

Isolamento e seleção de bactérias produtoras de amilase e pectinase sob fermentação submersa

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar bactérias presentes em manipueira fresca com capacidade para produzir enzimas amilolíticas e pectinolíticas. Um total de cinco isolados bacterianos foram obtidos e posteriormente inoculados em meio de cultivo contendo manipueira pura (100% v:v) e diluída em meio mínimo (50% v:v), ao longo de 31 dias. O isolado MANI B, classificado como *Pseudoclavibacter helvolus*, apresentou crescimento consistente em ambos os tratamentos, ao longo de todo período de incubação e por este motivo foi selecionado para avaliar o seu desempenho quanto à produção de amilase (sacarificante e dextrinizante) e pectinase, sob fermentação submersa, contendo manipueira como única fonte de carbono, na forma pura (100% v:v) e diluída em meio mínimo (50% v:v), ao longo de seis dias. Efeito significativo dos tratamentos sobre a atividade enzimática de amilases e pectinase foi observado, sendo a concentração de 100% de manipueira o melhor tratamento. As atividades enzimáticas de amilase sacarificante e dextrinizante foram inferiores quando comparadas às atividades de pectinase, em todos os tempos de fermentação avaliados. Concluiu-se que a manipueira se apresentou como fonte de micro-organismos promissores para produção de enzimas e que também se trata de um substrato alternativo a ser empregado em processos fermentativos.

PALAVRAS-CHAVE: Bioprospecção. Enzimas. Mandioca. Resíduo Agroindustrial.

Ingrid Andrade Leite Teixeira

ingridteixeiraa@gmail.com

orcid.org/0000-0003-2907-2561

Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil

Robert de Oliveira Gusmão

robert425@hotmail.com

orcid.org/0000-0001-9517-1758

Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil

Luthiane Machado Ferraz

luthy_15@msn.com

orcid.org/0000-0001-9553-1426

Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil

Andressa Porto Cordeiro Oliveira

andressacordeiro_77@hotmail.com

orcid.org/0000-0002-4278-0899

Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil

Fábia Giovana do Val de Assis

fabi_zoo@yahoo.com.br

orcid.org/0000-0002-4660-8068

Centro Tecnológico de Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Patrícia Lopes Leal

lealpat@yahoo.com.br

orcid.org/0000-0002-6151-334X

Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil

INTRODUÇÃO

A Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), da família Euphorbiaceae, é uma cultura alimentar tropical amplamente cultivada na África, Ásia e América Latina (Akoroda, 1995). No Brasil, a área destinada à mandiocultura abrange, aproximadamente, dois milhões de hectares, sendo o país um dos maiores produtores mundiais de mandioca, cuja produção é de aproximadamente 26,5 milhões de toneladas de raízes frescas (Fraife Filho; Bahia, 2009).

A partir do processamento industrial da mandioca para produção de farinha (principal produto derivado da mandioca) é gerado um resíduo líquido conhecido como manipueira. Este sub-produto do processamento da mandioca quando disperso no ambiente, sem tratamento algum, representa um passivo ambiental importante à solos e mananciais de águas (Barana; Cereda, 2000). Isto se deve ao potencial poluente da manipueira, decorrente da sua elevada carga orgânica, composta principalmente por açúcares solúveis de fácil fermentação, que são degradados rapidamente a ácidos orgânicos, inviabilizando o tratamento deste resíduo por processos físicos (Neves et al., 2014). Existe ainda o problema da toxidez associada à presença de um glicosídeo característico da planta de mandioca (linamarina) potencialmente hidrolisável à ácido cianídrico e de toxicidade significativa (Cereda, 2001).

Considerando o interesse crescente no uso eficiente de diversos resíduos agroindustriais, a manipueira pode representar um importante substrato para o desenvolvimento de bioprocessos a fim de se obter diversas moléculas com alto valor agregado, tais como proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol, enzimas e metabólitos secundários biologicamente ativos (Sanchés, 2009). Vale ressaltar ainda, que o uso da manipueira como substratos em bioprocessos, além de ser economicamente viável, contribuiria para minimização dos problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (Dashtban et al., 2009; Alvira et al., 2010).

Atualmente, a produção industrial de enzimas enfrenta alguns gargalos tecnológicos, sendo o custo de produção um dos pontos mais avaliados (Stroparo et al., 2012). Como alternativa para diminuir estes custos, está justamente o emprego de resíduos agroindustriais, geralmente descartados pela indústria, que se mostram como uma fonte riquíssima de substratos, geralmente, empregados na fermentação submersa (emprego de fontes de nutrientes solúveis num meio líquido) ou na fermentação em estado sólido (uso de substratos com baixa atividade de água), sendo que a primeira apresenta-se mais vantajosa por permitir maior controle sobre o processo, menor risco de contaminação e maior rendimento (Feitosa et al., 2010).

Dentre as enzimas obtidas a partir do cultivo de micro-organismos em meios fermentativos, destacam-se as amilases e pectinases. As amilases são enzimas responsáveis pela degradação das moléculas de amido. Para isso, uma enzima sacarificante (beta-amilase) hidrolisará o amido fornecendo maltose e uma enzima dextrinizante (alfa-amilase) atacará as ligações químicas ao acaso, fornecendo uma mistura de substâncias chamadas de dextrina. As aplicações das enzimas amilolíticas são amplas em processos biotecnológicos das indústrias têxteis, de

papel e celulose, de couro, detergentes, bebidas destiladas, cervejas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (Gupta et al., 2003).

As enzimas pectinolíticas, por sua vez, são capazes de degradar as substâncias pécticas, componentes da parede celular dos vegetais superiores. A habilidade para sintetizar enzimas pectinolíticas é muito comum entre os grupos de micro-organismos e elas possuem grande importância na era biotecnológica atual, devido as suas variadas aplicações, como na extração e clarificação de sucos de frutas, processamento do algodão, degomação de fibras de plantas, extração de óleo vegetal, chá e fermentação de café, clareamento de papel, como aditivo em ração animal, em indústrias de bebidas alcoólicas e de alimentos (Uenojo; Pastore, 2007; Jayani et al., 2005).

Segundo Barato et al. (2011), a ampla diversidade quanto às características das enzimas potencializa sua aplicação em diferentes processos na indústria, assim, frente à demanda por novas hidrolases com prospecção de aplicabilidade no setor industrial, há um estímulo natural pela exploração da biodiversidade microbiana, com o isolamento e seleção de novas cepas produtoras de enzimas. Micro-organismos isolados da própria matéria prima, que será empregada como substrato, na fermentação, representam uma alternativa promissora, uma vez que estes micro-organismos estão mais adaptados à composição química da fonte nutricional e portanto mais hábeis para metabolizarem o substrato.

Diante da necessidade do setor agroindustrial em obter enzimas com novas características, assim como, substratos alternativos para cultivo, especialmente de menor custo, o presente trabalho objetivou o isolamento e seleção de bactérias oriundas de manipueira com capacidade para produzirem enzimas amilolíticas e pectinolíticas, sob fermentação submersa utilizando a própria manipueira como fonte de carbono.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DA MANIPUEIRA

A manipueira fresca utilizada como meio de cultivo propriamente dito, foi obtida da linha de processamento de raízes de mandioca para a produção de farinha, em uma fábrica localizada no bairro Campinhos, do município de Vitória da Conquista/BA. Imediatamente após a prensagem da massa da mandioca, a manipueira foi armazenada em tambor plástico opaco, com volume de 30 litros, devidamente desinfetado, e transportada ao laboratório de Microbiologia e Enzimologia, da UFBA – Campus Anísio Teixeira.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS ORIUNDAS DA MANIPUEIRA

O isolamento das bactérias foi realizado a partir de amostras da manipueira fresca na expectativa de que estes isolados representassem a biodiversidade de

linhagens bacterianas cultiváveis presentes na manipueira, obtendo-se maior probabilidade de seleção de linhagens hábeis e adaptadas a utilizar os nutrientes contidos no resíduo de forma eficiente.

Para o isolamento das bactérias presentes na manipueira, foram utilizadas alíquotas de 1 mL da amostra de manipueira que foi diluída de forma seriada em 9 mL de água destilada estéril. Para o método de plaqueamento em superfície, foram empregadas as diluições de 10^{-3} a 10^{-6} e o meio de cultura utilizado foi Agar Nutriente, contendo nistatina 0,4%, a fim de inibir o crescimento de fungos. As placas foram incubadas a 28 °C, por um período de 18 horas.

A partir do crescimento das colônias, foram selecionadas aquelas com características visualmente distintas e repicadas em meio Agar Nutriente para obtenção de culturas puras.

ENSAIOS DE CRESCIMENTO BACTERIANO EM MEIO CONTENDO MANIPUEIRA

Para avaliar a habilidade metabólica das bactérias isoladas em utilizar manipueira como única ou principal fonte de carbono e energia, foram inoculadas suspensões de células destes isolados, na concentração de 10^5 UFC mL⁻¹ de manipueira, segundo escala de Mac Farland proposta por Lennette et al. (1985) e de acordo com metodologia proposta por Labeda (1990). Foram utilizados Erlenmeyers de 200 mL, contendo manipueira autoclavada pura (100% v:v) ou diluída (50% v:v) em meio mínimo (6,0 g L⁻¹ extrato de levedura e sais nas concentrações fixas de 6,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 5,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄ e 0,6 g L⁻¹ de MgSO₄ · 7H₂O. Os frascos foram incubados por 31 dias, em estufa a 28 °C. Alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada 24 horas, para determinação do crescimento bacteriano.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS BACTERIANOS HÁBEIS EM CRESCER EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO MANIPUEIRA

Os isolados bacterianos que apresentaram melhores habilidades de se multiplicarem em meio contendo manipueira como fonte de carbono, ao longo do tempo de incubação, foram selecionados para caracterização molecular e ensaios de fermentação. Para isso, os isolados foram crescidos em 10 mL de caldo MRS por 24 horas, a 37 °C, em seguida as culturas foram transferidas para tubos contendo ágar MRS inclinado e incubadas por 24 horas, a 37 °C. Decorrido esse período, 1 mL de água ultra pura foi transferida para os tubos contendo a cultura crescida. Após homogeneização, a massa celular foi transferida para microtubos de 2 mL e centrifugada a 16000 x g por um minuto para obtenção dos pellets.

O DNA foi extraído utilizando o Kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega) seguindo instruções do fabricante. A integridade e a quantidade do DNA foram verificadas usando eletroforese em gel de agarose a 0,8% e Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen), respectivamente.

O gene 16S rRNA foi amplificado por PCR utilizando os primers 8fn - 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' e 1492r - 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3' (Weisburg et al., 1991) para o domínio Bactéria, utilizados os seguintes reagentes e concentrações: 60 ng de DNA de cada amostra; 1 x de tampão da enzima Taq

DNA polimerase; 3,7 mM de $MgCl_2$; 0,6 pmol μL^{-1} de dNTPs; 0,4 pmol μL^{-1} de cada primer; 5 U de Taq DNA polimerase, com volume final ajustado para 50 μL com água ultra pura. Foram incluídos nos experimentos o controle negativo, substituindo o DNA por água ultra pura. Os ciclos de ampliações foram realizados no Veriti Thermal Cycler PCR (Applied Biosystems) com temperatura inicial de desnaturação 95 °C por 3 minutos; 30 ciclos de amplificação a 95 °C, por 1 minuto; 55 °C, por 1 minuto; 72 °C, por 2 minutos e temperatura de extensão final de 72 °C, por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e visualizados sobre luz ultravioleta. Em seguida, os amplicons foram purificados utilizando o kit Illustra® GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences) para posterior identificação nucleotídica utilizando o sequenciador automático ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) da empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA. A edição e montagem das sequências foram realizadas com o programa Sequencher 4.1.4 (Gene Code Corporation). O programa BLAST (Altschul et al., 1990) foi usado para comparar as sequências de cada isolado com aquelas encontradas em bancos de dados públicos que foram incluídas nas análises para fins de comparação.

ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA CONTENDO MANIPUEIRA COM SUBSTRATO PARA OBTENÇÃO DE ENZIMAS AMILASE E PECTINASE

A partir dos resultados dos ensaios de crescimento bacteriano em meio contendo manipueira, procedeu-se a seleção de isolados com maior habilidade em crescer nestas condições, a fim de empregá-los na fermentação submersa para produção de amilase (sacarificante e dextrinizante) e pectinase. Neste sentido, utilizaram-se suspensões do isolado bacteriano selecionado, na concentração de 10^5 UFC mL^{-1} para inoculação em meio contendo manipueira pura (100% v:v) e diluída (50% v:v) em meio mínimo. Erlenmeyers de 100 mL contendo o meio fermentativo inoculado foram mantidos por 6 dias, a 28 °C, em estufa. Alíquotas a cada 24 horas foram retiradas para medição da atividade enzimática.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE AMILASE E PECTINASE

Para avaliar a atividade de amilase sacarificante, utilizou-se 40 μL de tampão acetato de sódio (500 mmol L^{-1} , pH 6,0), 100 μL de solução de amido 0,5% (m/v) e 60 μL da alíquota retirada do meio fermentativo, contendo o coquetel enzimático da bactéria, em triplicata. Os tubos contendo esta mistura foram incubados a 40 °C, por 30 minutos e retirados para adição de 800 μL de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) previamente preparada. A mistura foi fervida por 5 minutos e, ao fim, adicionou-se 9,0 mL de água destilada seguida de homogeneização. A atividade enzimática foi obtida a partir da leitura em espectrofotômetro, a 540 nm de absorbância (Siqueira et al., 2010)

Para a atividade de amilase dextrinizante, utilizou-se 40 μL de tampão acetato de sódio (500 mmol L^{-1} , pH 6,0), 100 μL de solução de amido 0,5% (m/v), 60 μL da alíquota retirada do meio fermentativo, em triplicata, e foram incubados a 40 °C por 10 minutos. Passado este tempo, foi adicionado 200 μL de solução de ácido acético (1,0 mol L^{-1}), afim de parar a reação, 200 μL de solução iodo/iodeto

previamente preparada. Foi adicionado 2mL de água destilada, seguido de homogeneização e leitura em espectrofotômetro, a 660 nm de absorbância

Para avaliar a atividade de pectinase, foram utilizados 50 µL do filtrado e 100 µL de substrato (solução de 1% de pectina), reagindo por 30 minutos, a 50 °C. Após este período, adicionou-se 300 µL de DNS e os tubos com os ensaios foram conduzidos a temperatura de 100 °C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de água destiladas e os ensaios foram conduzidos para leitura em espectrômetro a 540 nm de absorbância, para avaliação da atividade enzimática (Siqueira et al., 2010).

Os ensaios de atividade de todas as enzimas foram conduzidos em triplicatas, havendo ainda o preparo de uma reação controle, que consistiu em mesmo tratamento peculiar a cada enzima, substituindo-se, porém, o extrato bruto enzimático por água destilada. A unidade das atividades enzimáticas (UI g⁻¹) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de produto (açúcares redutores) por segundo, por grama de amostra (polissacarídeos), nas condições de reação, utilizando-se como curva padrão os monômeros de glicose.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar o efeito da concentração da manipueira sobre a atividade das enzimas amilase e pectinase, aplicou-se análise de variância sobre as médias obtidas, pelo teste de Scott-Knott (5%), utilizando o software Sisvar (Ferreira, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de cinco morfotipos bacterianos foi isolado da manipueira e receberam os códigos MANI A, MANI B, MANI C, MANI D e MANI E. Através da coloração de Gram foi possível identificar dois isolados como Gram positivos (MANI B e MANI C) e três como Gram negativos (MANI A, MANI D e MANI E).

O baixo número de morfotipos recuperado a partir da manipueira pode estar relacionado à baixa adaptação destas bactérias ao meio de cultivo utilizado. Segundo Schmeisser et al. (2007) muitos micro-organismos (ou a maioria) não crescem em meios de cultura sintéticos, ainda que viáveis, por serem auxotróficos, necessitando portanto para seu crescimento de determinados requerimentos nutricionais (vitaminas, aminoácidos, hormônios etc.). Diante disso, é provável que os isolados cultiváveis obtidos a partir da manipueira representaram uma pequena fração da microbiota presente no resíduo. As técnicas moleculares são, atualmente, consideradas fortes aliadas em estudos de biodiversidade microbiana, para acessar isolados viáveis e não cultiváveis (Goulart et al., 2013). No entanto, tais técnicas não foram aplicadas no presente trabalho, uma vez que, se objetivou selecionar linhagens bacterianas cultiváveis e com maior probabilidade de serem hábeis e adaptadas para utilizarem, de forma eficiente, os nutrientes contidos no resíduo.

Os ensaios de crescimento em meio contendo manipueira, nas concentrações de 50 e 100% em relação ao volume final do meio, indicaram que todos os cinco isolados bacterianos apresentaram habilidade para permanecer em

altos números populacionais, ao longo de 30 dias, independente da concentração de manipueira no meio (Figura 1).

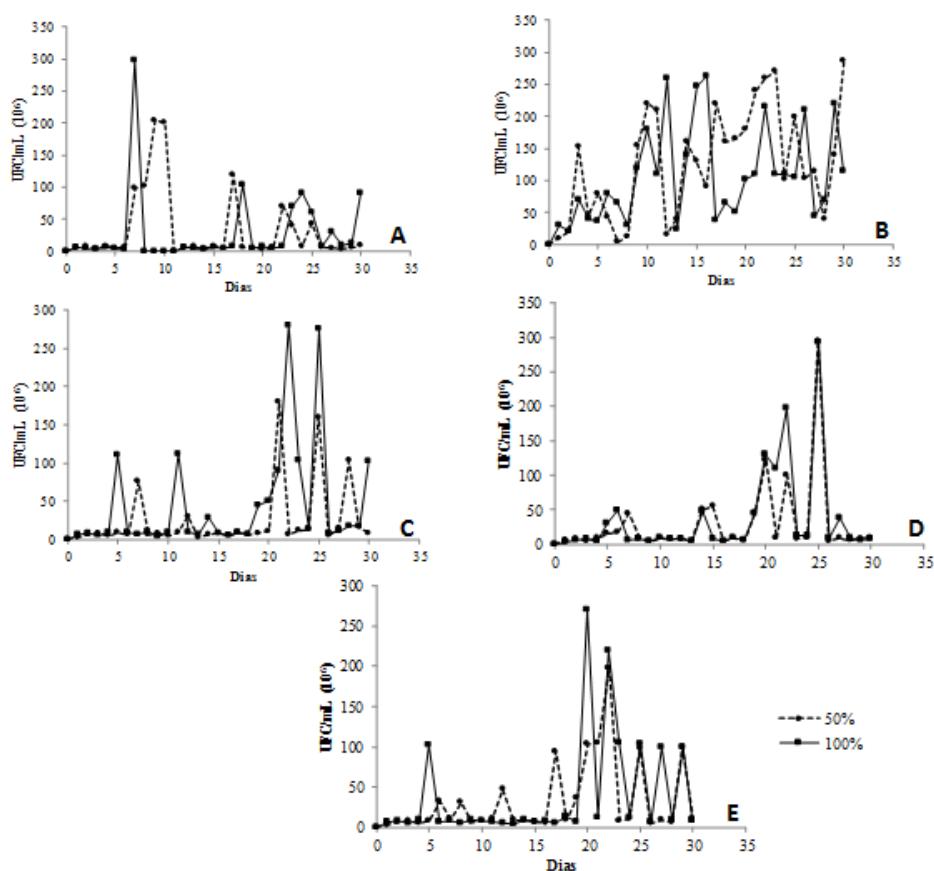
Isto indica que microrganismos isolados são naturalmente adaptados à constituição físico-química da manipueira, incluindo o cianeto, e, portanto, capazes de utilizar o resíduo como fonte de carbono por atividade enzimática.

No entanto, observou-se que os isolados MANI A, C, D e E necessitaram, em média, de cinco dias para iniciar o crescimento em meio contendo 50% de manipueira (Figura 1). O isolado MANI B, foi o que apresentou menor período de adaptação às condições de cultivo, em ambas as concentrações de manipueira, iniciando o crescimento nas primeiras horas de incubação (Figura 1B). Segundo Brito et al. (2015), alguns organismos apresentam, de fato, crescimento extremamente lento, necessitando de um tempo de incubação excessivamente longo, como comumente ocorre, por exemplo, para certos gêneros de actinobactérias.

Todos os isolados apresentaram oscilações de crescimento, ao longo do período de incubação, sendo que em determinados períodos de tempo, crescimento quase nulo foi registrado (Figura 1). A redução de constituintes carbônicos de mais fácil assimilação pelos isolados bacterianos parece ter influenciado no crescimento destes microrganismos. Além disso, estas oscilações devem estar relacionadas aos produtos gerados pela biodegradação da manipueira que conduziram à diminuição do crescimento das populações bacterianas. Microrganismos não especializados em promover a quebra de moléculas mais complexas podem sofrer estresse nutricional e diferentes estratégias de sobrevivência podem ocorrer, tais como a evolução para o estágio fisiológico viável não-cultivável (VNC) (Smith et al., 1997; Gupte et al., 2003; Kaur et al., 2005; Kalscheuer et al., 2007). Theodoro e Maringoni (2002) avaliaram a sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* em manipueira e constataram que após 24hs de incubação, nenhum crescimento celular foi observado. Estes autores atribuíram a não recuperação de células viáveis da bactéria devido aos processos naturais fermentativos desse resíduo, especialmente a queda de pH e o aumento da acidez total.

O tratamento com 50% de manipueira presente no meio, possibilitou o isolado MANI B atingir uma contagem celular igual a $300 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹, no 23º dia e valores iguais a $280 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹, aos 31 dias. Embora o tratamento contendo 100% de manipueira tenha permitido o isolado MANI B atingir o maior número populacional ($26 \cdot 10^6$ UFC mL⁻¹), aos 11 dias de incubação, foi possível notar maior sensibilidade deste isolado na concentração de 100% de manipueira (Figura 1 B). Tais resultados de crescimento apresentados por MANI B conduziram à seleção deste isolado para caracterização molecular e os testes quanto à produção das enzimas amilase (sacarificante e dextrinizante) e pectinase, quando cultivados em meio fermentativo submerso, contendo manipueira nas concentrações de 50 e 100%, ao longo de seis dias de incubação.

Figura 1 - Crescimento dos isolados bacterianos em meio contendo manipueira nas concentrações de 50 e 100%, à 30°C, por 31 dias. Onde, A = MANI A; B = MANI B; C = MANI C; D = MANI D e E = MANI E.



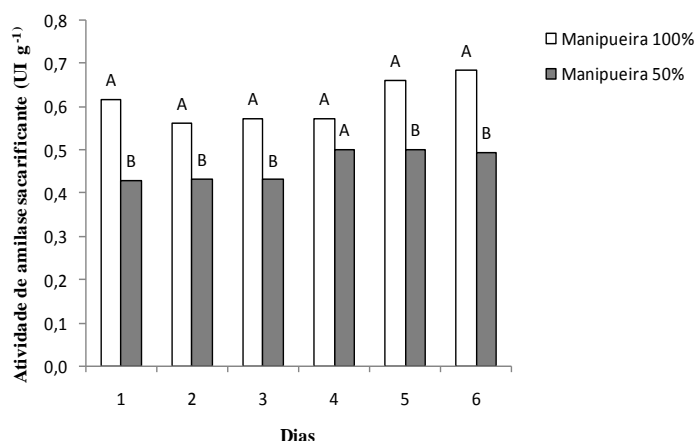
Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

A caracterização molecular evidenciou que o isolado MANI B se tratava da espécie *Pseudoclavibacter helvolus*, para a qual não foram encontrados registros na literatura relacionando essa espécie com a produção de enzimas a partir de tecnologias de fermentação. Contudo, no presente estudo, foi observada maior atividade de amilase sacarificante por *Pseudoclavibacter helvolus* em meio contendo 100% de manipueira, se diferenciando estatisticamente ($p < 0,05$) do tratamento contendo 50% de manipueira, para todos os dias de fermentação avaliados, exceto para o quarto dia quando não foi verificado o efeito da concentração da manipueira sobre a atividade enzimática (Figura 2). Maior atividade de amilase sacarificante ($0,7 \text{ UI g}^{-1}$) foi registrada, aos seis dias de fermentação, em meio contendo 100% de manipueira e menor atividade ($0,4 \text{ UI g}^{-1}$) ocorreu nos primeiros três dias de fermentação, em meio contendo 50% de manipueira. Nenhum efeito significativo ($p > 0,05$) quanto ao tempo de fermentação foi observado para ambos os tratamentos.

A atividade de amilase dextrinizante também sofreu efeito ($p < 0,05$) da concentração de manipueira, especialmente nos dois primeiros dias e aos seis dias de fermentação (Figura 3). Comparada à atividade de amilase sacarificante, menores valores foram registrados para amilase dextrinizante, sendo a máxima encontrada ($0,36 \text{ UI g}^{-1}$), aos seis dias de fermentação, em meio contendo 100% de

manipueira. Novamente, não foi registrado efeito significativo ($p > 0,05$) do tempo de fermentação para ambos os tratamentos.

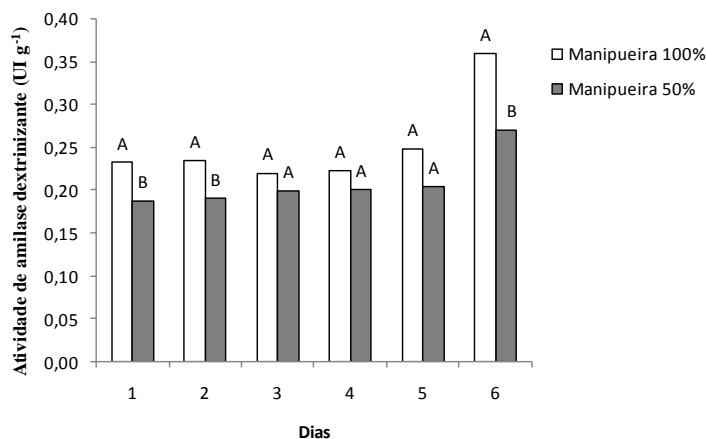
Figura 2 - Efeito da concentração de manipueira no meio fermentativo sobre atividade de amilase sacarificante, para cada dia de fermentação. Barras com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Os resultados da atividade de amilase encontrados no presente trabalho se apresentaram inferiores aos relatados por outros autores (Corrêa, 2011; Oliveira et al., 2007), indicando que as condições do cultivo bacteriano devem ser avaliadas e otimizadas para se alcançar maiores atividades enzimáticas. A perspectiva de se obter bactérias com potencial produção de amilase é importante, uma vez que enzimas bacterianas, quando comparadas às enzimas fúngicas, podem apresentar uma tolerância maior a altas temperaturas (até 70 °C) e um pH ótimo mais elevado, o que propiciaria uma maior aplicação industrial (Gupta et al., 2003; Barato et al., 2011).

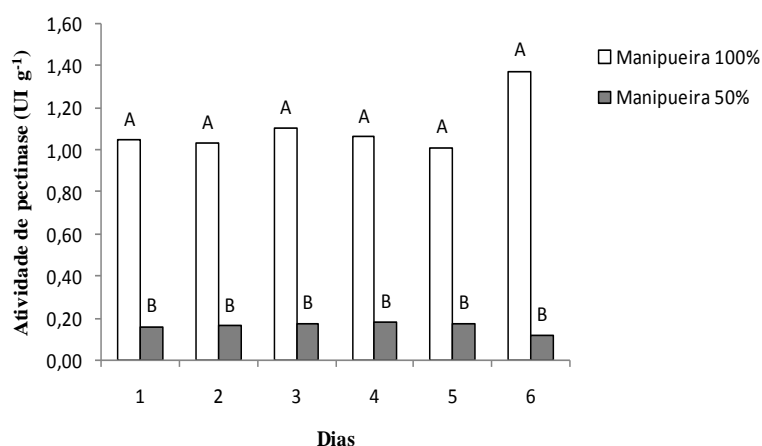
Figura 3 - Efeito da concentração de manipueira no meio fermentativo sobre atividade de amilase dextrinizante. Barras com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

Os resultados de atividade de pectinase revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) causadas pelos tratamentos, para todos os dias fermentação avaliados (Figura 4).

Figura 4 - Efeito da concentração de manipueira no meio fermentativo sobre atividade de pectinase. Barras com letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

O tratamento contendo 100% de manipueira permitiu uma atividade máxima da pectinase igual a $1,05 \text{ UI g}^{-1}$, aos seis dias de fermentação, enquanto para o tratamento contendo 50% de manipueira foi observada atividade enzimática máxima igual a $0,18 \text{ UI g}^{-1}$, aos quatro e cinco dias de fermentação (Figura 4). Assim como para amilase sacarificante e dextrinizante, não foi observado efeito significativo ($p > 0,05$) do tempo de fermentação sobre atividade de pectinase. Registros na literatura apontam que a utilização de fungos filamentosos em processos fermentativos para obtenção de pectinase é mais frequente do que o uso de bactérias para esta finalidade (Guimarães, 2006). No entanto, os valores de atividade de pectinase obtidos no presente estudo foram superiores aos encontrados por Gusmão et al. (2014), empregando a linhagem de *Aspergillus spp.* LEMI1, após seis dias de fermentação em casa de café.

A utilização da manipueira para diversos fins tem sido relatada na literatura, tais como: produção de biofertilizante (Vieites, 1998), nematicida, fungicida e inseticida (Gonzaga et al., 2007), ração animal (Almeida et al, 2009), produção de bioaromas (Damasceno et al., 1999), fabricação de tijolos a frio, produção de biogás, vinagre, sabão e ácido cítrico, como também na produção de etanol (Sumanet al., 2011), biosurfatantes (Nitschke; Pastore, 2006) e fertirrigação (Ferreira; Araújo, 2012). Boa parte dessas aplicações se deve à constituição químico-física da manipueira, conforme apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização físico-química da manipueira, conforme trabalhos publicados na literatura científica.

Variáveis		Autor				MÉDIA
		CEREDA (1994)	FERNANDES JÚNIOR (1995)	BARANA (1996)	BARANA (2000)	
% MS	Sólidos totais	6,28	6,00	4,51	5,54	5,6
	Sólidos voláteis	5,23	5,40	3,83	4,76	4,8
g L ⁻¹	DQO	63,0	69,3	60,0	62,3	63,7
mg L ⁻¹	Cianeto total	444,00	206,83	140,7	112,2	225,9
	Nitrogênio	4900	2000	3000	1242	2785,5
	Carbono	37000	35000	35000	12330	29832,5
	Fósforo	160	250	300	325	258,7
	Potássio	1863	2810	3800	1972	2611,3
	Cálcio	227	200	400	838	416,3
	Enxofre	195	78	200	60	133,3
	Magnésio	405	290	600	326	405,3
	Ferro	15,3	7,0	6,4	12,4	10,27
	Cobre	1,1	1,2	1,4	3,1	1,7
	Zinco	4,0	3,0	5,0	32,5	11,1
Manganês	3,7	3,3	3,5	2,2	3,17	

Fonte: Elaborado pelo autor (2015).

No entanto, são escassos na literatura os registros que sugerem a manipueira como fonte de microrganismos e a sua utilização como substrato em meios de fermentação para obtenção de enzimas de interesse industrial. Sendo assim, o presente trabalho apresentou dados importantes para que maiores investigações sobre a utilização de manipueira possam ser exploradas, bem como a habilidade metabólica da bactéria *Pseudoclavibacter helvolus* em utilizar fontes de carbono alternativas objetivando a produção de enzimas.

CONCLUSÃO

A manipueira se apresentou como importante fonte de bactérias que podem ter aplicações biotecnológicas promissoras e como substrato alternativo em meios fermentativos.

O emprego da manipueira como substrato em fermentação submersa permite agregar valor a um resíduo, comumente desprezado e considerado poluente ambiental, quando descartado, sem tratamento prévio, em solos e mananciais.

O isolado bacteriano MANI B cultivado sob fermentação submersa, contendo manipueira pura (100% v:v) como única fonte de carbono, se mostrou capaz de produzir amilase e, especialmente, pectinase.

Os resultados do presente trabalho apontam que adequações quanto às condições de cultivo, além da purificação das enzimas, análises de funcionalidade e estabilidade das mesmas poderão esclarecer de forma robusta o legítimo potencial da manipueira como substrato em processos fermentativos e a utilização

do isolado bacteriano MANI B, classificado como *Pseudoclavibacter helvolus*, para obtenção de enzimas de interesse industrial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal da Bahia pela concessão da bolsa de iniciação científica e aos órgãos de fomento Fapesb e CNPq, pelo apoio na pesquisa.

Isolation and selection of bacteria producing of amylase and pectinase under submerged fermentation

ABSTRACT

The objective of this study was to isolate and select bacteria in fresh cassava wastewater with capacity to produce amylolytic and pectinolytic enzymes. A total of five strains were obtained and subsequently inoculated into culture medium containing pure manipueira (100% v: v) and diluted in minimal medium (50% v: v), at 31 days . Only one of the isolates, *Pseudoclavibacter helvolus* (MANI B) showed consistent growth in both treatments throughout the incubation period and for this reason was selected to assess their performance for the production of α and β amylase and pectinase under submerged fermentation, containing cassava wastewater (100% v: v) and diluted in minimal medium (50% v: v), at six days. Significant treatment effect on the enzymatic activity of amylase and pectinase was observed, with the concentration of 100% manipueira the best treatment. The enzymatic activities of α and β amylase were lower when compared to pectinase activities in all evaluated fermentation times. It was concluded that the cassava is presented as a source of promising microorganisms for production of enzymes and also it is an alternative substrate to be used in fermentation processes.

KEYWORDS: Agro-industrial waste. Bioprospecting. Cassava. Enzymes.

REFERÊNCIAS

AKORODA, M. O. Alleviating hunger in Africa with root and tuber crops. **African Journal of Root and Tuber Crops**, v. 1, n. 1 p. 41- 43, 1995.

ALMEIDA, S. R. M. et al. Avaliação do potencial nutritivo da manipueira na dieta de ovinos deslanados. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 4, n. 2, p. 1434-1438, 2009.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p.4851-4861, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>

BARANA, A. C. **Estudo de carga de manipueira em fase metanogênica em reator anaeróbio de fluxo ascendente e leito fixo**. 1996. 80f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu.

BARANA, A. C. **Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica**. 2000. 95f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu.

BARANA, A. C.; CEREDA, M. P. Cassava wastewater (Manipueira) treatment using a two-phase anaerobic biodigester. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 183-186, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612000000200010>

BARATTO C. M. et al. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, v. 11, n. 2, p. 15-28, 2011

BRITO, F. A. E. et al. Actinobactérias do solo rizosférico no bioma caatinga. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p. 1992-2004, 2015.

CEREDA, M. P. **Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca**. In: _____. (coord.). Manejo, Uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação Cargill, 2001.

CORRÊA, T. L. R. et al. Simultaneous α -amylase and protease production by the soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using whey protein concentrate and corn steep liquor: compatibility of enzymes with commercial detergents. **Food Science and Technology**, v. 31, n. 4, p. 843-848, 2011.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000400003>

DAMASCENO, S. et al. Desenvolvimento de *Geotrichum fragrans* em manipueira. **Energia na Agricultura**, v. 14 n. 2, p. 7 – 14, 1999.

DASHTBAN, M.; SCHARAFT, H.; WENSHENG, Q. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.5.578>

FEITOSA, I. C. et al. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo = Lipase production by bacterial isolates from petroleum contaminated soil. **Acta Scientiarum Technology**, v. 32, n. 1, p. 23-31, 2010

FERREIRA, D. F. SISVAR: Um programa para análises e ensino de estatística. **Revista científica Symposium 6**, v. 2, p. 36 – 41, 2008.

FERREIRA, T. C.; ARAÚJO, N. C. Estudo agrônômico da espiga do milho (*Zea mays* L) fertirrigado com manipueira. **Engenharia Ambiental**, v. 9, n. 4, p. 152 – 163, 2012.

FRAIFE FILHO, G. A.; BAHIA, J. J. S. **Mandioca**. 2009. Disponível em:
<<http://www.ceplac.gov.br/radar/mandioca.htm>>. Acessado em: Dezembro de 2014.

GONZAGA, A. D. et al. Potencial de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) no controle de pulgão preto de citros (*Toxoptera citricida* Kirkaldy, 1907). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 646 – 650, 2007.

GOULART, K. C. S. et al. Metagonômica aplicada à biotecnologia. **Ciência e Tecnologia**, v. 5, n. 1, p. 1 -14, 2013..

GUIMARÃES, L. H. S. Screening at filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 37, n. 4, p. 474 – 480, 2006.

GUPTA, R. et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 1599 – 1616, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)

GUPTE, A. R.; REZENDE, C. L. E.; JOSEPH, S. W. Induction and resuscitation of viable but nonculturable. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6669-6675, 2003. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6669-6675.2003>

GUSMÃO et al. Produção de enzimas por *Aspergillus spp.* sob fermentação em estado sólido em casca de café. **Scientia Plena**, v. 10, n. 11, p.1-11, 2014.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal em 2011. Rio de Janeiro: IBGE, 2012.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v.40, n.9, p.2931-2944, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>

KALSCHEUER, R. et al. Analysis of storage Lipid Accumulation in *Alcanivorax borkumensis*: Evidence for alternative triacylglycerol biosynthesis routes in bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 918-928, 2007. <https://doi.org/10.1128/JB.01292-06>

KAUR A. et al. Phospholipid fatty acid – a bioindicador of environmental monitoring and assessment in soil ecosystem. **Current Science**, v.89, p.1103 – 1112, 2005.

LABEDA, D. P.; M. C. SHEARER. **Isolation of actinomycetes for biotechnological applications**. In: D. P. Labeda (ed.) Isolation of biotechnological organisms from nature. McGraw-Hill Publ. Co., pp. 1-19., 1990.

LENNETTE, E.H. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 4 ed. Washington: American

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426 – 428, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

NEVES O.S.C et al. Persistência do cianeto e estabilização do pH em manipueira. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 1, p.1274-1284, 2014.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 336 – 341, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.044>

OLIVEIRA, A. N. et al. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 61 – 66, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000100011>

SANCHÉS, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnological Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>

SCHMEISSER, C. et al. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 955 – 962, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0945-5>

SIQUEIRA F. G. et al. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulases from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, p. 20-26, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.10.002>

SMITH, P. V.; HERSON, D. S. Toluene elicits a carbon starvation response in *Pseudomonas putida* m-t containing the TOL plasmid pWW0. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p.1925-1932, 1997.

STROPARO, E. C. et al. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p.2267- 2278, 2012. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n6p2267>

SUMAN, P. A. et al. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). **Acta Scientiarum Technology**, v. 33, n. 4, p. 379 – 384, 2011.

<https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v33i4.9279>

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. Sobrevivência de *Xanthomona saxonopodis* pv. manihotis em manipueira sob condições ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 945 – 953, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2002000700008>

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200028>

VIEITES, R. L. Efeitos da adubação com manipueira sobre o rendimento e qualidade dos frutos de tomate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 45-47, 1998.

WEISBURG, W. G et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

Recebido: 31 mar. 2015.

Aprovado: 15 jun. 2017.

Publicado: 25 jun. 2017.

DOI: 10.3895/rbta.v11n1.2847

Como citar:

TEIXEIRA, I. A. L. Isolamento e seleção de bactérias produtoras de amilase e pectinase sob fermentação submersa. **R. bras. Tecnol. Agroindustr.**, Ponta Grossa, v. 11, n. 1, p. 2227-2244, jan./jun. 2017. Disponível em: <<https://periodicos.utfpr.edu.br/rbta>>. Acesso em: XXX.

Correspondência:

Patrícia Lopes Leal

Rua Rio de Contas, 58, Quadra 17, Lote 58. Bairro Candeias, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. CEP 45029-094.

Direito autorial: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

