UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

GYORGY RONALDO SAMPAIO FERREIRA

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE B- CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE (B-CGTASE) E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

RIO DE JANEIRO
2018

Gyorgy Ronaldo Sampaio Ferreira

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE B- CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE (B-CGTASE) E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Dissertação de Mestrado

Área de Concentração: Enzimas

Orientador: Prof. Rodrigo Pires Nascimento, D. Sc.

Março de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

S345s

Sampaio Ferreira, Gyorgy Ronaldo
SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE β-CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE E (β-CGTASE) E SEU POTENCIAL BIOTECNOLOGICO / Gyorgy Ronaldo Sampaio Ferreira. -- Rio de Janeiro, 2018.
84 f.

Orientador: Rodrigo Pires do Nascimento.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2018.

1. β-CGTase. 2. amilases. 3. bactérias endofiticas. 4. Physalis angulata. I. Pires do Nascimento, Rodrigo, orient. II. Título.

CIP- CATALOGAÇÃO DE PUBLICAÇÃO

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE β-CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE (β-CGTASE) E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Gyorgy Ronaldo Sampaio Ferreira

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do titulo de Mestre em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Rodrigo P. Nascimento

Rodrigo Pires Nascimento, D. EQ/UFRJ

Ivaldo Itabaiana Junior, D. EQ/UFRJ

Ana Maria Mazotto de Almeida, Dra. IM/UFRJ

Celuta Sales Alviano, Dra. IM/UFRJ

Hervé Louis Ghislain Rogez, D. ICB/UFRJ

RIO DE JANEIRO

2018

Dedico a minha família: meus pais e minhas irmãs, aos Profs. Rodrigo e Hervé, ao Julius e aos meus amigos por estarem sempre ao meu lado.

“A força interior é para a alma o que o coração é para o corpo”

Lourival Lopes

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pelo dom da vida e estar presente em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Rodrigo Nascimento, por ser um grande exemplo, tanto no âmbito científico quanto no âmbito pessoal. Obrigado por estar me ajudando e tendo muita paciência e colaborar com a minha dissertação.

Aos meus amigos do laboratório da E108, principalmente a Julia Ramos, Laysa Martins e Pedro Henrique Brito, por sempre estarem dispostos a dar um incentivo e uma palavra de consolo mesmo estando tão longe fisicamente.

Aos meus amigos do CVACBA (Centro de Valorização de Compostos Bioativos da Amazônia), especialmente ao prof. Hervé, a Glaucia, o Helber, a Mayumi e a Victoria por serem muito solícitos e estarem sempre dispostos a tirar minhas duvidas sobre analise ou sobre onde encontrar algum reagente.

Aos meus pais e minhas irmãs, por priorizarem minha educação e por abrir mão de muitas coisas para me incentivar a sempre buscar um ensino de qualidade. Dedico esta conquista a vocês.

Aos meus amigos da UFPA, de profissão e agora da vida, em especial à Adriane Lago, Elaine Karina, Carla Ramos, Caroline Carvalho, Jacqueline Malcher, Juliane Veiga, Rebeca Costa, Michelle Rodrigues e Paulo Chada, pela amizade verdadeira, pelos conselhos e incentivos dados durante todos esses anos da graduação.

A Lolita, Thor (meus filhotes felinos) e principalmente ao Julius (meu amigo e médico), por sempre me ouvirem e aguentarem os meus momentos de estresses.

Por fim, à UFPA e a UFRJ, que me proporcionou as mais diversas oportunidades e por proporcionar a minha formação.

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE β- CICLODEXTRINA GLICOSILTRANSFERASE E (β-CGTASE) E SEU POTENCIAL BIOTECNOLOGICO

RESUMO

Physalis é um gênero botânico da família Solanaceae, originário de regiões de clima tropical e subtropical, presente principalmente na America Latina, com características rústicas no seu cultivo e de fácil produção. O fruto da *Physalis* é muito comercializado na Colômbia e México, com diversos produtos indo desde seu consumo *in natura* até produtos processados como chás e bebidas fermentadas. Pouco se conhece sobre sua microbiota endofítica e seu papel nas propriedades benéficas da *Physalis*. As bactérias endofíticas contribuem para a promoção do crescimento vegetal através da fixação biológica do nitrogênio, da produção de hormônios e enzimas, de antibióticos e outros metabólitos secundários de interesse farmacológico, além de também poderem atuar como biocontroladores de pragas. Dentre as enzimas produzidas podemos destacar as fosfatases, peptidases e amilases. A grande família das amilases envolve uma série de enzimas que atuam em substratos amiláceos, como a mandioca, o trigo, entre outros, transformando-os em glucose, com destaque para as α-amilases, as β-amilases, as pululanases, as ciclodextrina glicosiltransferases entre outras. Sabe-se que a região Norte do país, com destaque para o estado do Pará, se destaca por ser um dos maiores produtores nacionais de mandioca, gerando uma quantidade significativa de resíduos oriundos do seu processamento, como é o caso do resíduo crueira, o qual ainda pode conter até 80% de amido em sua composição. Desta forma o presente trabalho objetivou avaliar o potencial amilolítico de bactérias endofíticas isoladas de diferentes áreas da planta *Physalis angulata*. 23 linhagens de bactérias isoladas da *Physalis* foram testadas quanto sua capacidade de produzir enzimas amilolíticas em meio sólido contendo substrato amiláceo. Após incubação a 35ºC / 48 horas, a atividade enzimática foi detectada após adição de solução Vermelho Congo e o Índice Enzimático (IE) determinado. As linhagens mais promissoras apresentaram IE para a β-CGTase de 4,60±0,31 (linhagem L), 3,4±0,5 (linhagem C) e 2,67±0,44 (linhagem Q). Essas linhagens foram então crescidas em meio de sais contendo crueira como principal fonte de carbono e as atividades de α-amilase, β-amilase e β-CGTase determinadas. Os valores máximos observados para a atividade de α-amilase foram 5,53 U/mL (C), 4,83 U/mL (L) e 5,08 U/mL (Q), enquanto que para β-amilase 0,904 U/mL (C), 0,834 U/mL (L) e 0,469 U/mL (Q). Já a atividade de β-CGTase atingiu valores de 6,37U/mL (C), 6,29U/mL (L) e 6,36 (Q). Assim, os resultados obtidos sugerem que as bactérias endofíticas de *Physalis angulata* foram capazes de produzir enzimas do complexo amilolítico, como as enzimas α- e β- amilases, bem como a enzima β-CGTase utilizando o resíduo crueira, do processamento da mandioca, como substrato de baixo custo. O objetivo central do presente trabalho é traças metas para selecionar bactérias endofíticas da planta *Physalis angulata*, capazes de produzir amilases e avaliar sua capacidade em produzir essas enzimas por fermentação submersa utilizando subprodutos agrícolas da cultura da mandioca.

Palavras-chave: β-CGTase, amilases, bactérias endofiticas, *Physalis angulata*.

SELECTION OF β-CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE AND (β-CGTASE) BACTERIA AND ITS BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL

ABSTRACT

Physalis is a botanical genus of the family Solanaceae, originating in regions of tropical and subtropical climate, present mainly in Latin America, with rustic characteristics in its cultivation and of easy production. The fruit of *Physalis* is very commercialized in Colombia and Mexico, with several products ranging from its *in natura* consumption to products processed like teas and fermented beverages. Little is known about its endophytic microbiota and its role in the beneficial properties of *Physalis*. Endophytic bacteria contribute to the promotion of plant growth through the biological fixation of nitrogen, the production of hormones and enzymes, antibiotics and other secondary metabolites of pharmacological interest, as well as being able to act as pest biocontrollers. Among the enzymes produced we can highlight the phosphatases, peptidases and amylases. The large family of amylases involves a series of enzymes that act on starch substrates, such as cassava, wheat, among others, transforming them into glucose, especially α-amylases, β-amylases, pullulanases, cyclodextrins glycosyltransferases among others. It is known that the northern region of the country, especially in the state of Pará, stands out as one of the largest domestic producers of cassava, generating a significant amount of waste from its processing, such as raw which can still contain up to 80% of starch in its composition. In this way the present work aimed to evaluate the amylolytic potential of endophytic bacteria isolated from different areas of the plant *Physalis angulata*. 23 strains of bacteria isolated from *Physalis* were tested for their ability to produce amylolytic enzymes in solid media containing starch substrate. After incubation at 35ºC / 48 hours, the enzymatic activity was detected after addition of Red Congo solution and the determined Enzymatic Index (IE). The most promising strains presented IE for β-CGTase of 4.60 ± 0.31 (L-line), 3.4 ± 0.5 (C-line) and 2.67 ± 0.44 (Q-line). These lines were then grown on crutal-containing salts medium as the main carbon source and the determined α-amylase, β-amylase and β-CGTase activities. The maximum values observed for α-amylase activity were 5.53 U / mL (C), 4.83 U / mL (L) and 5.08 U / mL (Q), whereas for β-amylase 0.904 U / mL (C), 0.834 U / mL(L) and 0.469 U / mL (Q). The activity of β-CGTase reached values of 6.37U / mL (C), 6.29U / mL (L) and 6.36 (Q). Thus, the results obtained suggest that the endophytic bacteria of Physalis angulata were able to produce enzymes of the amylolytic complex, such as enzymes α- and β-amylases, as well as the enzyme β-CGTase using the cassava processing crust, as substrate. The main objective of the present work is to determine the endophytic bacteria of the plant *Physalis* angulata, capable of producing amylases and to evaluate their capacity to produce these enzymes by submerged fermentation using agricultural by products of the cassava crop.

Key words: β-CGTase, amylases, endophytic bacteria, *Physalis angulata*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fotografia do fruto da *Physalis angulata*.....	**4**
Figura 2:	Esquema da planta *Physalis* e fruto.....	**5**
Figura 3:	Fórmula estrutural do amido .....……...	**7**
Figura 4:	Fluxograma da produção da farinha de mandioca……	**9**
Figura 5:	Classificação das enzimas amilolíticas…….	**13**
Figura 6:	Ação das enzimas envolvidas na degradação do amido……...	**14**
Figura 7:	α-amilase…….	**15**
Figura 8:	β-amilase…….	**16**
Figura 9:	Estrutura da CGTase……	**17**
Figura 10:	Estrutura da α-CD, β-CD e γ-CD…….	**17**
Figura 11:	Incorporação pela CGTase……..	**18**
Figura 12:	Esquematização da planta *Physalis angulata*.....	**20**
Figura 13:	Localização da plantação de mandioca e localização da UFPA.....	**31**
Figura 14:	Resíduo da mandioca.....	**32**
Figura 15:	Crescimento em placa das bactérias no tempo de 24 horas.....	**35**
Figura 16:	Formação do halo em meio específico para CGTase.....	**36**
Figura 17:	Atividade enzimática detectada em placa de Petri.....	**37**
Figura 18:	Micrografia da linhagem bacteriana C.....	**38**
Figura 19:	Exemplo do teste de catalase……	**38**
Figura 20:	Dosagem da atividade enzimática de α-Amilase……..	**43**
Figura 21:	Dosagem da atividade enzimática de β-Amilase……..	**45**
Figura 22:	Dosagem da atividade enzimática de β-CGTase……..	**46**
Figura 23:	Dosagem de proteínas totais solúveis pelo método de Lowry……..	**48**
Figura 24:	Curva padrão ajustada pela Teoria da Complexação para dosagem de β-CD.....	**61**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Alguns compostos encontrados no fruto da planta *Physalis angulata*.....	**6**
Tabela 2:	Composição nutricional da mandioca…….	**8**
Tabela 3:	Meio de Crescimento para produção de CGTase……	**21**
Tabela 4:	Meio utilizado para a verificação das bactérias produtoras de β-glucosidase……..	**22**
Tabela 5:	Reagentes utilizados no método Hartree-Lowry……	**27**
Tabela 6:	Índice Enzimático para CGTase (γ-CD)……..	**36**
Tabela 7:	Índice enzimático das atividades de β-glucosidase e Amilase…….	**37**
Tabela 8:	Características da Coloração de Gram e Produção de Catalase……...	**38**
Tabela 9:	Relação do crescimento das linhagens promissoras crescidas em diferentes valores de pH……..	**40**
Tabela 10:	Relação do crescimento das linhagens promissoras crescidas em diferentes temperaturas……...	**41**
Tabela 11:	Composição centesimal da crueira.....	**49**
Tabela 12:	Atividade de α-amilase.....	**62**
Tabela 13:	Atividade de β-amilase.....	**63**
Tabela 14:	Atividade de β-CGTase.....	**64**
Tabela 15:	Atividade de proteínas.....	**65**

LISTA DE ABREVIATURAS

Ciclodextrina Glicosiltransferase	**CGTase**
Gama- Ciclodextrina Glicosiltransferase	**γ-CGTase**
Alfa- Ciclodextrina Glicosiltransferase	**α-CGTase**
Beta- Ciclodextrina Glicosiltransferase	**β-CGTase**
Índice enzimático	**IE**
Densidade óticae	**DO**
Atividade de água	**Aw**
Umidade	**U**
Desvio padrão	**DP**
Centro de Valorização de Compostos Bioativos da Amazônia	**CVACBA**
Laboratório de Ecologia e Processos Microbianos	**LEPM**

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Índice enzimático……. **23**

Equação 2: Padronização do inóculo..... **26**

Equação 3: Determinação de proteína total solúvel..... **28**

Equação 4: Curva padrão de α-amilase..... **28**

Equação 5: Atividade de α-amilase..... **28**

Equação 6: Curva padrão de β-amilase..... **29**

Equação 7: Atividade de β-amilase..... **29**

Equação 8: Concentração de β-CD..... **30**

Equação 9: Teor de umidade..... **32**

Equação 10: Teor de lipídeos..... **32**

Equação 11: Teor de cinzas..... **33**

Equação 12: Teor bruto de fibras totais…….. **33**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
2.1 Características gerais da *Physalis* 4
2.1.1 Aspectos gerais 4
2.1.2 Produção da *Physalis* 5
2.1.3 Comercialização da *Physalis* 6
2.2 Amido 7
2.3 Mandioca 8
2.3.1 Crueira 9
2.4 Bactérias associadas a plantas 10
2.4.1 Aspectos gerais 10
2.4.2 Bactérias endofítica 11
2.5 Enzimas 12
2.5.1 Amilases 12
2.5.1.1 α- amilase 14
2.5.1.2 β -amilase 16
2.5.1.3 Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase) 17
3 OBJETIVOS 19
3.1 Objetivos gerais 19
3.2 Objetivos específicos 19
4 MATERIAIS E MÉTODOS 20
4.1 Bactérias endofíticas 20
4.2 Ativação das bactérias 20
4.3 Seleção das linhagens produtoras de CGTase 21
4.3.1 Primeira etapa de seleção 21
4.3.2 Segunda etapa da seleção 21
4.4 Detecção da atividade de amilase em placa 22
4.5 Detecção de atividade de β-glucosidase em placa 22
4.6 Cálculo do Índice Enzimático 23
4.7 Caracterização das linhagens promissoras 23
4.7.1 Técnica de microscopia: coloração de Gram 23
4.7.2 Teste de catalase 24
4.8 Produção de CGTase por fermentação submersa 25

4.8.1 Determinação do pH ótimo de crescimento 24
4.8.2 Determinação da temperatura ótima de crescimento 24
4.8.3 Análise estatística 25
4.8.4 Padronização do inóculo 25
4.8.5 Fermentação submersa 26
4.9 Ensaios analíticos 27
4.9.1 Determinação da concentração da proteína total solúvel 27
4.9.2 Determinação da atividade de amilase 28
4.9.2.1 Atividade de α-amilase 28
4.9.2.2 Atividade de β-amilase 29
4.9.2.3 Atividade de β-CGTase 29
4.10 Matéria-prima da fermentação 31
4.10.1 Composição centesimal 31
4.10.1.1 Teor de umidade (U) 31
4.10.1.2 Teor de lipídeos 32
4.10.1.3 Teor de cinzas 33
4.10.2 Teor de proteína bruta 33
4.10.3 Teor bruto de fibras totais 33
4.10.4 Teor de amido 34
4.10.5 Atividade de água (Aw) 34
4.10.6 Determinação do pH 34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 35
5.1 Seleções das linhagens produtoras de β-CGTase 35
5.2 Determinação das atividades amilolíticas e β-glucosidase em placa 37
5.3 Caracterização das linhagens promissoras 38
5.4 Determinação do pH ótimo de crescimento 39
5.5 Atividade enzimática 42
5.6 Teor de proteína bruta 47
5.7 Composição Centesimal 49
6 CONCLUSÃO 51
7 REFERÊNCIAS 52
Anexo 1 61
Anexo 2 62
Anexo 3 63

Anexo 4 64
Anexo 5 65

1 INTRODUÇÃO

Solanaceae é uma das maiores famílias no grupo das angiospermas, contendo 150 gêneros e cerca de 3.000 espécies, com maior distribuição e diversidade na região da América do Sul (SOUZA e LORENZI, 2005). Um dos gêneros de grande relevância dentro das Solanaceae é o gênero *Physalis*, encontrado ao longo de todo o continente americano, sendo identificado por Linneo em 1753 (HUNZIKER, 2001). O fruto da planta *Physalis* geralmente é consumido *in natura*, sem acompanhamento ou em saladas, dando um toque agridoce às comidas. A obtenção de produtos processados da *Physalis* é uma alternativa para a valorização agroindustrial dessa matéria-prima pouco explorada nas regiões norte e nordeste do Brasil. Em alguns países, como Colômbia e México, esses frutos são processados para a obtenção de produtos como frutas cristalizadas, frutas secas, geleias, bebidas lácteas, iogurtes e na elaboração de licores. As frutas são utilizadas em doces e para decorar tortas, podendo também, ser encontradas nas formas de conserva e sorvete (RUFATO *et al*, 2013).

Em associação com folhas e frutos, existe uma diversidade de microrganismos vivendo de forma harmônica numa relação de proto-cooperação ou mesmo mutualismo. As bactérias encontradas nas plantas podem ser divididas em dois grupos: Bactérias epifíticas, que são encontradas na superfície do vegetal e bactérias endofíticas, que vivem no interior do vegetal (STURZ, 2000; ANDREWS e HARRIS, 2000). Microrganismos endofíticos ou endófitos são fungos ou bactérias que colonizam o interior de tecidos ou órgãos vegetais podendo estar presentes em folhas, caule e raiz. Podem colonizar a planta em todo o seu período de vida ou apenas em parte do seu ciclo, sem causar danos ou doenças, proporcionando algumas vantagens ao hospedeiro, promovendo o crescimento da planta através da produção de enzimas e hormônios, fixando nitrogênio atmosférico nas raízes, protegendo contra o ataque de insetos e também de outros microrganismos (AZEVEDO *et al.*, 2000). Em função da sua capacidade de produzir diferentes enzimas extracelulares, alguns estudos realizados por Luz *et al* (2016) com bactérias isoladas de plantas como bromélia, briófita verde, briófita preta e algumas folhas e caule coletados na Serra do Ouro Branco – MG, apresentaram maiores atividades enzimáticas para celulose e amilase. Já Lima (2016), observou que as bactérias endofíticas isoladas da *Eichhornia crassipes Mart.* (aguapé) foram capazes de produzir biossurfactantes.

As bactérias endofíticas podem ser utilizadas para fins biotecnológicos, em diversos segmentos industriais, como indústria têxtil (amilases, celulases e peptidases) e indústria alimentícia (amilases, xilanases e peptidases). Assim, a busca por novas fontes microbianas capazes de produzir diferentes enzimas com diferentes características bioquímicas vem crescendo nas indústrias de vários setores. As enzimas amilolíticas, por exemplo, podem ser divididas em duas grandes categorias: as endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo α-1,4, de uma maneira aleatória, podendo hidrolisar tanto nas extremidades quanto no meio do polímero. Sua ação resulta na formação de oligossacarídeos ramificados e lineares de vários comprimentos de cadeias, estando associadas à rápida perda de viscosidade e liberação de dextrinas. Por outro lado, as exoamilases hidrolisam, sucessivamente, ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora das mesmas, resultando em unidades de glicose ou maltose, estando associadas à pequena alteração da viscosidade e a rápida liberação de açúcares redutores. Atualmente, são conhecidos um grande número de enzimas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos, e uma ação combinada de várias enzimas é necessária para hidrolisar completamente o amido (GUPTA *et al*., 2003; NAIDU e SARANRAJ, 2013).

Atualmente o mundo tem-se caracterizado pela alta produção de resíduos orgânicos, tanto de origem rural como urbana. Esses resíduos geralmente são levados para os aterros, para a incineração ou descartados em terrenos baldios, e constituem-se não só em um grande problema de saneamento ambiental, como também em desperdício de nutrientes. Os tratamentos dos resíduos orgânicos devem atender aos princípios sanitários e ecológicos para o seu tratamento para a redução dos inúmeros impactos ambientais. A utilização de resíduos / subprodutos de origem agrícola como matéria-prima vem se destacando por ser um produto de baixo valor e produzido em grande quantidade (COELHO *et al*., 2001; OLIVEIRA FILHO *et al*., 2018). Dentre os diversos subprodutos agrícolas podemos destacar os de origem amilácea, como os resíduos do processamento da mandioca e do milho, entre outras culturas agrícolas. De acordo com dados do IBGE (2017), a região Norte teve uma safra de mandioca superior a 10 mil toneladas por hectar em 2016, sendo o estado do Pará responsável por 25,5% dessa produção. Segundo Araújo *et al* (2014), uma tonelada de mandioca gera cerca de 15 kg de crueira, sendo que essa quantidade pode variar com o tempo de coleta, tipo de cultivo e ajustes do processo.

Assim, desenvolver estudos na área investigativa buscando novas linhagens de

bactérias endofíticas com capacidade para produzir enzimas com potencial biotecnológico pode ser de grande relevância. Enzimas como as amilases incluindo as β- ciclodextrinas glicosiltransferases (CGTase) já vem sendo utilizadas com êxito, principalmente na indústria alimentícia. Desta forma, estudar novas linhagens produtoras pode abrir novos horizontes para o seu uso em diferentes segmentos da indústria. Com esse objetivo central, o presente trabalho traçou metas para selecionar bactérias endofíticas da planta *Physalis angulata*, uma planta com pouco conhecimento sobre sua microbiota endofítica, capazes de produzir amilases, e avaliar sua capacidade em produzir essas enzimas por fermentação submersa utilizando subprodutos agrícolas da cultura da mandioca como matéria-prima (obtida no município de Moju).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características Gerais da *Physalis*

2.1.1 Aspectos gerais

Solanaceae é uma família de Angiospermas Eudicotiledôneas, pertencente à subclasse Sympetalae, ordem Solanales, sendo a que representa um maior número de espécies, com cerca de 150 gêneros e 3.000 já descritas. A região da América do Sul se destaca por apresentar uma grande diversidade dessa família. (HUNZIKER, 2001; SOUZA e LORENZI, 2005). Dentre os membros da família Solanaceae, podemos destacar os gêneros *Solanum* (tomate, batata, berinjela), *Capsicum* (pimentão, pimenta), *Mandragora* (mandrágora) e *Physalis* (physalis). A origem do nome *Physalis* vem do grego "physa", que significa bolha ou bexiga, em referência ao cálice da flor que cresce e protege o fruto (HAWKES *et al.*, 1991) como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1: Fotografia do fruto da *Physalis angulata*.

Fotos:Muniz, 2014.

O gênero das *Physalis* compreende, segundo Whitson e Manos (2005), entre 90 a 120 espécies, sendo algumas delas tóxicas. A região da América do Sul apresenta cerca de 12 espécies, indo desde o nível do mar até áreas de alta altitude, em ambientes nativos, em solos modificados ou em regiões com vegetação secundária (HUNZIKER, 2001). As espécies do gênero *Physalis* são bastante distribuídas ao longo das zonas tropicais e subtropicais do mundo, principalmente nas Américas Central e do Sul, tendo características herbáceas, com uma produção anual e perene (SILVA, 2014). Na região Amazônica essa herbácea é conhecida popularmente pelo nome de "camapú" ou physalis, palavra de origem tupi. No Brasil o gênero *Physalis* encontra-se com maior frequência nas regiões norte e nordeste, porém apenas 8 espécies são comercializadas (STEHMANN *et al.*, 2012). As espécies de *Physalis* podem ser encontradas em campos, jardins e quintais, apresentando características diferenciadas de outras frutas por

apresentar um envoltório, denominado de cálice (RUFATO *et al.*, 2008), como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2: (A) Esquema da planta *Physalis* e fruto (1- Planta, 2- Flor vista de frente, 3-Flor vista lateralmente, 4- Fruto com o cálice parcialmente removido e 5- Sementes), (B) Arbusto da planta *Physalis*, (C) Fruto e cálice.

Fontes: PROSEA, 2011; MFRURAL, 2016

Essa planta se caracteriza por ser considerada rústica e de fácil cultivo, apresentando bom crescimento numa faixa de temperatura entre 15 a 30°C, possuindo uma base lenhosa que pode chegar de 1 a 2 metros de altura (MUNIZ, 2015). Suas folhas são veludadas e em forma de triângulo (Figura 2), apresentando em seu talo principal uma estrutura herbácea e pilosa. O enraizamento se dá nos nós, apresentando os entrenós muito distantes, podendo chegar de 6,5 a 10 cm de comprimento (FISCHER e MIRANDA, 2012). Seus frutos são constituídos em uma baga carnosa, com diâmetro entre 1,25 e 2,50 cm e peso entre 4,0 e 10,0 g. Cada planta produz aproximadamente 2 a 3 kg de frutas por safra (LIMA, 2016).

2.1.2 Produção da *Physalis*

A produção do fruto da *Physalis angulata* vem crescendo desde 1985 no mercado colombiano, sendo comercializada na sua forma *in natura* ou processada. Atualmente, a produção desse fruto tem representado 44% do faturamento no mercado colombiano, mas sem muita exigência para exportação, visto a necessidade de se produzir frutos de qualidade e em quantidade satisfatória que atenda a demanda internacional (CORAL, 2012; RODRIGUES *et al*., 2013).

O cultivo da planta *Physalis angulata*, por ser considerada rústica e de boa

adaptação ao ambiente tropical, é uma ótima alternativa para os pequenos e médios produtores. O rendimento dos frutos varia de acordo com as regiões cultivadas, seu rendimento máximo se dá no primeiro ano de cultivo, tendo uma vida útil de 2 a 3 anos (MUNIZ *et al*., 2014). Esse fruto é conhecido pelo seu sabor açucarado, rico em vitaminas A e C, fósforo e ferro, além de flavonóides, alcalóides e fitoesteróides. A Tabela 1 representa alguns dos compostos encontrados na planta *Physalis angulata.* Por apresentar elevado conteúdo nutracêutico, se destacando a physalina (anticarcinogênico e anti-inflamatório) e por apresentar fácil cultivo, tem se estudado a possibilidade da incorporação da espécie *Physalis angulata* no cultivo orgânico (VELASQUEZ *et al.*, 2007). Os parâmetros físico-químicos relacionados ao sabor, odor, textura e valor nutritivo constituem atributos de qualidade que valorizam a comercialização e a utilização da polpa na elaboração de produtos industrializados (RODRIGUES *et al.*, 2014).

Tabela 1: Alguns compostos encontrados no fruto da planta *Physalis angulata*.

Composto	Quantidade
Calorias	49Kcal
Proteínas	1,5 g
Carboidratos	11,0 g
Niacina	0,8 mg
Vitamina A	1.730 UI
Vitamina C	20 mg
Ferro	1,7 mg
Fibra	0,4 g
Cálcio	0,9 mg
Fósforo	21 mg
Riboflavina	0,17 mg
Água	85,9 g

Fonte: CAMACHO, 2000.

2.1.3 Comercialização da *Physalis*

O Brasil se destaca por apresentar uma grande variedade de frutas nativas e exóticas, porém a *Physalis angulata* ou camapú, como é conhecida, não é muito

explorada nas regiões norte e nordeste do Brasil, sendo geralmente consumida *in natura*. Produtos processados do camapú são mais conhecidos em países como Colômbia e México (RUFATO, 2013).

2.2 Amido

Amido é um polímero de alto massa molecular, relativamente simples, composto de moléculas de glucose. O amido pode ser encontrado na forma de substância de reserva em plantas, sementes, frutas, tubérculos e raízes, sendo formado basicamente por 2 estruturas distintas, a amilose e amilopectina (GUPTA *et al*., 2003).

A amilose é uma molécula essencialmente linear, constituída de unidades de glucose (α-D-glicopiranosil) unidas entre si por ligações α-1,4 (Figura 3A). A amilopectina é formada por centenas de cadeias de α-1,4-glucanas, que são interligadas por aproximadamente 5% de ligações α-1,6, formando uma estrutura altamente ramificada (Figura 3B) (JOBLING, 2004).

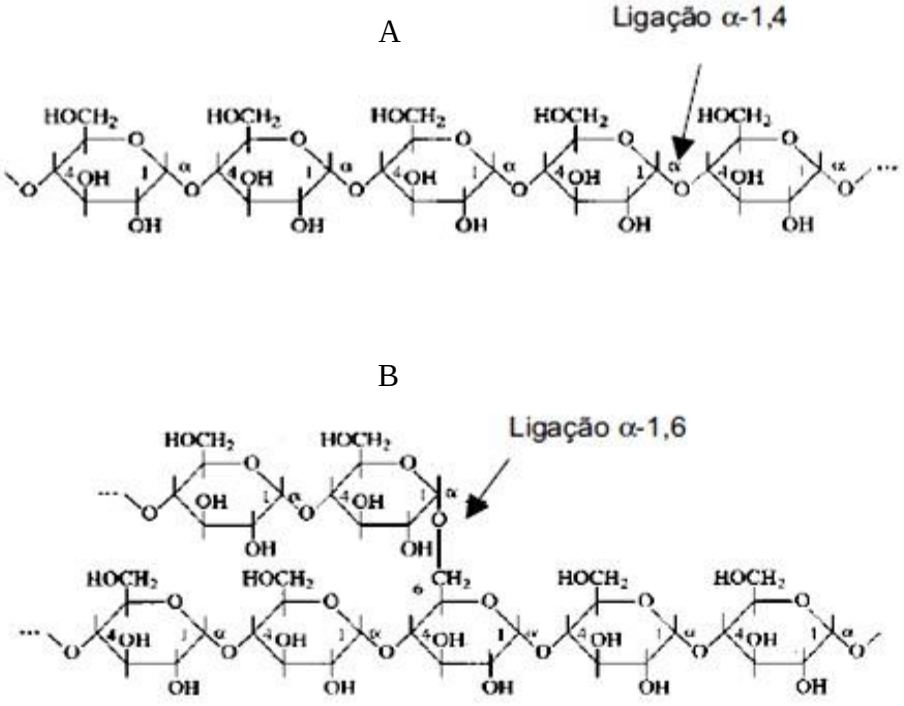

Figura 3: Formula estrutural do amido. A) Amilose e B) Amilopectina.

Fonte: JOBLING, 2004.

O amido é um dos polissacarídeos de grande importância para a indústria alimentícia, devido as suas características funcionais e qualidade nutricional. Assim, têm uma grande aplicação, seja diretamente como alimento ou como texturizante, estabilizante, ligante, gelatinizante, dentre outras aplicações nas formulações

alimentares (WHISTLER e BEMILLER, 1997). A degradação total do amido se dá principalmente, pela ação combinada de enzimas amilolíticas, as quais atuam na hidrólise das ligações α-1,4 e α-1,6, especificamente.

2.3 Mandioca

A mandioca é uma planta dicotiledônea, da família *Euphorbiaceae* e gênero *Manihot*, originária das Américas. O gênero *Manihot* apresenta um grande número de espécies, mas a utilizada para fins alimentícios é apenas a *Manihot esculenta Crantz* que pode ser da variedade brava ou mansa, devido ao teor de glicosídeos cianogênicos (que liberam o ácido cianídrico) presente (SOUZA e MENEZES, 2004).

A mandioca é um dos alimentos mais consumidos no mundo, destacando-se principalmente na região tropical, onde o seu cultivo ocorre em maior predominância. Destaca-se por ser uma planta rústica e de grande capacidade de adaptação às condições desfavoráveis de clima e solo, além de sua multiplicidade de usos (CONAB, 2016). A mandioca se destaca por ser à base alimentar de muitas famílias no Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste e também alimentação de animais, em função da sua composição química, rica em carboidrato, como pode ser observado na Tabela 2. O Brasil representa um dos maiores produtores dessa tuberosa e seu processamento é comumente utilizado para a fabricação de fécula e farinha (SILVA *et al.*, 2016).

Tabela 2: Composição nutricional da mandioca.

Amostra	Umidade	Cinzas	Proteínas	Lipídeos	Fibra bruta	Amido
Farinha de mandioca	9,21	1,40	0.94	0,70	2,3	95,30

Fonte: ÁLVARES et al., 2013.

Segundo o IBGE (2017), a safra da mandioca na região Norte representou 42,6% da produção em todo o Brasil. Dentre os principais estados produtores, o Pará tem grande destaque com uma produção de 6.034.713 toneladas, o que representa um percentual de 25,5% da produção nacional (IBGE, 2017).

2.3.1 Crueira

Atualmente a busca pela minimização ou reaproveitamento de resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais tem se destacado. Assim, a reutilização de resíduos é de extrema importância no que tange à redução dos impactos ambientais, pois contribui com a redução do descarte de lixo orgânico e outros compostos que podem ter um maior aproveitamento como subproduto agrícola (FURTADO, 2001).

A mandioca, assim como outras culturas agrícolas, se destaca pelo seu papel socioeconômico na agricultura brasileira, sendo seus principais subprodutos a fécula e a farinha. Na Figura 4, um fluxograma do processamento da mandioca para obtenção de farinha, assim como os resíduos gerados, está demonstrado.

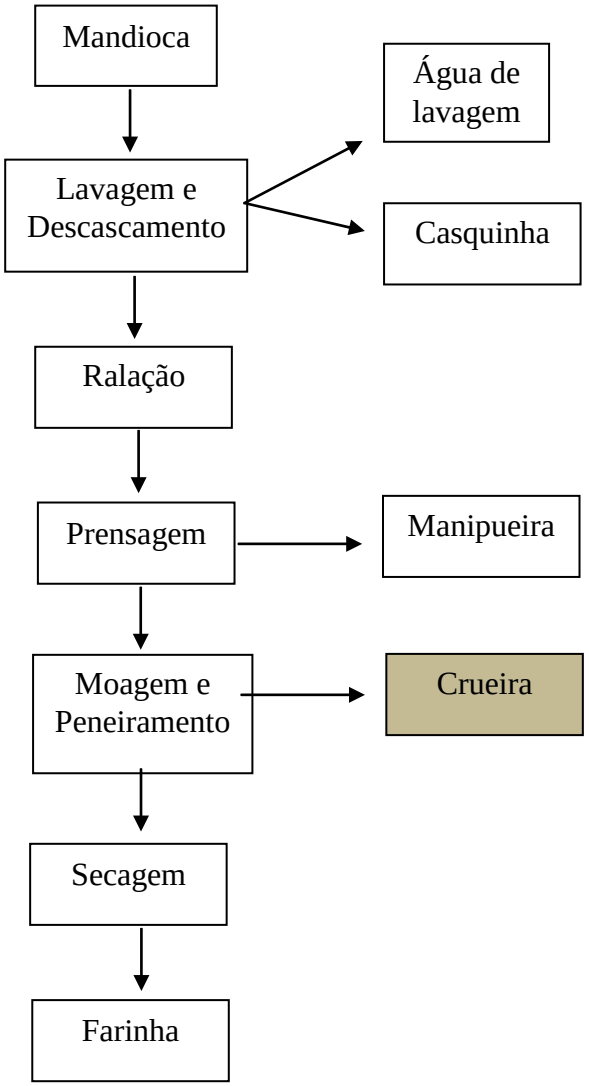

Figura 4: Fluxograma da produção da farinha de mandioca

Fonte: Neves, 2014.

Dentre os resíduos gerados durante a produção da farinha, destaca-se a crueira, um resíduo sólido, de estrutura fibrosa, constituída principalmente das raízes e entrecascas da mandioca que são peneirados antes da torração da massa prensada (NEVES, 2014 e ARAUJO *et al.,* 2014). A crueira vem sendo muito utilizada como fonte de carboidrato, por apresentar o valor de amido entre 48% a 80% da sua composição e um valor de cinzas de 0,9 a 2%, tornando-se um substrato potencial para os processos biotecnológicos de bioconversão (CARVALHO *et al*., 2005; ROCHA *et al*., 2016).

Muitos estudos utilizando resíduos agroindustriais como fontes de carbono para a produção de enzimas por fermentação microbiana vêm sendo realizados, principalmente em função da grande disponibilidade e por ser um subproduto de baixo valor comercial (COSTA e BOCCHI, 2012).

2.4 Bactérias Associadas a Plantas

2.4.1 Aspectos gerais

As bactérias podem ser encontradas tanto na superfície como no interior dos vegetais, podendo ter uma relação mutualística ou simbiótica com a planta hospedeira (GUO *et al*. 2008, MELNICK *et al*.2008). As bactérias que são associadas às plantas são denominadas de bactérias endofíticas, e vivem no interior dos vegetais sem causar danos aparentes ao seu hospedeiro (STURZ, 2000; ANDREWS e HARRIS, 2000). Pode-se afirmar que as distinções entre bactérias endofíticas, epifíticas e fitopatogênicas são de natureza apenas didática, não existindo um claro limite entre esses grupos e sim um gradiente entre eles, pois existem algumas bactérias que possuem colonização endofítica e também epifítica. Dependendo das condições ambientais, da integridade e estado de saúde do vegetal e o equilíbrio com outras populações endofíticas, uma bactéria endofítica pode se tornar patogênica, uma bactéria epifítica pode penetrar no vegetal por alguma lesão ou outro orifício que esteja presente e lá permanecer endofítica ou causar patologias ao seu hospedeiro (AZEVEDO *et al*., 2000; ANDREWS e HARRIS, 2000).

A origem, a forma de penetração, a colonização e transmissão de bactérias endofíticas, não estão ainda bem definidos. Elas podem ser provenientes de sementes, da própria rizosfera, do fitoplano e de material propagado vegetativamente. Muitas são as formar de penetração, sendo uma delas a entrada pelo estômato, ferimentos, raízes e

alguns microrganismos podem também produzir enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular dos vegetais. A origem das bactérias epifíticas pode ser proveniente das sementes, do solo, da propagação pelo ar, água e também insetos (SUZUKI, 2006; ANDREWS e HARRIS, 2000).

2.4.2 Bactérias Endofítica

Microrganismos endofíticos são fungos ou bactérias que colonizam o interior de tecidos e/ou órgãos vegetais das plantas podendo ser folhas, caule e raiz. Podem colonizar a planta em todo o seu período de vida ou apenas em parte do seu ciclo, sem causar danos ou doenças nas plantas, contrariamente podendo manifestar algumas vantagens ao hospedeiro, ajudando no crescimento da planta, protegendo-as contra o ataque de inseto (AZEVEDO, 2002). Os efeitos na promoção de crescimento incluem aumentos na altura, na biomassa da parte aérea, do caule e da raiz e na formação de pelos radiculares e foliares da planta, na lignificação de vasos do xilema e na produção de tubérculos em batata (PILLAY e NOWAK, 1997; STURTZ, 1995).

A teoria de que bactérias não-patogênicas residem em tecidos de plantas foi formulada por Perotti em 1926. Porém, estudos sobre a colonização de tecidos internos de plantas sadias por bactérias datam de 1870, com os trabalhos de Pasteur e outros pesquisadores. Os primeiros relatos consideraram as bactérias endofíticas como contaminantes resultantes da desinfestação superficial incompleta ou como patógeno fracamente virulento. Entretanto, pesquisas recentes demonstraram que bactérias endofíticas podem promover o crescimento das plantas e reduzir os sintomas de doenças causadas por diversas bactérias patogênicas (BARRETTI, 2008).

Durante o processo de colonização da planta pelo endófito, ocorre a ativação do sistema de defesa da planta, causando um aumento da resistência desta contra patógeno (PAZ *et al*., 2007). Os endófitos podem controlar o crescimento dos fungos patogênicos pela competição por nutrientes e produção de substâncias antibióticas, uma vez que eles ocupam o mesmo nicho, podendo também parasitar o patógeno ou mesmo induzir a planta a desenvolver resistência às doenças (SAIKKONEN *et al*., 1998; MACCHERONI *et al*., 2004).

De acordo com as estratégias de vida dos endófitos eles podem ser classificados em obrigatórios ou facultativos. Os obrigatórios são estritamente dependentes da planta hospedeira para seu crescimento e sobrevivência. Os facultativos, por outro lado,

possuem uma fase de seu ciclo dentro da planta hospedeira e outra em que vivem fora delas (HARDOIM *et al.*, 2008).

São conhecidas cerca de 1 milhão de espécies de bactérias endofíticas diferentes, sendo a grande maioria capaz de sintetizar compostos bioativos que podem ser utilizados pelas plantas para defesa contra fitopatógenos, como por exemplo alcalóides, terpenóides, flavonóides, esteróides, antibióticos e antitumorais (GUO et al. 2008, KOUR et al. 2008, QIU et al. 2010, ALY et al. 2011).

2.5 Enzimas

2.5.1 Amilases

As enzimas amilolíticas ou amilases são um dos mais importantes e antigos grupos de enzimas industriais com aplicações em diferentes setores da indústria, como alimentos, têxtil, química, farmacêutica e detergente, sendo a grande maioria de origem microbiana. As amilases começaram a ser produzidas em decorrência do interesse industrial pela produção de glucose a partir de materiais amiláceos (SANTANA, 2012).

Segundo Gupta *et al* (2003), as amilases são divididas em duas categorias, endoamilases e exoamilases. As endoamilases (α-amilases) catalisam as hidrólises das ligações glicosídicas do tipo α-1,4, de uma forma aleatória no interior da molécula de amido. Sua ação resulta na formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos. As exoamilases (glucoamilase) hidrolisam as ligações α-1,4 e α- 1,6 do amido a partir da extremidade não redutora, tendo como resultado a transformação total do amido em unidades de glicose a partir das extremidades não-redutoras da cadeia. A Figura 5 apresenta um resumo das enzimas que degradam o amido.

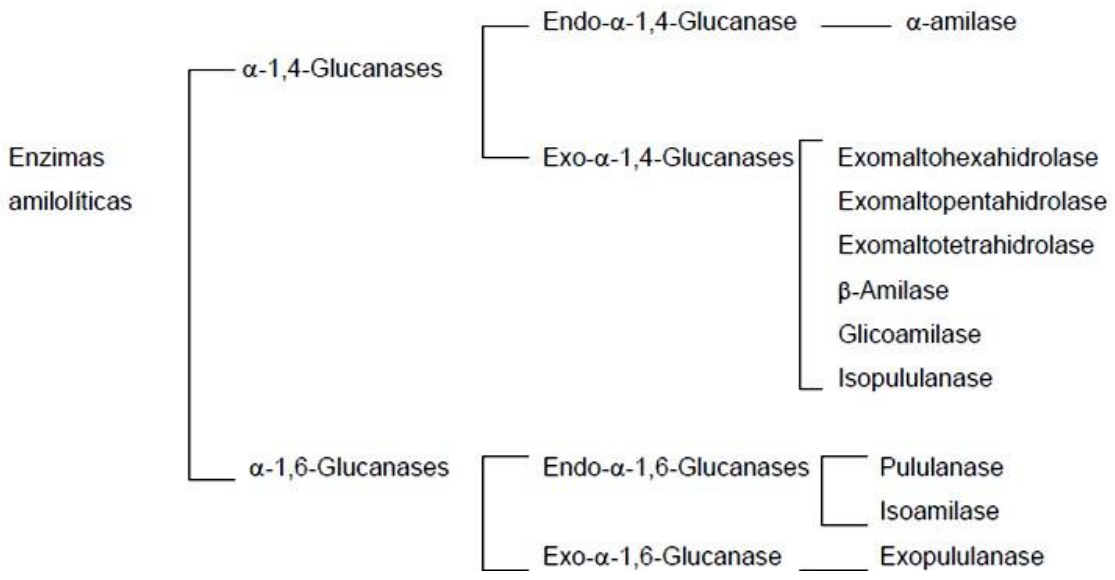

Figura 5: Classificação das enzimas amilolíticas

Fonte: COSTA, 1996.

Atualmente são conhecidas várias enzimas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos e a ação combinada de várias enzimas é necessária para a completa hidrólise do amido. As enzimas responsáveis pela degradação do amido estão amplamente distribuídas na natureza. Entre elas, as amilases, que atuam sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos para hidrolisar as ligações glicosídicas α-1,4. As amilases podem ser divididas em três grupos: as α-amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases); as β-amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glucoamilases (amiloglucosidases), as quais liberam unidades de glucose do terminal não-redutor das moléculas do substrato (REED, 1975). A ação de cada enzima pode ser observada na Figura 6.

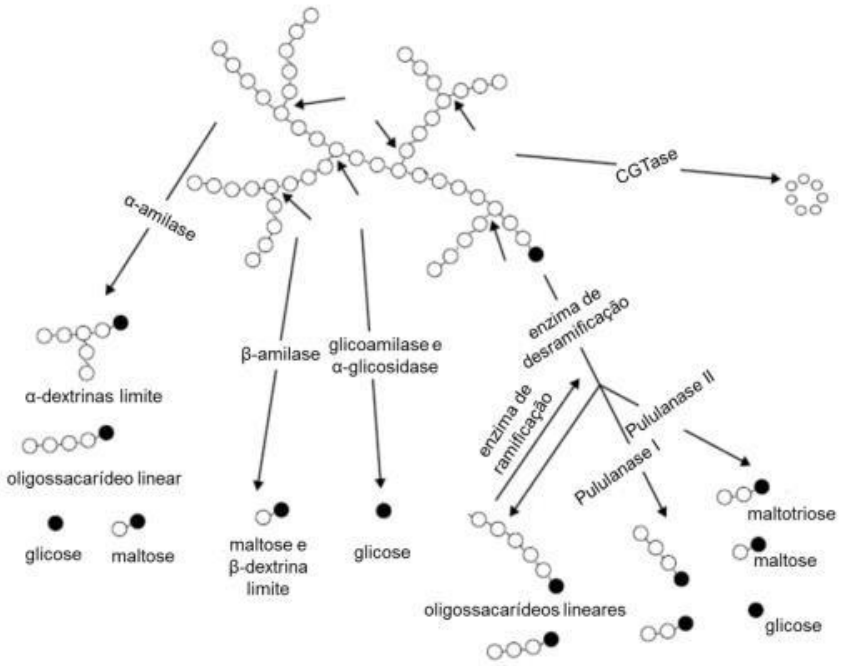

Figura 6: Ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (•) Molécula de glicose com extremidade redutora; (o) Molécula de glicose sem a extremidade não redutora. As setas indicam a preferência pela quebra na molécula de amido.

Fonte: PEREIRA, 2015.

As amilases têm grande importância na área biotecnológica, apresentando muitas linhas de aplicação industrial. Uma das principais aplicações das enzimas amilolíticas é na indústria de panificação, atuando na fibra amilácea da farinha de trigo, melhorando diversos aspectos, como no aumento do volume da massa, a melhor maciez e o melhor aspecto fibroso. Na produção de xaropes de glucose e frutose, as amilases são utilizadas para hidrolisar as moléculas de amido. Na indústria de papel e celulose, bem como na indústria têxtil, amilases são utilizadas para proteção da fibra celulósica contra danos mecânicos e melhoria do acabamento final (SANTANA, 2012).

2.5.1.1 α- Amilase

As α-amilases (EC 3.2.1.1, α-1,4-D-glucano glucanohidrolase) correspondem a endoamilases, que atuam ao longo da cadeia de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α-1,4 e liberando maltose e glicose, sendo induzidas pela presença de amido ou

maltose (GUPTA *et al*., 2003). A Figura 7 demonstra um modelo estrutural da enzima α-amilases, identificado por Hwang et al (1997), isolado da cepa de *Bacillus licheniformis.*

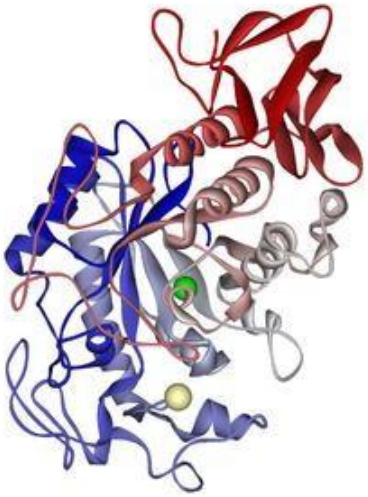

Figura 7: α-Amilase

Fonte: PDB

As α-amilases, também conhecidas como enzimas dextrinizantes, podem ser divididas em duas categorias, de acordo com o grau de hidrólise do substrato: sacarificantes, que hidrolisam 50 a 60% do amido produzindo glucose e maltose, e as liquidificantes, que quebram cerca de 30 a 40% do substrato, produzindo predominantemente, maltoligossacarídeos, sendo responsáveis principalmente pela redução da viscosidade do amido (DECLERCK *et al.*, 2000).

Estudos foram realizados comparando diferentes fontes de carboidratos para a produção da enzima amilase, porém o amido tem se destacado com relação a frutose e a glicose que inibem a produção da α-amilase. A utilização de cepas de Bacillus sp. para a produção da α-amilase tem se destacado por causa dos altos valores da atividade enzimática, podendo chegar a 50 U/mL, dependendo da concentração de amido no meio (CARVALHO et al., 2008).

As α-amilases podem ser utilizadas na indústria de panificação, adicionadas na massa do pão, elas hidrolisam o amido da farinha em pequenas dextrinas. A sua utilização é com o objetivo de intensificar a fermentação e reduzir a viscosidade da massa do pão. Na indústria têxtil, é utilizada para a retirada de gomas de diversos tipos de tecidos e utilizadas também para a limpeza destes tecidos (SOCCOL et al., 2005;

SAHNI e GOEL, 2015).

2.5.1.2 β -Amilase

As β-amilases (EC 3.2.1.2, α-1,4-D-glucano-maltohidrolase) são exoenzimas que hidrolisam a penúltima ligação α-1,4, a partir da extremidade não redutora do polímero de amilose liberando maltose, separando-a em duas unidades de glicose, por inversão, na forma de β-maltose (GUPTA *et al*., 2003). A Figura 8 demonstra o modelo estrutural da β-amilases, identificado por Oyama et al (1990), isolada da cepa de *Bacillus cereus.*

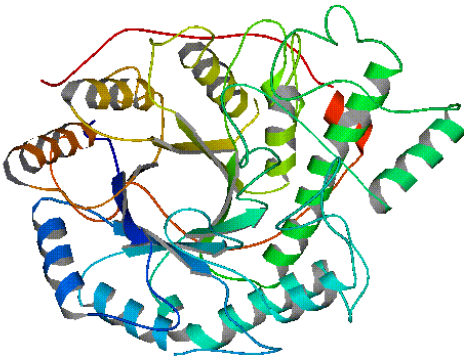

Figura 8: β-amilase

Fonte: PDB

Esse tipo de amilase está presente nos tecidos das plantas onde hidrolisam amido em β-maltose. Além da hidrólise, essa enzima também causa a inversão da configuração anomérica da maltose para o tipo β (CARVALHO *et al.*, 2008).

Embora as amilases tenham sua origem em diferentes fontes como: plantas, animais e microrganismos, as amilases de origem microbiana são muito utilizadas nas indústrias por apresentar características bioquímicas promissoras, alta produtividade e boa estabilidade térmica. Algumas estirpes de origem bacteriana pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Clostridium* se destacam pela sua elevada produção enzimática (RANI *et al;* 2008).

As exoamilases são enzimas utilizadas após a hidrolise do amido pela α-amilase, ainda pouco usada e estudada, a β-amilase apresenta uma baixa atividade enzimática (OLIVEIRA e SILVA; 2017).

2.5.1.3 Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase)

O modelo estrutural da enzima Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase, 1,4-α-D-glucan:1,4-α-D-glucopiranosil transferase, EC 2.4.1.19), pertencente à família α-amilase está demonstrada na Figura 9, identificado por Wind *et al* (1998), produzido pela cepa *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1.

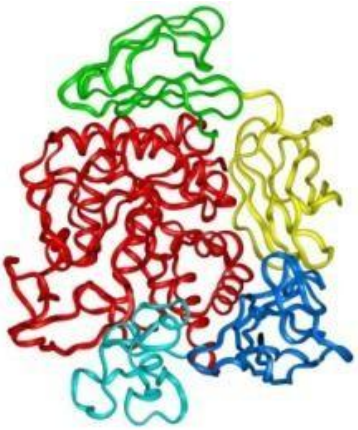

Figura 9: Estrutura da CGTase

Fonte: PDB

A produção de CGTase foi proposta inicialmente por Kitahata e Okada (1974) e Nakamura e Horikoshi (1976), utilizando composto de amido solúvel e caldo de maceração de milho (milhocina), além de extrato de levedura, peptona e sais.

As ciclodextrinas são oligossacarídeos compostos por seis, sete ou oito moléculas de glucose unidas por ligações α-1,4, conhecidas como α, β e γ – ciclodextrina (Figura 10), apresentando uma cavidade apolar e, com isso, moléculas orgânicas apolares ou com extremidades apolares podem ser incorporadas pela CGTase e armazenadas no seu interior, como pode ser observado na Figura 11 (SOUZA *et al*., 2017).

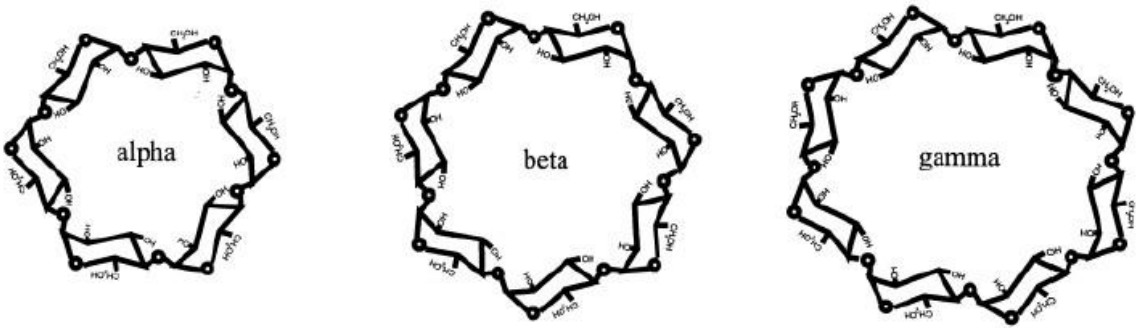

Figura 10: Estrutura da α-CD, β-CD e γ-CD

Fonte: ANDREAUS et al.,2010.

Figura 11: Incorporação pela CGTase.

Fonte: ANDREAUS et al.,2010.

A estrutura molecular da ciclodextrina possui cavidades alternadas com diferentes polaridades, a cavidade da CGTase pode formar complexos de inclusão com outras moléculas que possuem grande importância biotecnológica, o complexo molecular pode oferecer seleção, separação e solubilização de várias biomoléculas (PINHEIRO *et. al*., 2017).

Por apresentar uma cavidade apolar, a CGTase é empregada principalmente nas indústrias farmacêuticas. Contudo, outras indústrias também podem utilizar a CGTase em seus processos, como as indústrias têxtil, cosmética, químicas e alimentos. A incorporação da CGTase na formulação dos fármacos se deve a estabilidade, aumento da solubilidade, redução da toxicidade e aumento da absorção de substâncias bioativas (FERNANDES *et al*., 2007).

Nas indústrias alimentícias, a CGTase se destaca por apresentar a função de estabilizar aromas, atuar contra decomposição oxidativa, eliminar sabores indesejáveis e compostos como o colesterol (ASTRAY *et al*.,2009).

As enzimas CGTase podem ser produzidas por uma grande variedade de bactérias sendo principalmente do gênero *Bacillus*, *Anaerobranca*, *Thermoanaerobacterium* e *Thermococcus* (COSTA *et al*., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Physalis angulata é uma planta da família Solanaceae com grande relevância terapêutica, em função das suas propriedades medicinais. Estudar sua microbiota é de grande importância para conhecer suas bactérias endofíticas e avaliar seu potencial biotecnológico. Assim, o presente projeto objetivou estudar o potencial enzimático das bactérias endofíticas capazes de produzir as enzimas amilases.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial enzimático amilolítico das bactérias endofíticas previamente isoladas da planta *Physalis angulata* em meio seletivo;
- Determinar as condições de cultivo para produção das enzimas amilases e CGTases por fermentação submersa utilizando resíduo agroindustrial amiláceo;;
- Determinar a composição centesimal do resíduo agroindustrial da mandioca;
- Quantificar as atividades enzimáticas de β–CGTase, α–amilase, β–amilase.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Bactérias endofíticas

As bactérias endofíticas isoladas da planta *Physalis angulata*, pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Ecologia e Processos Microbianos (LEPM), Escola de Química, UFRJ, sob coordenação do Professor Doutor Rodrigo Pires Nascimento.

As linhagens das bactérias endofíticas, um total de 23, estavam conservadas em solução glicerol 20% a -20ºC, sendo identificadas por código de letras. De acordo com dados laboratoriais de estudos anteriores, as linhagens foram isoladas de 3 regiões da planta *Physalis angulata*, raiz, caule e folha (Figura 12).

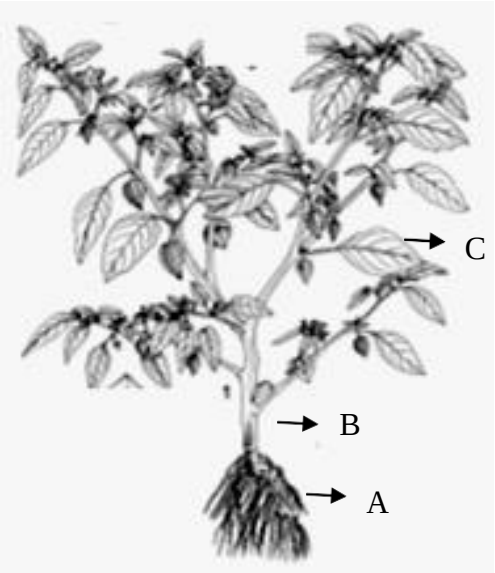

Figura 12: Esquematização da planta *Physalis angulata*
A) Raiz, B) Caule e C) Folha

4.2 Ativação das bactérias

Todas as 23 linhagens de bactérias endofíticas foram reativadas em tubos contendo meio caldo nutriente sobre agitação a 150rpm e após 24 horas a 35ºC, alíquotas foram transferidas para placas de Petri contendo meio Agar Nutriente e incubadas por 48 horas a 35ºC. Todo o procedimento experimental foi realizado em condições assépticas, dentro da câmara de fluxo laminar.

4.3 Seleção das linhagens produtoras de CGTase

A bioprospecção das bactérias endofíticas produtoras de CGTase foi realizada em 2 etapas, conforme descrito abaixo.

4.3.1 Primeira etapa de seleção

A primeira seleção para verificar a capacidade das bactérias endofíticas em produzir a enzima CGTase foi realizada em meio especifico (NAKAMURA e HORIKOSHI; 1976), como descrito na Tabela 3. Após o crescimento das linhagens bacterianas em meio caldo nutriente, uma alíquota foi retirada e transferida sob a forma de "spots" para o meio seletivo para produtores de CGTase e incubadas a 35ºC por 48 horas.

Tabela 3: Meio de crescimento para produção de CGTase

Componente	Quantidade (%)
$MgSO_4$	0,02
K_2HPO_4	0,10
Na_2CO_3	1,00
Polipeptona	0,50
Extrato de levedura	0,50
Amido Solúvel	1,00
Agar	1,50

Fonte: Nakamura, Horikoshi; 1976.

4.3.2 Segunda etapa da seleção

Após verificar quais linhagens bacterianas foram capazes de crescer no meio seletivo da primeira etapa para produção de CGTase, foi realizada a segunda etapa de seleção de bactérias produtoras de CGTase com as linhagens que apresentaram crescimento no meio seletivo. O meio de cultivo utilizado foi o mesmo meio já descrito anteriormente (NAKAMURA e HORIKOSHI; 1976) mudando somente a solução reveladora que é uma solução de Vermelho Congo, corante capaz de formar um complexo com o γ- CDTase (MATIOLI *et al*., 1998), como detalhado na Tabela 3.

As linhagens bacterianas foram inoculadas em placas de Petri, na forma de "spots", e incubadas a 35ºC por 48 horas. Após período de incubação, uma solução de Vermelho Congo (0,5% p/v) foi adicionado ao meio de cultivo, deixando em contato por 10 minutos para que a reação química ocorresse. Após este período de tempo, as placas contendo a solução de Vermelho Congo foram lavadas com solução NaCl 1M até a verificação da formação de zonas de hidrólise circunscrevendo o crescimento bacteriano.

4.4 Detecção da atividade de amilase em placa

A capacidade das linhagens de bactérias endofíticas em degradar o amido também foi verificada, de acordo com Hankin e Anagnostakis (1975). Como meio seletivo foi utilizado Ágar Nutriente suplementado com 0,2% (p/v) de amido solúvel, pH 6,0. Após inoculação, as placas contendo as bactérias foram incubadas a 35ºC por 24 h e então reveladas com solução de iodeto de potássio. A atividade amilolítica foi verificada pela formação de zona de hidrólise (mais clara) circunscrevendo o crescimento bacteriano.

4.5 Detecção de atividade de β-glucosidase em placa

Para a determinação da atividade enzimática de β-glucosidase, as linhagens bacterianas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio sólido, como detalhado na Tabela 4.

Tabela 4: Meio utilizado para a verificação das bactérias produtoras de β-glucosidase

Componente	Quantidade (%)
Triptona	1
Extrato de levedura	0,5
NaCl	1
Agar	1,5
Esculina sesquihidratada	1
Citrato de ferro (III) amoniacal	0,05

Fonte: FACKLAM e MOODY, 1970.

As placas, após inoculação, foram incubadas a 35ºC por 48 horas e a detecção da atividade foi realizada através da observação da formação de uma zona de hidrólise

mais escura ao redor das colônias. O escurecimento ocorre em função da formação de complexos fenólicos ferrosos após a clivagem enzimática da esculina.

4.6 Cálculo do Índice enzimático

As atividades enzimáticas detectadas em Placas de Petri foram expressas através do cálculo do índice enzimático (IE), como observado na Equação 1 (FLORENCIO *et al*., 2012).

Equação 1: $I = Dh/Dc$.

Sendo:

I= índice enzimático

Dh= compreende o diâmetro em milímetros (mm) do halo de hidrólise

Dc= corresponde ao diâmetro (mm) da colônia

4.7 Caracterização das linhagens promissoras

4.7.1 Técnica de microscopia: Coloração de Gram

As linhagens bacterianas que foram capazes de crescer no meio específico para CGTase e apresentaram maior zona de hidrólise na presença da solução Vermelho Congo foram visualizadas microscopicamente através da técnica de coloração de Gram (GRAM, 1884).

4.7.2 Teste de Catalase

O teste da enzima catalase permite separar as bactérias do gênero *Streptococcus* catalase negativa de outras bactérias Gram +, catalase + com formato de cocos, como os *Staphylococcus*. A enzima catalase é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. A liberação do oxigênio pode ser observada pela formação de bolhas (ANVISA, 2016).

O teste da catalase consiste em colocar uma alíquota (1,0 mL) da suspensão da bactéria em uma lâmina de microscopia, sendo posteriormente adicionado 1,0 mL de solução peróxido de hidrogênio a 3,0% (v/v). O resultado é considerado positivo quando se há formação de bolhas após a adição da solução do peróxido de hidrogênio (UK Standards for Microbiology – Catalase Test, 2014).

4.8 Produção de CGTase por Fermentação Submersa

As bactérias mais promissoras foram selecionadas para os estudos de fermentação submersa para avaliar a produção de CGTase. Desta forma, foram avaliados quais seriam os melhores valores de pH e temperatura para o crescimento microbiano e produção da enzima.

4.8.1 Determinação do pH ótimo de crescimento

Inicialmente as bactérias foram inoculadas em frascos Erlenmeyer (50 mL) contendo 10 mL de caldo nutriente, em diferentes valores de pH variando entre 5,0 e 10,0 (calibração do meio de cultivo foi conduzida em potenciômetro fabricado pela MARCONI, modelo MAS22 utilizando soluções de HCl e NaOH). Após esterilização dos frascos (121ºC / 15 min) e subsequente resfriamento, os frascos foram incubados em uma incubadora com agitação orbital (Marca SOLAB, modelo SL-222) sob velocidade de agitação de 150 rpm a 35ºC por 48 horas, sendo o crescimento bacteriano determinado por leituras em espectrofotômetro (Marca QUIMIS, modelo Q767B) utilizando comprimento de onda de 590 nm, nos tempos de 24 e 48 h (ACEBO-GONZÁLEZ e HERNANDEZ- GARCIA, 2013). O experimento foi conduzido em duplicata.

4.8.2 Determinação da temperatura ótima de crescimento

As linhagens bacterianas consideradas promissoras foram selecionadas para verificação da produção de CGTase por fermentação submersa. Após determinação do melhor valor de pH de crescimento para as linhagens bacterianas, as bactérias foram inoculadas em frascos Erlenmeyer (50 mL) contendo 10 mL de caldo nutriente. Cada linhagem foi inoculada no seu pH ótimo. Os frascos inoculados foram incubados a 150 rpm em 3 temperaturas diferentes (20º, 30º e 35ºC) em 5 tempos diferentes (6,12, 24, 36 e 48 horas). A cada um desses tempos, alíquotas foram coletadas e medidas espectrofotometricamente a 590 nm (ACEBO-GONZÁLEZ e HERNANDEZ-GARCIA, 2013).

4.8.3 Análise estatística

Com base nos valores obtidos após avaliação do crescimento nos diferentes valores de pH e temperatura, foram realizados o teste de Tukey a nível de significância a 95% (p = 0,05), utilizando o programa Statistica 7.0 ®.

4.8.4 Padronização do inóculo

Antes de iniciar a fermentação submersa com as linhagens bacterianas promissoras, foi realizada a padronização do inóculo. As bactérias foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio líquido específico para produção de CGTase (Tabela 3), e incubadas a 35ºC por 48 horas sob agitação orbital de 150 rpm. Os frascos foram inoculados em duplicatas e após esse período, foi realizado diluição seriada para quantificar o número de células viáveis, sendo o resultado expresso em UFC/mL (Equação 2).

Equação 2: $C = M_{placa} \times Di$ (UFC/mL)

Sendo:

C= concentração do inóculo

M_{placa} = Média aritmética da contagem

Di = diluição da contagem

4.8.5 Fermentação submersa

A produção das enzimas amiláceas (α-amilase, β-amilase e β-CGTase) foi realizada utilizando um meio líquido para a produção de CGTase (Tabela 3). As suspensões padronizadas (1,2 $x10^7$ UFC/mL) das bactérias promissoras foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio. Cada linhagem foi incubada em dois Erlenmeyers, sendo que o primeiro contendo o meio líquido conforme descrito na Tabela 3 suplementado com amido (meio Am) e o segundo contendo o mesmo meio, suplementado com crueira (meio Cr). Em ambos os frascos, os valores ótimos de pH foram 6,0 e 7,0, respectivamente. Os sistemas foram incubados a 35ºC sob agitação orbital com velocidade de agitação de 150 rpm, sendo retiradas alíquotas de 2 mL nos tempos de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 e 48 horas. As alíquotas retiradas em cada tempo foram colocadas em frascos eppendorfs, centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram congelados a -20ºC para análises posteriores.

4.9 Ensaios Analíticos

4.9.1 Determinação da concentração da proteína total solúvel

A concentração de proteínas totais solúveis presentes no extrato enzimático bruto foi determinada pelo método Hartree-Lowry (HARTREE, 1972), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão. Na Tabela 5 são indicados os reagentes utilizados para esta análise. A mistura reacional foi preparada a partir da adição de 0,45 mL do reagente A a 0,5 mL do extrato enzimático. A mistura reacional foi então incubada a 50°C, por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e foi adicionado 50 µL do reagente B, seguido de incubação por 10 min a 25ºC. Após esse período, foi acrescentado à mistura reacional 1,5 mL do reagente C, seguido de incubação a 50°C por 10 minutos. O branco da reação foi realizado de acordo com o mesmo procedimento descrito acima, substituindo o extrato enzimático por água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 650 nm.

Tabela 5: Reagentes utilizados no método Hartree-Lowry.

REAGENTE A	REAGENTE B	REAGENTE C
0,4g de $KNaC_4O_64H_2O$ (7mM)	0,4g de $KNaC_4O_64H_2O$ (7mM)	1 volume de Folin Ciocalteau para 15 volumes de água.
20g de Na_2CO_3 (0,81M), 100mL de NaOH (0,5N), completar para 200mL com H_2O	0,2g de $CuSO_4.5H_2O$ (0,04M), 2mL de NaOH (0,5N), acrescentar 18mL com H_2O	-
Estocagem: 2 a 3 meses em temperatura refrigerada.	Estocagem: 2 a 3 meses em temperatura refrigerada.	Estocagem: Preparar diariamente 16,0 mL ou múltiplos deste, não estocar.

A curva padrão utilizada para determinar a concentração protéica foi construída utilizando BSA (mg/mL), seguindo o mesmo procedimento, substituindo o extrato enzimático pela solução com BSA em diferentes concentrações, resultando na Equação 3.

Equação 3: $y = 0,0001x + 0,0049$

Sendo:

y= absorbância da reação

x= Concentração protéica (mg/mL)

4.9.2 Determinação da Atividade de Amilase

4.9.2.1 Atividade de α-amilase

Para a determinação da atividade de α-amilase a análise foi feita em triplicata, onde foram pipetados 0,5 ml de amostra (água para o controle e extrato enzimático para a reação) em um tubo contendo 0,5 ml de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,9 suplementado com 1,0% (p/v) amido e 0,006 M de cloreto de sódio. A mistura reacional foi incubada por 3 min a 25ºC, e após esse período, foi adicionado 1,0 mL de Solução ácido 3,5-Dinitrossalicílico 1% (p/v), reativo de cor, e, novamente, ela foi incubada durante 5 minutos, em banho-maria a 100ºC (BERNFELD, 1955).

Após este procedimento, a mistura reacional foi resfriada à temperatura ambiente, e então, adicionado 10,0 mL de água deionizada, seguido de leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A quantidade de micromoles de maltose liberada por minuto de reação foi obtida por meio da Equação 4 (curva padrão) enquanto a atividade enzimática determinada pela Equação 5.

Equação 4: $y = 4,1084x + 0,0799$

Sendo:

y= absorbância da reação

x= Concentração de α-amilase (µmol/mL)

Equação 5: $AE = (Abs \times Dil - 0,0799) / 4,1084$

AE= Atividade enzimática

Abs= Absorbância a 540nm

Dil= Diluição

4.9.2.2 Atividade de β-amilase

Para a determinação da atividade de β-amilase a análise foi feita em triplicata, onde foram pipetados 0,5 ml de amostra (água para o controle e extrato enzimático para a reação) em um tubo contendo 0,5 ml de tampão acetato de sódio 0,016 M, pH 4,8, suplementado com 1,0% (p/v) amido e 0,006 M de cloreto de sódio. A mistura reacional foi incubada por 3 min a 25°C, e após esse período, foi adicionado 1,0 mL de Solução ácido 3,5- Dinitrossalicílico 1% (p/v), reativo de cor, e, novamente, ela foi incubada durante 5 minutos, em banho-maria a 100ºC (BERNFELD, 1955).

Após este procedimento, a mistura reacional foi resfriada à temperatura ambiente, e então, adicionado 10,0 mL de água deionizada, seguido de leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A quantidade de micromoles de maltose liberada por minuto de reação foi obtida por meio da Equação 6 (curva padrão) enquanto a atividade enzimática determinada pela Equação 7.

Equação 6: $y = 6{,}9825x + 0{,}0754$

Sendo:

y= absorbância da reação

x= Concentração de α-amilase (µmol/mL)

Equação 7: $AE = 6{,}9825x + 0{,}0754$

AE= Atividade enzimática

Abs= Absorbância a 540nm

Dil= Diluição

4.9.2.3 Atividade de β-CGTase

Para a determinação da atividade de β-CGTase, uma curva analítica foi construída conforme descrito a seguir. Foram preparados uma solução alcoólica (95%) estoque de 3 mmol/L PHE (Fenolftaleína) e uma solução tampão de carbonato de sódio 0,6 mol/L. No momento da dosagem da atividade enzimática, foi preparada uma solução reacional PHE, misturando-se 2,0 mL da solução estoque PHE em 20,0 mL de solução tampão

carbonato de sódio 0,6 mol/L, perfazendo o volume final de 100 mL com água destilada.

A solução de 1 mmol/L ciclodextrina (β-CD) foi preparada dissolvendo-se 0,1135 g de β-CD e completando-se o volume final para 100 mL, contendo 70% de água destilada, 20% de solução tampão Tris-HCl 50 mmol/L e 10% de solução de $CaCl_2$ 50 mmol/L.

Para se preparar a curva padrão foram utilizados 21 tubos de ensaio com concentrações conhecidas de β-CD, na faixa de 0 a 1 mmol/L. A diluição foi feita com água tamponada. A dosagem de β-CD foi realizada misturando-se 0,5 mL da amostra que continha a β-CD numa concentração conhecida, com 2,5 mL da solução trabalho de PHE. A leitura foi efetuada utilizando espectrofotômetro o branco correspondia à solução do primeiro tubo, que continha uma concentração nula de β-CD.

Considerando que a relação entre a absorbância e a concentração de β-CD somente permanece linear para concentrações até 0,4 mmol/L, foi necessário a adoção da teoria da complexação, a qual fornece a relação não-linear entre a absorbância e a concentração de β-CD. Nesta teoria, assume-se a formação de um complexo com apenas uma molécula de PHE e uma molécula hospedeira (β-CD), e considera a formação do complexo como uma reação reversível que está em equilíbrio na solução de dosagem, chegando à definição de uma constante de equilíbrio termodinâmico (K β-CD). Esta constante foi determinada por regressão não-linear da Equação 9, utilizando o método de Quasi-Newton do programa Statistica®, para a série de dados obtida na curva padrão Anexo1, a análise foi feita em triplicata.

Portanto, os resultados de absorbância em função da concentração de β-CD, ajustados pela teoria da complexação, foram calculados de acordo com a Equação 8. Também foram calculados os limites de quantificação e detecção.

Equação 8: $$C = a\left(1 - \frac{Abs\ 550}{Abs0/550}\right)\left(1 + \frac{Abs0/\ 550}{K\ a\ Abs550}\right)$$

Sendo:

C: concentração de β-CD (mmol/L),

a: concentração total de PHE na cubeta do ensaio,

Abs550 e Abs0/550: são as absorbâncias em 550 nm das amostras e do branco, respectivamente.

4.10 Matéria-prima da fermentação

As amostras de crueira, resíduo industrial muito comum obtido através do processamento da mandioca, foram obtidos no município de Moju, na vila quilombola de Jambuaçu, como pode ser observado na Figura 13. O transporte foi feito em uma caixa térmica contendo gelo para evitar a degradação enzimática devido a alta atividade de água.

Figura 13: Localização da plantação de mandioca e localização da UFPA.

Fonte: Google Earth.

4.10.1 Composição Centesimal

4.10.1.1 Teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado pelo sistema de secagem direta em que consiste na pesagem de 3,0 gramas de amostra de crueira, seguido de incubação a 105°C em estufa de secagem (SOLAB, modelo: SL-100) com circulação de ar forçado. A amostra foi mantida a essa temperatura até atingir constância no peso, sendo em seguida resfriada em ambiente ausente de umidade (dessecador) até aproximadamente 25ºC (AOAC, 2012). A equação 9 foi a utilizada para determinar a porcentagem de umidade, a análise foi feita em triplicata.

Equação 9: $U\% = \frac{100X\,m}{p}$

Sendo:

U= Umidade

m= peso em gramas de água evaporada após secagem

p= peso em gramas da amostra

O resíduo seco foi triturado em agitador de facas até atingir o aspecto de farinha como pode ser observado na Figura 14.

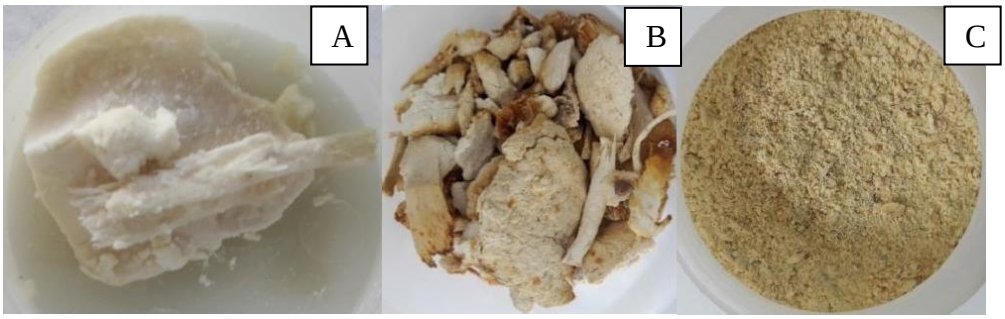

Figura 14: Resíduo da mandioca (A) Crueira *in natura*, (B) Crueira seca e (C) Farinha de crueira.

Fonte: Fotografia do autor.

4.10.1.2 Teor de lípideos

O teor de lipídeos foi determinado pelo sistema de extração em Soxhlet, que consiste em uma extração direta, onde se tem 3,0 gramas de amostra seca e envolvida em papel de filtro em um aparelho extrator, acrescido de éter de petróleo (marca: NOX) e mantido sob aquecimento em um refluxo continuo por 4 horas, com posterior evaporação do solvente em estufa a 105°C (AOAC, 2012). A Equação 10 foi utilizada para determinar a porcentagem de lipídeos na amostra, a análise foi feita em triplicata.

Equação 10: $L\% = \frac{100Xn}{p}$

Sendo:

L= Lipídeos

n= peso em gramas de lipídeos

p= peso em gramas de amostra

4.10.1.3 Teor de cinzas

As amostras secas foram incineradas até não haver mais a liberação de fumaça, e posteriormente, calcinadas em mufla (Lucadema) a 550ºC até atingir a constância no peso (AOAC, 2012). A Equação 11 foi a utilizada para a determinação de cinzas, a análise foi feita em triplicata.

Equação 11: $C\% = \frac{100Xn}{\mathrm{p}}$

Sendo:

C= Cinzas

n= peso em gramas de cinzas

p= peso em gramas de amostra

4.10.2 Teor de proteína bruta

O valor de Proteína foi determinado pela técnica do destilador Kjeldahl e bloco digestor (VELP SCIENTIFICA, modelo: UDK 159), baseado em hidrólise e posterior destilação da amostra, avaliando-se a porcentagem de nitrogênio na amostra. Foi utilizado o fator 6,25N para conversão para proteínas (AOAC, 2012), a análise foi feita em triplicata.

4.10.3 Teor bruto de fibras totais

O teor bruto de fibras foi determinado por meio de digestão do material em solução de H_2SO_4 a 1,25% p/v por 30 minutos, seguida de digestão com solução de NaOH 1,25% p/v por mais 30 minutos no determinador de fibras (SOLAB, modelo: SL-1118). Posteriormente, o material foi lavado com Etanol por 3 minutos e uma nova lavagem com Acetona por 3 minutos. Após as lavagens, as amostras foram secas em estufas e posteriormente incineradas em mufla a 550ºC (AOAC, 2012). A Equação 12 foi utilizada para determinar o teor de fibras, a análise foi feita em triplicata.

Equação 12: $Fibra\ bruta\% = \frac{(\mathrm{C}-\mathrm{A})-\mathrm{D}}{B} x100$

Sendo:

A= massa do saquinho vazio

B= massa da amostra

C= massa do conjunto cadinho-saquinho-extrato

D= massa do conjunto cadinho-cinzas

4.10.4 Teor de amido

O teor de amido foi determinado pelo método titulométrico de Lane-Eynon, no qual se baseia na redução de volume conhecido do reagente de cobre alcalino (Fehling) a óxido cuproso. Os valores foram expressos em base seca (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.10.5 Atividade de água (Aw)

A determinação da atividade de água tanto para o resíduo da crueira quanto para a farinha da crueira foram determinadas pelo equipamento AquaLab (serie: 3TE) pelo método da AOAC (2012).

4.10.6 Determinação do pH

A determinação do pH foi determinado por potenciometria, a análise foi feita em triplicata, onde foi feita inicialmente uma diluição de 10 vezes e posteriormente homogeneizado e verificado no pHmetro.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleções das linhagens produtoras de CGTASE

As linhagens de bactérias endofíticas isoladas de *Physalis angulata* se encontravam conservadas na coleção de culturas do LEPM. As bactérias foram isoladas de diferentes partes da planta (raiz, caule e folha), de acordo com dados experimentais anteriores (publicado no trabalho com o titulo de Colonização inicial de bactérias endofíticas em *Physalis angulata* L.), totalizando 23 linhagens. Essas linhagens foram testadas quanto à produção de celulases, xilanases e peptidases, apresentando resultados promissores. Até então, essas linhagens ainda não haviam sido testadas quanto a produção de amilases, sendo então avaliado no presente trabalho.

Foi realizada uma bioprospecção indireta com as 23 linhagens de bactérias isoladas de *Physalis angulata* para verificar a capacidade em produzir as enzimas Amilases e β-CGTase. Após 48 h de incubação em meio seletivo para produção de CGTase, apenas 14 linhagens apresentaram crescimento em placa (Figura 15).

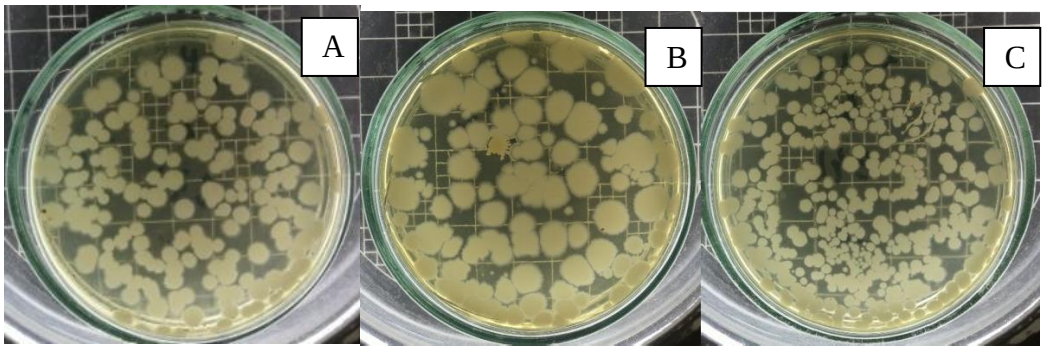

Figura 15: Crescimento em placa das bactérias no tempo de 24 horas: A- Linhagem L, B- Linhagem C e C- Linhagem Q.

Das 14 linhagens que cresceram em meio específico para CGTase (NAKAMURA e HORIKOSHI, 1976) apenas 7 foram capazes de formar zona de hidrólise após revelação com solução Vermelho Congo (Figura 16, Tabela 6). Sabe-se que a formação de zonas de hidrólise se dá em função do complexo com o γ- CDTase (MATIOLI *et al*., 1998). Contudo, das 7 linhagens bacterianas positivas, apenas 3 apresentaram valores de índice enzimático significativos. Segundo Hankin (1975), quanto maior for o índice enzimático (IE), maior é a atividade no meio. Um dos melhores resultados pode ser observado na Figura 16.

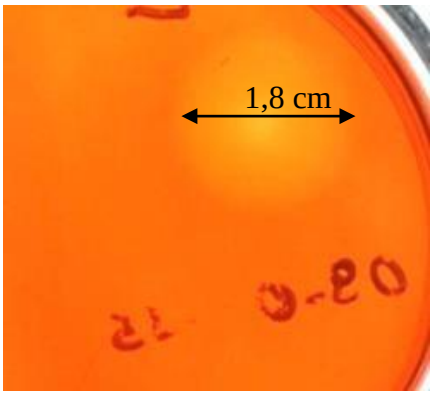

Figura 16: Formação do halo em meio específico para γ-CGTase, após revelação com solução vermelho Congo, para a bactéria C.

Tabela 6: Índice Enzimático para CGTase (γ-CD)

Bactéria	**Índice Enzimática**
B	1,83 ± 0,25
BB	1,13 ± 0,17
C	3,40 ± 0,49
DD	0,86 ± 0,09
EE	1,40 ± 0,09
L	4,60 ± 0,31
Q	2,67 ± 0,44

± Desvio Padrão (DP)

Segundo a escala de Silva (2015), as linhagens foram classificadas como fraco positivo (1,0 ≤ IE < 1,5), médio positivo (1,5 ≤ IE < 2,0), forte positivo (IE ≥ 2) e não produtoras (IE = 0) da enzima estudada. Tomando por base essa classificação (Silva, 2015), somente as linhagens C, L e Q foram classificadas como fortemente produtoras da enzima CGTase (γ-CD), com destaque especial para a linhagem bacteriana L, que apresentou um IE de 4,60 ± 0,31. Das 3 linhagens com maior IE, 2 foram isoladas da raiz (linhagens C e Q) e 1 do caule (linhagem L), previamente identificadas como Bacillus no trabalho anterior (Colonização inicial de bactérias endofíticas em *Physalis angulata* L.).

5.2 Determinação das atividades amilolíticas e β-glucosidase em placa

As três linhagens bacterianas selecionadas apresentaram valores IE diferenciados paras as atividades em placas, tanto para a enzima β-glucosidase como para a atividade amilolítica. Como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7: Índice enzimático das atividades de β-glucosidase e Amilase

Amostra	β-glicosidase	Amilolítica
C	1,46 ± 0,04	0,69 ± 0,01
L	1,25 ± 0,11	1,15 ± 0,03
Q	0,67 ± 0,02	0,40 ± 0,01

± D.P.

As três linhagens estudadas apresentaram um perfil de produção considerado fraco, de acordo com a classificação de Silva (2015). A linhagem bacteriana L apresentou um valor máximo IE de 1,15 ± 0,03 para atividade de amilase e a linhagem bacteriana C com um valor máximo IE de 1,46 ± 0,04 para atividade de β-glucosidase (Figura 17), porem nem todas as linhagens produtoras de β-glucosidase são produtoras de CGTase.

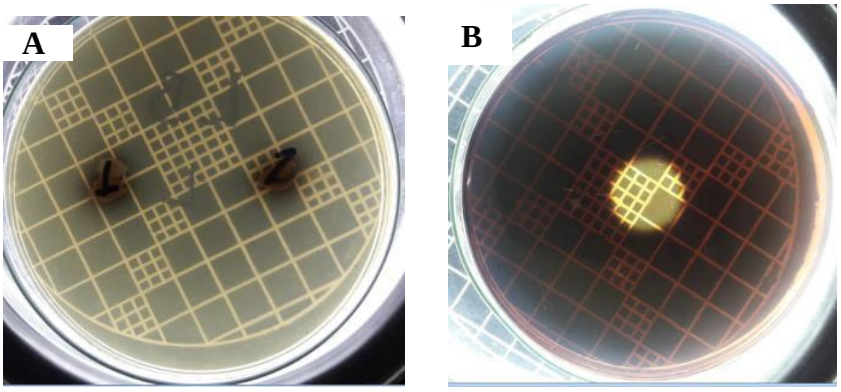

Figura 17: Atividade enzimática detectada em placa de Petri, ambas para a linhagem bacteriana L: (A) β-glucosidase e (B) Amilase.

5.3 Caracterização das linhagens promissoras

As linhagens mais promissoras foram submetidas a teste de microscopia (coloração de Gram) e ao teste da catalase, como observado na Tabela 8 e nas Figuras 18 e 19.

Tabela 8: Características da Coloração de Gram e Produção de Catalase

Bactérias	Gram	Catalase	Morfologia
C	+	+	Cocos
L	+	+	Cocos
Q	+	+	Cocos

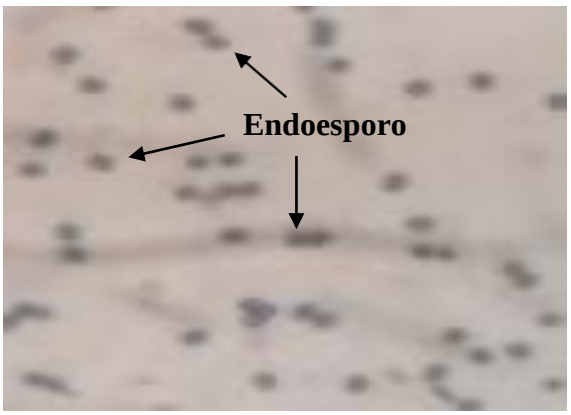

Figura 18: Micrografia da linhagem bacteriana C com visualização de endoesporo.

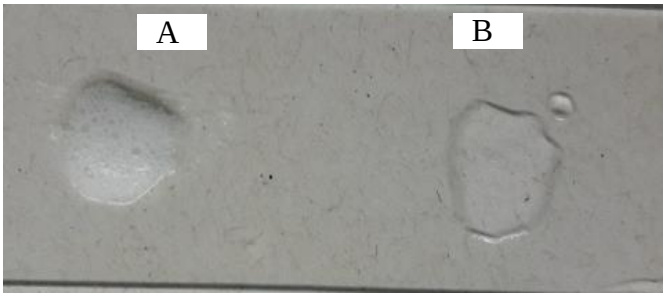

Figura 19: Exemplo do teste de catalase. A) catalase positiva e B) catalase negativa.

Todas as três linhagens apresentaram coloração compatível com Gram +, catalase + e formação de endósporos, indicando sugestivamente serem bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*. A produção de endósporos acontece quando essas bactérias se encontram em ambiente desfavorável ao crescimento e desenvolvimento celular. A visualização dessa estrutura foi observada ao fim de 24 horas de incubação a 35ºC, indicando que se teve o consumo total do nutriente. A identificação presuntiva das 3 linhagens como pertencentes ao gênero *Bacillus* corrobora com dados na literatura que indicam que esse gênero é considerado um dos melhores produtores para β-CGTase (COSTA e BOCCHI 2012).

De acordo com Levinson (2016), bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas são capazes de produzir enzimas oxidativas capazes de catalisar reações de quebra do radical livre O_2 (superóxido), como a enzima superóxido dismutase e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como a enzima catalase. Assim, das 3 linhagens testadas, apenas a linhagem C foi capaz de produzir catalase e reagir com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

5.4 Determinação do pH ótimo de crescimento

As 3 linhagens promissoras foram testadas quanto ao efeito do pH e temperatura no crescimento. Foram testados 6 valores de pH e 3 de temperatura, como podem ser observados nas Tabelas 9 (pH) e 10 (temperatura). Foi possível observar que a bactéria C apresentou um ótimo de crescimento em pH 6,0 a 35ºC com valore de densidade ótica (DO) 1,683±0,039, ao fim de 48 horas de incubação. Já as bactérias L com o valor de DO 1,605±0,006 em pH 6,0 a 35ºC e a bactéria Q com o valor de DO 1,604±0,097 em pH 7,0 a 30ºC, respectivamente, ao fim de 48h de incubação.

Tabela 9: Relação do crescimento das linhagens promissoras crescidas em diferentes valores de pH

Bactéria C						
Tempo (h)	**pH 4,0**	**pH 6,0**	**pH 7,0**	**pH 8,0**	**pH 9,0**	**pH 10,0**
24	0,010±0,005^{aA}	1,417±0,006^{bB}	1,102±0,041^{cC}	1,035±0,008^{dD}	0,904±0,003^{eE}	0,219±0,002^{fF}
48	0,014±0,002^{aA}	1,683±0,039^{bG}	1,562±0,017^{cH}	1,302±0,009^{dI}	1,164±0,003^{eJ}	0,295±0,011^{fK}
Bactéria L						
Tempo (h)	**pH 4,0**	**pH 6,0**	**pH 7,0**	**pH 8,0**	**pH 9,0**	**pH 10,0**
24	0,192±0,004^{aA}	1,004±0,005^{bB}	1,152±0,002^{cC}	1,316±0,009^{dD}	1,338±0,003^{eE}	0,486±0,002^{fF}
48	0,199±0,01^{aA}	1,605±0,006^{bG}	1,477±0,011^{cH}	1,471±0,049^{cI}	1,505±0,002^{cL}	0,194±0,023^{dK}
Bactéria Q						
Tempo (h)	**pH 4,0**	**pH 6,0**	**pH 7,0**	**pH 8,0**	**pH 9,0**	**pH 10,0**
24	0,020±0,004^{eA}	0,875±0,007^{aB}	1,261±0,009^{cD}	0,894±0,004^{abF}	0,912±0,005^{bH}	0,258±0,016^{dJ}
48	0,017±0,001^{aA}	1,478±0,004^{cC}	1,604±0,097^{cE}	1,496±0,049^{cG}	1,212±0,020^{bI}	1,109±0,041^{bL}

± D.P.

** Letra minúscula na mesma linha não teve diferença significativa*

***Letra maiúscula na mesma coluna não teve diferença significativa*

**** Valores expressos em absorbância*

Tabela 10: Relação do crescimento das linhagens promissoras crescidas em diferentes temperaturas

Tempo (h)	**Linhagem C**			**Linhagem Q**			**Linhagem L**		
	20ºC	***30 ºC***	***35 ºC***	***20 ºC***	***30 ºC***	***35 ºC***	***20 ºC***	***30 ºC***	***35 ºC***
6	0,119±0,008^{aA}	0,022±0,008^{aB}	0,254±0,03^{aC}	0,091±0,002^{aA}	0,019±0,005^{aB}	0,369±0,026^{aC}	0,128±0,001^{aA}	0,026±0,008^{aB}	0,640±0,001^{aC}
12	0,148±0,01^{bA}	0,049±0,003^{aB}	0,305±0,002^{abC}	0,138±0,006^{bA}	0,044±0,001^{bB}	0,381±0,056^{aC}	0,147±0,001^{bA}	0,079±0,01^{bB}	0,641±0,006^{bC}
24	0,154±0,003^{bA}	0,303±0,016^{bB}	0,335±0,023^{abB}	0,177±0,01^{cA}	0,655±0,003^{cB}	0,404±0,012^{aC}	0,165±0,005^{cA}	0,292±0,004^{cB}	0,869±0,01^{cC}
36	0,170±0,001^{bcA}	0,302±0,006^{bB}	0,336±0,021^{abB}	0,221±0,003^{dA}	0,681±0,003^{dB}	0,509±0,014^{bC}	0,237±0,003^{dA}	0,308±0,001^{cA}	0,886±0,01^{cB}
48	0,178±0,005^{cA}	0,307±0,002^{bB}	0,370±0,022^{bC}	0,229±0,001^{dA}	0,931±0,005^{eB}	0,760±0,02^{cC}	0,239±0,001^{dA}	0,312±0,009^{cB}	0,899±0,023^{cC}

± D.P.

** Letra minúscula na mesma coluna não teve diferença significativa*

***Letra maiúscula na mesma linha não teve diferença significativa*

**** Valores expressos em absorbância*

O presente estudo, esse valor foi inferior ao observado pelas linhagens Q, L e C que apresentaram uma DO de 1,604 ± 0,097 em pH 7,0, 1,605 ± 0,006 em pH 6,0 e 1,562 ± 0,017 em pH 6,0 ao fim de 48 horas de fermentação, respectivamente (Tabela 11).

Com relação a temperatura ótima de crescimento das bactérias endofíticas, foram observados valores máximos de DO de 0,370 ± 0,022 para a bactéria C, 0,760 ± 0,02 para a bactéria L quando se utilizou a temperatura de 35ºC e 0,931 ± 0,005 para a bactéria Q, na temperatura de 30ºC, ao fim de 48h. A bactéria Q ainda apresentou valor de DO de 0,886 ± 0,023 a 35ºC por 48 horas. Assim, visando otimizar e uniformizar o processo fermentativo, a temperatura de 35ºC foi escolhida como temperatura de fermentação.

Segundo Carvalho (2007), a linhagem *Bacillus* sp. SMIA-2 apresentou uma temperatura ideal de 50ºC no tempo de 24 horas, com uma DO 2,042±0013, sendo esse valor superior ao encontrado no presente estudo. Porém, segundo o autor, a produção de amilases ocorreu em uma larga faixa de temperatura indo de 30 a 80ºC. Para Haq *et al*. (2010), a melhor atividade de α-amilase para a linhagem mutante de *Bacillus amyloliquefaciens* EMS-6 foi a 37ºC após 48 horas.

De acordo com Punia *et al*. (2016), a linhagem *Bacillus subtilis* apresentou as condições ótimas de produção das enzimas amilases em pH 8, a 37ºC ao fim de 48 horas com um valor de DO de 0,55. Os parâmetros para a produção enzimática no estudo foram fixados para as linhagem de *Bacillus sp.*, identificadas como C, L e Q, a temperatura de 35ºC, no tempo de 48 horas com o pH 6 para a linhagem C, L e pH 7 para a linhagem Q.

5.5 Atividade enzimática

As atividades de α-amilase dos extratos enzimáticos obtidos a partir da fermentação das 3 linhagens promissoras de bactérias endofiticas na presença de 2

substratos como fontes de carbono (amido comercial e crueira) estão representadas na Figura 20.

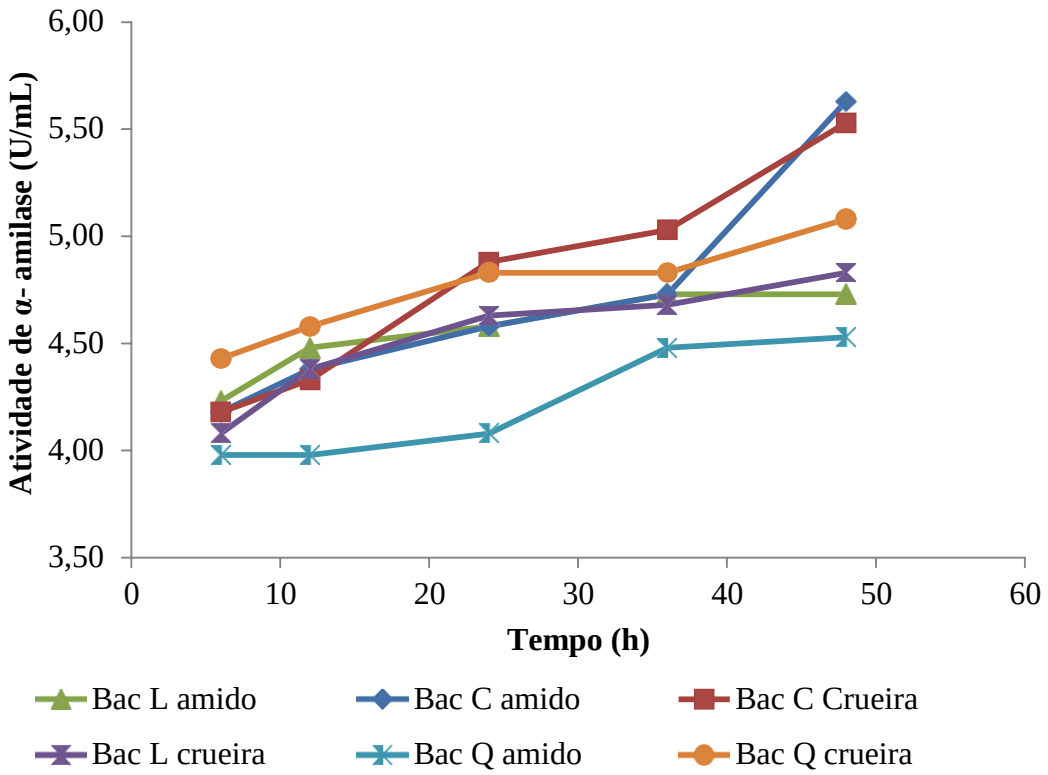

Figura 20: Dosagem da atividade enzimática de α-amilase nos extratos obtidos da fermentação submersa.

A bactéria C (*Bacillus* sp.) ao fim de 48 horas, apresentou uma atividade enzimática α-amilase máxima de 5,63 ± 0,004 U/mL (amido comercial) e 5,53 ± 0,01 U/mL (crueira). Já a bactéria L (*Bacillus* sp.), no mesmo tempo de fermentação, apresentou valores máximos de atividade enzimática de 4,73 ± 0,001 U/mL (amido comercial) o mesmo valor encontrado no tempo de 36 horas (permanecendo constante a atividade) e 4,83 ±0,01 U/mL (crueira), enquanto que a bactéria Q (*Bacillus* sp.) apresentou atividade enzimática de 4,53 ± 0,002 U/mL (amido comercial) e 5,08 ± 0,001 U/mL (crueira), os resultados podem ser melhor observados no Anexo 2. Os valores encontrados no presente trabalho foram inferiores aos observados na literatura.

De acordo com Carvalho (2007), ao fim de 48 horas de fermentação em meio contendo amido solúvel, a linhagem *Bacillus sp*. SMIA-2, isolada de amostra de solo do município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, obteve valores máximos de

atividade enzimática de α-amilase 19,069 ± 1,398 U/mL. Deb (2013), conseguiu valores de atividade de α-amilase de 27,43 ± 0,08 U/mL ao fim de 48 horas quando utilizou a linhagem *Bacillus amyloliquefaciens* P-001, em meio contendo amido solúvel.

Segundo Junior *et al*.(2012), as bactérias isoladas do rizobio de *Cajanus cajan (L.)*, utilizando como fonte de carboidrato o extrato de fermento- manitol, obteve uma atividade amilolitica de 3,70 U/mL para o isolado 47,3b, o único que apresentou melhor resultado em comparação com as 27 cepas isoladas.

De acordo com Teixeira *et al*. (2017), a atividade amilolitica de 0,7 U/mL para a bactéria isolada da mandioca identificada como MANI A, no tempo de 7 dias a 28ºC e usando a manipueira como fonte de amido foi encontrada. Os valores encontrados por Teixeira *et al*. (2017), foram inferiores quando comparados aos resultados encontrados no presente estudo pelas bactérias isolado da *Physalis angulata*.

De acordo com os resultados obtidos, é possível observar que o resíduo crueira pode ser considerado uma fonte amilácea para produção da enzima α-amilase. As linhagens Q e a L ao final de 48 horas apresentaram os maiores valores para atividade de α-amilase.

Vale a pena ressaltar que, em termos comparativos com dados da literatura, mesmo os valores do presente trabalho sendo 4 a 6 vezes inferior ao que se conhece, as comparações não refletem muito a realidade, visto que estudos de otimização da produção, variando as concentrações de fonte carbono e alternar fontes de nitrogênio podem levar a aumentos significativas da produção da atividade de α-amilase.

As atividades de β-amilase dos extratos enzimáticos obtidos a partir da fermentação das 3 linhagens promissoras de bactérias endofiticas na presença de 2 substratos como fontes de carbono (amido comercial e crueira) estão representadas na Figura 21.

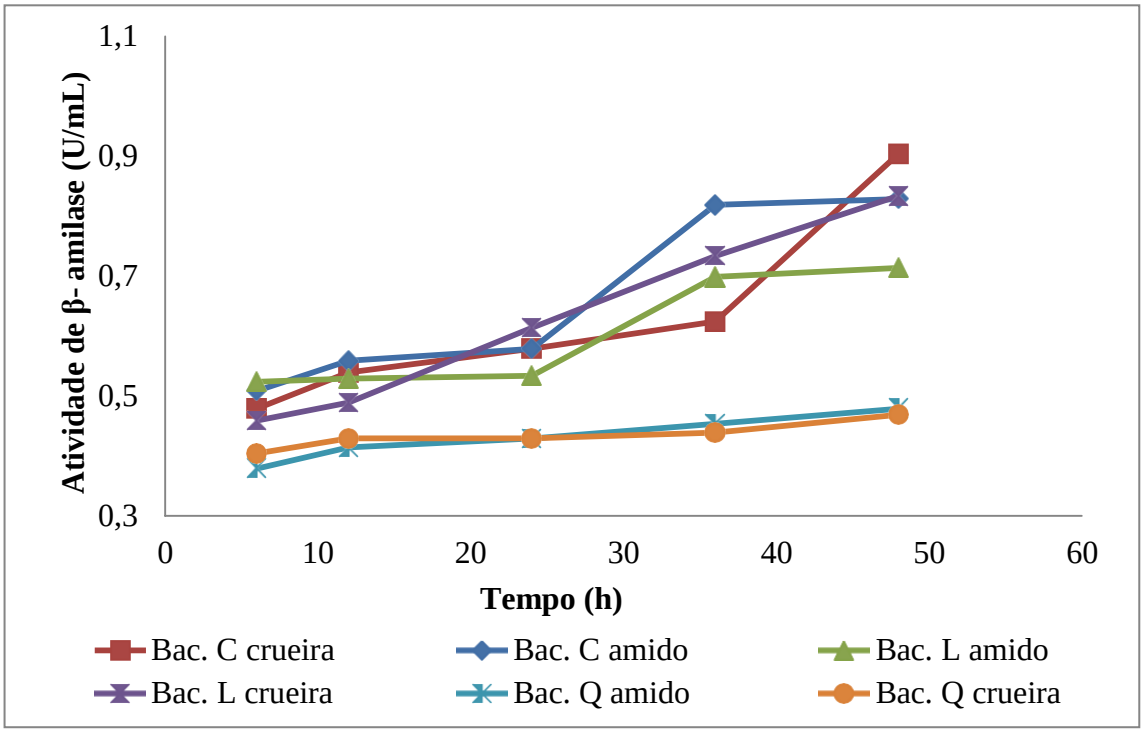

Figura 21: Dosagem da atividade enzimática de β-amilase nos extratos obtidos da fermentação submersa.

Os valores de atividade de β-amilase foram relativamente baixos, sendo a atividade máxima (0,904 ± 0,01U/mL) observada pela linhagem C, ao fim de 48 horas, na presença do resíduo crueira. Outra linhagem, a linhagem L também apresentou valores de atividade enzimática (0,834 ± 0,01U/mL) próximos do valor máximo. A linhagem Q apresentou valores similares tanto na presença de amido comercial como na presença de crueira, 0,429 ± 0,01 e 0,479 ± 0,01 U/mL, respectivamente. Melhor observado no Anexo 3.

De acordo com Cunha *et al*. (2016), a produção de β-amilase pela *Pinicillium spp*. LEMIA8221, obteve o valor de 0,13±0,05 U/mL em pH 5, temperatura de 30ºC por 48 horas utilizando como fonte de carboidrato o resíduo da colheita de soja, porém o valor é muito baixo quando comparado com outras cepas de *Pinicillium spp*., devido o resíduo conter um elevado conteúdo lignocelulósico, sendo a atividade enzimática encontrado muito inferior ao encontrado neste trabalho usando a crueira e o amido comercial como fonte de carbono. Para Olufunke e Azeez (2012), a produção de β-amilase foi de 0,479 U/mL utilizando cepa de *Bacillus subtilis* a 35ºC por 48 horas e a noz de cola (*Cola nítida Ventenat*) como fonte de carbono, apresentando um valor elevado

quando comparado com as cepas usadas no estudo.

Os valores encontrados no presente estudo para a atividade de β-amilase nas 3 cepas isoladas da *Physalis angulata*, foram inferiores quando comparados com a literatura, porém as linhagens das bactérias C e L, quando hidrolisam a crueira, apresentaram ótimos resultados em relação ao amido comercial, com isso a crueira pode ser considerada como ótimo substrato para a produção de enzimas β-amilases. Cepas isoladas de plantações que possuem em sua composição altas concentrações de amido apresentam valores elevados de atividade para as enzimas α e β-amilase, porém as cepas do estudo foram isoladas de uma planta que não é considerada fonte de amido, mas mesmo assim, obtiveram resultados para a produção das enzimas α e β-amilase.

A atividade enzimática de β-CGTase das 3 linhagens bacterianas está apresentada na Figura 22.

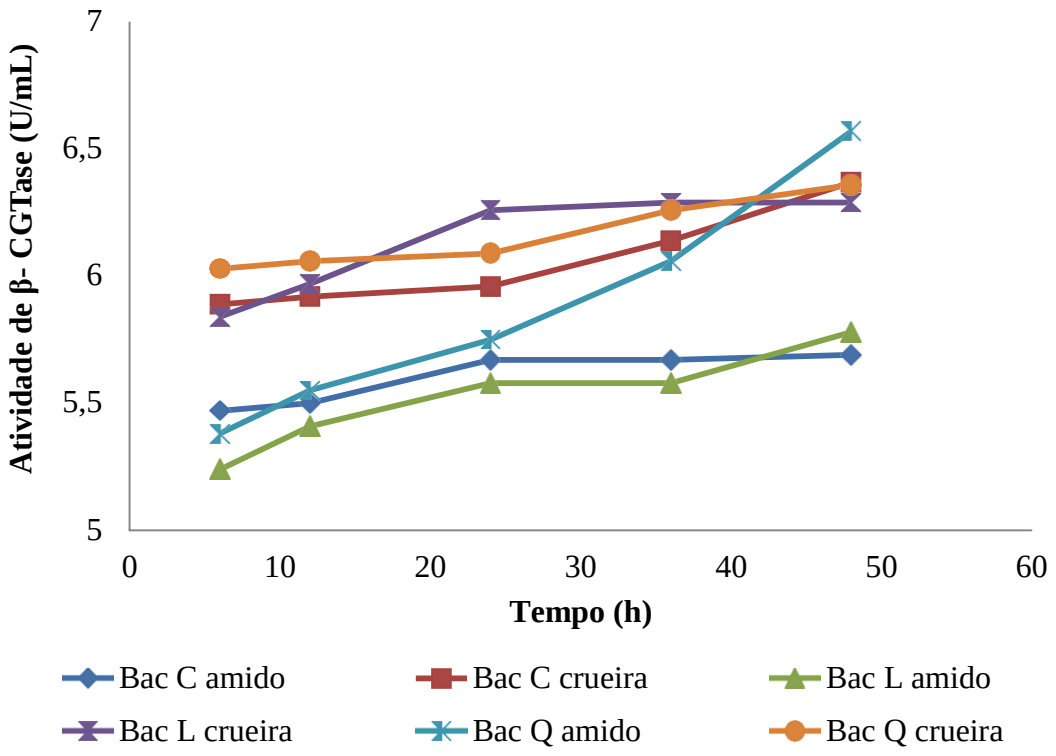

Figura 22: Dosagem da atividade enzimática de β-CGTase nos extratos obtidos da fermentação submersa.

Os valores de atividade enzimática mais relevantes foram encontrados para as bactéris *Bacillus* sp. C e L (6,37 U/mL e 6,29 U/mL, respectivamente), ao fim de 48

horas utilizando o substrato crueira como fonte de carbono. Já a bactéria *Bacillus* sp. Q apresentou valor máximo de 6,57 U/mL na presença de amido comercial, ao fim de 48 horas. Em comparação com dados na literatura, esses valores podem ser considerados promissores, podendo ser melhor observado no Anexo 4.

Segundo Moriwaki *et al.* (2009), a linhagem *Bacillus firmus* 37, isolada do solo de uma plantação de mandioca da cidade de Maringá, apresentou valor de atividade enzimática de 0,48 U/mL, ao fim de 24 horas em 37ºC e amido comercial como fonte de carboidrato. Costa *et al.* (2015), apresentou um valor de 1,47U/mL para o *Bacillus circulans* DR 9R**,** isolado da batata, quando a fermentação foi conduzida a 37ºC por 48 horas e amido comercial como fonte de carboidrato. De acordo com Rajput et al. (2016), utilizou *Microbacteria terrae* KNR 9, a 30ºC por 72 horas em meio contendo amido comercial para a produção de CGTase, obteve um valor de 4,71 U/mL.

As linhagens de bactérias endofiticas isoladas de Physalis angulata podem ser consideradas promissoras devido à sua alta produção quando a crueira é utilizada como fonte de carbono. Por se tratar de um resíduo, sua utilização reduz o custo de produção enzimática, sendo um diferencial competitivo.

5.6 Teor de proteína bruta

O teor de proteína total bruta solúvel no extrato enzimático das 3 linhagens bacterianas foi avaliado. Os resultados estão expressos na Figura 23.

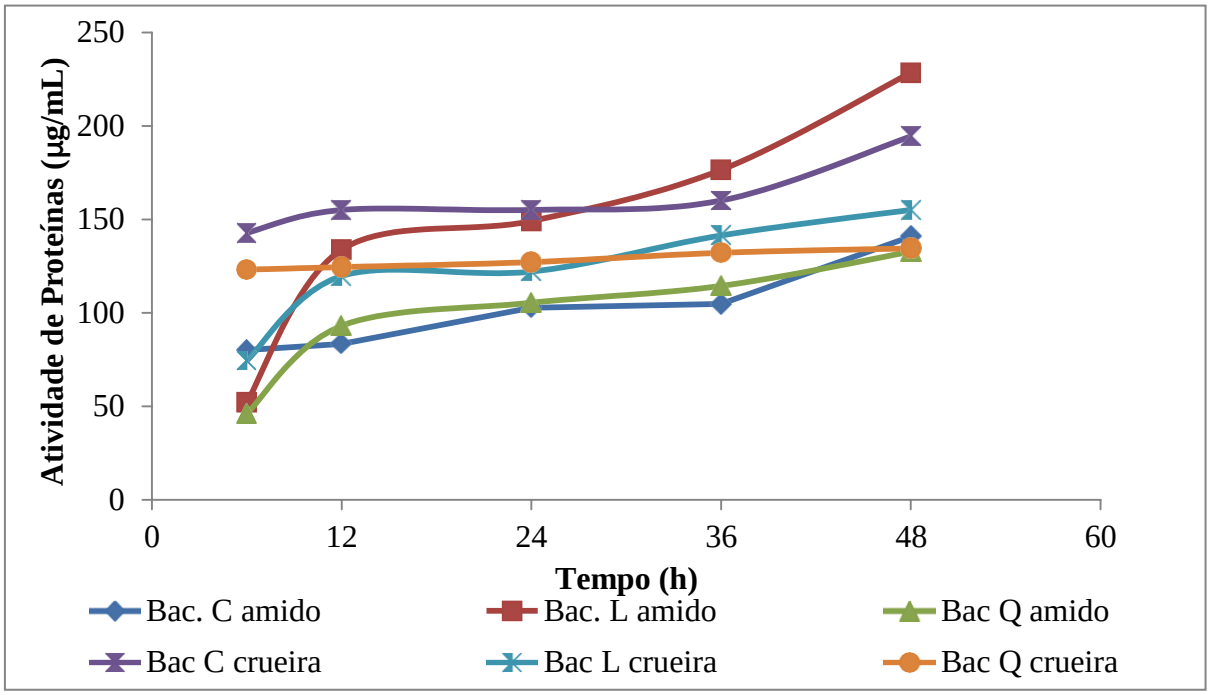

Figura 23: Dosagem de proteínas totais solúveis pelo método de Lowry nos extratos obtidos da fermentação submersa.

Para as 3 linhagens de bactérias endofíticas, somente a bactéria *Bacillus* sp. L apresentou valores de proteínas totais solúveis superiores a 228,43 ± 0,02µg/mL quando comparado a produção utilizando o resíduo da mandioca. Com relação à bactéria *Bacillus* sp. Q, após 48 horas de fermentação os valores de proteínas totais solúveis nos dois meios foram a 134,43 ± 0,03µg/mL (crueira) e 132,77 ± 0,015µg/mL (amido comercial), como pode ser observado no Anexo 4.

De acordo com Rajput et al. (2016), a linhagem *Microbacteria terrae* KNR 9 foi capaz de produzir 5,23 µg/mL de proteína total a 30ºC por 72 horas em meio contendo amido comercial. Segundo Marques (2017), o fungo *Saccharicola sp.* EJC04 isolado da *Eugenia jambola* (jamelão), foi capaz de produzir 20,88 µg/mL de proteína total a 28ºC por 8 dias, na presença de farelo de algodão e farelo de trigo nas concentrações de 1:2. Para Guzman e Yhon (2014), a linhagem isolada de cana-de-açúcar, *Leuconostoc mesenteroides* IBUN 91.2.98, obteve o valor máximo de proteína total de 2,82 µg/mL a 30ºC por 5 horas.

A quantificação de proteína total bruta obtido no estudo foi superior ao encontrado na literatura, somente a bactéria *Bacillus sp*. L obteve um crescimento maior quando comparado com outras cepas que utilizaram o amido comercial.

5.7 Composição Centesimal

O processo de secagem e posterior trituração do resíduo a crueira facilitou a homogeneização da amostra, permitindo um perfil uniforme para o resíduo, semelhante ao observado pela farinha branca. Esses processos facilitaram a utilização do resíduo como fonte de carbono para processo fermentativo e caracterização da composição centesimal do resíduo. Na Tabela 11, a composição centesimal do resíduo crueira está demonstrada, com os seus valores e os desvios apresentados para cada um dos parâmetros desejados.

Tabela 11: Composição centesimal da crueira.

Parâmetros	**Resultados***
U (%)	45,63 ± 1,6
Cinzas (%)	2,34 ± 1,20
Lipídeos (%)	2,15 ± 1,13
Fibra bruta (%)	9,41 ± 1,90
Proteína (%)	2,62 ± 0,77
Amido (%)	68,8 ± 2,64
Aw	0,03
pH	4,00

±D.P.

*Os resultados foram expressos em base seca.

As diferenças nos valores observados na tabela 13, podem ser atribuídas ao local de cultivo da planta *Manihot* (mandioca). As condições de cultivo encontradas em Sergipe no Nordeste são diferentes daquelas encontradas em São Paulo na região sudeste e em Rondônia no norte do Brasil. Essas diferenças se devem a utilização de diferentes variedades de cultura de mandioca, das condições climáticas e do tipo de solo da região produtora (Neves, 2004).

O valor de amido está próximo ao encontrado por Carvalho (2008) que é de 68 a

48 % e o obtido foi de 68,8 ± 2,64, porem um valor baixo quando comprado com Neves (2004) e Rocha (2016) 81,1±0,18 e 82,00±0,58 respectivamente. Por ter um valor baixo poderá influenciar na fermentação, pois as bactérias utilizaram a crueira como nutriente.

O valor de pH para Carvalho (2008) e Neves (2014) foi respectivamente de 5,39 e 5,40 sendo superior ao encontrado no presente estudo foi de 4 influenciando na correção do pH dos meios a serem fermentados.

O valor obtido para o teor de cinzas na crueira de 2,34 ± 1,20 demonstrou ser alto quando comparados com os autores de outras regiões que foram de 0,9 ±0,02 e 1,52 ± 0,03, respectivamente no trabalho de Neves (2014) e Silva (2016). Esses valores são considerados baixos quando comparado com valores obtidos para o mesmo componente em outros resíduos vegetais, como a palha de arroz e palha de trigo, que contêm 17,5% e 11,0% respectivamente (PANDEY, 2000).

No entanto, é possível constatar que a crueira analisada apresenta-se como um resíduo com alto teor de amido e baixo teor de cinzas, o que a torna um resíduo com alto potencial para uso em processos de bioconversão utilizando culturas microbianas.

6 CONCLUSÃO

Três linhagens bacterianas isoladas da planta *Physalis angulata* apresentaram Índice Enzimático considerado muito bom para a atividade de CGTase, com valores superiores a 2,5, sendo a linhagem L a mais promissora (4,60).

A amostra de crueira apresentou os valores na sua composição centesimal satisfatórios para ser utilizada na bioconversão, com uma alta concentração de amido 68,8±2,64 e um baixo valor de cinzas 2,34±1,20.

Para as condições de cultivo, com relação a pH e temperatura ótimo, os valores foram padronizados em pH 6,0 e 35ºC para as 3 linhagens bacterianas de modo que os valores de atividade β-CGTase atingiram valores até 4,4 vezes superior aos descritos na literatura.

Os resultados obtidos durante o processo fermentativo com as bactérias endofiticas indicam que o uso do resíduo crueira foi promissor produção das enzimas β-CGTase, β-amilase e α-amilase. A crueira é uma excelente fonte amilácea para ser utilizada em bioprocessos, com cerca de 70 a 80% de amido na sua composição.

As bactérias endofíticas isoladas da planta *Physalis angulata* apresentaram um grande potencial biotecnológico para a produção, em especial, da enzima β-CGTase utilizando resíduos amiláceos. Novos estudos deverão ser realizados para otimizar a produção dessa enzima por essas bactérias endofíticas, bem como estudos taxonômicos para identificar em nível de espécie essas 3 linhagens de *Bacillus* sp.

7 REFERÊNCIAS

ACEBO-GONZÁLEZ, D.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, A. T. **Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida**. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, v. 44, n. 1, 2013.

ÁLVARES, V. S.; COSTA, D. A.; FELISBERTO, F. A. V.; SILVA, S. F.; MADRUGA, A. L. S. **Atributos físicos e químicos da farinha de mandioca artesanal em Rio Branco, Acre**. Caatinga, 26:50-58. 2013.

ALY, A.H., DEBBAB, A., CLEMENTS, C., EDRADA-EBEL, R., ORLIKOVA, B., DIEDERICH, M., WRAY, V., LIN, W. & PROKSCH, P. **NF kappa B inhibitors and antitrypanosomal metabolites from endophytic fungus *Penicillium sp.* isolated from *Limonium tubiflorum***. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 19: 414-421, 2011.

ANDREAUS, J., DALMOLIN, M. C., JUNIOR, O., BARCELLOS, I. O. **Application of cyclodextrins in textile processes**. *Química Nova, 33*(4), 929-937.2010.

ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. **The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces**. Annual Reviews of Phytopathology, v. 38, p. 145-180, 2000.

AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. **Official methods of analysis**. 19th ed. Gaithersburg, 2012. 3000p.

ARAÚJO, N. C.; GUIMARÃES, P. L. F.; OLIVEIRA, S. J. C.; LIMA, V. L. A.; BANDEIRA, F. A.; ARAÚJO, F. A. C. **Quantificação da geração de resíduos em uma casa de farinha no Estado da Paraíba**. Rev Monogr Ambient. 2014.

ASTRAY, G., GONZALEZ-BARREIRO, C., MEJUTO, J. C., RIAL-OTERO, R., SIMAL-GÁNDARA, J. A. **Review on the use of cyclodextrins in foods**. *Food Hydrocolloids*, *23*(7), 1631-1640. 2009.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. **Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants**. Electronic Journal of Biotechnology, v.3, 2000.

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. **Endophytic bacteria as agents of plant growth promotion in tomato and inhibition in vitro of *Ralstonia solanacearum***. Ciência e Agrotecnologia, v. 32, n. 3, p. 731-739, 2008.

BERNFELD, P. **Amylases, α and β**. p.149-158. 1955.

CAMACHO, G. Procesamiento. In: FLOREZ, V., FISCHER, G., y SORA, A. **Producción, Poscosecha y Exportación de La Uchuva**. Bogotá: Universidad Nacional de Colômbia, p. 131, 2000.

CARVALHO, R. V. D., CORRÊA, T. L. R., SILVA, J. C. M. D., VIANA, A. P., MARTINS, M. L. L. **Optimization of culture conditions for the production of amylases by thermophilic *Bacillus* sp. and hydrolysis of starches by the action of the enzymes**. Food Science and Technology (Campinas), v. 28, n. 2, p. 380-386, 2008.

CARVALHO, R. V. **Produção e caracterização de α-amilase por *Bacillus sp.* smia-2 termofílico utilizando proteínas do soro de leite, e algumas aplicações da enzima**. Doutorado (mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 113p. 2007.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F. FURTADO, A. A. L. **Aproveitamento de resíduo agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde**. Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33, 2001.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_01_16_17_10_59_17.pdf>. Acesso em: 15 outubro 2016.

CORAL, L. G.; MARTINEZ, F. T.; CHAMORRO, B. Y. **Estudio de mercado para la comercialización de uchuva (*Physalis peruviana l.*) en nariño**. Revista de ciências agrícolas 29 (1) : 92-102. 2012.

COSTA, H., GASTÓN, J. R., LARA, J., MARTINEZ, C. O., MORIWAKI, C., MATIOLI, G., FERRAROTTI, S. A. **Cyclodextrin glycosyltransferase production by free cells of *Bacillus circulans* DF 9R in batch fermentation and by immobilized cells in a semi-continuous process**. , 38 (6), 1055-1063, 2015.

COSTA, J.A.V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus Níger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 203p, 1996.

COSTA, W. L. S.; BOCCHI, M. L.M. **Aplicações do bagaço da cana-de-açúcar utilizadas na atualidade**. Ciência & Tecnologia, Jaboticabal, v. 2, n.1, 2012.

CUNHA, J. R. B., SANTOS, F. C. P. D., ASSIS, F. G. D. V. D., & LEAL, P. L. **Cultivation of *Penicillium* spp. in soy bean crop residues for production of cellulase, protease and amylase**. *Revista Ceres*, *63*(5), 597-604, 2016.

DECLERCK, N.; MACHIUS, M.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; GAILLARDIN, C. **Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* α- amylase**. J. Mol. Biol. 31, 1041-1057. 2000.

FACKLAM, R. R.; MOODY, M. D. **Presumptive identification of group D streptococci: the bile-esculin test**. Appl. Microbiol. 20:245. 1970

FERNANDES, V. C., DENADAI, Â. M. L., MILLÁN, R. D. S., ALVES, R. J., JÚNIOR, C., SILVA, A. **Physico-chemical caracterization of insulin: dimethyl-beta-cyclodextrin and insulin: hydroxypropil-beta-cyclodextrin complexes and evaluation of the kind of complexes on the biodegradable microspheres preparation.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, *43*(4), 543-553.2007.

FISCHER, G., MIRANDA, D. Uchuva (*Physalis peruviana L*.). pp. 851-873. In: Fischer, G. (ed.). **Manual para el cultivo de frutales en el trópico**. Produmedios, Bogota. 2012.

FLORENCIO, C., COURI, S., FARINAS, C. S. **Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by Trichoderma strains**. Enzyme Research, p.1-7, 2012.

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. S.; FERREIRA, O. E. **Produção e caracterização de α-amilase termoestável de *Syncephalastrum racemosum***. *Revista Brasileira de Biociências*, *12*(4), 2015.

FURTADO, J. S. **Produção limpa**. Novembro, 2001. Disponivel em: http://www.teclim.ufba.br/jsfurtado. Acesso em 15 jun. 2016.

GRAM, C. **The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations**. *General Microbiology*, *2*, 185-189, 1884.

GUO, B., WANG, Y., SUN, X. & TANG, K. **Bioactive natural products from endophytes: a review.** Applied Biochemistry and Microbiology, 44: 136-142. 2008.

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

GUZMÁN, F.; YHON, G. (2014). **Estudio de la enzima dextransacarasa (DS) producida por *Leuconostoc mesenteroides* cepa IBUN 91.2. 98** (Doctoral dissertation, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia-IBUN-). 2014.

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

HAQ, I.; ALI, S.; JAVED, M. M.; HAMEED, U.; SALEEM, A.; ADNAN, F.; QADEER, M. A. **Production of alpha amylase from a randomly induced mutant strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application as a desizer in textile industry**. Pak J Bot 42(1):473–484. 2010.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. **Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth**. Trends in Microbiology, 16: 463-471. 2008.

HAWKES, J. G. **Solanaceae III taxonomy chemistry evolution. Richmond,Surrey**, UK: The Royal Botanic Gardens Kew, 1991.

HARTREE, E. F. **Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response**. *Analytical biochemistry*, *48*(2), 422-427. 1972.

HUNZIKER, A.T. **Genera Solanacearum**. Rugell: A.R.G. Gantner Verlag. 500 p. 2001.

HWANG, K. Y.; SONG, H. K.; CHANG, C.; LEE, J.; LEE, S. Y.; KIM, K. K.; CHOE, S; SWEET, R. M ; SUH, S. W. **Crystal structure of thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* refined at 1.7 A resolution**. Molecules and cells, 7(2), 251-258. 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 31 fevereiro 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. 4 ed. Rio de Janeiro: IBGE.137 p. 2017.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1018 p. 2008.

JOBLING, S. **Improving starch for food and industrial applications**. Current Opinion In Plant Biology, v. 7, p. 210–218, 2004.

KITAHATA, S.; OKADA, S. **Action of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus megaterium* strains n°5 on starch**. Agricultural and Biological Chemistry. v.38, p.2413, 1974.

KOUR, A.; SHAWL, A. S.; REHMAN, S.; SULTAN, P.; QAZI, P. H.; SUDEN, P.; KHAJURIA, R. K.; VERMA, V. **Isolation and identification of an endophytic strain of Fusarium oxysporum producing podophyllotoxin from Juniperus recurva**. World J Microbiol Biotechnol, 24: 1115-1121. 2008.

LIMA, J. M. S. Avaliação do potencial de produção de biossurfactantes por micro-organismos endofíticos e epifíticos de macrófitas aquáticas coletadas em afluentes do Rio Negro contaminados por petróleo. Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE/Universidade Federal do Amazonas - UFAM/Universidade Estadual do Amazonas - UEA (2016).

LUZ, B. D. D. S.; BICAS, J. L.; SARROUH, B.; LOFRANO, R. C. Z. **Bioprospecção de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial realizada no Parque Estadual Serra do Ouro Branco**, Brasil. Interbio v.10 n.1. 13-14. 2016.

MACCHERONI, W. J.; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S. **Ecologia: habitat e**

interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: Uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004.

MARQUES, N. P. Produção de celulases por fungos endofíticos e aplicação das enzimas na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. Universidade Estadual Paulista, doutorado biotecnologia. 2017.

MATIOLI, G.; ZANIN, G. M.; DE MORAES, F. F.; GUIMARAES, M. F. **Production and purification of CGTase of alkalophylic *Bacillus* isolated from Brazilian soil**. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 267-275). Humana Press, Totowa, NJ. 1998.

MELNICK, R. L.; ZIDACK, N. K.; BAILEY, B. A.; MAXIMOVA, S. N.; GUILTINAN, M.; BACKMAN, P.A. **Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao**. Biological Control, 46: 46-56. 2008.

MORIWAKI, C.; MAZZER, C.; PAZZETTO, R.; MATIOLI, G**. Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina glicosiltransferases para produção de ciclodextrinas**. Química nova, 32(9), 2360-2366,2009.

MUNIZ, J.; KRETZSCHMAR, A. A.; RUFATO, L.; PELIZZA, T. R.RUFATO, A. R.; TIAGO AFONSO DE MACEDO, T. A. **General aspects of *physalis* cultivation.** Ciência Rural, v.44, 2014.

MUNIZ, J.; MOLINA, A. R.; MUNIZ, J. ***Physalis*: Panorama produtivo e econômico no Brasil**. Hortic. Bras. vol.33 no.2 Vitoria da Conquista, 2015.

NAIDU, M. A.; SARANRAJ, J. **Bacterial amylase a review**. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive, v. 4, n. 2, 2013.

NAKAMURA, N.; HORIKOSHI, K**. Purification and properties of neutral-cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp**. Agricultural and Biological Chemistry. v. 40, n. 9, p. 1785-1791, 1976.

NEVES, V. J. M**. Uso do resíduo da produção de farinha de mandioca (crueira) na produção de álcool fino**. Dissertação (mestrado). Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 55p, 2014.

OLIVEIRA FILHO, J. G. D.; CAMARA, C. P. D.; SOUSA, T. C. F. D.; CRUZ, Í. D. A.; EGEA, M. B.; FALCÃO, H. A. D. S.; SILVA, E. R. D. **Caracterização microbiológica do processo de compostagem de resíduos orgânicos em pequena**

escala. In *Colloquium Agrariae* Vol. 13, No. 2, pp. 130-136. 2018.

OLIVEIRA, G. A. V. D.; SILVA, J. M. S. F. D. **Chemical equilibrium and enzymatic kinetics of α-amylase interaction with phenolic compounds found in beer**. *Química Nova*, *40*(7), 726-732. 2017.

OLUFUNKE, F. O. T.; AZEEZ, I. I. **Purification and characterization of beta-amylase of *Bacillus subtilis* isolated from *Kolanut Weevil***. *Journal of Biology and Life Science*, *4*(1). 2012.

OYAMA, T.; KUSUNOKI, M.; KISHIMOTO, Y.; TAKASAKI, Y.; NITTA, Y. **Crystal Structure of βAmylase from *Bacillus cereus* var. mycoides at 2.2 Å Resolution**. The Journal of Biochemistry, 125(6), 1120-1130. 1999.

PANDEY, A.; SOCCOLA, C. R.; NIGAMB, P.; SOCCOLC, V. T. **Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse**. Bioresource Technol. 2000 Ago; 74(1): 81-87.

PAZ, Z., BURDMAN, S., GERSON, U., & SZTEJNBERG, A. **Antagonistic effects of the endophytic fungus *Meira geulakonigii* on the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora***. Journal of applied microbiology, *103*(6), 2570-2579. 2007.

PEREIRA, J. L. **Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus oryzae* através de fermentação no estado sólido**. Tese de conclusão de curso. Ceilândia (DF): Universidade de Brasília. 57p 2015.

PILLAY, V. J.; NOWAK, J. **Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (Lycopersicon esculentum L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium**. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v. 43, p. 354-361, 1997.

PINHEIRO, K. H.; DO NASCIMENTO, L. B.; FENELON, V. C.; BARÃO, C. E.; MATIOLI, G.; DE MORAES, F. F. **Mathematical modelling and kinetic study for CD production catalysed by Toruzyme® and CGTase from *Bacillus firmus* strain 37**. *Bioprocess and biosystems engineering*, *40*(9), 1305-1316. 2017.

Protein Data Bank (PDB). Disponivel em:< http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> Acessado em: 10 outubro 2016.

Public Health England. UK Standards for Microbiology Investigations – Catalase Test, Bacteriology – Test Procedures, TP 8, Issue 3, 2014.

PUNIA, P.; KAUSHIK, S.; JYOTI, A. **Optimization of production conditions and partial characterization of extracellular amylase from *Bacillus subtilis* under submerged condition**. Journal of scientific & industrial research vol 75, p. 371-377. 2016.

QIU, M., XIE, R.S., SHI, Y., ZHANG, H. & CHEN, H.M. **Isolation and identification**

of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba L*. Ann Microbiol, 60: 143-150, 2010.

RANI, A., PORWAL, S., SHARMA, R., KAPLEY, A., PUROHIT, H. J., KALIA, V. C. **Assessment of microbial diversity in effluent treatment plants by culture dependent and culture independent approaches**. *Bioresource technology*, *99*(15), 7098-7107. 2008.

REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 2.ed. New York: Academic Press Inc., p. 62-87. 1975.

RODRIGUES, F. A.; PENONI, E. S.; SOARES, J. D. R.; SILVA, R. A. L.; PASQUAL, M. **Chemical, physical and physical-chemical characterization of physalis cultivated in greenhouse.** Ciência Rural, Santa Maria, v.44, n.8, p.1411-1414, ago, 2014.

RODRIGUES, F. A.; PENONI, E. S.; SOARES, J. D. R.; SILVA, R. A. L.; PASQUAL, M. **Caracterização fenológica e produtividade de *Physalis peruviana* cultivada em casa de vegetação**. Bioscience Journal, v.29, n.6, p.1771-1777, 2013.

RUFATO, A. R.; RUFATO, L.; LIMA, C. S. M. ; MUNIZ, J.. **A cultura da *Physalis*.** In: AIKE ANNELIESE KRETZSCHMAR, LEO RUFATO, TÂNIA REGINA PELIZZA. (Org.). 2013.

RUFATO, L.; RUFATO, A. R.; SCHLEMPER, C.; LIMA, C. S. M.; KRETZSCHMAR, A. A. **Aspectos técnicos da cultura da *Physalis***. Lages: CAV/UDESC; Pelotas: UFPel,. 100 p, 2008.

SAHNI, T. K.; GOEL, A. **Microbial enzymes with special reference to α-amylase**. Bio Evolution. V. 2(1), p. 19-25, 2015.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. **Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants**. Annual Review of Ecology and Systematics,n.29, p. 319-343,1998.

SANTANA, R. S. M. **Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, p.73. 2012.

SILVA, C. F., ROCHA, G. G. C., SANTOS, A. M., COSTA, S. S., BISPO, D. F., & DE SOUZA, R. R. **Crueira: resíduo agroindustrial sólido rico em amido**. Scientia Plena, 12(5). 2016.

SILVA, D. F. **Utilização de malhas de sombreamento coloridas na produção de mudas e frutos de espécies do gênero *Physalis L*.** Dissertação (mestrado). Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras. 129p, 2014.

SILVA, C. F., ROCHA, G. G. C., SANTOS, A. M., COSTA, S. S., BISPO, D. F., & DE

SOUZA, R. R. **Crueira: resíduo agroindustrial sólido rico em amido**. *Scientia Plena, 12*. 2016.

SILVA, V. M. A.; MARTINS, C. M.; MARTINS, S. C. S. **Atividade celulolítica de actinobactérias de região semiárida do Ceará**. Enciclopédia Biosfera, v.11 n.21, p.2026-2036, 2015.

SOCCOL, C. R.; ROJAN, P. J.; PATEL, A. K.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PANDEY, A. **Glucoamylase. In: enzyme technology**.

New Delhi: Asiatec Publishers In. P. 221- 230, 2005.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. **Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 24, n. 1, p. 120 – 128, 2004.

SOUZA, V. C. D. **Polímeros de ß-ciclodextrina: síntese, caracterização e utilização na obtenção/estabilização de nanopartículas de prata**. 2017

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Plantarum, Nova Odessa. 2005.

STEHMANN, J. R.; MENTZ, L. A.; AGRA, M. F. ***Solanaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB014606>. Acesso em: 16 outubro 2015.

STURTZ, A. V. **The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization**. Plant and Soil, Dordrecht, v. 175, p. 257-263, 1995.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. **Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production**. Critical Reviews in Plant Sciences, v. 19, p. 1-30, 2000.

SUZUKI, M. T. **Isolamento, identificação e caracterização de linhagens endofíticas de Bacillus thuringlensis de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*)**. Mestrado em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biomédicas/ USP, São Paulo. Embrapa Meio Ambiente-Sistema de Produção (INFOTECA-E), 2006.

TEIXEIRA, I. A. L.; DE OLIVEIRA GUSMÃO, R., FERRAZ, L. M., OLIVEIRA, A. P. C.; DE ASSIS, F. G. D. V.; LEAL, P. L. **Isolamento e seleção de bactérias oriundas da manipueira produtoras de amilase e pectinase sob fermentação submersa**. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, 11(1). 2017.

VELASQUEZ, H. J. C.; GIRALDO, O. H. B.; ARANGO, S. S. P.; **Estudio preliminar de la resistencia mecánica a la fractura y fuerza de firmeza para frut fruta de uchuva (*Physalis peruviana L.*)**. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, v.

60, n. 1, p. 3785-3796, 2007.

WIND, R. D.; UITDEHAAG, J. C.; BUITELAAR, R. M.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. **Engineering of cyclodextrin product specificity and pH optima of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1**. Journal of Biological Chemistry, 273(10), 5771-5779. 1998.

WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. Starch. **Carbohydrtate chemistry for food scientists**. Saint Paul: Eagan Press. p. 117-151, 1997.

WHITSON, M.; MANOS, P.S. **Untangling *Physalis* (Solanaceae) from the Physaloids: A two-gene phylogeny of the *Physalinae***. Syst. Bot. 30, 216-230. 2005.

Anexo 1

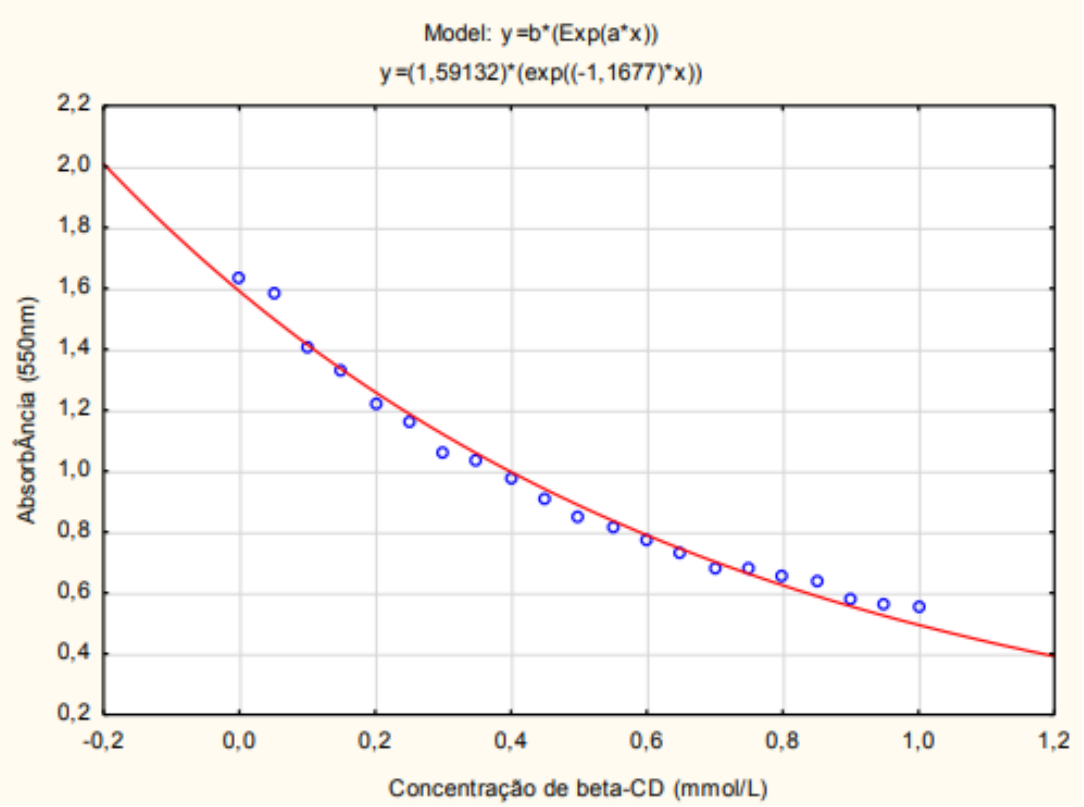

Figura 24: Curva padrão para dosagem de β-CD.

Anexo 2

Tabela 12: Atividade de α-amilase

Linhagem C		
Tempo(horas)	Amido(U/mL)	Crueira(U/mL)
6	4,18±0,003	4,18±0,001
12	4,38±0,002	4,33±0,002
24	4,58±0,002	4,88±0,002
36	4,73±0,004	5,03±0,001
48	5,63±0,004	5,53±0,01
Linhagem L		
Tempo(horas)	Amido(U/mL)	Crueira(U/mL)
6	4,23±0,001	4,08±0,002
12	4,48±0,002	4,38±0,01
24	4,58±0,001	4,63±0,01
36	4,73±0,04	4,68±0,01
48	4,73±0,01	4,83±0,01
Linhagem Q		
Tempo(horas)	Amido(U/mL)	Crueira(U/mL)
6	3,98±0,001	4,43±0,001
12	3,98±0,007	4,58±0,01
24	4,08±0,01	4,83±0,01
36	4,48±0,002	4,83±0,002
48	4,53±0,002	5,08±0,001

±DP

Anexo 3

Tabela 13: Atividade de β-amilase

Linhagem C		
Tempo(horas)	Amido(U/mL)	Crueira(U/mL)
6	0,509±0,01	0,479±0,001
12	0,559±0,001	0,539±0,01
24	0,579±0,002	0,579±0,01
36	0,819±0,001	0,624±0,01
48	0,829±0,01	0,904±0,001
Linhagem L		
Tempo(horas)	Amido(U/mL)	Crueira(U/mL)
6	0,524±0,001	0,459±0,03
12	0,529±0,001	0,489±0,01
24	0,534±0,01	0,614±0,001
36	0,699±0,002	0,734±0,001
48	0,714±0,002	0,834±0,002
Linhagem Q		
Tempo(horas)	Amido(U/mL)	Crueira(U/mL)
6	0,379±0,001	0,404±0,01
12	0,414±0,001	0,429±0,001
24	0,429±0,001	0,429±0,001
36	0,454±0,002	0,439±0,002
48	0,479±0,002	0,469±0,01

±DP

Anexo 4

Tabela 14: Atividade de β-CGTase

Linhagem C		
Tempo(horas)	Amido(U/mL)	Crueira(U/mL)
6	5,47±0,001	5,89±0,001
12	5,5±0,001	5,92±0,001
24	5,67±0,002	5,96±0,002
36	5,67±0,002	6,14±0,03
48	5,69±0,01	6,37±0,02
Linhagem L		
Tempo(horas)	Amido(U/mL)	Crueira(U/mL)
6	5,24±0,01	5,84±0,001
12	5,41±0,001	5,97±0,001
24	5,58±0,02	6,26±0,02
36	5,58±0,02	6,29±0,02
48	5,78±0,001	6,29±0,001
Linhagem Q		
Tempo (horas)	Amido(U/mL)	Crueira(U/mL)
6	5,38±0,01	6,03±0,01
12	5,55±0,03	6,06±0,001
24	5,75±0,04	6,09±0,001
36	6,06±0,03	6,26±0,04
48	6,57±0,03	6,36±0,03

±DP

Anexo 5

Tabela 15: Atividade de proteínas

Linhagem C		
Tempo(horas)	Amido(µg/mL)	Crueira(µg/mL)
6	80,1±0,001	142,77±0,03
12	83,43±0,03	155,10±0,02
24	102,77±0,02	155,10±0,04
36	104,77±0,01	160,10±0,04
48	104,77±0,11	194,43±0,001
Linhagem L		
Tempo(horas)	Amido(µg/mL)	Crueira(µg/mL)
6	52,10±0,001	74,43±0,02
12	133,77±0,03	119,77±0,03
24	149,10±0,06	122,10±0,06
36	176,43±0,04	141,43±0,04
48	28,43±0,02	155,10±0,02
Linhagem Q		
Tempo (horas)	Amido(µg/mL)	Crueira(µg/mL)
6	46,10±0,01	123,10±0,03
12	93,10±0,05	124,43±0,02
24	105,43±0,001	127,10±0,001
36	114,43±0,01	132,10±0,01
48	132,77±0,02	134,43±0,03

±DP