

● CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS E CULTIVADAS EM RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DE MANDIOCA

Andressa Porto Cordeiro Oliveira¹, Juliana Gomes Barreto Souza²,
Lucas Santos Solidade², Fábيا Giovana do Val de Assis³, Patrícia Lopes Leal^{*4}

RESUMO: A manipueira é gerada a partir do processamento da mandioca e quando disposta no meio ambiente, sem tratamento prévio, pode causar um grande impacto ambiental. O objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar bactérias presentes na manipueira com potencial para produzir enzimas amilolíticas, pectinolíticas e xilanolíticas, sob cultivo submerso utilizando a própria manipueira como fonte de carbono. O isolamento foi realizado por diluição seriada seguida de plaqueamento em superfície em meio Agar Nutriente. Isolados em culturas puras foram avaliados, via testes qualitativos, a fim de determinar a capacidade da produção de enzimas a partir de substratos específicos. Isolados bacterianos selecionados foram cultivados em manipueira fresca, a pH 5,5 sob agitação de 140 rpm, à 30 °C, durante 72 h. Ao longo do processo, foram determinadas a produção de enzimas e densidade celular das bactérias. A produção de amilase foi predominante entre as bactérias (n = 18), seguida da produção de pectinase (n = 6) e por fim, xilanase (n = 2). A máxima atividade enzimática registrada neste estudo foi para o isolado B17A (2,53 UI mL⁻¹ de pectinase, em 24 h de fermentação), seguida dos isolados B26A (2,49 UI mL⁻¹ de amilase, em 72 h) e B18G (2,38 UI mL⁻¹ de xilanase, em 48 h). A densidade celular dos isolados bacterianos, ao longo do processo fermentativo, indicou que nenhuma suplementação de nutrientes ao meio de cultivo microbiano em manipueira se fez necessária.

Palavras-chave: Amilase. Bioprocessos. Manipueira. Pectinase. Xilanase.

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ASSAYS OF THE ENZYMES PRODUCTION BY BACTERIA ISOLATED AND CULTIVATED IN CASSAVA LIQUID WASTE

ABSTRACT: Manipueira is liquid waste from cassava processing that, when untreated and disposed in the environment, can cause an important environmental impact. The objective of this study was to isolate and select bacteria in manipueira with the potential to produce amylases, pectinolytic and xylan enzymes under submerged fermentation using own cassava as a source of carbon. The isolation was performed by serial dilution followed by plating on surface in an Agar Nutrient solution. Isolated in pure cultures were assessed via qualitative tests in order to determine the ability of producing enzymes from specific substrates. Selected bacterial isolated were grown in fresh manipueira, with a pH 5.5 under agitation of 140 rpm, at 30 °C, for 72 hours. Throughout the process, the production of enzymes and cell density of the bacteria were determined. The amylase production was predominant (n = 18) between bacteria, followed by pectinase production (n = 6) and finally, xylanase (n = 2). The maximum enzyme activity recorded in this study was to the isolated B17A (2, 53 UI mL⁻¹ of pectinase, 24 h of fermentation), followed by isolated B26A (2, 49 UI mL⁻¹ of amylase in 72 h) and B18G (2, 38 UI mL⁻¹ of xylanase in 48 h). The bacteria isolated cell density, throughout the fermentation process, indicated no supplementation of nutrients through the microbial cultivation in manipueira was necessary.

Keywords: Amylase. Bioprocesses. Cassava liquid waste. Pectinase. Xylanase

* Autor correspondente: lealpat@yahoo.com.br

1 Bacharel em Biotecnologia. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, *Campus* Anísio Teixeira (UFBA- IMS). Vitória da Conquista, BA, Brasil. dessacordeiroget@gmail.com

2 Graduandos em Biotecnologia. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, *Campus* Anísio Teixeira (UFBA- IMS). Vitória da Conquista, BA, Brasil. anailuj.gbs@gmail.com, lucas.solidade@outlook.com

3 Doutora em Microbiologia Agrícola. Ecosoluções - Centro Tecnológico de Desenvolvimento Regional de Viçosa (CENTEV/UFV). Viçosa, MG, Brasil. fabi_zoo@yahoo.com.br

4 Doutora em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, *Campus* Anísio Teixeira (UFBA- IMS). Vitória da Conquista, BA, Brasil. lealpat@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O beneficiamento da mandioca (*Manihot esculenta*) para produção de farinha gera uma grande quantidade de resíduos sólidos (cascas, cepas, crueiras e farelo) e líquidos (água de lavagem das raízes, instrumentos e máquinas utilizadas no processo e manipueira) (ARAÚJO et al., 2012). A manipueira é a água residuária da produção de farinha de mandioca com elevada carga poluente e tóxica, podendo contaminar cursos d'água e os solos se não for corretamente tratada e descartada (MELO et al., 2015). A toxicidade da manipueira está relacionada à elevada concentração de ácido cianídrico (HCN), o qual é liberado pela hidrólise de glicosídeos cianogênicos presente nos tecidos da planta de mandioca.

Estudos têm sido conduzidos com o objetivo de selecionar linhagens microbianas capazes de metabolizar o cianeto presente em manipueira ao utilizarem o resíduo como fonte de carbono (PANTAROTO, 2001; VASCONCELOS et al., 2009). Neste sentido, a utilização de manipueira como substrato em processos fermentativos poderia também representar uma perspectiva interessante para rotas tecnológicas alternativas de produção de enzimas por micro-organismos, proporcionando diminuição do custo de produção dessas biomoléculas, além de agregar valor ao material que, naturalmente, seria descartado e, ocasionalmente, acarretaria em danos ao meio ambiente (TEIXEIRA et al., 2017).

A substituição de substratos sintéticos por matéria orgânica proveniente de resíduos agroindustriais em processos fermentativos para produção de enzimas vem sendo relatada na literatura: Vijayabaskar, Jayalakshmi, Shankar, (2012) verificaram a capacidade de *Bacillus cereus* em produzir amilase por fermentação em estado sólido usando o bagaço da cana de açúcar. Nagar et al. (2012) confirmaram a capacidade de *Bacillus pumilis* SV-205 em produzir xilanase sob fermentação semi-sólida, usando farelo de trigo suplementado com extrato de levedura e peptona. Tepe e Dursun (2014) também confirmaram a capacidade de *Bacillus pumilis* para produção de pectinase usando como meio de cultivo farelo de trigo e polpa de beterraba sob fermentação.

A utilização da manipueira como substrato em processos fermentativos tem sido voltada para a obtenção de diversos produtos como etanol (SUMAN et al., 2011), ácido cítrico (PASTORE et al., 2011), biomassa e proteína microbiana (LUPATINI et al., 2013); ácidos graxos voláteis (ZEMPULSKI et al., 2014); biossurfactante (BARROS, PASTORE, 2008; BEZERRA et al., 2012) e biogás (KUCZMAN et al., 2011). Todavia, são escassos na literatura relatos sobre a utilização de manipueira como substrato em processos fermentativos para produção de enzimas (TEIXEIRA et al., 2017). Amilase, pectinase e xilanase são exemplos de enzimas microbianas hidrolíticas utilizadas em diversas aplicações, como nas indústrias alimentícias, têxteis, de papel, celulose e detergentes, que podem ser obtidas na sacarificação de resíduos agrícolas (EL-SHISHTAWY et al., 2014; SAHA et al. 2014). Neste sentido, o objetivo deste estudo foi isolar e selecionar bactérias

presentes em manipueira com potencial para produzir enzimas amilolíticas, pectinolíticas e xilanolíticas sob cultivo submerso utilizando a própria manipueira como fonte de carbono.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e caracterização físico-química da manipueira

Amostras de manipueira fresca, provenientes da primeira prensagem da mandioca, foram coletadas em oito casas de produção de farinha, localizadas no município de Vitória da Conquista/BA (14°51'58"S; 40°50'22"W). As amostras foram homogeneizadas e utilizadas como substrato para fermentação sendo, previamente, caracterizada quanto ao pH e teores de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, ferro, zinco, sódio, alumínio, nitrogênio (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 1999; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008) e cianeto livre (NEVES et al., 2014), conforme apresentado na Tabela 1. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Tabela 1. Caracterização química da amostra composta de manipueira obtidas em casas de farinha, na microrregião de Vitória da Conquista - BA.

pH	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Zn	Na	Al	N	CN
	mg L ⁻¹											
4,7	198	302,7	9,3	30,2	22,7	1,2	3,6	3,5	44,2	81,6	370	186,8

Isolamento e obtenção de culturas puras de bactérias em amostra de manipueira

A amostra de manipueira foi utilizada para o isolamento das bactérias a partir de diluições seriadas, aplicando-se o método de plaqueamento em superfície utilizando meio de cultura específico para bactérias (Ágar Nutriente (AN) contendo Nistatina 1 %) e incubado a 30 °C por 24 h. Os isolados bacterianos em culturas puras foram transferidos para placas contendo meio AN e incubados a 30 °C por 24 h. Após a incubação, os isolados foram analisados em microscópio ótico e, de acordo com as características morfológicas, foram separados para cultivo e obtenção de culturas puras. Os isolados bacterianos em cultura pura foram preservados em tubos contendo solução de glicerol a 10 %, e mantidos a -20 °C.

Seleção de isolados bacterianos produtores de enzimas amilase, pectinase e xilanase

Testes qualitativos para determinação do potencial enzimático dos isolados foram conduzidos em placas de Petri, em triplicata, contendo meio mínimo mineral (3 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 2 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 2 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 15 g L⁻¹ de ágar) acrescido de 1 % (p/v) de amido solúvel, pectina cítrica ou xilana, como única fonte de carbono, conforme descrito por Pereira (2012). Os isolados que apresentaram crescimento em placa, formando halo

translúcido ao redor das colônias, foram selecionados e, posteriormente, empregados separadamente em processos de cultivo submerso contendo a manipueira como substrato para produção de enzimas Pereira (2012).

Avaliação do potencial hidrolítico e crescimento de bactérias cultivadas em meio contendo manipueira

Cultura estoque dos isolados bacterianos pré-selecionados foram, individualmente, reativadas em meio caldo nutriente por 18 h, a 30 °C. Após repetidas lavagens com solução salina 0,85 %, as linhagens foram, separadamente, inoculadas (2×10^6 UFC g⁻¹) em 100 mL de manipueira autoclavada, com pH ajustado para 5,5. O cultivo submerso foi conduzido para cada um dos isolados bacterianos selecionados, com três repetições, utilizando Erlenmeyers de 250 mL que foram mantidos em estufa com agitação orbital, a 140 rpm e à 30 °C, por 72 h.

A cada 24 h, alíquotas de 1 mL e 5 mL dos meios foram retiradas para avaliar, respectivamente, o crescimento bacteriano e a atividade amilolítica, pectinolítica e xilanolítica. O crescimento celular foi determinado em função da densidade óptica a 600 nm, utilizando-se espectrofotômetro UV-VIS 190 a 1100nm. Para determinação da atividade enzimática, as alíquotas coletadas foram centrifugadas a 4500 rpm por 15 min, e o sobrenadante livre de células foi utilizado para dosagem da atividade de amilase, pectinase e xilanase.

A avaliação da atividade de amilase, pectinase e xilanase foi determinada conforme método de Miller (1959) utilizando-se 0,05 mL da solução do extrato bruto da enzima, 0,1 mL do substrato enzimático (1 %; m/v) de amido solúvel para amilase, pectina cítrica para pectinase e xilana para xilanase e 0,2 mL de tampão acetato (0,1 MolL⁻¹, pH 5,5), a 50 °C, por 10 min. A reação foi paralisada pela adição de 0,2 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) à mistura que foi submetida à fervura (100°C) por 5 min e resfriada em banho de gelo por 5 min. Posteriormente, adicionou-se 5,0 mL de água destilada e a leitura foi feita por espectrofotometria utilizando comprimento de onda de 540 nm.

Os ensaios de atividade de todas as enzimas foram conduzidos em triplicata, havendo ainda o preparo de uma reação controle que consistiu do mesmo tratamento peculiar a cada enzima, porém substituindo o extrato bruto enzimático por água destilada. A unidade das atividades enzimáticas (UI mL⁻¹) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de produto (açúcares redutores) por minuto por mililitro de amostra (polissacarídeos), nas condições de reação, utilizando como curva padrão glicose, ácido galacturônico e xilana para amilase, pectinase e xilanase, respectivamente (MILLER, 1959).

As médias de atividades enzimáticas obtidas de cada tratamento (isolado bacteriano), ao final de 72 h de cultivo em manipueira, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias foram determinadas pelo teste de Scott-Knott.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O total de 98 isolados bacterianos foi obtido das amostras de manipueira e 43 deles foram selecionados a partir dos testes qualitativos em placa de Petri, por produzirem, pelo menos uma das enzimas, sendo 95,3 % das bactérias hábeis em produzir amilase, 79,0 % em produzir xilanase, 39,5 % em produzir pectinase e 6,5 % em produzir as três enzimas (Tabela 2).

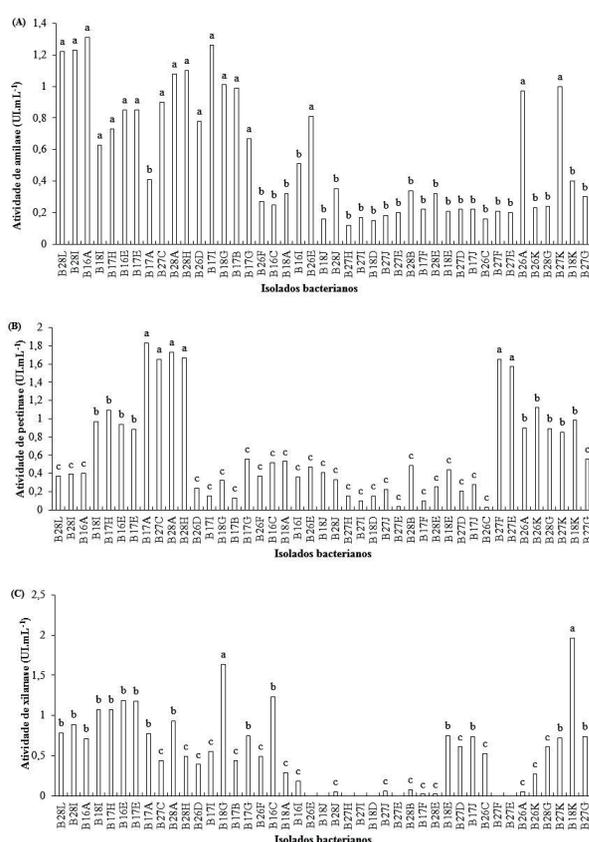
Tabela 2. Triagem qualitativa de bactérias produtoras de amilase, xilanase e pectinase.

Linhagens	Amilase	Xilanase	Pectinase
B28L	+	+	+
B28I	+	+	+
B16A	+	+	+
B18I	+	+	+
B17H	+	+	+
B16E	+	+	+
B17E	+	+	+
B17A	+	+	+
B27C	+	+	+
B28A	+	+	+
B28H	+	+	+
B26D	+	+	+
B17I	+	+	+
B18G	+	+	+
B17B	+	+	+
B17G	+	-	-
B26F	+	+	-
B16C	+	-	-
B18A	+	+	-
B16I	+	-	-
B26E	+	+	-
B18J	+	+	-
B28J	+	+	-
B27H	+	+	-
B27I	+	+	-
B18D	+	+	-
B27J	+	+	-
B27E	+	-	+
B28B	+	+	-
B17F	+	-	-
B28E	+	-	-
B18E	+	+	-
B27D	+	+	-
B17J	+	+	-
B26C	+	-	+
B27F	+	+	-
B27E	+	-	-
B26A	+	+	-
B26K	+	+	-
B28G	+	-	-
B27K	-	+	-
B18K	-	+	-
B27G	+	+	-

* (+) indica produção da enzima e (-) indica a não produção.

Isolados bacterianos selecionados nos testes qualitativos foram cultivados em meio contendo manipueira como única fonte de carbono e os resultados desses ensaios indicaram que, entre os 43 isolados, as maiores atividades de amilase, pectinase e xilanase ($p > 0,05$), ao final de 72 h de cultivo, variaram, respectivamente de 0,63 a 1,31 UI mL⁻¹, entre 18 isolados (Figura 1A); de 1,57 a 1,83 UI mL⁻¹, entre 6 isolados (Figura 1B) e de 1,64 a 1,96 UI mL⁻¹, entre 2 isolados (Figura 1C).

Figura 1. Amilase (A) Pectinase (B) xilanase (C). Avaliação dos isolados bacterianos produtores de enzimas ao final de 72 h de cultivo em manipueira. Barras seguidas de letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Scott-knott, ($p < 0,05$). * Ensaios realizados com três repetições para cada isolado sob cultivo submerso em manipueira como única fonte de carbono. Valores médios apresentados para atividades enzimáticas, sendo os desvios-padrão inferiores a 15 %.



Os isolados com desempenho significativamente melhor para produção de amilase, pectinase e xilanase sob cultivo submerso em manipueira foram avaliados quanto à cinética da atividade enzimática (Figuras 2 a 4). Para amilase, a atividade enzimática máxima foi registrada, para a maioria dos isolados, nas primeiras 24 h de fermentação, alcançando em média 1,1 UI mL⁻¹ (Figura 2). Exceções para essa tendência foram verificadas para os isolados B17G e B18G, cujas atividades amilolíticas máximas (1,37 UI mL⁻¹; 1,35 UI mL⁻¹, respectivamente) ocorreram em 48 h de fermentação e para o isolado B26A que apresentou maior atividade de amilase (2,49 UI mL⁻¹) ao final do processo (72 h). Resultados similares foram registrados por Unakal,

Kallur, Kaliwal, (2012) que detectaram atividade amilolítica de 3,60 UI mL⁻¹ por *Bacillus subtilis* após 12 h de fermentação em casca de banana.

Carvalho et al. (2008) basearam-se em dados da literatura para apontarem duas tendências, de modo geral, para síntese de amilase por bactérias do gênero *Bacillus*, dependendo das condições do experimento e do microrganismo utilizado: 1) A síntese da enzima acompanha o crescimento microbiano e diminui a velocidade de síntese à medida que a cultura entra na fase estacionária. 2) A formação da enzima é lenta durante a fase logarítmica de crescimento, seguida de um aumento da velocidade de síntese na medida em que a velocidade de crescimento diminui e atinge a fase estacionária. No presente estudo, com exceção para o isolado B26A, a primeira tendência foi predominante entre os isolados bacterianos, para os quais foi verificada produção de amilase acompanhando o crescimento exponencial dos microrganismos (Figura 5).

Para pectinase, a atividade enzimática máxima foi registrada, para a maioria dos isolados, nas primeiras 24 h de fermentação, alcançando atividade média igual a 1,81 UI mL⁻¹ e indicando uma rápida assimilação dos nutrientes contidos na manipueira pelos isolados bacterianos (Figura 3). O isolado B17A se destacou pela maior atividade pectinolítica registrada (2,61 UI mL⁻¹) nas primeiras horas de cultivo em manipueira, superando valores encontrados para *Aspergillus awamori* (0,05 μmol/mL/min), após 7 dias de fermentação em farinha de trigo integral (BLANDINO et al., 2001) e para *Lentinus edodes* (1,5 a 2,2 μmol/mL/min), após 40 dias de fermentação em resíduos de processamento de frutas (ZHENG e SHETTY, 2000).

O decaimento da atividade pectinolítica, para muitos isolados bacterianos, foi observado às 48 h de fermentação, seguido pelo aumento dessas atividades ao final do processo (72 h). Exceção em relação a esse comportamento foi verificada para o isolado B27E, cuja atividade pectinolítica máxima (2,31 UI mL⁻¹) ocorreu em 48 h de fermentação. Attri e Garg (2014) também encontraram atividade máxima de pectinase (2,11 UI mL⁻¹) em 48 h de fermentação por estirpes bacterianas isoladas de solos contendo resíduos de frutas e vegetais em decomposição quando cultivadas em casca de laranja como substrato.

Atividade enzimática máxima de xilanase foi registrada para os isolados B18K (2,18 UI mL⁻¹) e B18G (2,38 UI mL⁻¹) em 48 h de fermentação. Esses resultados são condizentes aos reportados por Rahmani et al. (2014) após 24 h do cultivo de *Bacillus safensis* P20 em resíduos agroindustriais como fonte de carbono: 2,82; 1,8 e 1,7 UI mL⁻¹ utilizando como substrato bagaço da cana, espiga de milho e palha de trigo, respectivamente; e por Sugumaran et al. (2013) que verificaram atividades de xilanase iguais a 1,3; 1,5 e 3,0 UI mL⁻¹ a partir do cultivo de *B. subtilis* em farelo de trigo, farinha de trigo e bagaço de mandioca, respectivamente.

Figura 2. Atividade da amilase em função do tempo de cultivo submerso em manipueira para potenciais isolados bacterianos. As linhas pontilhadas representam a tendência da relação produção da amilase pelo tempo de cultivo.

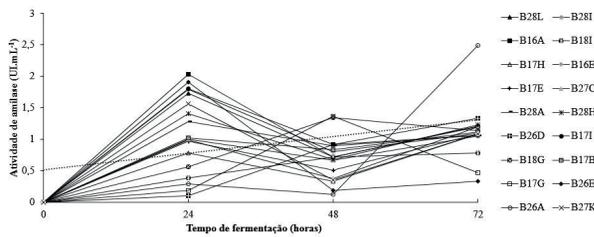
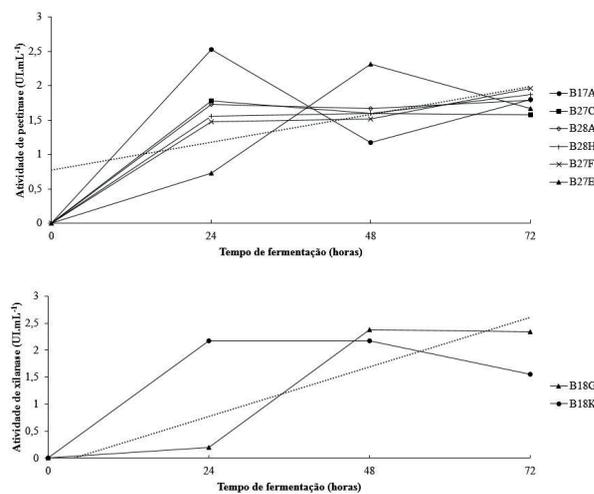


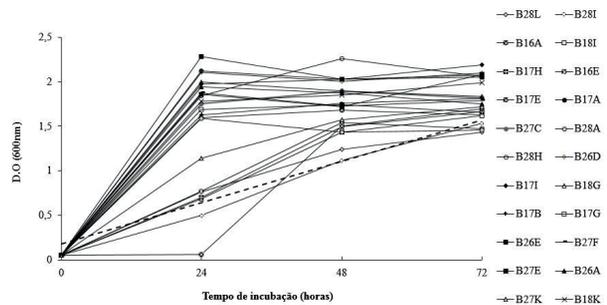
Figura 3. Atividade da pectinase em função do tempo de cultivo submerso em manipueira para potenciais isolados bacterianos. As linhas pontilhadas representam a tendência da relação produção da pectinase pelo tempo de cultivo.



A cinética de crescimento dos isolados bacterianos potenciais produtores de amilase, pectinase e xilanase em cultivo submerso em manipueira foi avaliada e os resultados corroboraram com os obtidos para a cinética enzimática (Figura 5). Todos os isolados, com exceção de B17E, não requereram fase lag extensiva, indicando que os isolados bacterianos se apresentaram naturalmente adaptados à constituição química da manipueira, incluindo o cianeto, e, portanto, capazes de utilizar, prontamente, o resíduo como fonte de carbono por atividade enzimática. Às 48 h de incubação, foi possível observar uma leve queda do crescimento celular para a maioria dos isolados bacterianos, que em seguida, iniciaram a fase estacionária. Exceções foram registradas para os isolados B28I, B17H, B18I, B28L, B16E, B16A B17E, B27C, B28H, B17I, B17B, B17G, B27K, e B18K que ainda se encontravam em fase exponencial de crescimento, às 48 h de incubação. Após 72 h do início do processo, o crescimento celular dos isolados, em geral, se manteve estacionado. Resultado similar foi verificado por Pantaroto (2001) em relação à linhagem de *Bacillus* sp. B6 que apresentou crescimento exponencial nas primeiras 24 h de cultivo em manipueira, seguida por fase estacionária e tendência ao declínio após 5 e 6 dias de incubação.

Apesar da manipueira ser fonte de carbono interessante para utilização como substrato em processos fermentativos para produção de enzimas, a suplementação nutricional desse resíduo para tais fins, parece ser recomendável para estender a fase exponencial de crescimento microbiano e promover uma produção de enzimas compatível à obtida com meios sintéticos. Isso foi verificado por Sugumaran et al. (2013) que obtiveram aumento da produção de pectinase por *B. subtilis* quando enriqueceu o meio de cultivo contendo bagaço de mandioca com diferentes fontes de nitrogênio (triptona, extrato de carne e extrato de levedura). De toda forma, isolados bacterianos promissores para produção de amilase, pectinase e xilanase sob cultivo em manipueira foram revelados pelo presente estudo, contribuindo para que novas abordagens tecnológicas, incluindo a otimização de processos fermentativos, sejam exploradas a fim de ampliar as vantagens do uso desse resíduo como fonte de carbono renovável e economicamente viável.

Figura 5. Cinética do crescimento dos potenciais isolados bacterianos produtores das enzimas em meio contendo apenas manipueira. As linhas pontilhadas representam a tendência da relação entre crescimento e tempo de incubação.



CONCLUSÕES

O resíduo gerado do processamento da mandioca para produção de farinha manipueira foi uma fonte de bactérias com capacidade metabólica para utilizar o próprio resíduo como única fonte de carbono, permitindo a produção de enzimas. Pelo menos 60,46 % dos isolados bacterianos obtidos de amostras de manipueira foram capazes de produzir amilase, pectinase e xilanase. Destaques para os isolados B26 como melhor produtor de amilase (2,49 UI mL⁻¹), ao final de 72 h de cultivo; B17A como melhor produtor de pectinase (2,53 UI mL⁻¹), às 24 h de cultivo; B18G como melhor produtor de xilanase (2,38 UI mL⁻¹), às 48 h de cultivo. A densidade celular dos isolados bacterianos, ao longo do processo fermentativo, indicou a não necessidade de suplementação de nutrientes ao meio de cultivo microbiano em manipueira.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), à Secretaria do Meio Ambiente do Estado da Bahia (SEMA) e à Universidade Federal da Bahia (UFBA) pelo financiamento de estudos e projetos.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO de, N.C. et. al. Problemática dos resíduos líquidos das agroindústrias processadoras de raízes de mandioca no Estado da Paraíba. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 2, p. 258-262, 2012. Disponível em: <<http://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/1281/1261>> Acesso em: 11 de Maio de 2017.
- ATTRI, S.; GARG, G. Isolation of microorganisms simultaneously producing xylanase, pectinase and cellulase enzymes using cost effective substrates. **Journal of Innovative Biology**, v. 1, n. 1, p. 045-050, 2014. Disponível em: <<http://citeserx.ist.psu.edu/viewdoc/download?>> Acesso em: 07 de Julho de 2017.
- BARROS, Francisco Fábio Cavalcante et al. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Food Science and Technology** (Campinas), 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000400034>. Acesso em: 13 de Junho de 2017.
- BEZERRA, M.S. et. al. Produção de biotensoativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (p.a.) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. **Holos**, n. 28, v. 1, 2012. Disponível em: DOI: <<https://doi.org/10.15628/holos.2012.838>>. Acesso em: 13 de Junho de 2017.
- BLANDINO, A. et. al. Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 497-503, 2001. Disponível em: DOI: <[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00241-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00241-2)>. Acesso em: 03 de Julho de 2017.
- CARVALHO, R.V. et. al. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n.2, p.380-386, 2008. Disponível em: DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000200017>. Acesso em: 01 de Julho de 2017.
- EL-SHISHTAWY, R.M. et. al. Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megatherium*. **BMC Biotechnology**, v. 24, p.14, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-29>>. Acesso em: 28 de Junho de 2017.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. Disponível em: <http://livraria.sct.embrapa.br/liv_resumos/pdf/00083136.pdf>. Acesso em: 20 de Agosto de 2017.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ . **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 85, 104-105, 741-746. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_sitory&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7>. Acesso em: 20 de Agosto de 2017.
- KUCZMAN, O. et. al. Produção específica de biogás a partir de manipueira em reator de fase única. **Engenharia Agrícola**, v. 31, p. 143-149, 2011. Disponível em: DOI: <<https://doi.org/10.1590/S0100-69162011000100014>>. Acesso em: 21 de Junho de 2017.
- LUPATINI, K.N. et. al. Proteína microbiana em biomassa residual de reatores anaeróbios para produção de hidrogênio a partir de resíduo líquido de fecularia. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 3, p. 52-66, 2013. Disponível em: DOI: <<http://dx.doi.org/10.5380/rber.v2i2.33808>>. Acesso em: 05 de Junho de 2017.
- MELO, J. et. al. Otimização operacional em planta piloto para a produção de biodiesel usando álcool proveniente de manipueira. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 8293-8300, 2015. Disponível em: DOI: <<https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-1163-20711-156353>>. Acesso em: 11 de Maio de 2017.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426-428, 1959. Disponível em: DOI: <<https://doi.org/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em: 19 de Abril de 2017.
- NAGAR, S. et. al. Production of alkali tolerant cellulase free xylanase in high levels by *Bacillus pumilus* SV-205. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 2, p. 414-420, 2012. Disponível em: DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.12.026>>. Acesso em: 16 de Maio de 2017.
- NEVES, O. S. C. et al. Persistência do cianeto e estabilização do pH em manipueira. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 1, 2014. Disponível em: DOI: <<https://doi.org/10.3895/S1981-36862014000100012>>. Acesso em: 20 de Agosto de 2017.
- PANTAROTO, S. **Isolamento, seleção, identificação e avaliação de microrganismos aeróbios in situ, com habilidade à biodegradação de linamarina**. 2001. 128f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) -Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/90544>>. Acesso em: 11 de Maio de 2017.

- PASTORE, N.S.; HASAN, S.M.; ZEMPULSKI, D.A. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. **Engevista**, v. 13, n. 3, p. 149-159, 2011. Disponível em: DOI: <<https://doi.org/10.22409/engevista.v13i3.306>>. Acesso em: 05 de Junho de 2017.
- PEREIRA, V.M. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012. Acesso em: 17 de Abril de 2017.
- RAHMANI, N. et al. Optimization of production xylanase from marine bacterium *Bacillus safensis* P20 on sugarcane bagasse by submerged fermentation. **International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology**, v. 4, n. 6, p. 419-422, 2014. Disponível em: DOI: <<https://doi.org/10.18517/ijaseit.4.6.458>>. Acesso em: 15 de Julho de 2017.
- SAHA, K. et. al. Optimization of amylase production from *B. amyloliquefaciens* (MTCC 1270) using solid-state fermentation. **International journal of microbiology**, v. 2014, p.7 2014. Disponível em: DOI: <<https://doi.org/10.1155/2014/764046>>. Acesso em: 28 de Junho de 2017.
- SUGUMARAN, K.R. et. al. Cassava bagasse-low cost substrate for thermo-tolerant xylanase production using *Bacillus subtilis*. **International Journal of Chem Tech Research**, v. 5, p. 394-400, 2013. Disponível em: <[http://sphinxsai.com/2013/janmar/chempdf/CT=56\(394-400\)JM13.pdf](http://sphinxsai.com/2013/janmar/chempdf/CT=56(394-400)JM13.pdf)>. Acesso em: 15 de Julho de 2017.
- SUMAN, P. A. et. al. Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). **Acta Scientiarum**, v. 33, n. 4, p. 379-384, 2011. Disponível em: DOI: <<http://dx.doi.org/10.4025/actascitechnol.v33i4.9279>>. Acesso em: 05 de Junho de 2017.
- TEIXEIRA, I. A. L. et al. Isolamento e seleção de bactérias produtoras de amilase e pectinase sob fermentação submersa. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 11, n. 1, p. 2227-2244, 2017. Disponível em: DOI: <<https://doi.org/10.3895/rbta.v11n1.2847>>. Acesso em: 21 de Junho de 2017.
- TEPE, O.; DURSUN, A.Y. Exo-pectinase production by *Bacillus pumilus* using different agricultural wastes and optimizing of medium components using response surface methodology. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 16, p. 9911-9920, 2014. Disponível em: DOI: <<https://doi.org/10.1007/s11356-014-2833-8>>. Acesso em: 16 de Maio de 2017.
- UNAKAL, C.; KALLUR, R.I.; KALIWAL, B.B. Production of α -amylase using banana waste by *Bacillus subtilis* under solid state fermentation. **European Journal of experimental Biology**, v. 2, p. 1044-1052, 2012. Disponível em: <<http://www.imedpub.com/articles/production-of-amylase-using-banana-waste-by-bacillus-subtilis-under-solidstate-fermentation.pdf>>. Acesso em: 29 de Junho de 2017.
- VASCONCELLOS, S.P. et. al. In vitro degradation of linamarin by microorganisms isolated from cassava wastewater treatment lagoons. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 879-883, 2009. Disponível em: DOI: <<https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000400019>>. Acesso em: 11 de Maio de 2017.
- VIJAYABASKAR, P.; JAYALAKSHMI, D.; SHANKAR, T. Amylase production by moderately halophilic *Bacillus cereus* in solid state fermentation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 23, p. 4918-4926, 2012. Disponível em: DOI: <<https://doi.org/10.5897/AJMR11.1310>>. Acesso em: 16 de Maio de 2017.
- ZEMPULSKI, D.A. **Produção de ácidos graxos voláteis por fermentação anaeróbia de manipueira e de permeado de soro de queijo**. 2013. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2013. Disponível em: <<http://tede.unioeste.br/handle/tede/1913#preview-link0>>. Acesso em: 05 de Junho de 2017.
- ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 8, p. 825-830, 2000. Disponível em: DOI: <[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00143-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00143-0)>. Acesso em: 03 de Julho de 2017.