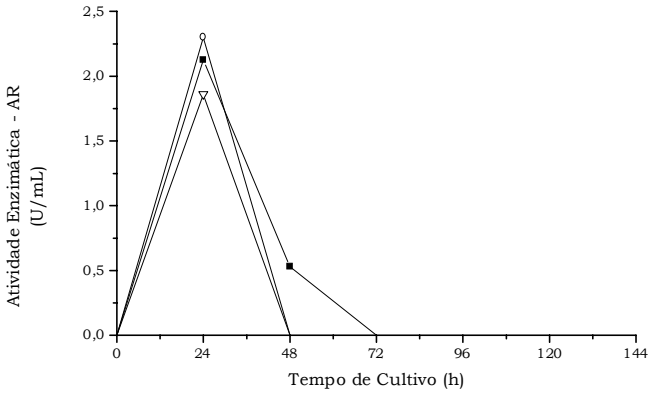
As **Figuras 23** e **24** ilustram as produções de amilases em fermentações submersa e semi-sólida, respectivamente, pela linhagem bacteriana $A4_7$-1. Analisando-se os dados da **Figura 23**, pode-se verificar que, para as atividades dextrinizante **(Fig. 23 A)** e àquela medida pela liberação de açúcares redutores **(Fig. 23 B),** os picos de produção das enzimas ocorreram em 24 horas de cultivo para todos os meios, sendo as maiores produções verificadas no meio nutriente-mandioca (0,70 U/mL, para atividade dextrinizante e 2,3 U/mL, pela liberação de açúcares redutores). A atividade de glicoamilase foi muito baixa em todos os meios testados **(Fig. 23 C)**, sendo que a maior produção (0,07 U/mL) foi obtida em resíduo líquido de milho, em 120 horas de cultivo.

Na **Figura 24** estão apresentados os dados da produção de amilases em fermentação semi-sólida. Pelo método dextrinizante **(Fig. 24 A)**, em todos os meios de cultivo, nota-se que o pico de produção ocorreu em 24 horas, sendo que o maior valor de atividade foi obtido em farelo de trigo (0,33 U/mL ou 1,98 U/g).

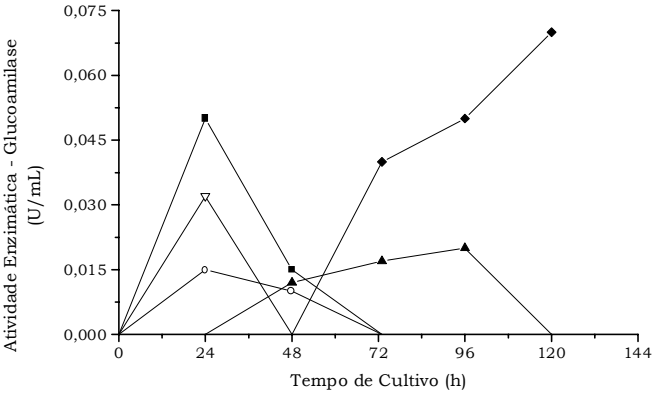
Através da avaliação da atividade enzimática pela quantificação do açúcares redutores liberados **(Fig. 24 B)**, verifica-se que houve variação do tempo de produção máxima entre os meios de cultivo, sendo a maior produção observada no meio de farelo de mandioca (1,34 U/mL ou 8,04 U/g), em 72 horas, seguida daquela detectada em meio de farelo de milho (1,16 U/mL ou 6,96 U/g), em 48 horas. Quanto à glicoamilase **(Fig. 24 C)**, a maior produção ocorreu em farelo de mandioca, em 24 horas (0,12 U/mL ou 0,69 U/g).



A



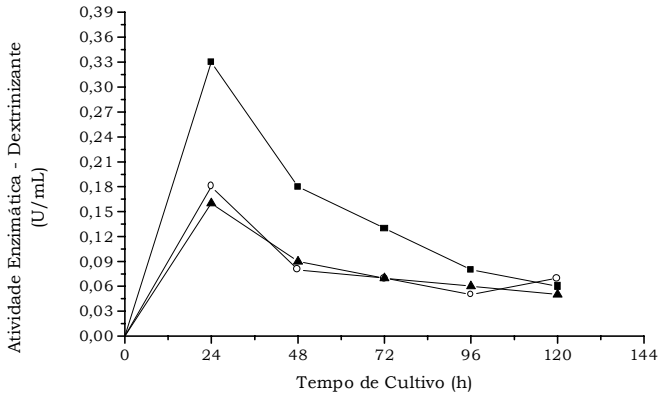
B



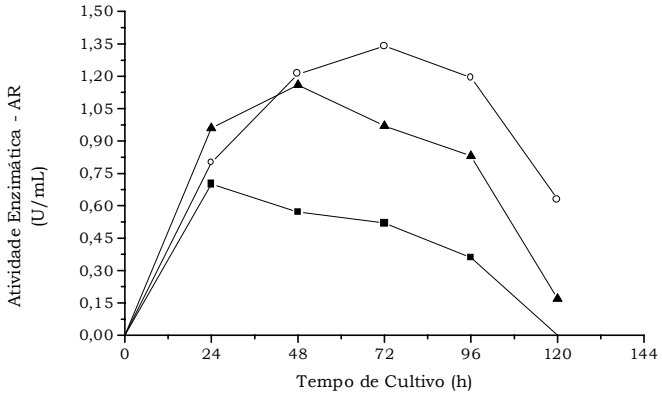
C

Figura 23 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana $A4_7$-1 em fermentação submersa. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

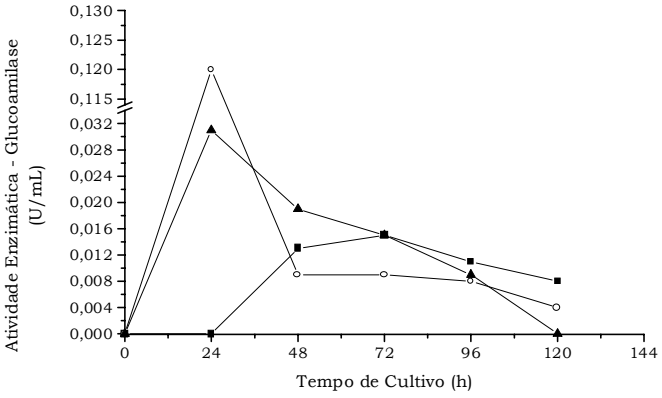
Legenda: —■— meio nutriente; —○— meio nutriente-mandioca; —▲— resíduo líquido de mandioca; —▽— meio nutriente-milho; —◆— resíduo líquido de milho.



A



B



C

Figura 24 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana A4$_7$-1 em fermentação semi-sólida. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

Legenda: —■— farelo de trigo; —○— farelo de mandioca; —▲— farelo de milho.

Verifica-se, diante do exposto, que quando utilizada a linhagem $A4_7$-1, o melhor meio para fermentação submersa foi o nutriente mandioca e em fermentação semi-sólida, o farelo de mandioca, em períodos de 24 a 48 horas, uma vez que em tais meios foram detectadas atividades pelos três ensaios realizados. É importante ressaltar que a linhagem em questão cresceu bem a 60°C.

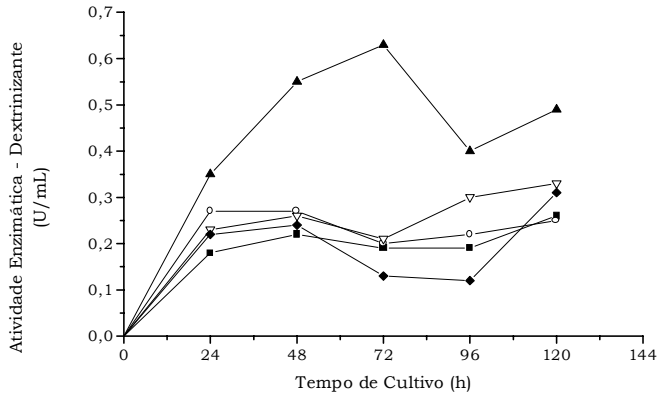
5.6. Linhagem bacteriana A11-4

As **Figuras 25** e **26** ilustram, respectivamente, as produções de amilases pela linhagem bacteriana A11-4 em fermentação submersa e semi-sólida. Analisando-se a **Figura 25 A**, verifica-se que o perfil de produção de α-amilase foi muito semelhante nos diferentes meios, excluindo-se o resíduo líquido de mandioca. O pico de produção (0,63 U/mL) ocorreu em 72 horas de cultivo no resíduo líquido de mandioca, sendo esta produção bem maior que a apresentada nos demais meios.

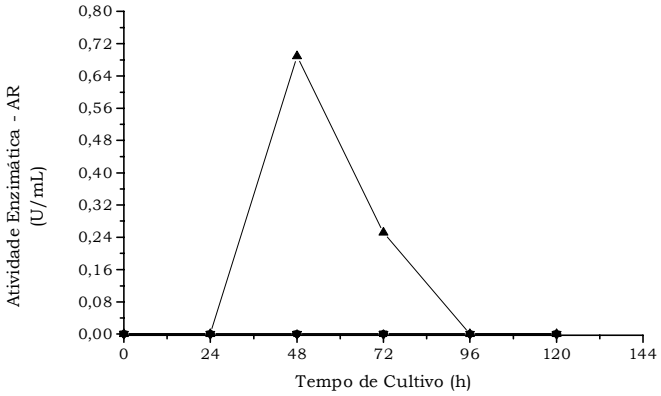
Através das avaliações da atividade enzimática pela quantificação do açúcares redutores liberados pela ação enzimática sobre a molécula de amido **(Fig. 25 B)** e da atividade de glicoamilase **(Fig. 25 C)**, verifica-se que somente o resíduo líquido de mandioca apresentou atividade destas enzimas, sendo os picos obtidos em 48 (0,69 U/mL) e 72 horas de fermentação (0,07 U/mL), respectivamente.

Na **Figura 26**, estão apresentadas as produções de enzimas amilolíticas pela linhagem A11-4 em fermentação semi-sólida. Analisando-se os dados, verifica-se que a maior produção de α-amilase foi obtida em farelo de trigo (0,59 U/mL ou 3,54 U/g) em 96 horas de cultivo. Nos farelos de mandioca e milho, os picos de produção máxima ocorreram em 96 (0,20 U/mL ou 0,66 U/g) e 120 horas (0,18 U/mL ou 1,11 U/g), respectivamente.

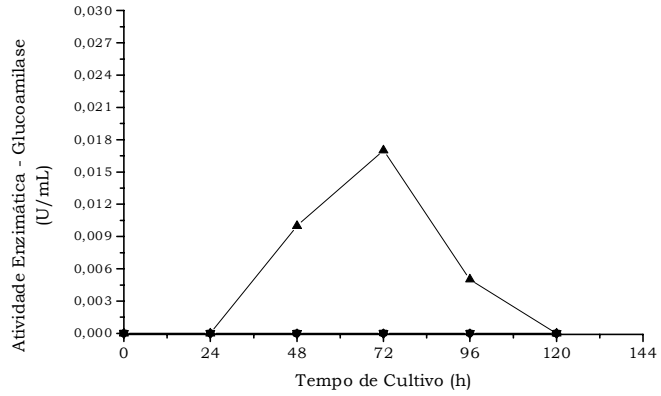
A produção máxima de amilase, analisada pelos teores de açúcares redutores liberados **(Fig. 26 B)**, ocorreu em 48 horas de fermentação em farelo de milho, a 72 horas em farelo de mandioca e em 120 horas, em farelo de trigo, sendo produção máxima obtida neste último (1,94 U/mL ou 11,64 U/g).



A



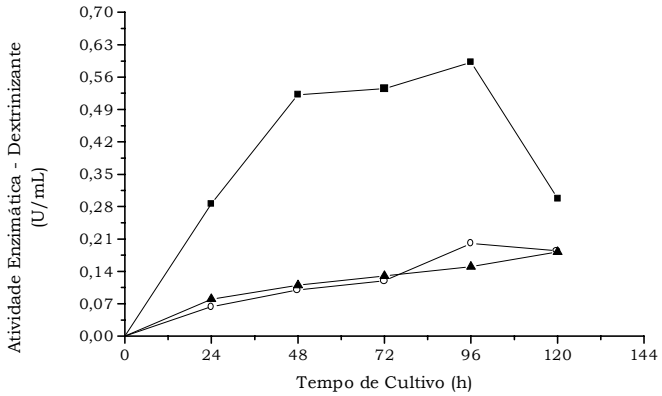
B



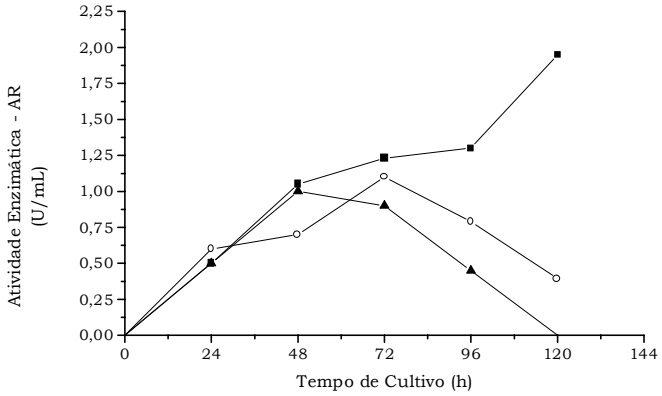
C

Figura 25 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana A11-4 em fermentação submersa. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

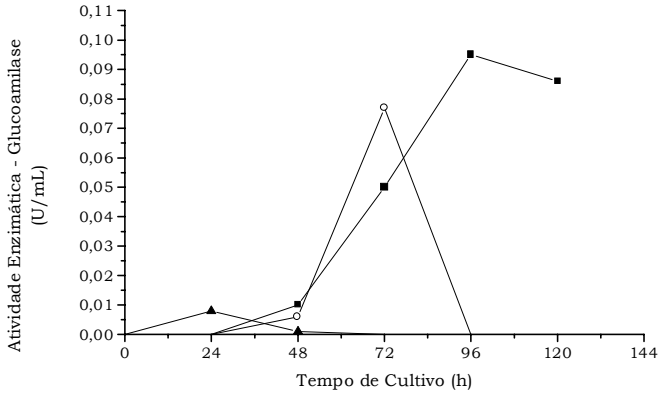
Legenda: —■— meio nutriente; —○— meio nutriente-mandioca; —▲— resíduo líquido de mandioca; —▽— meio nutriente-milho; —◆— resíduo líquido de milho.



A



B



C

Figura 26 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana A11-4 em fermentação semi-sólida. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

Legenda: —■— farelo de trigo; —○— farelo de mandioca; —▲— farelo de milho.

A linhagem apresentou atividade de glicoamilase baixa em todos os meios testados **(Fig. 26 C)**.

Portanto, o melhor meio para fermentação submersa foi o resíduo líquido de mandioca, em períodos de 48 a 96 horas de incubação. Para fermentação semi-sólida, o farelo de trigo foi considerado melhor o meio para produção de amilases pela linhagem em questão, em cultivos de 96 a 120 horas, visto que apresentou as maiores atividades para as enzimas testadas.

5.7. Linhagem bacteriana A13-8

As produções de amilases pela linhagem bacteriana A13-8, em fermentação submersa e semi-sólida, são apresentadas nas **Figuras 27** e **28**, respectivamente.

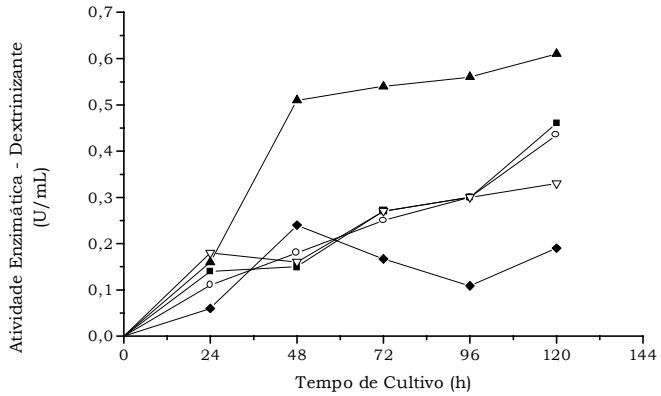
Em fermentação submersa, verifica-se que a atividade enzimática dextrinizante **(Fig. 27 A)** foi detectada em todos os meios, com picos máximos em 120 horas de cultivo, exceto no resíduo líquido de milho, cujo pico de atividade foi obtido em 48 horas. A maior produção (0,61 U/mL) foi obtida em meio de resíduo de mandioca, em 120 horas de fermentação.

A avaliação da atividade amilolítica pela liberação de açúcares redutores **(Fig. 27 B)** revelou que a maior atividade foi obtida em resíduo líquido de mandioca (1,45 U/mL), em 48 horas. Os meios nutriente e nutriente-mandioca apresentaram picos de atividade em 72 e 48 horas, respectivamente. No meio nutriente-milho e no resíduo líquido de milho, não foram detectadas atividades enzimáticas por este método.

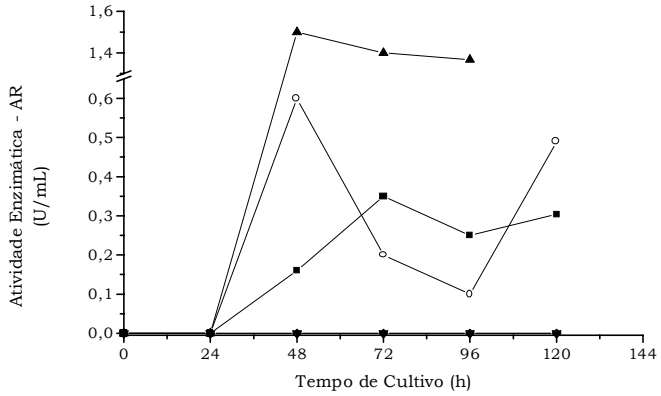
Através da **Figura 27 C**, nota-se que as maiores atividades de glicoamilase foram obtidas nos meios nutriente e nutriente-mandioca (0,19 e 0,11 U/mL, respectivamente), ambas em 96 horas de cultivo.

Assim, conclui-se que o resíduo líquido de mandioca foi o melhor meio para produção de amilases, em períodos de 48 a 120, por ter apresentado atividade pelos três métodos analisados

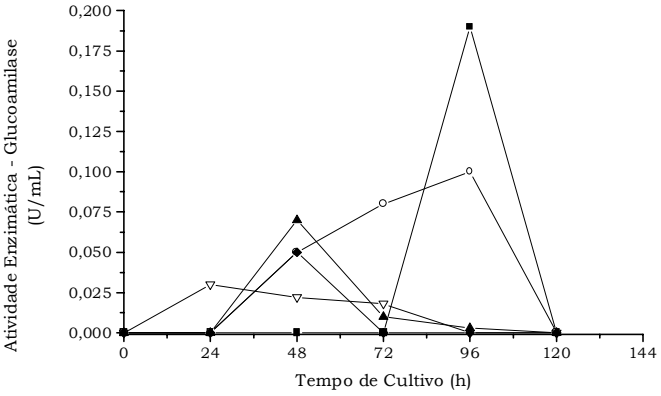
A **Figura 28** mostra a produção de amilase em fermentação semi-sólida, pela linhagem A13-8.



A



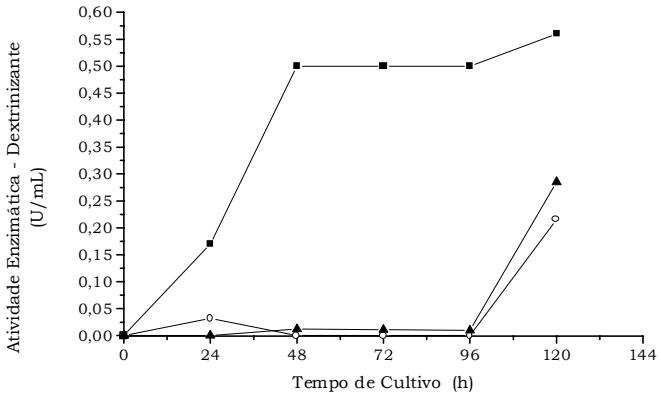
B



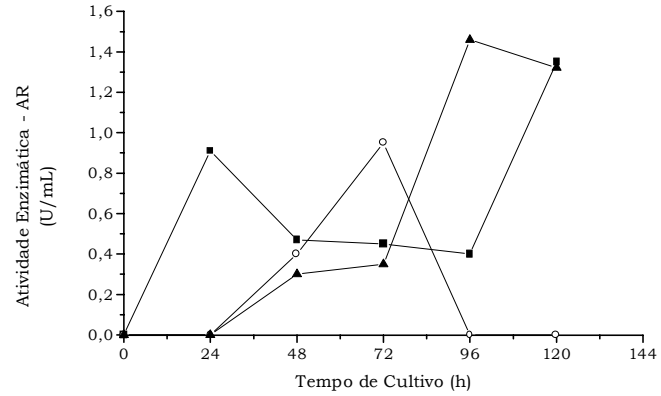
C

Figura 27 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana A13-8 em fermentação submersa. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

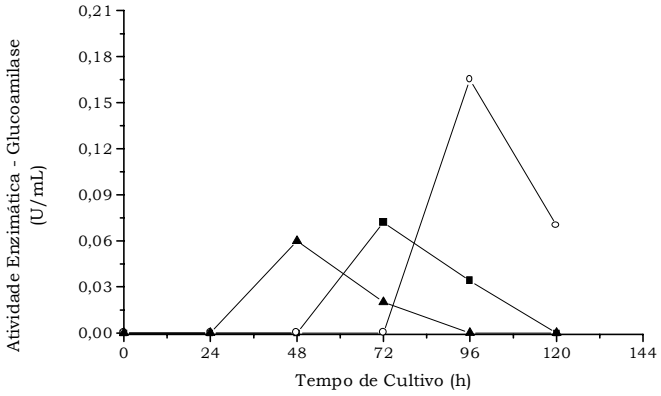
Legenda: —■— meio nutriente; —○— meio nutriente-mandioca; —▲— resíduo líquido de mandioca; —▽— meio nutriente-milho; —◆— resíduo líquido de milho.



A



B



C

Figura 28 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana A13-8 em fermentação semi-sólida. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

Legenda: —■— farelo de trigo; —○— farelo de mandioca; —▲— farelo de milho.

Analisando-se a **Figura 28 A**, verifica-se que em todos os meios, o melhor tempo de produção da α-amilase foi de 120 horas, sendo o valor máximo de atividade produção obtida em farelo de trigo (0,56 U/mL ou 3,36 U/g). Nota-se que em meio de farelo de trigo foi obtida considerável produção da enzima em 48 horas. Quando a atividade enzimática foi avaliada pela liberação de açúcares redutores **(Fig. 28 B)** notou-se que, nos diferentes meios, os picos ocorreram entre 72 e 120 horas. A maior produção foi obtida em farelo de milho (1,46 U/mL ou 8,76 U/g), em 96 horas de cultivo.

Quanto à glicoamilase **(Fig. 28 C)**, o pico de produção foi observado no farelo de mandioca (0,16 U/mL ou 0,96 U/g), em 96 horas de cultivo.

Baseados nos dados expostos, sugere-se que o farelo de trigo foi o melhor substrato para produção de amilases pela linhagem A13-8, em períodos de 48 a 120 horas de cultivo, em fermentação semi-sólida.

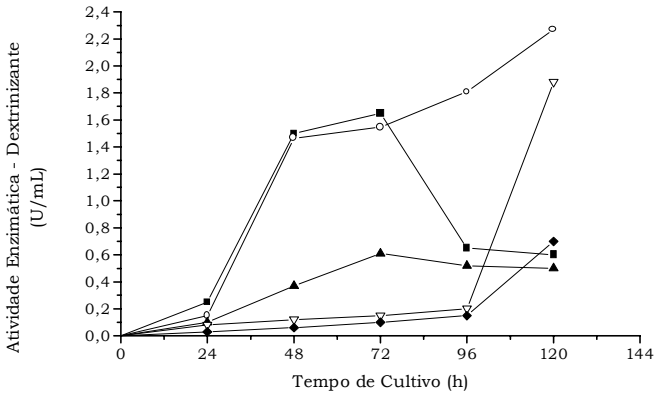
5.8. Linhagem bacteriana A13-22

As **Figuras 29** e **30** mostram, respectivamente, as produções enzimáticas em fermentação submersa e semi-sólida, pela linhagem bacteriana A13-22.

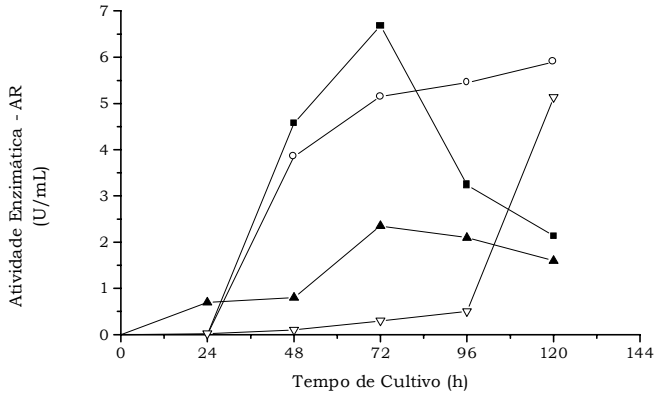
Analisando-se a **Figura 29** pode-se verificar que, pelos três métodos analisados, nos meios nutriente e resíduo líquido de mandioca a linhagem apresentou pico de produção de enzima em 72 horas de cultivo, enquanto que nos demais meios apresentou pico de produção em 120 horas. O meio em que houve maior produção de amilases correspondeu ao meio nutriente-mandioca, com 2,27 U/mL, em 120 horas de cultivo **(Fig. 29 A)**.

A atividade de amilase determinada pela liberação de açúcares redutores **(Fig. 29 B)** foi maior em meio nutriente (6,68 U/mL), em 72 horas de cultivo, seguido pelo meio nutriente-mandioca, com produção de 5,90 U/mL, em 120 horas.

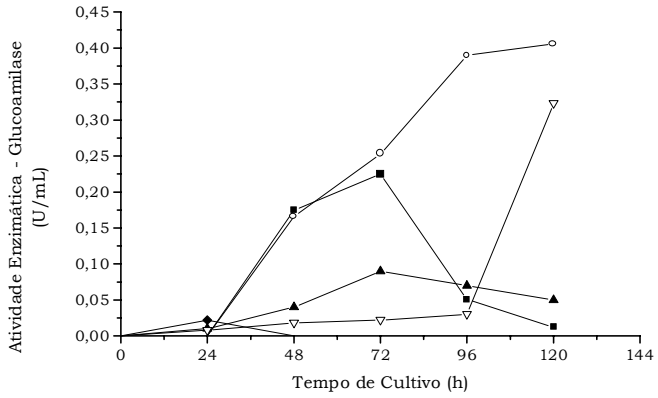
A produção de glicoamilase pela linhagem A13-22 **(Fig. 29 C)** foi maior do que aquela apresentada por todas as linhagens testadas, sendo obtidas 0,41 e 0,32 U/mL, respectivamente, nos meios nutriente mandioca e



A



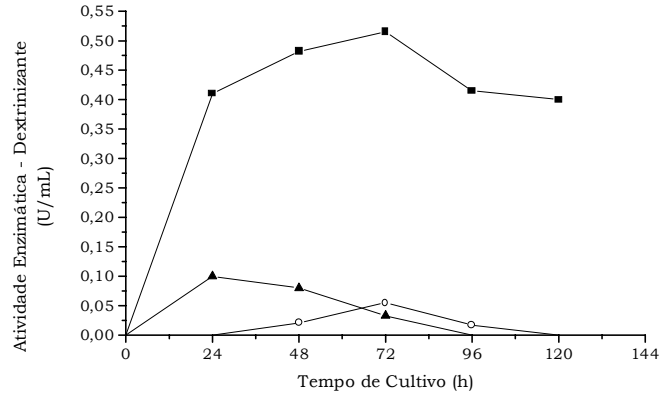
B



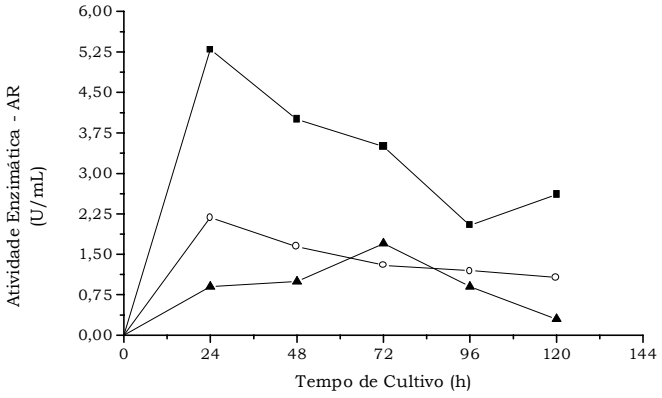
C

Figura 29 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana A13-22 em fermentação submersa. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

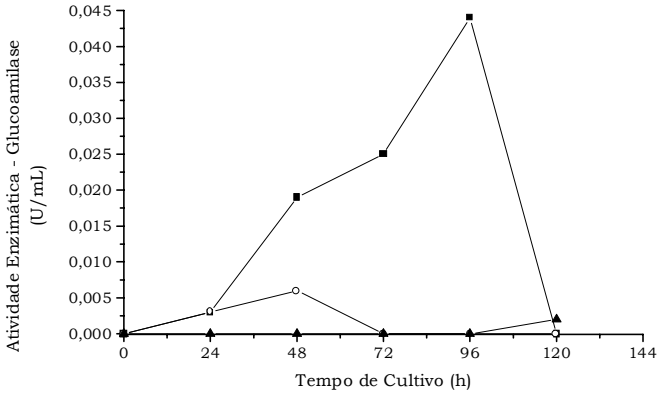
Legenda: —■— meio nutriente; —○— meio nutriente-mandioca; —▲— resíduo líquido de mandioca; —▽— meio nutriente-milho; —◆— resíduo líquido de milho.



A



B



C

Figura 30 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana A13-22 em fermentação semi-sólida. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

Legenda: —■— farelo de trigo; —○— farelo de mandioca; —▲— farelo de milho.

nutriente milho, ambos em 120 horas de cultivo. É interessante notar que o perfil de atividade apresentados pelos diferentes meios foi semelhante nos três métodos de análise, sugerindo que as amilases detectadas nos diferentes ensaios estão sendo sintetizadas simultaneamente pela linhagem.

Os resultados expostos indicam que o meio nutriente-mandioca foi o mais adequado para produção das amilases, em 120 horas, uma vez que foram detectadas atividades pelos três métodos analisados.A **Figura 30** ilustra os resultados da produção enzimática pela linhagem A13-22 em fermentação semi-sólida. As maiores produções de α-amilase **(Fig. 30 A)** foram obtidas em farelo de trigo, cujo pico de atividade foi obtido em 72 horas de fermentação (0,52 U/mL ou 3,12 U/g).

A atividade de amilase, avaliada pela liberação de açúcares redutores **(Fig. 30 B),** apresentou picos em 24 horas de cultivo, em farelo de trigo (5,30 U/mL ou 31,8 U/g) e farelo de mandioca (2,17 U/mL ou 13,02 U/g) e em 72 horas, para o farelo de milho (1,67 U/mL ou 10,02 U/g).

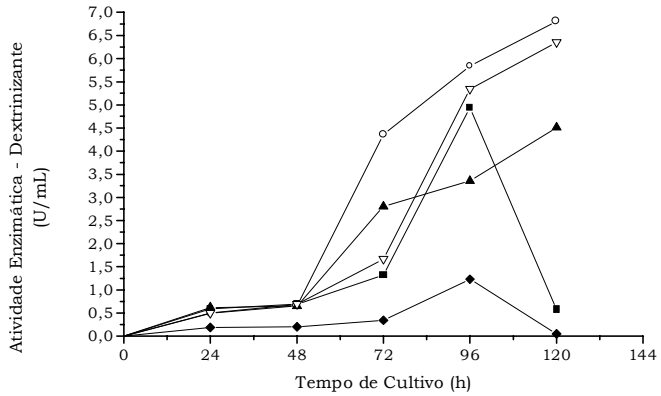
Em todos os meios testados a atividade de glicoamilase **(Fig. 30 C)** foi muito baixa.

Acredita-se que o farelo de trigo foi o melhor substrato para a fermentação semi-sólida, em 120 horas de cultivo.

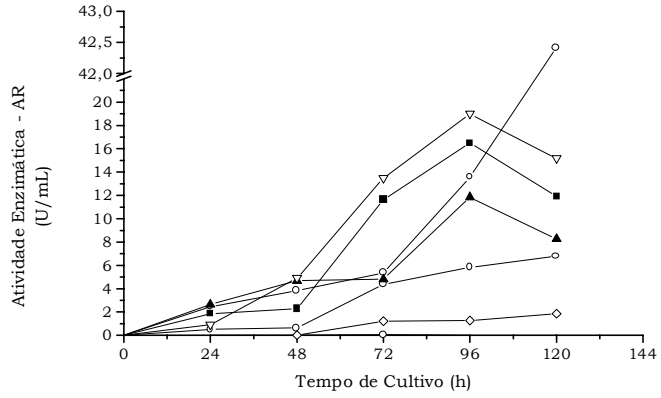
5.9. Linhagem fúngica A13-36

Entre as linhagens selecionadas, apenas a linhagem A13-36 consistiu de fungo filamentoso. As produções de amilases por esta linhagem em fermentação submersa e semi-sólida são apresentadas nas **Figuras 31** e **32**, respectivamente.

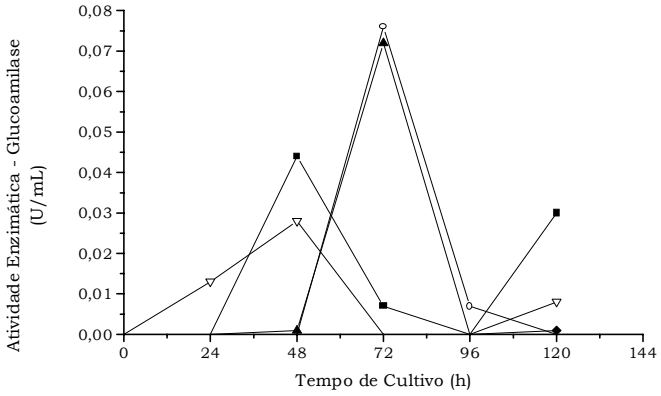
Analisando-se os gráficos da **Figura 31**, pode-se verificar que, pelo método dextrinizante **(Fig. 31 A)**, a maior produção de α-amilase ocorreu no meio nutriente-mandioca (6,8 U/mL), seguida pelo nutriente-milho (6,35 U/mL), em 120 horas de fermentação.



A



B



C

Figura 31 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem bacteriana A13-36 em fermentação submersa. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

Legenda: —■— meio nutriente; —○— meio nutriente-mandioca; —▲— resíduo líquido de mandioca; —▽— meio nutriente-milho; —◆— resíduo líquido de milho.

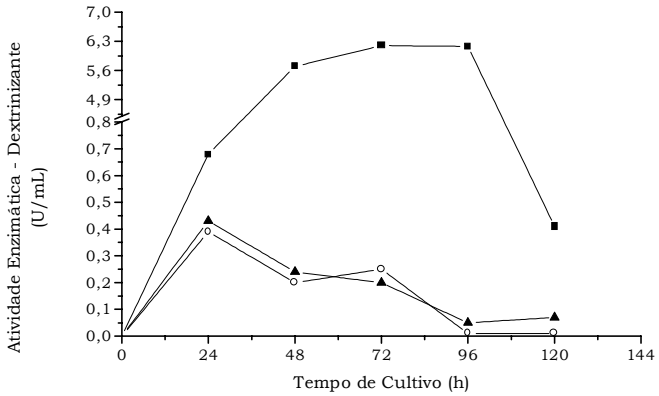
Pelo método de liberação de açúcares redutores **(Fig. 31 B)**, o pico de produção ocorreu em 96 horas de cultivo nos meios nutriente, nutriente-mandioca e resíduo líquido de mandioca, enquanto que em meio nutriente-milho foi detectado pico de produção em 120 horas de cultivo.

O meio nutriente-mandioca foi o que apresentou maior atividade de enzima amilolítica por esse método (42,42 U/mL), seguido pelos meios nutriente-milho (19 U/mL) e nutriente (16,5 U/mL). A linhagem em questão produziu atividade de glicoamilase muito baixa **(Fig. 31 C)**.

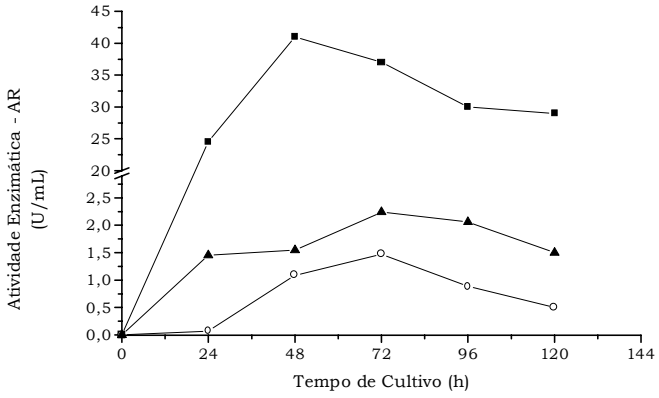
Em fermentação semi-sólida, a produção máxima de α-amilase pela linhagem A13-36 ocorreu em 24 horas nos farelos de mandioca e de milho, enquanto que em farelo de trigo o pico de produção foi obtido em 72 horas, sendo esta a maior produção (6,20 U/mL ou 37,2 U/g) **(Fig. 32 A)**.

Pelo método de liberação de açúcares redutores **(Fig. 32 B)**, observa-se picos de atividade em 48 horas de cultivo, em meio de farelo de trigo (41 U/mL ou 246 U/g), e em 72 horas para farelo de mandioca (1,47 U/mL ou 8,82 U/g) e farelo de milho (2,24 U/mL ou 13,44 U/g). A presença de glicoamilase também não foi confirmada em fermentação semi-sólida **(Fig. 32 C)**.

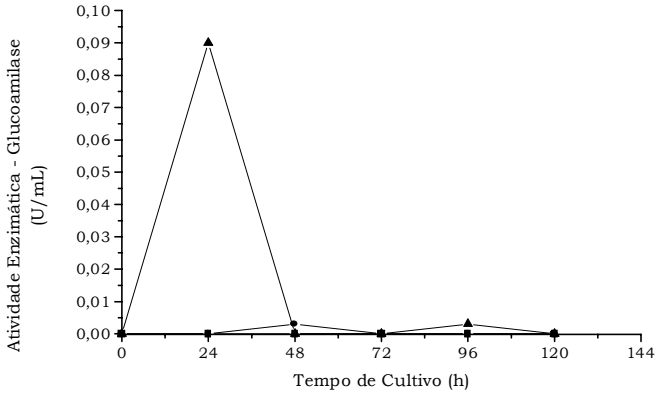
Diante do exposto, acredita-se que o meio nutriente-mandioca em 120 horas foi o melhor meio para produção de amilases pela linhagem fúngica A13-36, em fermentação submersa, e que o farelo de trigo foi o melhor substrato para produção destas enzimas em fermentação semi-sólida, de 48 a 96 horas.



A



B



C

Figura 32 – Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de amilases pela linhagem fúngica A13-36 em fermentação semi-sólida. (A) atividade enzimática dextrinizante (α-amilase); (B) atividade enzimática quantificada pela liberação de açúcares redutores e (C) atividade enzimática de glicoamilase.

Legenda: —■— farelo de trigo; —○— farelo de mandioca; —▲— farelo de milho.

Analisando-se os dados de forma geral, em fermentação submersa, percebe-se que o perfil de produção de amilases entre as linhagens testadas foi variável, com picos de produção entre 24 e 120 horas nos diferentes meios e para as diferentes enzimas analisadas.

Quanto à α-amilase, os picos de produção foram obtidos, na maioria das vezes, nas primeiras horas de cultivo. Esses dados são comparáveis com os de Yuguo et al. (2000), que obtiveram pico de produção de α-amilase em 48 horas para *Bacillus subtilis* e com os de Shaw et al. (1995), que obtiveram períodos de 24 a 48 horas como os melhores para produção de α-amilase por *Thermus* sp, em fermentação submersa.

Por outro lado, em trabalhos com fungos filamentosos, esse tempo tem mostrado ser um pouco maior. Arnesen et al. (1998), estudando a produção de α-amilase por *Thermomyces laguginosus* obtiveram picos de fermentação entre 96 e 120 horas. O mesmo tempo de cultivo foi determinado por Cruz et al. (1997), para a produção de α-amilase por *Rhizopus* sp.

Nota-se que ao longo do processo fermentativo ocorre perda da atividade da enzima, a qual deve estar ocorrendo por redução gradual na estabilidade pela produção de inibidores ou por ação de proteases (PRIEST, 1977).

Quando a atividade enzimática foi avaliada pela liberação de açúcares redutores ou de glicose (glicoamilase), notou-se picos de produção nas fases iniciais ou finais do processo. Entretanto, trabalhos com a produção de glicoamilase em meio contendo amido tem indicado que a enzima é produzida, geralmente, nas primeiras horas de cultivo (JIN et al., 1998, KILIKIAN, 1996),

No **APÊNDICE D**, é mostrado que os teores de açúcares redutores no meio de cultivo são elevados, enquanto a concentração de glicose, quantificada pela reação de acoplamento com glicose-oxidase, mostra-se bem mais baixa.

É conhecido que a síntese de glicoamilase é induzida pelo amido ou por seus hidrolisados, tais como, dextrinas, maltose, isomaltose e outros oligossacarídeos. Por outro lado, glicose, sacarose, lactose, frutose e

galactose, quando empregados como fontes de carbono, em concentrações acima de 1%, causam efeito repressivo na produção da enzima (FACCIOTTI et al., 1989).

Diante do exposto, e sabendo-se que a quantidade de glicose presente no caldo fermentado foi baixa e que os açúcares redutores determinados poderiam referir-se a açúcares liberados ao meio pela ação da α-amilase (ou β-amilase) os quais são potencialmente indutores de glicoamilase, poder-se-ia inferir que as linhagens estudadas não são boas produtoras de glicoamilase e que a atividade observada para algumas linhagens poderia tratar-se de enzimas constitutivas produzidas em níveis basais.

Por outro lado, há que se considerar que através somente da determinação da atividade no meio não é possível concluir sobre a capacidade ou não de determinada linhagem produzir uma enzima, visto que enzimas extracelulares podem manter-se associadas às células (espaço periplasmático ou ligadas à face externa da membrana citoplasmática) (SALYERS et al., 1996). Destaque-se, mais uma vez, que bactérias em geral, não são consideradas boas produtoras de glicoamilase, sendo esta uma característica atribuída aos fungos filamentosos (VIHINEN e MÄNTSÄLÄ, 1989).

Quanto ao meio de cultivo para a produção de amilases, foi considerado como melhor meio aquele que produz todas as enzimas de interesse. Baseados nesse conceito, temos que, para fermentação submersa, o melhor meio de produção foi o meio nutriente mandioca, pois 6 das 9 linhagens testadas tiveram sua maior produção quando nele cultivadas.

É interessante notar que as linhagens apresentaram maior produção em fermentação submersa quando se utilizou o farelo de mandioca ou milho como fonte alternativa de carbono, quando comparado com o meio à base de amido purificado (*Synth* PA), o que nos leva a inferir que ambos os substratos, além de serem ricos em amido, possuem outros componentes ou fatores que poderiam estar induzindo a produção, ou aumentando a eficiência da ação da enzima, como por exemplo, a estrutura do amido. Cruz et al. (1997), sugeriram que estruturas ramificadas presentes no substrato afetaram a síntese da enzima, e que a indução de α-amilase variou em

função da fonte de amido utilizada na composição do meio, concluindo que amilose e amilopectina de milho são melhores indutoras que as respectivas homólogas da batata.

Quanto ao melhor tempo de produção (considerando-se como melhor, o tempo de em que foram produzidas as enzimas de interesse), verificou-se que não houve um padrão para as linhagens analisadas. Das nove linhagens analisadas, três linhagens ($A4_1$-b, $A4_4$-i e $A4_7$-1) apresentaram melhor produção em 24 horas de fermentação; duas linhagens ($A4_5$-2 e A11-4) apresentaram maior produção em 48 horas de cultivo e, quatro linhagens ($A4_4$-f, A13-8, A13-22 e A13-36) apresentaram melhor produção em 120 horas.

Com relação à fermentação semi-sólida, a análise dos dados revela que de forma geral, as linhagens não apresentaram nenhum padrão quanto à produção de amilases pelos três métodos analisados. Também nota-se que pela avaliação de liberação enzimática de açúcares redutores a partir do amido, a maioria das linhagens produziram enzimas amilolíticas durante todo período de fermentação. Através deste método, também foi possível verificar que, para algumas linhagens, em diferentes meios, há mais de um pico de produção indicando que diferentes enzimas podem estar sendo produzidas nas diferentes fases da fermentação.

Verificou-se que o melhor meio para a fermentação semi-sólida, foi o farelo de trigo, pois oito das nove linhagens apresentaram sua maior produção quando nele cultivadas, seguido pelo farelo de mandioca que foi o melhor meio de produção para a linhagem $A4_4$-f. Mulimani et al. (2000), investigando a produção de α-amilase pelo fungo *Gibberella fugikuroi*, em fermentação semi-sólida, verificou que houve maior produção em meio de farelo de trigo quando comparado com outros substratos como palha e farelo de arroz. Os mesmos autores mencionam ainda, que fatores como forma da partícula semi-sólida, porosidade e difusividade com o substrato sólido, transferência de massa ao substrato sólido, natureza hidrofílica e hidrofóbica, são fatores importantes e responsáveis pela aderência do microrganismo ao substrato e que afetam a produção da enzima.

Quanto ao melhor tempo de produção, em fermentação semi-sólida, verificou-se que também não houve um padrão para as linhagens analisadas. Das nove linhagens estudadas apenas duas linhagens apresentaram picos de produção das enzimas pelos três métodos analisados ao mesmo tempo: a linhagem $A4_4$-f, em 24 horas, e a linhagem $A4_5$-2, em 72 horas. As demais linhagens apresentaram mais de um período para picos de produção das diferentes enzimas, sendo que a linhagem $A4_1$-b, apresentou picos de produção em 24, 48 e 120 horas; a linhagem $A4_4$-i em 24, 72 e 96; 4_7-1 em 24 e 72 horas; A11-4 e A13-8 em 96 e 120 horas; A13-22 em 24, 48 e 96 horas e A13-36 em 48, 72 e 120 horas.

A linhagem fúngica (A13-36) foi a que mais se destacou, produzindo 6,2 U/mL de α-amilase, (farelo de trigo, 72 horas), 41 U/mL pela liberação de açúcares redutores (farelo de trigo, 48 horas) e 0,1 U/mL de glicoamilase (farelo de milho, 24 horas). As linhagens bacterianas que melhor produziram foram: $A4_1$-b que se destacou pela produção de 0,7, 5,3 e 0,22 U/mL das respectivas enzimas (em meio nutriente-mandioca), $A4_4$-i que produziu 15,9 U/mL (95,4 U/g) pela liberação de açúcares redutores (farelo de trigo, 72 horas) e A13-22 que produziu 2,27, 5,91 e 0,41 U/mL das três enzimas, respectivamente (meio nutriente mandioca).

Duedahl-Olesen (2000), estudando a produção de amilases formadoras de malto-oligossacarídeos por *Bacillus clausii*, obtiveram pico de produção 0,67 U/mL. Já Mulimani et al. (2000), obtiveram 42 U/g de substrato, em seus experimentos com *Gibberalla fugikuroi* em fermentação semi-sólida.

Jin et al. (1998), utilizando resíduo líquido do processamento de amido de milho e trigo para produção de amilases por Aspergillus oryzae, obtiveram atividade de α-amilase de 55,0 U/mL. Jin et al. (1999), trabalhando com Rhizopus oligosporos, utilizaram o mesmo resíduo, porém em condições assépticas, para produção de glicoamilase, obtendo 3,89 U/mL.

Analisando-se as produções máximas das linhagens em fermentação submersa e semi-sólida, de uma maneira geral, conclui-se que os valores obtidos neste trabalho foram promissores sob o ponto de vista de produção das enzimas e aproveitamento dos resíduos.

Os dados aqui apresentados, por tratarem-se de amilases produzidas por microrganismos termofílicos, são bastante animadores, visto que a obtenção dessas enzimas com alta termoestabilidade é de grande interesse para aplicação biotecnológica. O *screening* de cepas ou espécies termofílicas para produção de amilases tem sido foco de trabalhos de Jovet et al. (1992) com linhagens de *Bacillus licheniformis*, de Bem Ali et al., (1999) com espécies de *Bacillus*, McMahon et al., (1999) com espécies de *Streptomyces* sp, de Effio et al. (2000), com espécies de *Bacillus* e de Ronaszèki et al.(2000) com linhagens do fungo *Thermomyces lanuginosus*. Nesses trabalhos, a temperatura de crescimento dos microrganismos esteve entre 40 e 45°C, com exceção das linhagens de *B. licheniformes*, cuja temperatura mínima de crescimento foi de 60°C. Comparando os dados aqui expostos, é possível inferir a característica promissora das cepas isoladas, considerando que as temperaturas de crescimento estiveram entre 50-55°C, sendo que algumas delas, apresentaram bom crescimento a 60°C. A termofilia das cepas tem sido estritamente relacionada à termoestabilidade das enzimas produzidas como por exemplo, em espécies de *Humicula* (*H. insolens*, *H. lanuginosa, H. stellata), Thermomyces, Malbrachea pulchella* var. *sulfurea, Mucor pusillus e Talaromyces thermophilus* (NIGAM e SINGH, 1995), além dos trabalhos citados anteriormente.

6. Identificação das linhagens microbianas

6.1. Linhagens bacterianas

As linhagens selecionadas como melhores produtoras foram submetidas a testes preliminares para identificação, incluindo coloração de Gram, presença de esporos e catalase. Os resultados são mostrados na **Tabela 7.**

Tabela 7 – Análise morfológica e colorações para identificação das linhagens microbianas

LINHAGENS	FORMA	GRAM	ESPORO	CATALASE	GÊNERO PROVÁVEL
$A4_1$-b	Bastonete curto	+	+	+	*Bacillus*
$A4_4$-f	Bastonete curto (com cápsula)	-	-	+	não identificada
$A4_4$-i	Bastonete curto	+	+	+	*Bacillus*
$A4_5$-2	Bastonete	+	+	+	*Bacillus*
$A4_7$-1	Bastonete	+	+	+	*Bacillus*
A11-4	Bastonete longo	+	-	+	*Kurthia*
A13-8	Bastonete	+	+	+	*Bacillus*
A13-22	Bastonete curto	+	+	+	*Bacillus*

6.2. Linhagem fúngica

A linhagem fúngica A13-36, quando cultivada em placa de Petri, apresentou micélio branco, cotonoso e abundante, com ausência de pigmentos. Os esporos, também abundantes, apresentaram cor escura.

Através de técnicas de microcultivo foi possível observar hifas não septadas, esporângios arredondados no topo do esporangióforo com columela visível. A forma e característica do esporângio sugeriram tratar-se do gênero *Mucor* (ALEXOPOULUS et al., 1996).

7. Caracterização físico-química das enzimas produzidas pelas linhagens selecionadas

Os ensaios para a caracterização das enzimas foram realizados a partir das soluções enzimáticas brutas obtidas pelo cultivo das linhagens *Bacillus* $A4_1$-b, $A4_4$-f, *Bacillus* sp A13-22 e *Mucor* sp A13-36 em fermentação submersa, utilizando o meio nutriente-mandioca (item 1.5.1.2.). Foram avaliados pH e temperatura ótimos de atividade de α-amilase para cada solução enzimática assim como, a estabilidade das mesmas frente às

variações a valores de pH e temperatura. Os resultados são apresentados nas **Figuras 33** a **36**.

As amilases produzidas pelas três linhagens bacterianas (*Bacillus* $A4_1$-b e A13-22 e a linhagem $A4_4$-f) apresentaram pH ótimo de 6,5, enquanto o fungo *Mucor* sp A13-36 produziu α-amilase acídica com pH ótimo de 4,5.

Dados da literatura mostram que, geralmente, as amilases produzidas por bactérias possuem atividade ótima com pH variando de ligeiramente ácido a alcalinos, enquanto que as amilases fúngicas atuam melhor em pH ácido a neutro. Entre as amilases bacterianas com pH ótimo de atividade entre levemente ácido a próximo da neutralidade estão aquelas produzidas por *Nocardiopsis* sp com pH ótimo igual a 5,0 (STAMFORD, et al. 2001), de *Bacillus* sp, com atividade ótima em pH 5,5 (MAMO e GESSESSE, 1999), de *Thermosipho* sp BI-430, com atividade ótima em pH 6,0 (LEGIN et al. 1997) e de *Thermoactinomyces* sp que apresentaram pH ótimo de 5,0 a 5,5 (YALLOP et al. 1997). Entre as linhagens produtoras de amilases com atividade ótima em pH alcalino estão o *Bacillus* sp TS23 que produz amilases com atividade ótima em pH 8,8 a 9,6 (LIN et al. 1994) e o *Bacillus clausii* BT-21 com atividade ótima em pH 9,5 (DUEDAHL-OLESEN et al. 2000).

Já para as arqueobactérias o pH ótimo varia na faixa de ácido a próximo da neutralidade, sendo *Pirrococcus*, *Thermococcus*, *Thermogota* e *Fervidobacterium* os gêneros mais estudados (VIHINEN e MÄNTSÄLÄ, 1989). Canganella et al. (1994), estudando uma linhagem de *Fervidobacterium* sp descreveram amilases com pH ótimo na faixa de 5,5 a 6,5, semelhante àquelas amilases produzidas por *Pirrococcus woesei*, (SCHUMANN et al., 1991), cuja faixa de pH ótimo foi de 5,0 a 6,0.

Quanto às amilases fúngicas, pode-se destacar as glicoamilases produzidas pelas linhagens de *Aspergillus terreus* NA170 com pH ótimo de 5,0 (HOSH et al. 1991) e *A. terreus* GTC826, com pH ótimo de 4,0 (ALI e HOSSAIN, 1991). Outra espécie de *Aspergillus*, *A. tamarii*, produziu amilases com atividade ótima na faixa de pH de 4,5 a 6,0 (MOREIRA et al., 1999) ao passo que Ronaszek et al. (2000) descreveram uma α-amilase com pH ótimo de 5,0 produzida por esta mesma espécie.

Quanto à estabilidade frente à variação de pH, as linhagens bacterianas $A4_1$-b e $A4_4$-f produziram α-amilases estáveis na faixa de pH de 4,5 a 10,0, enquanto que a α-amilase do *Bacillus* sp A13-22 foi estável na faixa de pH 5,5 a 9,0. O fungo *Mucor* sp A13-36 produziu α-amilase estável em pH ácido, na faixa de pH de 3,0 a 4,0.

Mamo e Gessesse (1999), caracterizaram uma α-amilase produzida por *Bacillus* sp WN11 com estabilidade na faixa de pH de 5,5 a 9,0 enquanto Legin et al. (1997) descreveram amilases de *Thermosipho* sp BI-430 que apresentaram estabilidade no faixa de pH de 4,6 a 8,0.

As linhagens de *Aspergillus terreus* NA170 (HOSH et al., 1991) e *A. terreus* GTC826 (ALI e HOSSAIN, 1991) produziram glicoamilases com estabilidade na faixa de pH de 3,0 a 7,0, semelhante à faixa de estabilidade encontrada para as amilases produzidas pelo *A. tamarii* nos estudos de Moreira et al. (1999).

Analisando-se as figuras referentes à estabilidade das enzimas frente à variação de pH **(Fig. 33 B** a **36 B)** verifica-se que ocorreu um ligeiro aumento da atividade enzimática após a incubação da enzima bruta nos diferentes valores de pH, quando comparados com a curva de atividade, sugerindo que possa ter ocorrido alguma modificação na estrutura protéica de modo a facilitar a função catalítica de tais enzimas. McMahon, et al. (1999), estudando três α-amilases de *Streptomyces* sp IMD 2679 mencionam que o pH leva à diferenças de ionização dos aminoácidos do interior das cadeias da estrutura primária das enzimas e dessa forma, influencia em características das moléculas como à suscetibilidade à termoinativação. Pode-se supor que uma pré incubação da enzimas em pH determinado possa auxiliar no aumento de sua função catalítica.

O efeito da temperatura numa reação enzimática pode ser observado inicialmente através do aumento progressivo na atividade devido ao aumento da velocidade de formação do produto e conseqüente consumo do substrato. Entretanto, verifica-se que há uma temperatura limite para cada enzima, acima da qual começa a ocorrer, perda gradativa da atividade possivelmente devido à desnaturação protéica pelo calor, como resultado da perda da conformação nativa.

A temperatura na qual os níveis enzimáticos são máximos é conhecida como temperatura ótima e representa o estado em que a molécula apresenta uma conformação ideal para sua máxima eficiência.

As temperaturas máximas de atividades de α-amilase foram de 60°C para o *Bacillus* $A4_1$-b (com retenção de aproximadamente 50% da atividade a 70°C), 65°C para a linhagem $A4_4$-f (com aproximadamente 85% de atividade a 70°C e 50% a 80°C), 70°C para o *Bacillus* sp A13-22 (com 80% da atividade a 85°C) e 80°C para o fungo *Mucor* sp A13-36 (com 90% da atividade a 85°C e 28% a 95°C). Esses dados confirmam a termofilia das enzimas estudadas.

As amilases produzidas pelo *Bacillus clausii* (BT-21) apresentaram atividade ótima a 55°C (DUEDAHL-OLESEN et al., 2000), enquanto as amilases de *Thermosipho* sp BI-430 apresentaram atividade ótima a 60°C (LEGIN et al., 1997); Mamo e Gessesse (1999), estudando a linhagem de *Bacillus* sp WN11l, descreveram uma α-amilase com atividade ótima na faixa de 75 a 80°C e as amilases de *Thermoactinomyces* sp, apresentaram temperatura ótima de 75 a 80°C, quando estudadas por Yallop et al. (1997).

Hosh et al. (1991) caracterizaram glicoamilase produzida por *Aspergillus terreus* NA170 a qual apresentou temperatura ótima de 60°C, semelhante ao apresentado pela a linhagem GTC826 estudada por Ali e Hossain (1991) enquanto as amilases produzidas por *Aspergillus tamarii*, caracterizadas por Moreira et al. (1999), apresentaram temperatura ótima de 50°C.

De forma geral, as linhagens testadas apresentaram tolerância à temperaturas ligeiramente inferiores aos valores ótimos de temperatura. A α-amilase do *Bacillus* $A4_1$-b foi estável à temperaturas compreendidas entre 5 e 55°C mantendo apenas 26% da atividade inicial a 60°C. A enzima da linhagem $A4_4$-f apresentou-se estável entre 5 e 50°C, preservando 14% da atividade a 55°C. Para a α-amilase do *Bacillus* sp A13-22 observou-se que esta manteve 80% de sua atividade inicial a 65°C. A α-amilase fúngica (*Mucor* sp A13-36) foi a mais termoestável das enzimas estudadas, com 100% de atividade após uma hora a 65°C.

As temperaturas de estabilidade encontradas para as amilases produzidas pela linhagem de *Bacillus* sp TS23, estudas por Lin et al. (1994),

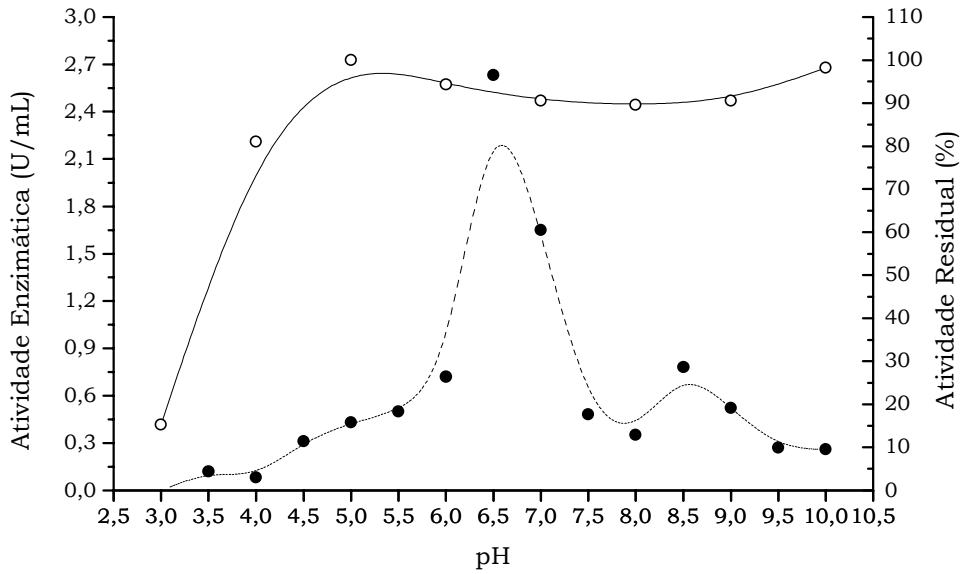
variam entre 55 e 70°C. Legin et al. (1997), caracterizaram amilases de *Thermosipho* sp BI-430 estáveis a temperaturas de 56 a 80°C.

As glicoamilases produzidas por *Aspergillus terreus* NA170 apresentaram estabilidade à temperaturas de 30 a 75°C, conforme estudos de Hosh et al. (1991) ao passo que Ali e Hossain (1991), estudando a linhagem GTC826 dessa espécie caracterizaram glicoamilases com características semelhantes às encontradas por Hosh et al. (1991), porém com faixa de estabilidade à temperatura mais restrita (de 40 a 60°C). As amilases produzidas por *Aspergillus tamarii*, caracterizadas por Moreira et al. (1999), apresentaram-se estáveis numa faixa de temperatura de 50-65°C.

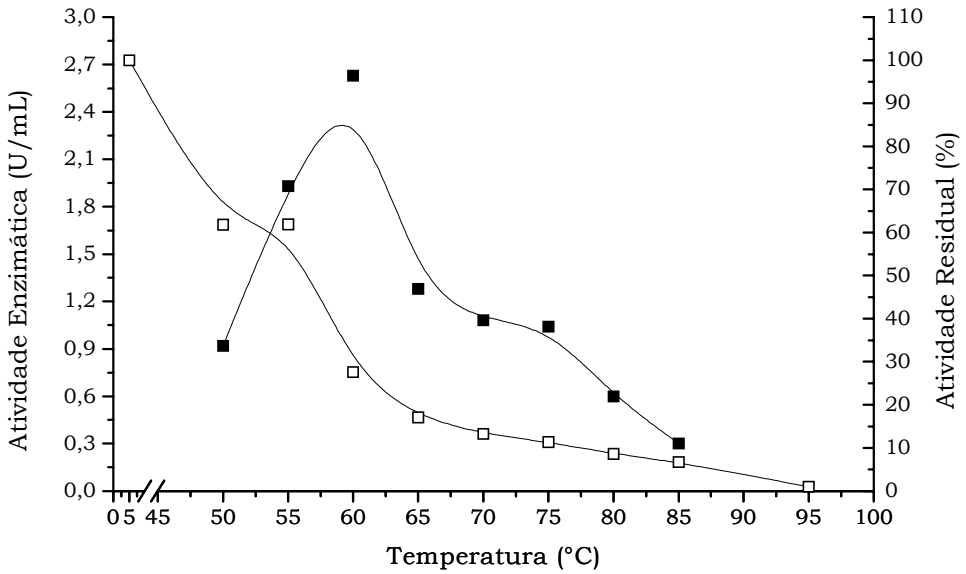
Uma vez que o processamento do amido para a produção de xaropes envolve uso de temperaturas elevadas, a temperatura de ação das enzimas é um fator limitante para sua aplicação nesse processo industrial. Comparando-se os resultados obtidos neste estudo com os dados encontrados na literatura, verifica-se que as amilases produzidas pelas linhagens de *Bacillus* sp A13-22 e *Mucor* sp A13-36 apresentam-se com características mais termofílicas que as linhagens descritas.

Quanto às amilases produzidas pelo fungo *Mucor* sp A13-36, vale salientar que suas características termofílicas (atividade ótima a 80°C) são excepcionais quando comparadas às enzimas fúngicas, esse fato pode ser verificado em extensa revisão realizada por Vihinen e Mäntsälä (1989), a qual relata que das 16 linhagens fúngicas analisadas, nenhuma apresentou enzimas amilolíticas com atividade superior a 60ºC.

A atividade ótima desta enzima, próxima à temperaturas de gelatinização do amido possibilitaria seu uso na etapa de liquefação no processamento do mesmo.

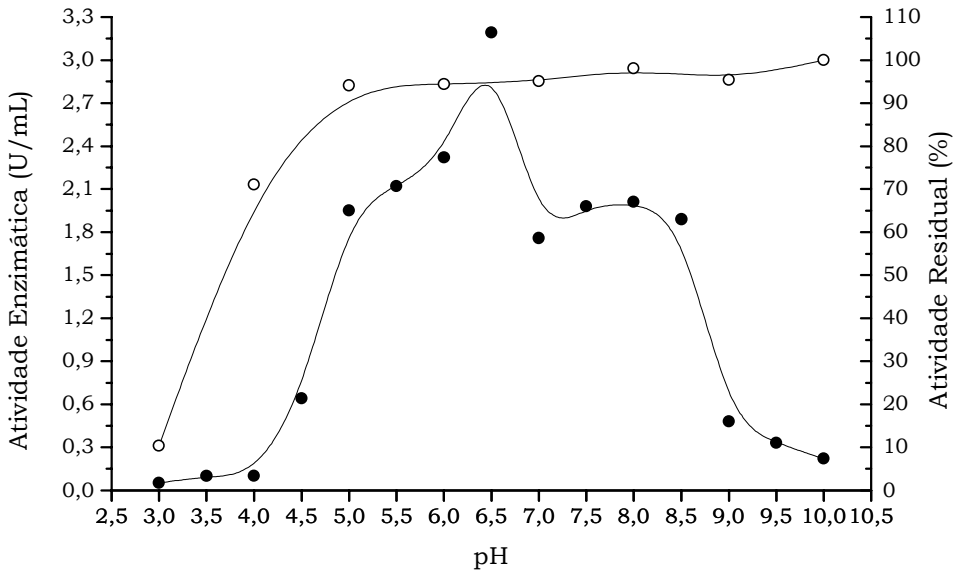


A

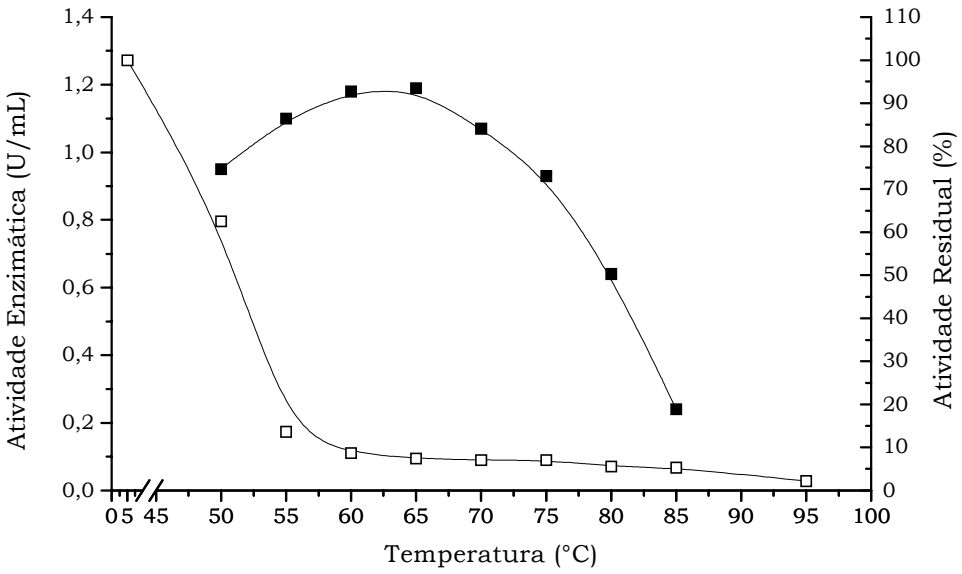


B

Figura 33 – Caracterização físico-química da enzima bruta do *Bacillus* sp $A4_1$-b. (**A**) –●– efeito do pH sobre a atividade enzimática (pH 3,0 a 5,0: tampão acetato de sódio; pH 5,0 a 7,0: tampão citrato-fosfato; pH 7,0 a 8,5: tampão tris-HCl; pH 8,5 a 10,0: tampão glicina-NaOH); –○– estabilidade da enzima, em ausência de substrato, frente à variação de pH (pH 3,0 a 8,0: tampão McIlvaine; pH 8,0 a 10,0: tampão Glicina-NaOH). (**B**) –■– efeito da temperatura sobre a atividade enzimática; –□– estabilidade da enzima, em ausência de substrato, frente à variação de temperatura.

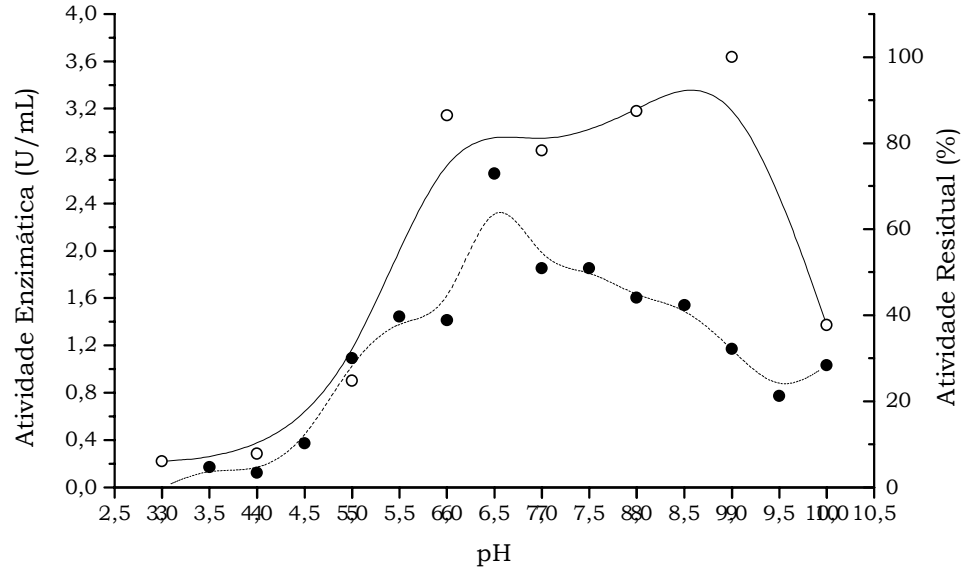


A

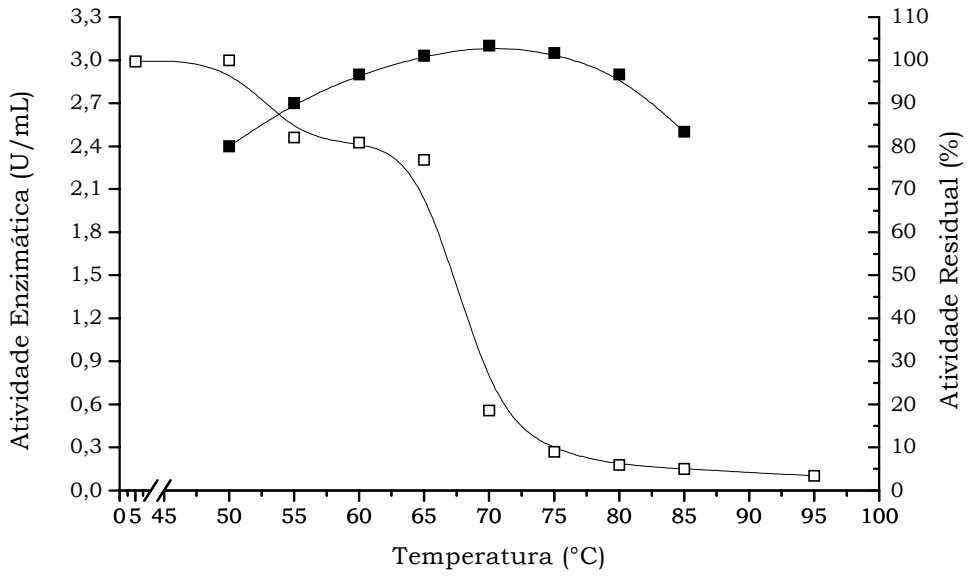


B

Figura 34 – Caracterização físico-química da enzima bruta da linhagem bacteriana A4$_4$-f. (**A**) –●– efeito do pH sobre a atividade enzimática (pH 3,0 a 5,0: tampão acetato de sódio; pH 5,0 a 7,0: tampão citrato-fosfato; pH 7,0 a 8,5: tampão tris-HCl; pH 8,5 a 10,0: tampão glicina-NaOH); –○– estabilidade da enzima, em ausência de substrato, frente à variação de pH (pH 3,0 a 8,0: tampão McIlvaine; pH 8,0 a 10,0: tampão Glicina-NaOH). (**B**) –■– efeito da temperatura sobre a atividade enzimática; –□– estabilidade da enzima, em ausência de substrato, frente à variação de temperatura.

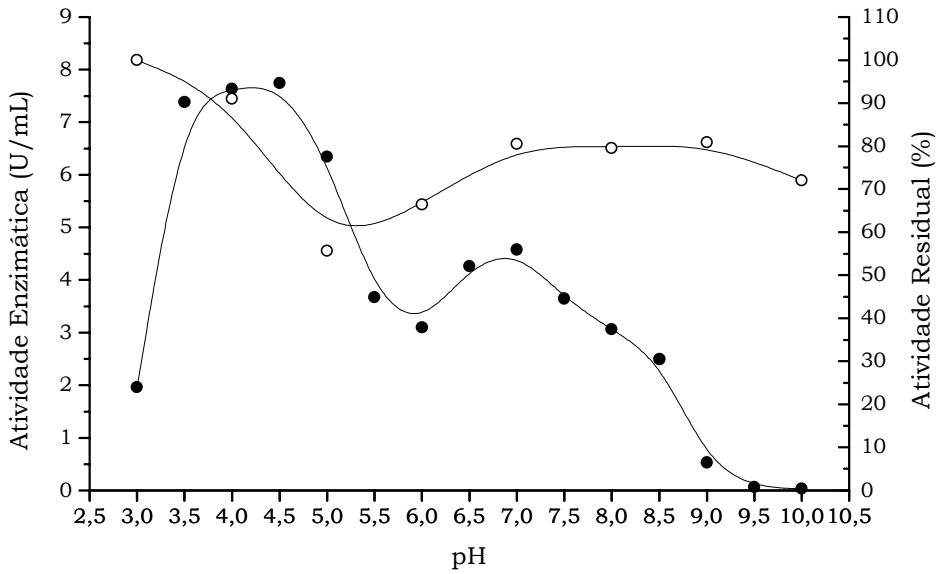


A

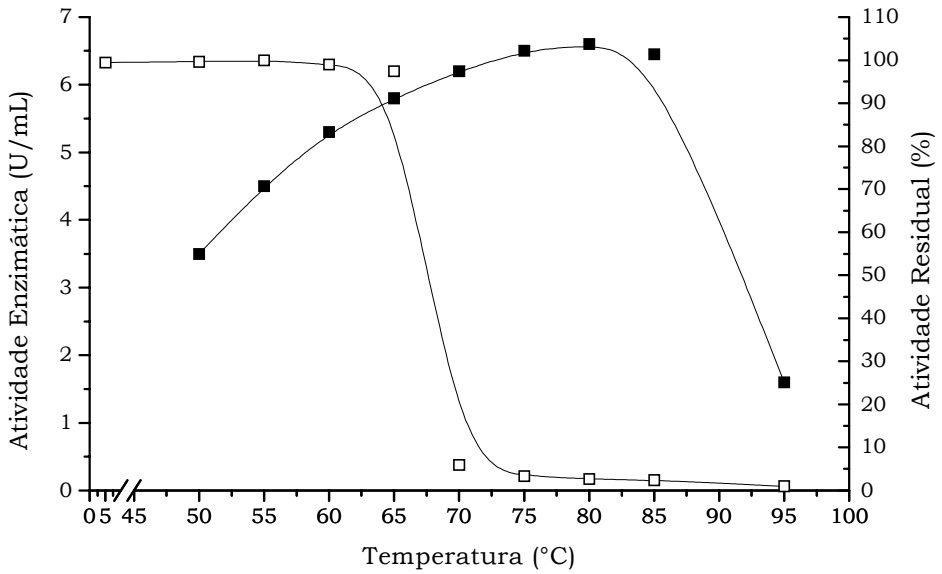


B

Figura 35 – Caracterização físico-química da enzima bruta do *Bacillus* sp A13-22. (**A**) –●– efeito do pH sobre a atividade enzimática (pH 3,0 a 5,0: tampão acetato de sódio; pH 5,0 a 7,0: tampão citrato-fosfato; pH 7,0 a 8,5: tampão tris-HCl; pH 8,5 a 10,0: tampão glicina-NaOH); –○– estabilidade da enzima, em ausência de substrato, frente à variação de pH (pH 3,0 a 8,0: tampão McIlvaine; pH 8,0 a 10,0: tampão Glicina-NaOH). (**B**) –■– efeito da temperatura sobre a atividade enzimática; –□– estabilidade da enzima, em ausência de substrato, frente à variação de temperatura.



A



B

Figura 36 – Caracterização físico-química da enzima bruta do *Mucor* sp A13-36. (**A**) –●– efeito do pH sobre a atividade enzimática (pH 3,0 a 5,0: tampão acetato de sódio; pH 5,0 a 7,0: tampão citrato-fosfato; pH 7,0 a 8,5: tampão tris-HCl; pH 8,5 a 10,0: tampão glicina-NaOH); –○– estabilidade da enzima, em ausência de substrato, frente à variação de pH (pH 3,0 a 8,0: tampão McIlvaine; pH 8,0 a 10,0: tampão Glicina-NaOH). (**B**) –■– efeito da temperatura sobre a atividade enzimática; –□– estabilidade da enzima, em ausência de substrato, frente à variação de temperatura.

8. Efeito dos íons Ca^{2+} na atividade das amilases bacterianas

O perfil de atividade amilolítica, apresentado pela solução enzimática bruta do *Bacillus* sp A13-22 em presença de concentrações crescentes de cálcio, é mostrado na Figura 37.

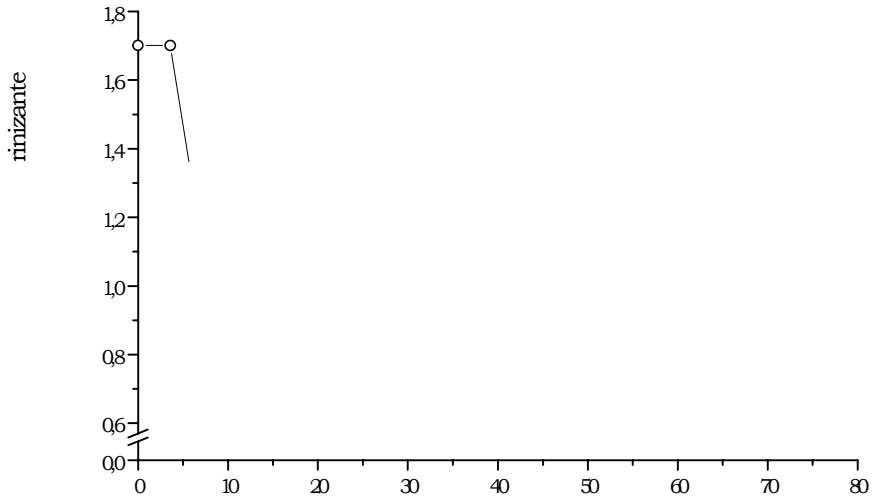


Figura 37 - Efeito da concentração de íons cálcio na atividade enzimática, dosada pela reação dextrinizante, do *Bacillus* sp A13-22.

Os resultados indicam que as amilases produzidas pelo *Bacillus* sp A13-22 perdem, progressivamente, sua atividade em concentrações de íons Ca^{2+} superiores a 3,6 ppm (0,09 mM)

A maioria das α-amilases produzidas por linhagens do gênero *Bacillus* tem se mostrado dependentes de íons cálcio para sua atividade em temperaturas elevadas. A α-amilase de *B. subtilis*, por exemplo, requer quatro gramas de átomos de cálcio por mol de enzima para sua atividade ótima (HSIU et al., 1964). Concentrações de íons cálcio superiores a 150 ppm, conferem estabilidade a α-amilase de *B. licheniformis*, conforme demonstrado por Fogarty (1983).

Em uma extensa revisão, Guzmán-Maldonado e Paredes-López (1995), relatam que a quantidade de cálcio requerida para a estabilização de cada enzima geralmente varia entre 30 e 250 ppm, sendo que a estabilização

total das amilases do *B. subtilis* requer cerca de 150 ppm para alcançar o nível de saturação.

Crabb e Mitchinson (1997) utilizam 30 ppm de Ca^{2+} para liquefação do amido para obtenção de açúcares, pelo uso da α-amilase de *Bacillus licheniformis*, enquanto Saha e Zeikus (1987), verificaram que geralmente 50 ppm de cálcio são requeridos para estabilização das α-amilases termoestáveis comerciais (*B. subtilis* e *B. licheniformis*) durante a liquefação do amido para a produção de xarope de maltose.

Brown e Kelly (1993), constataram que 5 mM de Ca^{2+} provocou efeito positivo nas atividades enzimáticas das amilases de *Pyrococcus furiosus* e *Thermococcus litoralis* em temperaturas superiores a 120ºC.

As α-amilases são metaloenzimas que contêm íons Ca^{2+}que ativam e estabilizam a molécula, sendo que a quantidade destes íons, ligados à estrutura, pode variar de um a dez (VALLEE et al., 1959). As amilases de *B. subtilis e B. stearothermophilus* contêm em sua estrutura quatro íons Ca^{2+}, os quais são essenciais a atividade da enzima (VIHINEN e MÄNTSÄLÄ, 1989). Na enzima de *B. amyloliquefaciens,* aparecem quatro íons cálcio ligados firmemente à molécula, sendo que apenas um deles exerce maior efeito na estabilidade e conformação da proteína (HSIU et al., 1964). Normalmente, apenas um íon é o bastante para estabilizar as enzimas de A. *orizae* e *B. subtilis* var. *amylisacchariticus* (YUTANI et al., 1969).

Acredita-se que o papel do cálcio esteja relacionado à ligação entre domínios da α-amilase, sugerindo que uma das regiões conservadas dessas enzimas seja responsável pela ligação desse íon. Estudos da estrutura das α–amilases liqueficantes de *Bacillus* também indicaram que alguns outros resíduos conservados estão envolvidos na ligação do cálcio à enzima (VIHINEN e MÄNTSÄLÄ, 1989).

Entretanto, têm sido descritas amilases bacterianas cuja ativação ou termoestabilidade independem da presença de íons Ca^{2+} no meio de reação, como as amilases de *Clostridium thermosulfurogenes* (HYUN e ZEIKUS, 1985), a α-amilase produzida pelo *Thermus* sp (SHAW et al., 1995) e as α-amilases de mutantes de *B. licheniformis* (DECLERK et al., 1997).

Por outro lado, comportamento semelhante ao da α-amilase produzida pelo *Bacillus* sp A13-22 (Fig. 37) cuja atividade foi inibida por íons Ca^{2+}, foi inicialmente descrito para α-amilase fúngica (*Mucor pusillus*), a qual teve sua atividade reduzida em 39% em presença de 10 mM de $CaCl_2$ (SONKUTI e STEINBERG, 1980). Posteriormente, foram apresentados estudos sobre α-amilases bacterianas inibidas por Ca^{2+}. Takasaki (1982) descreveu a α-amilase de *Bacillus circulans* G-6, cuja atividade foi reduzida em 39,4% em presença de 5 mM de $CaCl_2$ e Kumar et al. (1990) apresentaram estudos sobre o efeito inibitório do íon Ca^{2+} sobre a α-amilase produzida por *Bacillus licheniformis* Os dados desse últimos autores indicaram redução de 33% na atividade quando a concentração de $CaCl_2$ foi de 10 mM, sendo que em presença de 50 mM deste íon essa redução chega a 65%.

Uma das possíveis razões para a perda da atividade talvez seja conseqüência de alterações conformacionais na estrutura tridimensional da proteína, provocadas pela interação entre os íons Ca^{2+} em excesso e os resíduos de aminoácidos da enzima, no entanto tal afirmação só seria possível mediante a realização de estudos mais aprofundados da estrutura da proteína.

A redução na concentração de cálcio para estabilização da enzima apresenta vantagens econômicas no processo de produção de hidrolisados de amido, evitando custos com sua posterior remoção durante o refinamento (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995), trazendo benefício também ao processo de produção de xaropes com alto teor de frutose, uma vez que o cálcio é um inibidor conhecido da glicose-isomerase (FULLBROOK, 1984).

9. Estudo da hidrólise do amido de mandioca utilizando solução enzimática bruta

9.1. Hidrólise do amido de mandioca em duas etapas

Para a aplicação das enzimas brutas na liquefação do amido de mandioca foram selecionadas as linhagens *Bacillus* sp A13-22 e *Mucor* sp A13-36, uma vez que foram as que produziram enzimas com características mais termofílicas e termoestáveis. Os ensaios realizados, conforme item 10.1. da seção Material e Métodos, levaram aos resultados apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8– Teores de açúcares redutores, reação com iodo e valores DE dos hidrolisados de amido de mandioca utilizando solução enzimática bruta dos *Bacillus* sp A13-22 e *Mucor* sp A13-36

Linhagem	Aç. Redutor (mg/mL xarope)	Reação com Iodo	DE
Bacillus sp A13-22	124,4	–	49,8
Mucor sp A13-36	115,5	–	46,2

Analisando-se a **Tabela 8** verifica-se que os hidrolisados obtidos a partir do tratamento da suspensão de amido com as soluções enzimáticas brutas bacteriana e fúngica, em duas etapas, apresentaram valores de DE elevados para um processo de liquefação. A partir dos valores DE obtidos e da ausência de coloração do hidrolisado em presença de iodo, pode-se inferir que houve total liquefação do amido.

O processo de liquefação e sacarificação pelo sistema enzima-aquecimento-enzima (EHE) foi o primeiro processo enzimático utilizado industrialmente, sendo ainda muito utilizado principalmente na produção de xaropes a partir de amido de cereais. De um modo geral, o uso de temperaturas inferiores a 90°C não permite a hidrólise eficiente em um

único passo, sendo requerido um tratamento térmico a 120-140°C para que ocorra a gelatinização e a completa hidratação do amido entre os dois estágios. O aquecimento auxilia também na dissociação de complexos insolúveis de ácidos graxos e amilose que normalmente estão presentes no amido de cereais ou que se formaram durante o processamento e que são resistentes à ação das amilases (HEBEDA e LEACH, 1974).

Em seus estudos, Lee e Kim (1990) adotaram valor DE 10 como critério de liquefação do amido e obtiveram valores de DE que variaram de 9,8 a 14,4, sendo obtido o DE 10 após 45 e 50 segundos para as suspensões 20% (p/p) de amido de batata e milho, respectivamente, tratadas com 1% de α-amilase bacteriana termoestável (Novo Industri A/S), a 95ºC.

Slominska e Starogardzka (1986) em seus estudos de produção enzimática de xarope de maltose obtiveram DE de 7,6, 12, 14,6 e 17 durante o passo de liquefação do amido de batata 30%, a 85 ºC durante uma hora, enquanto que Saha e Zeikos (1997) consideraram o passo de liquefação por terminado quando o DE atingiu de 5-10.

Note-se que os valores DE obtidos pela hidrólise do amido no tratamento com as soluções enzimáticas brutas de ambas as linhagens conduziram a valores DE próximos entre si (49,8 e 46,2). Segundo Reilly (1985), as α-amilases fúngicas são endohidrolases que diferem das outras α-amilases não no modo de ação, pois todas atacam as ligações α-1,4 da molécula de amido, mas em sua relativa atividade de produzir glicose como produto final através da hidrólise de polímeros de glicose com comprimento de cadeia ímpar (por exemplo maltopentose), sendo a maltose seu principal produto de hidrólise, entre outros oligossacarídios. Já as α-amilases bacterianas possuem muito pouco dessa habilidade, sendo que sua ação é liqueficante, ou seja a formação de dextrinas (GUZMÁN-MALDONADO e PAREDES-LÓPEZ, 1995).

É importante ressaltar que as α-amilases fúngicas são normalmente utilizadas na sacarificação do amido. De acordo com Guzmán-Maldonado e Paredes-López (1995), o uso destas enzimas chega a hidrolisar cerca de 50 a 60% do substrato, sendo portanto denominadas α-amilases sacarificantes, o que justificaria os altos teores de açúcares redutores encontrados. Por outro

lado, as dextrinas são os principais produtos de hidrólise das α-amilases bacterianas, possuindo maior poder liqueficante quando comparadas às α-amilases fúngicas. Assim, acredita-se que os maiores teores de açúcares redutores no hidrolisado bacteriano podem estar relacionados à presença de enzimas sacarificantes na solução enzimática bruta, entre elas a glicoamilase, como verificado nos ensaios realizados na fase de seleção.

9.2. Efeito do tempo e concentração de enzima fúngica na hidrólise do amido de mandioca em etapa única

De acordo com Reilly (1985) não é interessante hidrolisar o amido com α-amilases por longos períodos a 85-95°C para a produção de xaropes com alto teor de glicose pois em pH próximo à neutralidade (6,2 a 6,5) ocorre a formação de sub-produtos como a maltulose (4-α-D-glicopiranosil-D-frutose) que são resistentes à hidrólise posterior pela glicoamilase. Precursores deste dissacarídeo são formados quando unidades finais de glicose dos oligossacarídeos são isomerizadas à frutose por isomerização alcalina durante o estágio de liquefação. Durante a sacarificação, a última ligação α-1,4 do oligossacarídeo é resistente à hidrólise devido ao terminal frutose e portanto, a maltulose acumula-se no hidrolisado com perda equivalente no rendimento de glicose. Segundo Hebeda (1987) essa reação é minimizada pelo controle da liquefação em pH abaixo de 6,3, sendo melhor utilizar a α-amilase apenas para hidrolisar o amido a um nível em que a retrogradação não ocorra (aproximadamente 10 DE) e então proceder à sacarificação com glicoamilase.

Diante dessas considerações e das características termofílicas e hidrolíticas excepcionais apresentadas pelas amilases produzidas pelo *Mucor* sp A13-36 e ao fato das amilases produzidas por esta linhagem possuírem atividade ótima em pH 4,5, realizou-se novos ensaios objetivando conhecer a extensão de sacarificação destas amilases. Nesses experimentos variou-se o tempo de hidrólise e a quantidade de enzima utilizada.

Na **Tabela 9** são mostrados os resultados obtidos nos ensaios de variação do tempo de hidrólise, utilizando quantidades fixas de enzima (20 U/g amido)

Tabela 9 – Teores de açúcares redutores, reação com iodo e valores DE dos hidrolisados de amido de mandioca utilizando 20 U/g amido da solução enzimática bruta do *Mucor* sp A13-36, em diferentes tempos de hidrólise

Tempo de Hidrólise (h)	Aç. Redutor* (mg/mL hidrolisado)	Reação com Iodo	DE
0,5	29,61	+	10,6
1	99,82	–	35,9
2	130,68	–	47,0
3	158,04	–	56,9

* padrão maltose

Os resultados mostrados na **Tabela 9** indicam que trinta minutos de hidrólise são suficientes para se obter valor DE considerado como critério de liquefação (LEE e KIM, 1990; HEBEDA, 1987; HEBEDA et al., 1988; REILLY, 1985), embora a reação positiva com o iodo indique que as cadeias de amilose ainda estejam organizadas. A partir de uma hora de hidrólise, os valores de DE mostram-se superiores àqueles normalmente adotados para a liquefação, como discutido anteriormente.

Comparando-se estes resultados com os dos ensaios realizados em duas etapas **(Tabela 8)** utilizando a solução enzimática do *Mucor* sp A13-36, verifica-se que os valores de DE obtidos em duas horas em um único passo são muito próximos aos obtidos quando a hidrólise foi realizada em duas etapas. Tais resultados sugerem que o amido de mandioca dispensa a etapa de autoclavagem, o que normalmente é aplicado aos amidos de cereais para dissociação dos complexos insolúveis de ácidos graxos-amilose e para completar a gelatinização dos grânulos de amido (HEBEDA e LEACH, 1974). Verifica-se também, que após três horas de incubação, os teores de açúcares redutores aumentaram cerca de 20% quando comparados à hidrólise em duas horas, o que indica que a enzima apresenta-se ainda ativa após três horas a 85°C, salientando a característica termoestável da mesma.

Segundo Saha e Zeikus (1987), três tipos de xaropes contendo maltose são normalmente produzidos comercialmente: xaropes com alto teor de

maltose (cerca de 45-60% de maltose e 35-40 DE), xaropes com extremo teor de maltose (70-85% de maltose, 45-60 DE) e xaropes de alta conversão (cerca de 30-47% de maltose, 35-43% glicose e 60-70 DE). De acordo com Hebeda (1987) três tipos de enzimas estão envolvidas na produção de xaropes contendo maltose: endoamilases (α-amilase), exoamilases (β-amilase e glicoamilase) e enzimas desramificantes (pululanase e isoamilase).

Baseando-se apenas nos valores de DE obtidos e nas características normalmente apresentadas pelas α-amilases fúngicas, poderia sugerir-se que após uma hora de hidrólise estaria ocorrendo a sacarificação do amido de mandioca com a possível produção de xarope com alto teor de maltose e que, em duas e três horas de hidrólise poderiam estar sendo produzidos xaropes com extremo teor de maltose. Entretanto, tais sugestões só poderiam ser aceitas mediante a análise quantitativa e qualitativa dos produtos de hidrólise. É importante ressaltar que no processo utilizou-se pH 4,5, o que viria a minimizar a formação de compostos indesejáveis como a maltulose, e que a conversão ocorreu em um passo único, dispensando a correção de pH e a redução da temperatura do processo.

Para os testes de variação da quantidade de enzima (U/g de amido) utilizou-se suspensão de amido a 25% fixando-se o tempo de hidrólise em uma hora. Os resultados estão apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10 – Teores de açúcares redutores, reação com iodo e valores DE dos hidrolisados de amido de mandioca utilizando diferentes concentrações de solução enzimática bruta do *Mucor* sp A13-36, durante três horas de hidrólise

CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA (U/g AMIDO)	AÇ. REDUTOR* (mg/mL HIDROLISADO)	REAÇÃO COM IODO	DE
20	107,2	–	38,5
30	159,2	–	58,3
40	253,6	–	89,2

* padrão maltose

Os resultados mostrados indicam que o aumento da quantidade de enzima conduziu a um aumento na conversão do amido a açúcares redutores. Quando comparado ao controle (20 U/g amido), observa-se um aumento de aproximadamente 50% na conversão quando se utilizou 30 U/g

amido e cerca de 130% quando se utilizou 40U/g. Esses valores ultrapassaram aqueles em que a hidrólise ocorreu durante três horas. A conversão de 89,2% do amido em açúcares redutores, com a concentração de 40 U/g de substrato, confere rendimento excelente de hidrólise, em tempo relativamente curto e em um único passo, o que torna esses resultados animadores sob o ponto de vista de aplicação.

Uma vez que as α-amilases não atuam sobre as ligações glicosídicas α-1,6 presentes na molécula de amido, o teor de maltose é limitado a 60%, devido ao alto teor de maltotriose formado (HEBEDA, 1987; SAHA e ZEIKUS, 1987). Ainda segundo estes mesmos autores, a quantidade máxima de maltose é também limitada pela formação de maltotriose a partir da hidrólise de polímeros de D-glicose com comprimento de cadeia ímpar, os quais são formados durante a etapa de liquefação. Como pôde ser verificado nos ensaios durante a fase de seleção, a linhagem em questão não é boa produtora de glicoamilase, sendo os elevados teores de açúcares redutores provavelmente resultantes da atividade sacarificante da α-amilase presente no extrato enzimático bruto.

9.3. Análise cromatográfica dos açúcares presentes nos hidrolisados

9.3.1. Hidrólise do amido de mandioca em duas etapas

Os perfis de distribuição dos açúcares presentes nos hidrolisados resultantes da hidrólise das suspensões de amido de mandioca a 25% tratadas com as soluções enzimáticas bacteriana e fúngica em duas etapas (item 10.1.) são mostrados nos cromatogramas da **Figura 38**.

Quando a suspensão de amido a 25% foi hidrolisada com solução enzimática bacteriana durante duas horas **(Fig. 38 A)** nota-se bandas referentes aos padrões de glicose, maltose e maltotriose, além de uma banda maior possivelmente correspondente aos componentes maiores que a maltotriose os quais não se separam pelo método usado.

(A)

(B)

Figura 38 – Cromatografia de papel descendente, em papel *Whatman* nº 1, dos produtos de hidrólise do amido de mandioca a 25% tratados com as soluções enzimáticas brutas do *Bacillus* sp A13-22 (A) e *Mucor* sp A13-36 (B), em duas etapas.
Padrões: G = glicose, G2 = maltose, G3 = maltotriose, G4 = maltotetrose, G6 = maltohexose e G7 = maltoheptose.

Quando utilizou-se a solução enzimática bruta do *Mucor* sp A13-36, nota-se a ausência de glicose e presença das bandas referentes à maltose, maltotriose e uma banda maior correspondente ao material que não se separou no processo cromatográfico **(Fig 38 B)**.

A presença de glicose no hidrolisado tratado com enzima bacteriana é, provavelmente, decorrente da ação de glicoamilase, detectada na solução enzimática **(Fig. 29 e 30)**. Por outro lado, a ausência desse açúcar no hidrolisado com a enzima fúngica, pode ser justificado pela ausência dessa enzima **(Fig. 31)**, sendo a presença de maltose no hidrolisado resultante da ação sacarificante das α-amilases fúngicas.

Segundo Ali et al. (1999) a hidrólise de 1% de amido de batata pelas amilases termoestáveis produzidas pela linhagem de *Bacillus* sp US100 resultou, ao final de 72 horas, em maltopentose e maltohexose (cerca de 34 e 20%, respectivamente), seguido de maltotriose e maltose (aproximadamente 20%), maltotetrose e glicose (cerca de 8%) e com teores de maltoheptose quase não detectáveis. Na composição de carboidratos em hidrolisados enzimáticos de amido de trigo após a sacarificação, Nebesny (1993) observou um pequeno conteúdo de glicose e oligossacarídeos de baixo peso molecular (G_1-G_4) e grande conteúdo de oligossacarídeos maiores e dextrinas, que causou baixo valor DE a este hidrolisado. Já Govindasamy et al. (1996), verificaram que oligossacarídeos como a maltose, maltotriose, maltopentose e maltohexose foram predominantes nos extrudados solúveis da hidrólise enzimática do amido de sagu, e que a glicose não foi detectada.

Sabendo que a presença de glicose no hidrolisado, por períodos prolongados, pode ser comprometida face à característica da glicoamilase de reversão dos produtos de reação (SIMS e CHERIAN, 1992), realizou-se experimentos nos quais os perfis dos açúcares redutores liberados pela ação enzimática foram acompanhados. Para esses ensaios, utilizou-se como substratos, soluções de amido a 1%.

Quando foi utilizada a enzima de *Bacillus* sp A13-22, nota-se que nos primeiros cinco minutos de reação as bandas referentes à glicose, maltose e maltotriose já estão presentes. Entretanto, a banda de glicose já apareceu menos nítida nos cromatogramas referentes aos tempos de hidrólise

superiores a vinte minutos, embora tenham sido aplicados os mesmos volumes de amostras, sugerindo uma possível reação de reversão pela glicoamilase **(Fig. 39 A-F)**.

Quando foi utilizada a enzima do *Mucor* sp A13-36 nota-se a ausência de glicose em todos os tempos de hidrólise estudados, confirmando a não liberação desse açúcar durante a hidrólise enzimática do amido. Note-se também que até trinta minutos, apenas a banda referente à maltose é observada de forma nítida **(Fig. 40 A-F)**.

B(5') G G2 G3 G4 G6 G7

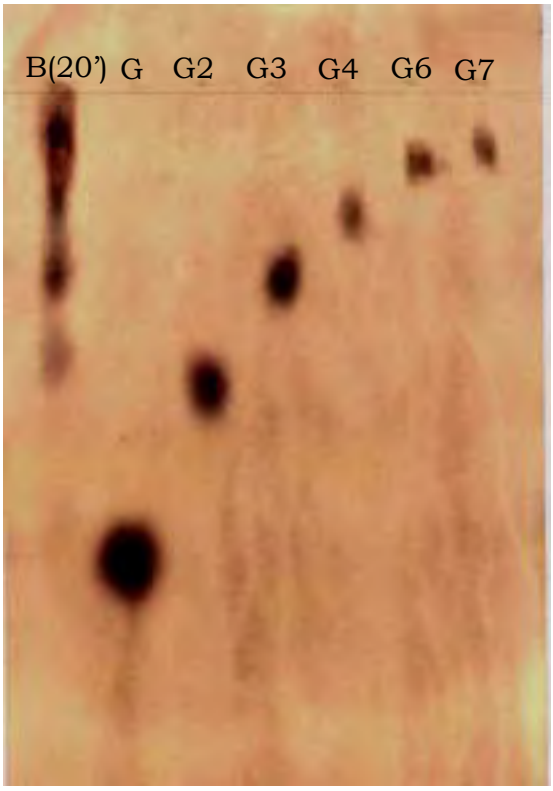
(A)

B(10') G G2 G3 G4 G6 G7

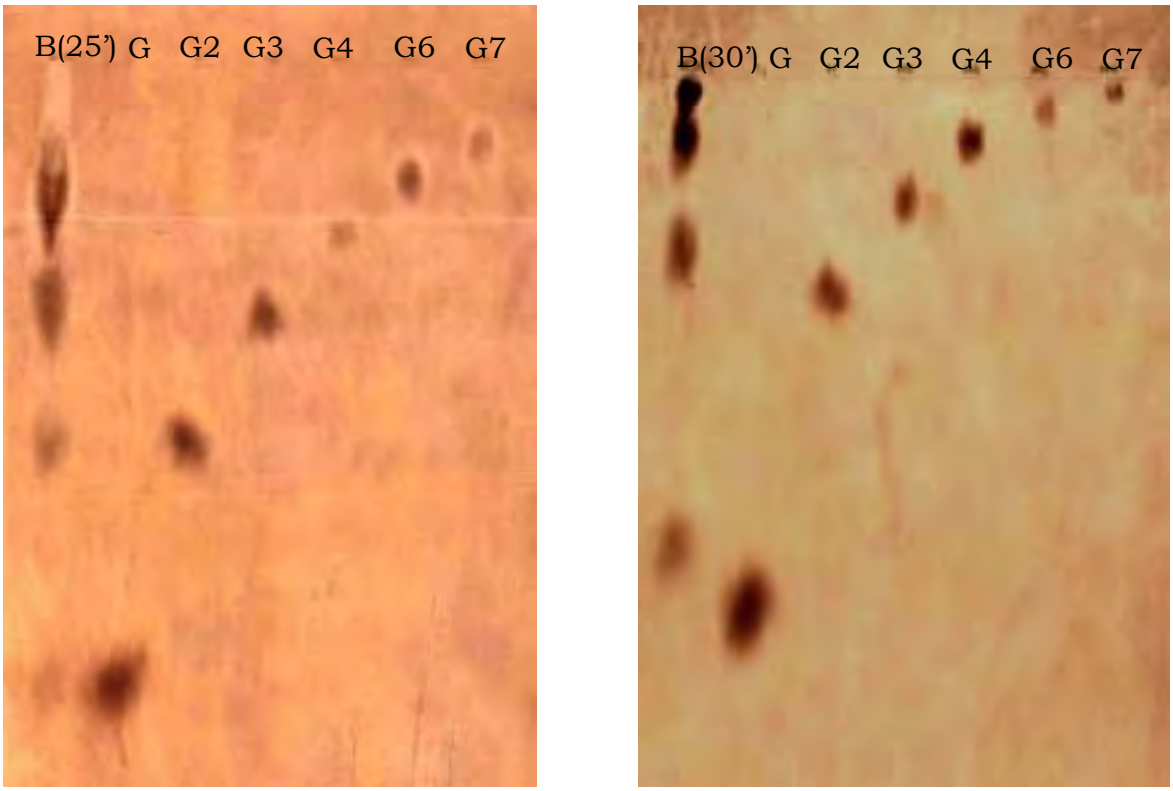
(B)

B(15') G G2 G3 G4 G6 G7

(C)


B(20') G G2 G3 G4 G6 G7

(D)



(E) (F)

Figura 39 – Cromatografia de papel descendente, em papel *Whatman* nº 1, dos produtos de hidrólise do amido de mandioca a 1%, em diferentes tempos, pela ação da solução enzimática bruta do *Bacillus* sp A13-22. Em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) são mostrados o perfil de corrida dos produtos após 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de hidrólise, respectivamente. Padrões: G = glicose, G2 = maltose, G3 = maltotriose, G4 = maltotetrose, G6 = maltohexose e G7 = maltoheptose.

F(5') G G2 G3 G4 G6 G7

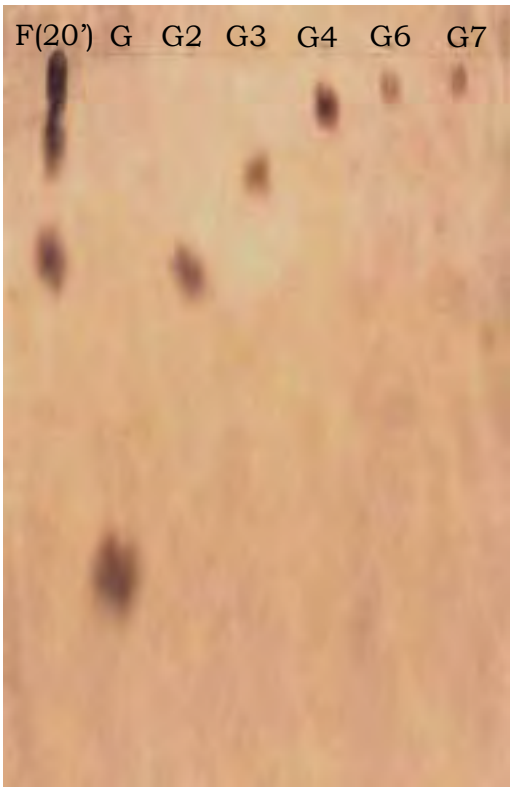
(A)

F(10') G G2 G3 G4 G6 G7

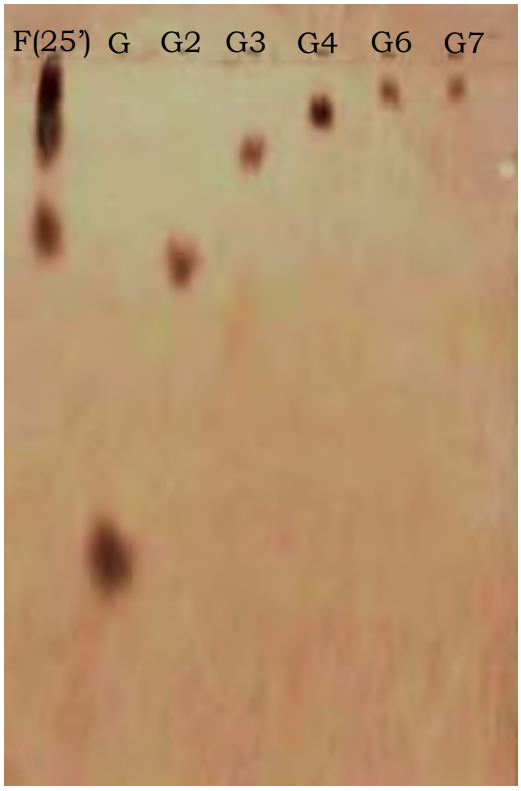
(B)

F(15') G G2 G3 G4 G6 G7

(C)


F(20') G G2 G3 G4 G6 G7

(D)



(E)

(F)

Figura 40 – Cromatografia de papel descendente, em papel *Whatman* nº 1, dos produtos de hidrólise do amido de mandioca a 1%, em diferentes tempos, pela ação da solução enzimática bruta do *Mucor* sp A13-36. Em (A), (B), (C), (D), (E) e (F) são mostrados o perfil de corrida dos produtos após 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de hidrólise, respectivamente.
Padrões: G = glicose, G2 = maltose, G3 = maltotriose, G4 = maltotetrose, G6 = maltohexose e G7 = maltoheptose.

A quantificação dos açúcares redutores presentes nos hidrolisados pela enzima bacteriana, em cada amostra cromatografada, indicou que os teores aumentaram rapidamente até os primeiros quinze minutos de hidrólise com pequena redução até 30 minutos **(Fig. 41)**, dados estes considerados consistentes com àqueles das cromatografias.

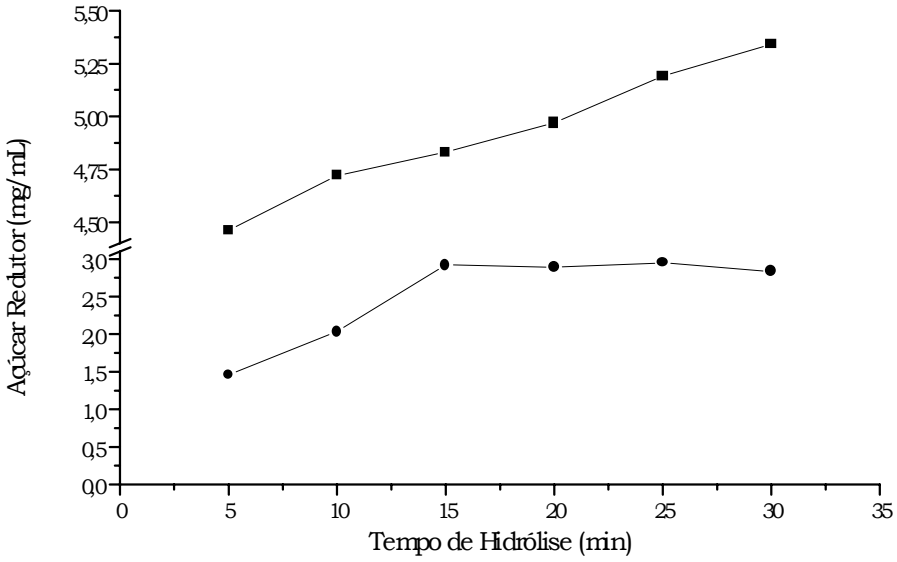


Figura 41 - Açúcares redutores liberados pela ação enzimática após diferentes tempos de hidrólise do amido de mandioca a 1% pela solução enzimática bruta do *Bacillus* sp A13-22 (—●—) e *Mucor* sp A13-36 (—■—), expressos em glicose e maltose, respectivamente.

Por outro lado, nos hidrolisados referentes à enzima fúngica, a concentração de açúcares redutores aumentou gradativamente durante os trinta minutos de reação, atingindo um valor de 5,3 mg/mL, quase duas vezes maior que o obtido no hidrolisado pela enzima bacteriana.

9.4. Perfil de viscosidade dos amidos de mandioca natural e tratado com solução enzimática bruta

As α-amilases são utilizadas na liquefação do amido, etapa em que há redução substancial na viscosidade do meio. Uma vez que esta enzima é componente da solução enzimática bruta (avaliada pela atividade dextrinizante), o perfil de viscosidade dos amidos natural e sob a ação das enzimas bacteriana e fúngica são mostradas na **Figura 42**.

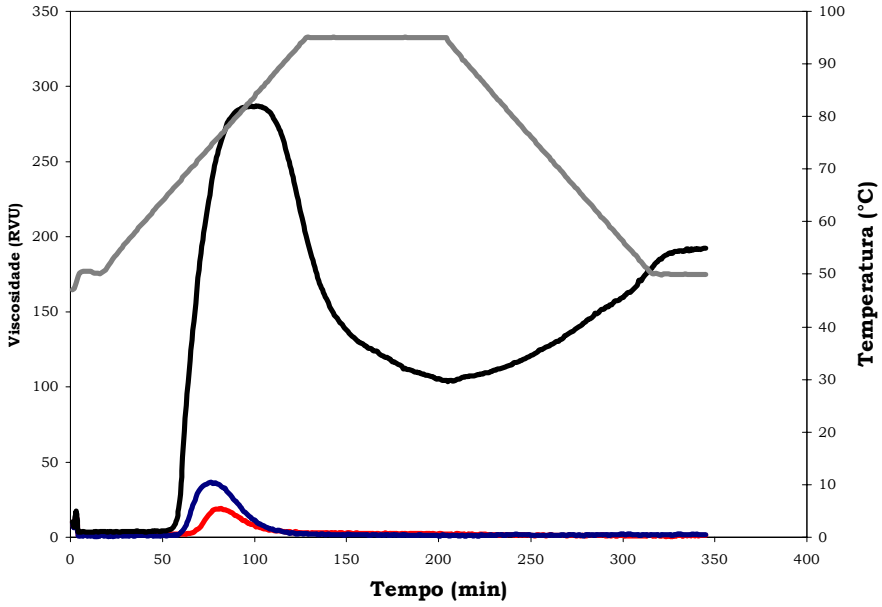


Figura 42: Viscosidade das soluções durante a liquefação do amido de mandioca natural (—) e tratado com as soluções enzimáticas do *Bacillus* sp A13-22 (—) e do *Mucor* sp A13-36 (—), monitoradas pelo rápido visco analisador (RVA).

Os resultados obtidos indicam que o amido de mandioca natural apresentou perfil viscoamilográfico típico, conforme descrito na literatura (SWINKELS, 1985), com uma alta viscosidade de pico (287 RVU). A ação das enzimas bacteriana e fúngica sobre o mesmo provocou uma redução de 93 e 87%, respectivamente, da viscosidade à quente sendo a amostra tratada com a enzima bacteriana a mais afetada. Verifica-se também que não houve recuperação da viscosidade final em ambos os tratamentos.

Aqui observou-se a ação dextrinizante das enzimas utilizadas, sendo esta mais intensa para a enzima bacteriana, como era esperado.

A atividade ótima das enzimas em temperaturas elevadas e o elevado valor DE obtido pelos tratamentos enzimáticos, durante um período de tempo relativamente curto (normalmente utilizado para o processo de liquefação), salientam as características excepcionais das amilases produzidas pelo *Bacillus* sp A13-22 e *Mucor* sp A13-36.

Tais características possibilitariam o uso destas enzimas nos passos de liquefação e sacarificação do amido para a produção de xaropes.

As amilases produzidas pelo *Bacillus* apresentam mais de 80% das suas atividades a 60°C e retêm quase 50% da atividade em pH 5,0. Já as amilases produzidas pelo *Mucor* sp A13-36 apresentam mais de 80% das suas atividades a 60°C e a atividade ótima da enzima é em pH 4,5. Estas características possibilitariam o uso destas enzimas para a conversão do amido a xaropes com alto teor de glicose ou maltose, podendo ser mantidas ativas durante todo o processo.

CONCLUSÕES

1. A partir de amostras de solos, compostagens e resíduos agro-industriais foi possível o isolamento de linhagens microbianas produtoras de amilases termofílicas, em temperatura de 50ºC para as linhagens bacterianas e 45ºC para as linhagens fúngicas, com amido como única fonte de carbono.

2. Os resíduos líquidos e sólidos da extração de amido de milho e mandioca, bem como o amido solúvel e o farelo de trigo foram bons substratos para a produção de amilases, sendo o meio nutriente-mandioca, no qual o farelo de mandioca foi utilizado como fonte de carbono (fermentação submersa}, e o farelo de trigo (fermentação semi-sólida) bons indutores para a produção de amilases.

3. As amilases produzidas, em fermentação submersa no meio nutriente-mandioca, pelas linhagens bacterianas ($A4_4$-f, *Bacillus* sp $A4_1$-b, *Bacillus* sp A13-22) e fúngica (*Mucor* sp A13-36) selecionadas, apresentaram pH ótimo de 6,5 e 4,5 respectivamente. As α-amilases produzidas pelas linhagens bacterianas $A4_1$-b e $A4_4$-f foram estáveis na faixa de pH de 4,5 a 10,0, as do *Bacillus* sp A13-22 entre 5,5 a 9,0 e as do *Mucor* sp A13-36 de 3,0 a 4,0. As temperaturas máximas de atividades de α-amilase foram de 60°C para o *Bacillus* sp $A4_1$-b, 65°C para a linhagem $A4_4$-f, 70°C para o

Bacillus sp A13-22 e 80°C para o fungo *Mucor* sp A13-36. Quanto a tolerância à temperatura as amilases do *Bacillus* sp $A4_1$-b foram estáveis entre 5 e 55°C, as enzimas da linhagem $A4_4$-f apresentaram estabilidade entre 5 e 50°C, as amilases do *Bacillus* sp A13-22 mantiveram 80% da atividade inicial a 65°C, e as amilases do *Mucor* sp A13-36 foram as mais termoestáveis das enzimas estudadas, com 100% de atividade após uma hora a 65°C.

4. As amilases produzidas pela linhagem bacteriana *Bacillus* sp A13-22 e pela linhagem fúngica *Mucor* sp A13-36 apresentaram pH (6,5 e 4,5, respectivamente) e temperatura (70 e 80°C, respectivamente) ótimos de atividade adequados à utilização no processamento industrial do amido.

1. Sugestões para estudos futuros

No intuito de complementar este trabalho, sugere-se que para as linhagens selecionadas sejam realizados os seguintes estudos:

- identificação das linhagens em nível específico;
- efeito da temperatura de crescimento e do pH inicial do meio de cultivo, uma vez que neste trabalho estas foram fixadas de acordo com as características gerais de linhagens bacterianas e fúngicas;
- purificação das amilases produzidas;
- aplicação das amilases no processamento de amidos de diferentes origens, com análise qualitativa e quantitativa dos produtos de hidrólise, a fim de se conhecer o tipo de xarope produzido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MOAGEM DE MILHO. **Visão do setor**. Disponível em: <http//www.abimilho.com.br/setor.html>. Acesso em: 21 jan. 2000a.

_____. **Consumo por segmento**. Disponível em: <http//www.abimilho.com.br/estatísticas.html>. Acesso em: 28 abr. 2000b.

_____. **Aplicações**. Disponível em: <http//www.abimilho.com.br/aplicações.html>. Acesso em: 31 jan. 2000c.

_____. **Riqueza/produtividade**. Disponível em: <http//www.abimilho.com.br/riqueza.html>. Acesso em: 21 jan. 2000d.

ALEXOPOULUS, C.J. MINS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology.** 4th ed. Wiley: USA, 1996. 869 p.

ALI, M.B.; MEZGHANI, M.; BEJAR, S. Thermostable α-amylase producing maltohexaose from a new isolated *Bacillus* sp. US 100: study of activity and molecular cloning of the corresponding gene. **Enz. Microbiol. Technol.**, v. 24, p. 584-589, 1999.

ALI, S.; HOSSAIN, Z. Characteristics of glucoamylase from *Aspergillus terreus*: **J. Appl. Bacteriol**., v. 71, p. 144-146, 1991.

ALVAREZ, H.; SUMERLI, R.; CEREDA, M.P.; CHUZEL, G. Panorama da produção e uso dos hidrolisados no Brasil. **Boletim técnico CERAT/UNESP**, São Paulo, 1997, p. 35.

ANDRADE, C.M.M.C.; PEREIRA Jr., N.; ANTRHANIKIAN, G. Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes**. Rev. Microbiol.**, v. 30, p. 287-298, 1999.

ANTRANIKIAN, G.; RUDIGER, A.; CANGANELLA, F. KLINGEBERG, M.; SUNNA, A. Biodegradation of polymers at temperatures up 130-degrees-C. **J. Macromol. Sc. Pure and Apll. Chem.**, v. 32, p. 661-669, 1995.

AQUINO, A.C.M.H. **Purificação e determinação de propriedades bioquímicas das atividades glucoamilase e α-amilase produzidas pelo fungo termofílico** *Scytalidium thermophilum* **15.1**. 2000. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) – FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ARNESEN, S.; ERIKISEN, S.H.; OLSEN, J.; JENSEN, B. Increased production of α-amylase from *Thermomyces lanuginosus* by the addition of Tween 80. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 23, p. 249-252, 1998.

BEM ALI, M.B; MEZGHANI, M.; BEJAR, S. A thermostable α-amylase producing maltohexaose from a new isolated *Bacillus* sp. us100: study of activity and molecular cloning of the corresponding gene. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 24, p. 584-589, 1999.

BERGMEYER, H.U.; BERNT, E. Methods of enzymatic analysis. In: BERGMEYER, H.U. (ed).**Methods of enzymatic analysis.** New York: Verlag-Chimie-Academic Press, 1974. 3 v. p. 1205-1215.

BIGELIS, R. Carbohydrases. In: NAGODAWITHANA, T., REED, G. **Enzymes in food processing**. 3th ed. New York: Academic Press, 1993. p. 121-158.

BROOKS, J.R.; GRIFFI, U.K. Saccharide analysis of corn syrup solids and maltodextrins using high-performance liquid chromatograhy. **Cereal Chem.**, v. 64, n. 4, p.253-255, 1987.

BROCK, T.D. **Thermophilic microorganism and life at high temperatures**. New York: Springer-Verlag, 1978.

_____. Life at high temperatures. **Science**, v. 230, p. 132-138, 1985.

BROWN, S. H.; COSTANTINO, H. R. Characterization of amylolytic enzyme activities associated with the hyperthermophilic archaeobacterium *Pirococcus furiosus.* **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 7, p. 1985-1991, 1990.

BROWN, S.H.; KELLY, R.M. Characterization of amylolytic enzymes, having both α-1,4 and α-1,6 hydrolytic activity, from the thermophilic Archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, n. 8, p. 2614-2621, 1993.

BRUMM, P.J. Enzymatic production of dextrose. **Cereal Food World**, v. 40, n. 11, p. 804-07, 1998.

CANGANELLA, F.; ANDRADE, C.M.; ANTRANIKIAN, G. Characterization of amylolytic and pullulytic enzymes from thermophilic Archae and from a new *Fervidobacterium* species. **Appl. Microbiol. Biotechnol**., v. 42, p. 239-245, 1994.

CHUNG, Y.C.; KOBAYASHI, T.; KANAI, H.; AKIBA, T.; KUDO, T. Purification and properties of extracellular amylase from the hypherthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* DT432, **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 4, p. 1504-1506, 1995.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Estimativa da produção de grãos, 13 de julho de 1999.** Disponível em:

<:http//www.conab.gov.br/html/abast/safra/avalisafra/cptpr>. Acesso em: 22 set. 1999.

COSTANTINO, H.R.; BROWN, S.H.; KELLY, R.M. Purification and characterization of an α-glucosidase from a hyperthermophilic archaebacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature optimum of 105 to 115°C. **J. Bacteriol.**, v. 172, n. 7, p. 3654-3660, 1990.

CRABB, W.D.; MITCHINSON. C. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. **Tibtech**, v. 15, p. 349-352, 1997.

CRUZ, R.; SOUZA, E.L.; HOFFMANN, E.H.E.; BELLINI, M.Z.B.; CRUZ, V.D.; VIEIRA, C.R. Relationship between carbon source, production and pattern action of α-amylase from *Rhizopus* sp. **Rev. Microbiol.**, v. 28, p. 101-105, 1997.

DA SILVA, R. **Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de** *Humicola sp* **179-5 e aplicação dessas enzimas**. 1992. 147 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DECLERCK, N.; MACHIUS, M.; CHAMBERT, R.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; GAILLARDIN, C. Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* α-amylase: thermodynamic studies and structural interpretation. **Protein Eng.**, v. 10, n. 5, p. 541-549, 1997.

DEL BIANCHI, V. **Balanço de massa e de energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do Estado de São Paulo**. 1998. 118 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DUEDAHL-OLESEN, L.; KRAGH, K.M.; ZIMMERMANN, W. Purification and characterization of a malto-oligosaccharide-forming amylase active at high pH from *Bacillus clausii* BT-21. **Carbohydr. Res.**, v. 329, p. 97-107, 2000.

EFFIO, C.P.; SILVA, E.F. ; PUEYO, M.T. A simple methods for screening amylolytic bacteria. **Biochem. Educ**., v. 28, p. 47-49, 2000.

FABRIANI, G.; LINTAS,C. **Durum wheat: Chemistry and thecnology**. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, Inc, 1988. 322 p.

FACCIOTTI, M.C.R.; KILIKIAN, B.V.; SCHIMIDELL, W.; FACHINI, E.R. Processo descontínuo de síntese de amiloglucosidade por *Aspergillus awamori*: Influência do pH e da concentração inicial de polissacarídeo. **Rev. Microbiol.**, v. 20, n. 1, p. 108-114, 1989.

FONTANA, A. Analysis and modulation of protein stability. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 2, p. 551-560, 1991.

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

GANTELET, H.; DUCHIRON, F.; Purification and properties of a thermoactive and thermostables pullulanase from *Thermococcus hydrothermalis*, a hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 49, p. 770-777, 1998.

GLAZER, A.N.; NIKAIDO, H. **Microbiol. Biotechnoly.** New York: W.H. Freeman and Company, 1995. 662 p.

GOMES, E.; DA SILVA, R.; IEMBO, T. The production, characterization and properties of depolymerizing enzymes from a strain of *Curvalaria inaequalis*: **Folia Microbiol.**, v. 46, p. 303-308, 2001.

GOSH, A.; CHATTERJEE, B. DAS, A. Purification and characterization of glucoamylase of *Aspergillus terreus* NA-170 mutant. **J. Apll. Bacteriol.**, v. 71, p. 162-169, 1991.

GOTO, C.E.; BARBOSA, E.P.; KISTNER, L.C.L.; GANDRA, R.F.; ARRIAS, V.L.; PERALTA, R.M. Production of amylases by *Aspergillus fumigatus*: **Rev. Microbiol**., v. 29, p. 99-103, 1998.

GOVINDASAMY, S.; CAMPANELLA, O.H.; OATES, C.G. Enzymatic hydrolisis of sago starch in a twin-screw extruder. **J. Food Eng.**, v. 32, p. 403-426, 1997.

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

HEBEDA, R.E.; STYRLUND, C.R.; TEAGUE, W.M. Benefits of *Baccilus megaterium* amylase in dextrose production. **Starch/Stärke**, v. 40, n. 1, p.33-35, 1988.

HEBEDA, R.E. Corn sweeteners. In: WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. **Corn, chemistry and technology**. St Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemistry, Inc. 1987.

HEBEDA, R.E.; LEACH, The nature of insoluble starch particles in liquefied corn-starch hydrolysates. **Cereal chemystry**, v. 51, n. 2, p. 272-281, 1974.

HEINEN, W.; LAUWERS, A.M. Amylase activity and stability at high and low temperature depending on calcium and other divalent caiotns. **Experientia Suppl.**, v.26, n. 77, 1975.

HOBBS, L. Corn syrups. **Cereal foods World**, v. 31, n. 12, p. 852-858, 1986.

HOUGH, D.W.; DANSON, M.J. Extrozymes. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 3, n. 1, p. 39-46, 1999.

HOSH, A.; CHATTERJEE, B.; DAS, A. Purification and characterization of glucoamylase of *Aspergillus terreus* NA-170 mutant. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 71, p.162-169, 1991.

HSIU, J.; FISHER, E.H.; STEIN, E.A. Alpha-amylase as calcium metallenzymes. II. Calcium and catalytic activity. **Biochemistry**. v. 3, n. 64, p. [ ], 1964.

HUBER, R.; LANGWORTNY, T.H.; KONIG, H.; THOMM, M.; WOESE, C.R.; SLEYTR, U.B.; STETTER, K.O. *Thermogota maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up 90ºC. **Arch. Microbiol**., v. 144, p. 324-333, 1986.

JAMES, J.A.; LEE, B.H. Glucoamylase: Microbial sources, industrial applications and molecular biology - A Review. **J. Food. Biochem.**, v. 21, p.1-52, 1997.

JIN, B.; LEEUWEN, H.J.; PATEL, B.; YU, Q. Utilization of starch processing wastwater for production of microbial biomass protein and fungal α-amylase by *Aspergillus oryzae*. **Resour. Technol.**, v. 66, p. 201-206, 1998.

JOVET, P.; DECLERCK, N. ; GAILLARDIN, C. Hyperthermostable variants of a highly thermostable alphe-amylase. **Biotechnology**, v. 10, p. 1579-1583, 1992.

KILIKIAN, B.V. Production of glucoamylase by fed-batch culture of *Aspergillus awamori* NRRL 3112. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 137-141, 1996.

KOCH, R.; SPREINAT, A.; LEMKE, K.; ANTRANIKIAN, G. Purification and properties of a hyperthermoactive α-amylase from archaeobacterium *Pyrococcus woesei*. **Arch. Microbiol.**, v. 155, p. 572-578, 1991.

KRISTJANSSON, J.K.; HREGGVIDSSON, G.O. Ecology and habitats of extremophiles. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 11, p. 17-25, 1995.

LADERMAN, A.K.; DAVIS, B.R.; KRUTZCH, H.C.; LEWIS, M.S.; GRIKO, Y.V. PRIVALOV, P.L.; ANFINSEN, C.B. The purification and characterization of an extremely thermostable α-amylase from hyperthermophilic archaebacterium *Pyrococcus furiosus*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 32, p. 24394-24401, 1993.

LASZLO, H.; BASSO, L.M.; COELHO, C.M.L. **Química de Alimentos**. São Paulo: Nobel, 1986. 98p.

LASA, I.; BERENGUER, J. Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. **Microbiol. Sem.**, v. 9, p. 77-89, 1993.

LEE, Y.K.; KIM, K.T. Gelatinization and liquefation of starch with a heat stable α-amylase. **J. Food Sci.**, v. 55, n. 5, p. 1371-72, 1990.

LEGIN, E.; LADRAT, C.; GODFROY, A.; BARBIER, G.; DUCHIRON, F. Thermostable amylolitic enzymes of thermophilic microorganisms from deep-sea hydrothermal vents. **C. R. Acad. Sci**., v. 320, p. 893-898, 1997.

LEHNINGER, A.C.; NILSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica.** 2th ed. Worth Publishers, 1995.

LIN, L. L.; TSAU, M.R.; CHU, W.S. General characteristics of thermostable amylopullulanases and amylases from the alkalophilic *Bacillus* sp. TS-23. **Appl. Microbiol. Biotechnol**., v. 42, p. 51-56, 1994.

MACMAHON, H.; KELLY, C.T.; FORGARTY, WM. Thermostability of three α-amylçase of *Streptomyces* sp. IMD 2679. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**., v. 22, p. 96-99, 1999.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAAT, M.K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, n. 3, p. 461-488, 2000.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulases technology. **J. Ferment. Technol.**, v. 54, p. 267-286, 1976.

MAMO, G.; GASHE, B.A.; GESSESSE, A. A high thermostable amylase from newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. WN11. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, n. 4, p. 557-560, 1999.

MAMO, G.; GESSESSE, A. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable alpha-amylases from thermophilic *Bacillus*. **Enz. Microbial. Technol.**, v. 25, n. 3-5, p. 433-438, 1999.

MATHEUS, C.K.; VAN HOULD, K.E. **Biochemistry**. Redwood city, California:. The Benjamim/Cummings Publishing Company, 1990. p.260-297.

MATSUMURA, M.; YASUMURA, S.; AIBA, S. Cumulative effect of intragenic amino-acid replacements on the thermostability of a protein. **Nature**, v. 323, p. 356-358, 1986.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem**., v. 31, p. 426-428, 1959.

MOREIRA, F.G.; LIMA, F.A.; PEDRINHO, S.R.F.; LENARTOVIEZ, V.; SOUZA, C.M.S.; PERALTA, R.M. Production of amylases by *Aspergillus tamarii*. **Rev. Microbiol**., v. 30, p. 157-162, 1999.

MULIMANI, V.H.; PATIL, G.N.; RAMALINGA, M. α-Amilase production by solid state fermentation: A new practical approach to biotechnology courses. **Biochemical Education**, v. 28, p. 161-163, 2000.

NAGODAWITHANA, T., REED, G. **Enzymes in food processing**. 3th ed. New York: Academic Press, 1993. p. 121-158.

NEBESNY, E. Changes of carbohydrate compositions during enzymatic hydrolisis of starches of various origin. **Starch/Stärke**, v. 45, n. 12, p. 426-429, 1993.

NIEHAUS, F.; BERTOLDO, C.; KAHLER, M.; ANTRANIKIAN, G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, p. 711-729, 1999.

NIGAN, P.; SINGH, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. **Enz. Microbiol. Technol**., v. 17, p.770-778, 1995.

PANDEY, A.; NIGAN, P.; VOGEL, M. Simultaneous saccharification and protein enrichment fermentation of sugar beet pulp. **Biotechnol. Lett.**, v. 10, n. 1, p. 67-72, 1988.

PANDEY, A. Recent process development in solid state fermentation. **Process Biochem.**, v. 27, n. 2, p. 109-117, 1992.

_____. Solid state fermentation: An overwiew. In: Pandey, A. (Ed), **Solid State Fermentation**. Wiley Eastern, New Delhi, 1994. p. 3-10.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. NIGAN, P., SOCCOL, V.T.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresour. Technol.**, v. 74, p. 81-87, 2000.

PELCZAR, M. REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia.** Vol. 1, 1ª Ed. São Paulo: Ed. Makron Books, 1981. p.

PRIEST, F.G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriol. Rev.**, v. 41, n. 3, p. 711-753, 1977.

REILLY, P.J. Enzimic degradation of starch. In: BEYNUM, G.M.A.; ROELS, J.A.; DEKKER, M. **Starch Corvertion Technology**. New York, 1985. p.101-142.

RONASZEK, G.; NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABO, J. M.; HOSCHKE, A. BHAT, M. K. Screening the strains of thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosos* for amylolytic activities. **Acta Aliment.**, v. 29, n. 1, p. 71-79, 2000.

SAHA, B.C.; ZEIKUS, J.G. Biotechnology of maltose syrup production. **Process Biochem.**, p.78-82, june 1987.

SALYERS, A.A.; REEVES, A.; D'ELIA, J. Solving the problem of how to eat something as big as yourself: Diverse bacterial strategies for degrading polysaccharides. **J. Ind. Microbiol.**, v. 17, p. 470-476, 1996.

SCHUMANN, J.; WRBA, A.; JAENICKE, R.; STETTER, K.O. Topographical and enzymatic characterization of amylases from the extremely thermophilic eubacterium *Thermogota maritima*. **Fed. Europ. Biochem. Soc.**, v. 282, n. 1, p. 122-126, 1991.

SHAW, J.F.; LIN, F.P.; CHEN, S.C.; CHEN, H.C. Purification and properties of an extracellular α-amylase from *Thermus* sp. **Bot. Bull. Acad.**, v. 36, p. 195-200, 1995.

SIMMS, R.L. The technology of corn wet milling. In: BEYNUM, G.M.A.; ROELS, J.A.; DEKKER, M. **Starch Corvertion Technology**. New York, 1985. p. 47-72.

SIMS, K.A.; CHERIAN, M. Continuous production of glucose syrup in an ultrafiltration reactor. **J. Food Sci.**, v. 57, n. 1, p. 163-166, 1992.

SINGH, S.K.; JOHNSON, L.A.; POLLAK, L.M.; FOX, S.R., BAILEY, T.B. Comparison of laboratory and pilot-plant corn wet-milling procedures. **Cereal chem.**, v. 74, p. 40-48, 1997.

SLOMINSKA, L.; STAROGARDZKA, G. Studies on the application of maltogenic amylase in the production of maltose containing syrup. **Starch/Stärke,** v.38, n. 6, p. 205-210, 1986.

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

SOARES, M.M.C.N.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential aplication on juice extration. **World J. Biotechnol.**, v. 17, p. 79-82, 2001

STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; COELHO, L.C.B.B.; ARAÚJO, J.M. Production and characterization of a thermostable α-amylase from *Nocardiopsis* sp. endophyte of yam bean. **Bioresour. Technol.**, v. 76, p. 137-141, 2001.

STOLP, H. **Microbiol ecology: organisms, habitats, activities**, Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 280p.

SWINKELS, J.J.M. Sources of starch, its chemistry and physic. In: BEYNUM, G.M.A.;. ROELS, J.A.; DEKKER, M. **Starch: Source, chemistry, and physics**, 1985. p.15-46.

TEAGUE, W.M.; BRUMM, P.J. Commercial enzymes for starch hydrolysis products, In: SCHENK, F.W.; HEBEDA, R.E. **Starch Hydrolysis Products**, VCH publischers, 1992. p. 45-77.

TREVELIN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.G. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, v. 166, p. 444-445, 1950.

VALLEE, B.L.; STEIN, E.A., SUMMERWELL, W.N.; FISHER, E.H. Metal content of α-amylase of various origins. **J. Biol. Chem.**, v. 234, p. 2901-2906, 1959.

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

WOODS, L.F.J.; SWINTON, S.J. Enzymes in the starch and sugar industries. In: TUCKER, G.A.; WOODS, L.F.J. **Enzymes in food processing**. 2th ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995. 319 p.

YALLOP, C. A.; EDWARDS, C.; WILLIAMS, S. T. Isolation and growth physiology of novel thermoactinomycetes. **J. Appl. Microbiol.**, v. 83, n. 6, p. 685-692, 1997.

YUGUO, Z.; ZHAO, W.; XIAOLONG, C. α-Amilase production by *Bacillus subtilis* with dregs in an external-loop airlift bioreactor. **Biochem. Eng. J.**, v. 5, p. 115-121, 2000.

YUTANI, A.; YUTANI, K.; ISEMURA, T. Stability of the conformation of sacharifying α-amylase. **J. Biochem.**, v. 62, p. 201-210, 1969.

APÊNDICE A – Crescimento em meio líquido e amido residual presente no meio de cultivo das linhagens testadas.

	LINHAGEM	**T (°C) CRESCIMENTO**	**CRESCIMENTO M. LÍQUIDO (Abs. 600 nm)**	**REAÇÃO DO MEIO DE CULTURA COM IODO (Abs. 600 nm)***
1	A1-1	50	NA	NA
2	A1-5	55	0,604	0,018
3	A1-6	55	1,008	0,019
4	A1-8	55	1,137	0,288
5	A1-9	55	1,469	0,021
6	A1-11	55	0,879	0,023
7	A1-12	55	1,821	0,029
8	A1-13	55	1,560	0,033
9	A1-14	55	1,180	0,017
10	A1-15	55	0,817	0,384
11	A1-21	55	1,204	0,953
12	A1-24	55	1,586	0,017
13	A1-25	55	1,460	0,110
14	A1-26	55	1,344	0,018
15	A1-27	55	1,265	0,026
16	A3-4	60	1,371	0,018
17	A3-8	55	1,408	0,021
18	A3-9	55	1,319	0,035
19	A3-11	55	1,134	0,997
20	A3-12	55	1,650	0,017
21	A3-14	55	1,342	0,026
22	A3-15	55	1,500	0,092
23	A3-16	55	0,624	0,202
24	A3-17	55	1,552	0,026
25	A3-18	60	2,060	0,029
26	A3-19	55	1,528	0,933
27	A3-20	55	1,341	0,049
28	$A4_1$-2	55	0,666	0,027
29	$A4_1$-b	55	0,224	0,045
30	$A4_1$-d	55	0,564	0,030
31	$A4_1$-e	55	0,583	0,024
32	$A4_2$-2	55	1,761	0,033
33	$A4_4$-a	55	0,352	0,375
34	$A4_4$-b	55	0,613	0,267
35	$A4_4$-e	55	1,657	0,030
36	$A4_4$-f	55	0,482	0,101
37	$A4_4$-h	55	0,432	0,239
38	$A4_4$-i	55	1,025	0,023
39	$A4_5$-2	55	0,266	0,323
40	$A4_5$-a	60	0,411	0,199
41	$A4_5$-b	55	1,881	0,024
42	$A4_6$-c	55	0,672	0,023
43	$A4_6$-d	55	0,535	0,021
44	$A4_6$-f	55	0,710	0,021
45	$A4_7$-1	60	1,028	0,333
46	A5-1	60	1,189	0,029
47	A5-5	55	1,890	0,028
48	A5-6	55	1,841	0,029
49	A5-9	60	0,342	0,005

APÊNDICE A – Crescimento em meio líquido e amido residual presente no meio de cultivo das linhagens testadas (continuação).

	LINHAGEM	T (°C) CRESCIMENTO	CRESCIMENTO M. LÍQUIDO (Abs. 600 nm)	REAÇÃO DO MEIO DE CULTURA COM IODO (Abs. 600 nm)*
50	A5-13	60	0,556	0,065
51	A5-14	60	0,571	0,007
52	A5-25	55	0,471	0,769
53	A5-37	60	1,440	0,016
54	A5-39	55	1,997	0,023
55	A5-41	55	1,728	0,033
56	A5-50	55	0,773	0,331
57	A5-52	55	0,463	0,278
58	A5-53	55	1,524	0,151
59	A5-64	60	1,039	0,259
60	$A6_2$-5	55	1,373	0,033
61	$A6_2$-7	55	0,369	0,370
62	$A6_2$-8	55	0,968	0,035
63	$A7_1$-4	55	1,415	0,0040
64	$A7_3$-1	55	1,097	0,247
65	$A7_3$-2	55	1,086	0,225
66	$A7_3$-3	55	1,274	0,275
67	$A7_3$-4	55	1,409	0,169
68	$A8_1$-1	55	1,097	0,297
69	$A8_1$-3	55	0,428	0,180
70	$A8_2$-2	55	1,369	0,031
71	$A9_2$-2	55	1,751	0,036
72	$A9_3$-1	55	1,915	0,026
73	$A9_5$-1	55	1,501	0,031
74	$A9_5$-2	55	1,686	0,033
75	$A9_5$-3	55	2,142	0,041
76	$A10_1$-4	55	1,908	0,047
77	$A10_1$-a	55	0,469	0,312
78	$A10_1$-c	55	1,854	0,042
79	$A10_3$-a	55	0,526	0,032
80	$A10_4$-2	60	2,015	0,029
81	$A10_4$-3	55	0,894	0,029
82	$A10_4$-a	55	1,261	0,030
83	$A10_5$-9	60	0,738	0,296
84	$A10_5$-a	55	1,447	0,043
85	$A10_5$-b	55	1,803	0,031
86	$A10_5$-d	55	0,628	0,332
87	$A10_7$-b	55	1,613	0,030
88	A11-1	55	0,071	0,367
89	A11-2	55	0,044	0,28
90	A11-3	55	0,062	0,158
91	A11-4	55	1,058	0,131
92	A11-5	50	1,578	0,025
93	A11-6	50	1,537	0,031
94	A11-7	50	1,821	0,035
95	A11-8	50	1,380	0,041
96	A11-9	50	1,568	0,041
97	A11-10	50	1,011	0,009
98	A11-11	50	0,885	0,255
99	A11-12	50	1,242	0,188

APÊNDICE A – Crescimento em meio líquido e amido residual presente no meio de cultivo das linhagens testadas (continuação).

	LINHAGEM	T (°C) CRESCIMENTO	CRESCIMENTO M. LÍQUIDO (Abs. 600 nm)	REAÇÃO DO MEIO DE CULTURA COM IODO (Abs. 600 nm)*
100	A11-13	50	1,494	0,054
101	A11-14	50	1,534	0,052
102	A11-15	50	1,670	0,012
103	A11-16	50	1,305	0,012
104	A11-17	50	1,634	0,013
105	A11-18	50	0,571	0,489
106	A11-19	50	0,820	0,016
107	A11-20	50	1,630	0,012
108	A11-21	50	0,531	0,016
109	A11-22	50	1,543	0,053
110	A11-23	50	0,760	0,415
111	A11-24	55	0,055	0,149
112	A12-1	50	1,422	0,045
113	A12-2	60	0,572	0,033
114	A12-3	60	0,887	0,040
115	A12-5	50	1,633	0,183
116	A12-6	55	1,730	0,031
117	A12-8	50	0,631	0,046
118	A12-9	50	1,534	0,003
119	A12-11	50	1,493	0,056
120	A12-12	50	1,535	0,102
121	A12-13	55	0,704	0,191
122	A12-14	50	0,821	0,309
123	A12-15	50	1,152	0,074
124	A12-16	50	0,792	0,360
125	A12-17	50	1,413	0,008
126	A12-18	50	1,391	0,014
127	A12-19	55	0,115	0,079
128	A12-20	55	0,050	0,009
129	A13-2	55	0,047	0,266
130	A13-4	50	1,290	0,011
131	A13-5	55	0,680	0,068
132	A13-8	55	0,054	0,039
133	A13-9	55	1,236	0,031
134	A13-10	60	1,230	0,147
135	A13-11	55	0,477	0,399
136	A13-12	55	0,354	0,430
137	A13-13	50	1,503	0,002
138	A13-16	50	1,761	0,002
139	A13-17	55	0,093	0,361
140	A13-18	50	1,377	0,003
141	A13-19	55	0,470	0,087
142	A13-20	50	1,205	0,013
143	A13-21	60	0,786	0,160
144	A13-22	55	0,660	0,216
145	A13-23	55	0,835	0,205
146	A13-24	55	1,249	0,048
147	A13-26	55	0,399	0,336
148	A13-27	55	0,431	0,348
149	A13-28	55	0,071	0,318

APÊNDICE A – Crescimento em meio líquido e amido residual presente no meio de cultivo das linhagens testadas (continuação).

	LINHAGEM	**T (°C) CRESCIMENTO**	**CRESCIMENTO M. LÍQUIDO (Abs. 600 nm)**	**REAÇÃO DO MEIO DE CULTURA COM IODO (Abs. 600 nm)***
150	A13-30	50	0,670	0,022
151	A14-3	50	0,943	0,044
152	A14-4	50	0,729	0,013
153	A14-5	50	1,635	0,001
154	A14-7	50	1,792	0,002
155	A14-8	50	1,176	0,037
156	A14-9	50	1,491	0,031
157	A14-10	50	1,705	0,001
158	A14-12	50	1,487	0,002
159	A14-13	50	1,666	0,003
160	A14-14	50	1,352	0,016
161	A14-15	50	0,282	0,570
162	A14-16	50	0,621	0,129
163	A14-17	50	0,284	0,156

***** amido residual presente no meio de cultivo. O meio de reação foi constituído de 0,3 mL de solução enzimática, 0,7 mL de tampão acetato 0,25 M, pH 5,0, 4,0 mL de ácido clorídrico 0,2 N, 0,5 mL de reagente de iodo (KI 0,3% + I_2 0,03%) e 10 mL de água destilada.

APÊNDICE B – Determinação da atividade de amilase produzida em fermentação submersa utilizando diferentes fontes de carbono

LINHAGEM	MEIO	TEMPO CULTIVO (h)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)		
			DEXTRINIZANTE	AMILASE (AR)	GLICOAMILASE
A4$_1$-b	NA	24	0,684	1,444	0,180
	NA	48	0,281	ND	ND
	NA	72	0,253	ND	ND
	NA	96	0,209	ND	0,043
	NA	120	0,190	ND	ND
	Md 1%	24	0,688	5,301	0,221
	Md 1%	48	0,206	ND	ND
	Md 1%	72	0,195	ND	ND
	Md 1%	96	0,157	ND	ND
	Md 1%	120	0,228	ND	ND
	Md RL	24	0,526	0,861	ND
	Md RL	48	0,384	ND	ND
	Md RL	72	0,267	ND	ND
	Md RL	96	0,158	ND	ND
	Md RL	120	0,177	0,579	0,019
	Mi 1%	24	0,593	0,861	ND
	Mi 1%	48	0,214	ND	ND
	Mi 1%	72	0,273	ND	ND
	Mi 1%	96	0,242	0,088	0,020
	Mi 1%	120	0,129	1,206	ND
	Mi RL	24	0,239	0,604	ND
	Mi RL	48	0,200	6,381	0,251
	Mi RL	72	0,208	4,372	ND
	Mi RL	96	0,157	4,016	ND
	Mi RL	120	0,167	1,024	0,084
A4$_4$-f	NA	24	1,070	2,383	0,043
	NA	48	0,083	ND	ND
	NA	72	0,129	ND	ND
	NA	96	0,094	ND	ND
	NA	120	0,081	0,729	ND
	Md 1%	24	1,125	3,560	0,022
	Md 1%	48	0,186	ND	ND
	Md 1%	72	0,145	ND	ND
	Md 1%	96	0,371	1,380	ND
	Md 1%	120	0,167	4,126	ND
	Md RL	24	0,595	ND	0,012
	Md RL	48	0,068	ND	ND
	Md RL	72	0,110	0,106	ND
	Md RL	96	0,082	ND	ND
	Md RL	120	0,143	ND	ND
	Mi 1%	24	1,009	3,506	0,046
	Mi 1%	48	0,250	ND	ND
	Mi 1%	72	0,118	ND	ND
	Mi 1%	96	0,264	0,041	ND
	Mi 1%	120	0,158	ND	ND
	Mi RL	24	0,196	ND	ND
	Mi RL	48	0,413	ND	ND
	Mi RL	72	0,072	ND	ND
	Mi RL	96	ND	ND	ND
	Mi RL	120	0,159	ND	0,158

APÊNDICE B – Determinação da atividade de amilase produzida em fermentação submersa utilizando diferentes fontes de carbono (continuação)

LINHAGEM	MEIO	TEMPO CULTIVO (h)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)		
			DEXTRINIZANTE	AMILASE (AR)	GLICOAMILASE
	NA	24	0,418	2,750	0,010
	NA	48	0,197	1,055	ND
	NA	72	0,111	0,404	ND
	NA	96	ND	0,113	ND
	NA	120	0,111	ND	ND
	Md 1%	24	0,799	3,220	0,011
	Md 1%	48	0,094	1,392	ND
	Md 1%	72	0,161	0,894	0,017
	Md 1%	96	0,148	ND	0,118
	Md 1%	120	0,110	ND	0,010
	Md RL	24	0,464	1,900	0,014
	Md RL	48	0,049	ND	0,010
$A4_4$-i	Md RL	72	ND	ND	ND
	Md RL	96	ND	0,353	ND
	Md RL	120	0,059	ND	ND
	Mi 1%	24	0,638	3,053	0,015
	Mi 1%	48	0,154	0,550	0,003
	Mi 1%	72	0,115	ND	0,002
	Mi 1%	96	0,053	ND	ND
	Mi 1%	120	0,132	ND	0,056
	Mi RL	24	0,150	1,370	ND
	Mi RL	48	0,100	0,908	ND
	Mi RL	72	0,129	0,502	ND
	Mi RL	96	0,124	0,502	ND
	Mi RL	120	0,006	0,786	0,144
	NA	24	0,378	1,407	ND
	NA	48	0,620	2,989	0,056
	NA	72	0,429	1,758	0,012
	NA	96	0,202	0,751	ND
	NA	120	0,163	0,742	ND
	Md 1%	24	0,584	2,740	0,031
	Md 1%	48	0,293	1,328	ND
	Md 1%	72	0,176	0,959	ND
	Md 1%	96	0,093	1,042	ND
	Md 1%	120	0,028	0,417	ND
	Md RL	24	0,542	ND	0,044
	Md RL	48	0,292	0,953	ND
$A4_5$-2	Md RL	72	0,164	0,846	ND
	Md RL	96	0,135	0,161	ND
	Md RL	120	0,121	0,145	ND
	Mi 1%	24	0,496	1,944	0,018
	Mi 1%	48	0,224	0,820	ND
	Mi 1%	72	0,157	0,351	ND
	Mi 1%	96	0,080	0,233	ND
	Mi 1%	120	0,053	0,208	ND
	Mi RL	24	0,256	3,093	ND
	Mi RL	48	0,285	1,540	ND
	Mi RL	72	0,298	0,486	0,370
	Mi RL	96	0,151	ND	0,385
	Mi RL	120	0,115	ND	0,371

APÊNDICE B – Determinação da atividade de amilase produzida em fermentação submersa utilizando diferentes fontes de carbono (continuação)

LINHAGEM	MEIO	TEMPO CULTIVO (h)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)		
			DEXTRINIZANTE	AMILASE (AR)	GLICOAMILASE
$A4_7$-1	NA	24	0,394	2,126	0,047
	NA	48	0,141	0,529	0,015
	NA	72	0,111	ND	ND
	NA	96	0,095	ND	ND
	NA	120	0,189	ND	ND
	Md 1%	24	0,700	2,298	0,015
	Md 1%	48	0,222	ND	0,010
	Md 1%	72	0,142	ND	ND
	Md 1%	96	0,107	ND	ND
	Md 1%	120	0,099	ND	ND
	Md RL	24	0,405	ND	ND
	Md RL	48	0,131	ND	0,012
	Md RL	72	0,089	ND	0,017
	Md RL	96	0,073	ND	0,019
	Md RL	120	0,335	ND	ND
	Mi 1%	24	0,422	1,859	0,032
	Mi 1%	48	0,287	ND	ND
	Mi 1%	72	0,145	ND	ND
	Mi 1%	96	0,149	ND	ND
	Mi 1%	120	0,082	ND	ND
	Mi RL	24	0,388	ND	ND
	Mi RL	48	0,162	ND	ND
	Mi RL	72	0,174	ND	0,049
	Mi RL	96	0,149	ND	0,047
	Mi RL	120	0,074	ND	0,070
A11-4	NA	24	0,181	ND	ND
	NA	48	0,223	ND	ND
	NA	72	0,192	ND	ND
	NA	96	0,195	ND	ND
	NA	120	0,261	ND	ND
	Md 1%	24	0,270	ND	ND
	Md 1%	48	0,276	ND	ND
	Md 1%	72	0,201	ND	ND
	Md 1%	96	0,223	ND	ND
	Md 1%	120	0,252	ND	ND
	Md RL	24	0,351	ND	ND
	Md RL	48	0,551	0,689	0,010
	Md RL	72	0,632	0,252	0,017
	Md RL	96	0,401	ND	0,005
	Md RL	120	0,493	ND	ND
	Mi 1%	24	0,231	ND	ND
	Mi 1%	48	0,262	ND	ND
	Mi 1%	72	0,211	ND	ND
	Mi 1%	96	0,302	ND	ND
	Mi 1%	120	0,330	ND	ND
	Mi RL	24	0,225	ND	ND
	Mi RL	48	0,241	ND	ND
	Mi RL	72	0,131	ND	ND
	Mi RL	96	0,121	ND	ND
	Mi RL	120	0,313	ND	ND

APÊNDICE B – Determinação da atividade de amilase produzida em fermentação submersa utilizando diferentes fontes de carbono (continuação)

LINHAGEM	MEIO	TEMPO CULTIVO (h)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)		
			DEXTRINIZANTE	AMILASE (AR)	GLICOAMILASE
A13-8	NA	24	0,140	ND	ND
	NA	48	0,151	0,161	ND
	NA	72	0,271	0,349	ND
	NA	96	0,297	0,251	0,190
	NA	120	0,459	0,304	ND
	Md 1%	24	0,107	ND	ND
	Md 1%	48	0,180	0,582	0,049
	Md 1%	72	0,246	0,201	0,081
	Md 1%	96	0,303	0,111	0,104
	Md 1%	120	0,435	0,491	ND
	Md RL	24	0,163	ND	ND
	Md RL	48	0,510	1,454	0,070
	Md RL	72	0,536	1,404	0,011
	Md RL	96	0,559	1,366	0,003
	Md RL	120	0,606	0,808	ND
	Mi 1%	24	0,185	ND	0,028
	Mi 1%	48	0,157	ND	0,022
	Mi 1%	72	0,267	ND	ND
	Mi 1%	96	0,306	ND	0,022
	Mi 1%	120	0,330	ND	ND
	Mi RL	24	0,063	ND	ND
	Mi RL	48	0,238	ND	0,047
	Mi RL	72	0,167	ND	ND
	Mi RL	96	0,109	ND	ND
	Mi RL	120	0,189	ND	ND
A13-22	NA	24	0,222	ND	ND
	NA	48	1,523	4,574	0,173
	NA	72	1,610	6,684	0,222
	NA	96	0,649	3,242	0,051
	NA	120	0,615	2,132	0,012
	Md 1%	24	0,150	ND	ND
	Md 1%	48	1,464	3,864	0,166
	Md 1%	72	1,546	5,185	0,253
	Md 1%	96	1,807	5,440	0,390
	Md 1%	120	2,272	5,907	0,406
	Md RL	24	0,082	0,689	0,010
	Md RL	48	0,371	0,806	0,036
	Md RL	72	0,614	2,354	0,087
	Md RL	96	0,519	2,110	0,069
	Md RL	120	0,509	1,577	0,052
	Mi 1%	24	0,087	0,022	0,008
	Mi 1%	48	0,124	0,104	0,018
	Mi 1%	72	0,152	0,267	0,022
	Mi 1%	96	0,203	0,523	0,030
	Mi 1%	120	1,882	5,130	0,323
	Mi RL	24	0,027	ND	0,022
	Mi RL	48	0,059	ND	0,051
	Mi RL	72	0,133	ND	ND
	Mi RL	96	0,136	ND	ND
	Mi RL	120	0,686	ND	ND

APÊNDICE B – Determinação da atividade de amilase produzida em fermentação submersa utilizando diferentes fontes de carbono (continuação)

LINHAGEM	MEIO	TEMPO CULTIVO (h)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)		
			DEXTRINIZANTE	AMILASE (AR)	GLICOAMILASE
A13-36	NA	24	0,594	1,861	ND
	NA	48	0,680	2,268	0,044
	NA	72	1,317	11,627	0,010
	NA	96	4,938	16,500	ND
	NA	120	0,572	11,915	0,030
	Md 1%	24	0,494	2,439	ND
	Md 1%	48	0,651	3,806	ND
	Md 1%	72	4,359	5,376	0,075
	Md 1%	96	5,838	13,581	0,010
	Md 1%	120	6,798	42,425	ND
	Md RL	24	0,620	2,645	ND
	Md RL	48	0,647	4,672	ND
	Md RL	72	2,801	4,811	0,073
	Md RL	96	3,359	11,837	ND
	Md RL	120	4,507	8,273	ND
	Mi 1%	24	0,502	0,907	0,013
	Mi 1%	48	0,688	4,900	0,028
	Mi 1%	72	1,670	13,492	ND
	Mi 1%	96	5,342	18,987	ND
	Mi 1%	120	6,346	15,157	0,010
	Mi RL	24	0,186	0,016	ND
	Mi RL	48	0,202	0,004	ND
	Mi RL	72	0,341	1,212	ND
	Mi RL	96	1,227	1,259	ND
	Mi RL	120	0,049	1,855	ND

NA = meio nutriente; Md 1% = meio nutriente-mandioca; Md RL = resíduo líquido de mandioca; Mi 1% = meio nutriente-milho; Mi RL = resíduo líquido de milho; ND = atividade não detectada

APÊNDICE C – Determinação da atividade de amilase produzida em fermentação semi-sólida (farelo de trigo, farelo de mandioca e farelo de milho)

LINHAGEM	MEIO	TEMPO DE CULTIVO (h)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)		
			DEXTRINIZANTE	AMILASE (AR)	GLICOAMILASE
A4$_1$-b	Tri	24	0,121	4,976	0,308
	Tri	48	0,116	5,212	ND
	Tri	72	0,243	6,519	ND
	Tri	96	0,213	6,164	ND
	Tri	120	0,244	6,573	ND
	Md	24	0,143	2,802	ND
	Md	48	0,143	6,636	ND
	Md	72	0,325	1,451	ND
	Md	96	0,335	1,347	ND
	Md	120	0,360	0,347	0,019
	Mi	24	0,106	0,663	ND
	Mi	48	0,126	0,719	ND
	Mi	72	0,175	1,336	0,023
	Mi	96	0,104	1,123	ND
	Mi	120	0,080	1,024	0,010
A4$_4$-f	Tri	24	0,051	ND	ND
	Tri	48	ND	ND	ND
	Tri	72	ND	ND	ND
	Tri	96	0,042	ND	ND
	Tri	120	ND	0,303	ND
	Md	24	1,698	4,415	0,043
	Md	48	0,549	3,682	0,038
	Md	72	0,588	3,648	0,034
	Md	96	0,520	1,550	0,049
	Md	120	0,535	0,973	0,059
	Mi	24	ND	0,570	0,118
	Mi	48	ND	0,274	ND
	Mi	72	ND	0,371	ND
	Mi	96	0,039	0,773	ND
	Mi	120	ND	ND	ND
A4$_4$-i	Tri	24	0,197	3,081	ND
	Tri	48	0,415	4,421	ND
	Tri	72	0,238	15,926	ND
	Tri	96	0,236	2,482	ND
	Tri	120	0,218	ND	ND
	Md	24	0,125	0,808	ND
	Md	48	0,227	0,851	0,051
	Md	72	0,062	0,872	0,065
	Md	96	0,044	0,748	0,039
	Md	120	0,024	0,948	ND
	Mi	24	0,131	1,114	ND
	Mi	48	0,112	0,653	ND
	Mi	72	0,014	0,739	0,151
	Mi	96	0,014	0,355	0,194
	Mi	120	0,097	0,414	0,021

APÊNDICE C – Determinação da atividade de amilase produzida em fermentação semi-sólida (farelo de trigo, farelo de mandioca e farelo de milho) (continuação)

LINHAGEM	MEIO	TEMPO DE CULTIVO (h)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)		
			DEXTRINIZANTE	AMILASE (AR)	GLICOAMILASE
	Tri	24	0,111	3,055	ND
	Tri	48	0,269	3,722	0,010
	Tri	72	0,594	5,672	0,070
	Tri	96	0,594	5,727	0,021
	Tri	120	0,518	5,365	0,015
	Md	24	0,145	3,086	ND
	Md	48	0,162	3,531	ND
$A4_5$-2	Md	72	0,172	3,415	ND
	Md	96	0,217	3,330	ND
	Md	120	0,247	3,962	ND
	Mi	24	0,130	5,464	ND
	Mi	48	0,111	4,471	ND
	Mi	72	0,125	4,220	ND
	Mi	96	0,280	3,519	ND
	Mi	120	ND	3,569	ND
	Tri	24	0,328	0,702	ND
	Tri	48	0,184	0,574	0,013
	Tri	72	0,133	0,526	0,015
	Tri	96	0,082	0,362	0,011
	Tri	120	,063	ND	0,010
	Md	24	0,176	0,797	0,115
	Md	48	0,085	1,212	0,012
$A4_7$-1	Md	72	0,073	1,337	0,010
	Md	96	0,055	1,195	0,004
	Md	120	0,072	0,626	0,008
	Mi	24	0,161	0,959	0,031
	Mi	48	0,041	1,164	0,019
	Mi	72	0,075	0,828	0,015
	Mi	96	0,058	0,969	0,010
	Mi	120	0,092	0,172	ND
	Tri	24	0,286	0,473	ND
	Tri	48	0,522	1,052	0,010
	Tri	72	0,535	1,230	0,052
	Tri	96	0,592	ND	0,090
	Tri	120	0,298	1,939	0,090
	Md	24	0,064	0,653	ND
	Md	48	0,011	0,675	0,010
A11-4	Md	72	0,012	1,077	0,077
	Md	96	0,204	0,791	ND
	Md	120	0,123	0,395	ND
	Mi	24	0,084	0,461	ND
	Mi	48	0,134	0,999	0,010
	Mi	72	0,141	0,465	0,080
	Mi	96	0,150	0,924	ND
	Mi	120	0,182	ND	ND

APÊNDICE C – Determinação da atividade de amilase produzida em fermentação semi-sólida (farelo de trigo, farelo de mandioca e farelo de milho) (continuação)

LINHAGEM	MEIO	TEMPO DE CULTIVO (h)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (U/mL)		
			DEXTRINIZANTE	AMILASE (AR)	GLICOAMILASE
A13-8	Tri	24	0,168	0,911	ND
	Tri	48	0,502	0,464	ND
	Tri	72	0,503	0,447	0,072
	Tri	96	0,500	0,404	0,034
	Tri	120	0,558	1,345	ND
	Md	24	0,032	ND	ND
	Md	48	ND	0,400	ND
	Md	72	ND	0,936	ND
	Md	96	ND	ND	0,165
	Md	120	0,216	ND	0,070
	Mi	24	ND	ND	ND
	Mi	48	0,012	0,287	0,063
	Mi	72	0,011	0,353	ND
	Mi	96	0,010	1,460	ND
	Mi	120	0,285	1,321	0,019
A13-22	Tri	24	0,407	5,303	ND
	Tri	48	0,482	4,444	0,019
	Tri	72	0,515	3,986	0,025
	Tri	96	0,415	2,043	0,044
	Tri	120	0,397	2,609	ND
	Md	24	ND	2,176	ND
	Md	48	0,021	1,310	0,010
	Md	72	0,055	1,066	ND
	Md	96	0,017	1,643	ND
	Md	120	ND	1,188	ND
	Mi	24	0,082	0,901	ND
	Mi	48	0,079	0,977	ND
	Mi	72	0,033	1,666	ND
	Mi	96	ND	0,866	ND
	Mi	120	ND	0,289	ND
A13-36	Tri	24	0,683	24,549	ND
	Tri	48	5,704	40,993	ND
	Tri	72	6,196	36,962	ND
	Tri	96	6,176	29,091	ND
	Tri	120	0,409	29,823	ND
	Md	24	0,385	0,072	ND
	Md	48	0,197	1,086	ND
	Md	72	0,230	1,470	ND
	Md	96	0,005	0,894	ND
	Md	120	0,009	0,528	ND
	Mi	24	0,431	1,446	0,092
	Mi	48	0,225	1,552	ND
	Mi	72	0,201	2,245	ND
	Mi	96	0,028	1,560	ND
	Mi	120	0,070	2,062	ND

Tri = farelo de trigo; Md = farelo de mandioca; Mi = farelo de milho; ND = atividade não detectada

APÊNDICE D – Crescimento do inóculo, dosagem de açúcares redutores, glicose e amido residual presentes no meio nutriente, em fermentação submersa

Linhagem	Tempo de Cultivo (h)	Meio	Crescimento do Inóculo (Abs. 600 nm)	Aç. Redutor (mg/mL)	Glicose (mg/mL)	Amido Residual (Abs 600nm)*
$A4_1$-b	24	NA	1,427	3,026	0,053	0,009
	48	NA	0,524	1,686	0,193	0,008
	72	NA	0,440	3,026	0,193	0,012
	96	NA	0,321	2,330	0,161	0,010
	120	NA	0,488	0,802	0,177	0,015
	24	Md 1%	**	1,382	0,121	0,006
	48	Md 1%	**	2,290	0,177	0,006
	72	Md 1%	**	2,002	0,177	0,006
	96	Md 1%	**	2,002	0,147	0,008
	120	Md 1%	**	2,330	0,134	0,011
	24	Md RL	**	1,382	0,161	0,009
	48	Md RL	**	0,802	0,161	0,012
	72	Md RL	**	1,088	0,193	0,010
	96	Md RL	**	1,686	0,177	0,012
	120	Md RL	**	0,802	0,134	0,018
	24	Mi 1%	**	1,382	0,177	0,008
	48	Mi 1%	**	1,382	0,193	0,009
	72	Mi 1%	**	1,382	0,193	0,009
	96	Mi 1%	**	1,686	0,147	0,012
	120	Mi 1%	**	2,002	0,203	0,004
	24	Mi RL	**	9,803	0,317	0,003
	48	Mi RL	**	0,980	0,134	0,004
	72	Mi RL	**	16,654	0,603	0,003
	96	Mi RL	**	12,569	0,603	0,004
	120	Mi RL	**	12,569	0,408	0,018
$A4_4$-f	24	NA	1,845	2,360	0,017	0,002
	48	NA	1,832	0,240	0,153	0,007
	72	NA	1,586	0,160	0,014	0,007
	96	NA	1,457	0,540	0,016	0,009
	120	NA	1,350	0,280	0,017	0,009
	24	Md 1%	**	0,300	0,021	0,002
	48	Md 1%	**	0,060	0,031	0,012
	72	Md 1%	**	ND	0,117	0,010
	96	Md 1%	**	0,020	0,052	0,011
	120	Md 1%	**	0,120	0,034	0,011
	24	Md RL	**	0,060	0,016	0,005
	48	Md RL	**	ND	0,019	0,003
	72	Md RL	**	ND	0,009	0,002
	96	Md RL	**	0,020	0,033	0,007
	120	Md RL	**	0,080	0,010	0,003
	24	Mi 1%	**	ND	0,013	0,008
	48	Mi 1%	**	0,020	0,034	0,020
	72	Mi 1%	**	ND	0,036	0,010
	96	Mi 1%	**	ND	0,023	0,010
	120	Mi 1%	**	0,120	0,023	0,012
	24	Mi RL	**	17,202	0,291	0,004
	48	Mi RL	**	22,663	0,198	0,488
	72	Mi RL	**	25,023	0,235	0,005
	96	Mi RL	**	31,904	0,211	0,007
	120	Mi RL	**	29,623	0,007	0,004

APÊNDICE D – Crescimento do inóculo, dosagem de açúcares redutores, glicose e amido residual presentes no meio nutriente, em fermentação submersa (continuação)

Linhagem	Tempo de Cultivo (h)	Meio	Crescimento do Inóculo (Abs. 600 nm)	Aç. Redutor (mg/mL)	Glicose (mg/mL)	Amido Residual (Abs 600nm)*
	24	NA	2,06	2,894	0,014	0,005
	48	NA	1,686	ND	0,012	0,010
	72	NA	1,405	3,012	0,014	0,023
	96	NA	1,425	1,968	0,102	0,010
	120	NA	1,737	2,222	0,022	0,019
	24	Md 1%	**	0,940	0,068	0,005
	48	Md 1%	**	ND	0,016	0,021
	72	Md 1%	**	1,126	0,015	0,028
	96	Md 1%	**	1,300	0,020	0,014
	120	Md 1%	**	0,980	0,021	0,005
	24	Md RL	**	0,052	0,019	0,005
	48	Md RL	**	ND	0,015	0,003
$A4_4$-i	72	Md RL	**	2,166	0,009	0,021
	96	Md RL	**	0,124	0,045	0,003
	120	Md RL	**	0,448	0,201	0,005
	24	Mi 1%	**	0,690	0,022	0,005
	48	Mi 1%	**	ND	0,018	0,028
	72	Mi 1%	**	11,261	0,014	0,033
	96	Mi 1%	**	3,940	0,017	0,015
	120	Mi 1%	**	0,808	0,146	0,015
	24	Mi RL	**	6,317	0,024	0,108
	48	Mi RL	**	9,087	0,273	0,355
	72	Mi RL	**	15,688	0,160	0,032
	96	Mi RL	**	16,334	0,130	0,004
	120	Mi RL	**	15,112	0,237	0,015
	24	NA	1,283	8,177	0,160	0,023
	48	NA	1,794	4,386	0,071	0,023
	72	NA	1,330	3,554	0,036	0,026
	96	NA	1,800	3,582	0,033	0,026
	120	NA	1,373	4,188	0,035	0,026
	24	Md 1%	**	3,674	0,096	0,024
	48	Md 1%	**	2,396	0,038	0,024
	72	Md 1%	**	2,536	0,028	0,023
	96	Md 1%	**	2,446	0,025	0,026
	120	Md 1%	**	2,960	0,026	0,026
	24	Md RL	**	1,024	0,030	0,028
	48	Md RL	**	0,150	0,040	0,030
$A4_5$-2	72	Md RL	**	0,130	0,050	0,032
	96	Md RL	**	0,156	0,047	0,032
	120	Md RL	**	1,102	0,063	0,038
	24	Mi 1%	**	2,578	0,068	0,025
	48	Mi 1%	**	1,540	0,031	0,026
	72	Mi 1%	**	1,292	0,026	0,028
	96	Mi 1%	**	1,406	0,031	0,028
	120	Mi 1%	**	1,612	0,038	0,033
	24	Mi RL	**	13,333	0,280	0,025
	48	Mi RL	**	14,452	0,480	0,024
	72	Mi RL	**	17,890	0,135	0,025
	96	Mi RL	**	18,560	0,108	0,025
	120	Mi RL	**	21,072	0,108	0,025

APÊNDICE D – Crescimento do inóculo, dosagem de açúcares redutores, glicose e amido residual presentes no meio nutriente, em fermentação submersa (continuação)

Linhagem	Tempo de Cultivo (h)	Meio	Crescimento do Inóculo (Abs. 600 nm)	Aç. Redutor (mg/mL)	Glicose (mg/mL)	Amido Residual (Abs 600nm)*
$A4_7$-1	24	NA	1,964	3,236	0,023	0,0101
	48	NA	1,813	1,786	0,024	0,0521
	72	NA	1,688	1,940	0,025	0,0502
	96	NA	1,816	2,354	0,024	0,0526
	120	NA	1,236	3,714	0,025	0,047
	24	Md 1%	**	4,665	0,025	0,221
	48	Md 1%	**	0,954	0,031	0,0413
	72	Md 1%	**	1,594	0,030	0,0406
	96	Md 1%	**	3,074	0,031	0,0456
	120	Md 1%	**	3,524	0,038	0,0642
	24	Md RL	**	1,204	0,074	0,1248
	48	Md RL	**	0,090	0,024	0,0411
	72	Md RL	**	0,116	0,017	0,0503
	96	Md RL	**	0,130	0,025	0,0529
	120	Md RL	**	0,600	0,044	0,0566
	24	Mi 1%	**	2,732	0,019	0,0105
	48	Mi 1%	**	1,858	0,017	0,0434
	72	Mi 1%	**	1,196	0,023	0,0432
	96	Mi 1%	**	1,706	0,021	0,045
	120	Mi 1%	**	2,504	0,029	0,0468
	24	Mi RL	**	7,479	0,041	0,0066
	48	Mi RL	**	15,366	0,119	0,0323
	72	Mi RL	**	19,444	0,047	0,0325
	96	Mi RL	**	18,704	0,035	0,0334
	120	Mi RL	**	4,483	0,038	0,0339
A11-4	24	NA	2,264	0,134	0,014	0,015
	48	NA	1,968	0,074	0,013	0,020
	72	NA	1,995	0,222	0,016	0,019
	96	NA	1,990	0,074	0,017	0,020
	120	NA	2,047	0,190	0,016	0,020
	24	Md 1%	**	2,760	0,034	0,021
	48	Md 1%	**	0,390	0,029	0,021
	72	Md 1%	**	0,376	0,026	0,021
	96	Md 1%	**	0,308	0,028	0,021
	120	Md 1%	**	0,286	0,025	0,021
	24	Md RL	**	0,174	0,020	0,052
	48	Md RL	**	0,094	0,016	0,052
	72	Md RL	**	0,100	0,010	0,052
	96	Md RL	**	0,068	0,020	0,052
	120	Md RL	**	0,082	0,020	0,052
	24	Mi 1%	**	0,726	0,023	0,039
	48	Mi 1%	**	0,410	0,024	0,039
	72	Mi 1%	**	0,460	0,024	0,039
	96	Mi 1%	**	0,264	0,024	0,039
	120	Mi 1%	**	0,350	0,022	0,039
	24	Mi RL	**	3,592	0,025	0,084
	48	Mi RL	**	4,208	0,021	0,084
	72	Mi RL	**	3,894	0,018	0,084
	96	Mi RL	**	2,366	0,020	0,084
	120	Mi RL	**	3,800	0,024	0,084

APÊNDICE D – Crescimento do inóculo, dosagem de açúcares redutores, glicose e amido residual presentes no meio nutriente, em fermentação submersa (continuação)

Linhagem	Tempo de Cultivo (h)	Meio	Crescimento do Inóculo (Abs. 600 nm)	Aç. Redutor (mg/mL)	Glicose (mg/mL)	Amido Residual (Abs 600nm)*
A13-8	24	NA	2,239	2,244	0,066	0,005
	48	NA	1,665	1,248	0,060	0,010
	72	NA	1,444	1,308	0,014	0,023
	96	NA	1,295	0,724	0,015	0,010
	120	NA	0,867	0,930	0,125	0,019
	24	Md 1%	**	5,449	0,017	0,005
	48	Md 1%	**	1,018	0,016	0,021
	72	Md 1%	**	7,097	0,050	0,028
	96	Md 1%	**	0,558	0,022	0,014
	120	Md 1%	**	0,366	0,013	0,005
	24	Md RL	**	2,310	0,026	0,005
	48	Md RL	**	0,332	0,010	0,003
	72	Md RL	**	9,757	0,086	0,021
	96	Md RL	**	0,092	0,009	0,003
	120	Md RL	**	0,030	0,009	0,005
	24	Mi 1%	**	0,182	0,013	0,005
	48	Mi 1%	**	1,136	0,019	0,028
	72	Mi 1%	**	1,450	0,023	0,033
	96	Mi 1%	**	0,416	0,021	0,015
	120	Mi 1%	**	0,416	0,022	0,015
	24	Mi RL	**	0,392	0,103	0,108
	48	Mi RL	**	4,156	0,035	0,355
	72	Mi RL	**	5,975	0,011	0,032
	96	Mi RL	**	2,442	0,056	0,004
	120	Mi RL	**	6,829	0,157	0,015
A13-22	24	NA	2,338	2,988	0,042	0,009
	48	NA	2,112	1,200	0,036	0,036
	72	NA	1,941	0,600	0,061	0,014
	96	NA	1,892	0,400	0,118	0,007
	120	NA	1,793	1,000	0,133	0,003
	24	Md 1%	**	2,800	0,165	0,007
	48	Md 1%	**	0,500	0,084	0,013
	72	Md 1%	**	0,280	0,056	0,013
	96	Md 1%	**	0,200	0,046	0,012
	120	Md 1%	**	0,200	0,049	0,013
	24	Md RL	**	0,200	0,058	0,010
	48	Md RL	**	0,200	0,062	0,011
	72	Md RL	**	0,200	0,067	0,013
	96	Md RL	**	0,200	0,068	0,012
	120	Md RL	**	0,200	0,075	0,015
	24	Mi 1%	**	ND	0,042	0,006
	48	Mi 1%	**	0,660	0,040	0,006
	72	Mi 1%	**	0,560	0,045	0,007
	96	Mi 1%	**	0,560	0,052	0,001
	120	Mi 1%	**	0,200	0,049	0,010
	24	Mi RL	**	6,401	0,032	0,003
	48	Mi RL	**	9,801	0,031	0,002
	72	Mi RL	**	6,601	0,033	0,007
	96	Mi RL	**	8,001	0,035	0,026
	120	Mi RL	**	5,201	0,033	0,011

APÊNDICE D – Crescimento do inóculo, dosagem de açúcares redutores, glicose e amido residual presentes no meio nutriente, em fermentação submersa (continuação)

Linhagem	Tempo de Cultivo (h)	Meio	Crescimento do Inóculo (Abs. 600 nm)	Aç. Redutor (mg/mL)	Glicose (mg/mL)	Amido Residual (Abs 600nm)*
A13-36	24	NA	**	ND	0,036	0,006
	48	NA	**	ND	0,026	0,014
	72	NA	**	0,660	0,010	0,007
	96	NA	**	0,780	0,015	ND
	120	NA	**	ND	0,012	0,157
	24	Md 1%	**	ND	0,098	0,125
	48	Md 1%	**	0,100	0,104	0,090
	72	Md 1%	**	ND	0,069	0,008
	96	Md 1%	**	1,380	0,016	0,113
	120	Md 1%	**	ND	0,115	0,006
	24	Md RL	**	1,448	0,070	0,201
	48	Md RL	**	ND	0,011	0,013
	72	Md RL	**	1,180	0,013	0,157
	96	Md RL	**	2,220	0,057	0,005
	120	Md RL	**	0,112	0,100	0,008
	24	Mi 1%	**	ND	0,023	0,006
	48	Mi 1%	**	ND	0,008	0,014
	72	Mi 1%	**	0,540	0,031	0,008
	96	Mi 1%	**	1,060	0,030	0,002
	120	Mi 1%	**	ND	0,116	0,007
	24	Mi RL	**	4,617	0,059	0,119
	48	Mi RL	**	ND	0,055	0,021
	72	Mi RL	**	0,092	0,111	0,069
	96	Mi RL	**	0,038	0,032	0,001
	120	Mi RL	**	ND	0,006	0,005

*****O meio de reação foi constituído de 0,3 mL de solução enzimática, 0,7 mL de tampão acetato 0,25 M, pH 5,0, 4,0 mL de ácido clorídrico 0,2 N, 0,5 mL de reagente de iodo (KI 0,3% + I_2 0,03%) e 10 mL de água destilada;

** - análise não realizada;

ND - atividade não detectada.

APÊNDICE E – Cromatografia de papel descendente, em papel *Whatman* nº 1, dos açúcares padrões. Da esquerda para a direita: mistura dos padrões (P), glicose (G1), maltose (G2), maltotriose (G3), maltotetrose (G4), maltohexose (G6) e maltoheptose (G7).