



ARTIGO

Efeito das condições de cultivo na produção de amilase por duas linhagens de leveduras

Crislane Maria da Silva Bastos^{1*}, Samira Tenório Cavalvante Costa¹, Thiago Lucas de Abreu-Lima³, Abraham Damian Giraldo Zuniga⁴ e Solange Cristina Carreiro²

Recebido: 18 de fevereiro de 2014 Recebido após revisão: 1 de junho de 2015 Aceito: 10 de julho de 2015
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2947>

RESUMO: (Efeito das condições de cultivo na produção de amilase por duas linhagens de leveduras). O efeito da temperatura, pH e concentração de CaCO_3 na produção de α -amilase e glicoamilase pelas linhagens de leveduras AC1 e L15 foi avaliado utilizando-se um Delineamento Composto Central Rotacional, associado a metodologia de superfície de resposta. As linhagens de levedura utilizadas foram capazes de produzir apenas α -amilase. As melhores condições de produção de α -amilase pela linhagem AC1 ocorreram na faixa de temperatura de 25 a 36 °C e pH de 5,4 a 6,6. Para a linhagem L15, ocorreram na faixa de temperatura de 28 - 39,5 °C, pH 4,6 a 5,9 e concentração de carbonato de cálcio de 0,3% a 0,5%. O pH foi o parâmetro que mais influenciou a produção de amilase pela linhagem AC1, já a produção de amilase pela linhagem L15 foi influenciada intensamente pela concentração de íons de cálcio.

Palavra-chave: agroenergia, enzima, metodologia de superfície de resposta.

ABSTRACT: (Effect of culture conditions on amylase production by two yeast strains). The effect of temperature, pH and CaCO_3 levels on α -amylase and glucoamylase production by yeast strains AC1 and L15 was assessed using a rotatable central composite design associated with the response surface methodology. Both yeast strains were able to produce only α -amylase. Optimal conditions for α -amylase production were at the 25 - 36 °C temperature range and 5.4 - 6.6 pH range for the AC1 strain; and at the 28 - 39.5 °C temperature range, 4.6 - 5.9 pH range and 0.3 - 0.5 % CaCO_3 concentration range for the L15 strain. The pH was the parameter that most influenced amylase production by AC1, while calcium ion concentration was the one that most exerted such influence on L15.

Keywords: agroenergy, enzyme, response surface methodology.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a utilização da biomassa como fonte de energia renovável para produção de biocombustíveis tem recebido crescente atenção devido aos problemas ambientais e geopolíticos decorrentes da utilização de combustíveis fósseis. Uma das aplicações mais importantes da biomassa energética é a produção de etanol (Sachs 2005; Lin & Tanaka 2006).

No Brasil, a cana-de-açúcar é a matéria-prima mais utilizada para a obtenção de etanol (Lora & Andrade 2009). No entanto, outras matérias-primas, como aquelas ricas em amido, podem ser utilizadas e tornam-se fundamentais diante da necessidade de diversificação de fontes energéticas para a produção de etanol. Nesse contexto, o Brasil se sobressai devido à grande extensão territorial e a diversidade de solo e clima do país que são propícios para a agricultura de energia (Goldemberg & Moreira 2005; Silveira *et al.* 2007).

A preocupação com questões ambientais, com a qualidade dos produtos e com o consumo de energia vem incentivando vários setores industriais a buscar tecnologias mais limpas e eficientes. No contexto da

produção de etanol a partir de fontes amiláceas, a tecnologia enzimática por processos biocatalisados surgiu como alternativa para a substituição gradual de processos químicos (Bon *et al.* 2008).

As amilases (α -amilases e glicoamilases) representam um dos mais importantes grupos de enzimas dentro do campo da biotecnologia. Estas enzimas têm numerosas aplicações industriais e biotecnológicas, incluindo a sua utilização na sacarificação do amido para produção de etanol (Rodríguez *et al.* 2006).

O amido é um constituinte de inúmeras matérias-primas agrícolas e um substrato conveniente para produção de etanol. No entanto, os processos para a produção de etanol a partir dessa fonte carecem de melhorias tecnológicas que levem ao aumento do rendimento e viabilidade econômica, principalmente no que se refere a reduções nos custos associados ao uso/produção de enzimas, que influenciam diretamente no custo final do biocombustível (Castro *et al.* 2011).

As leveduras tem sido utilizadas na fabricação de pães, cerveja e vinhos desde tempos remotos, sendo seu papel na fermentação reconhecido por Pasteur no final do século 19. Desde então, a utilização de leveduras como

1. Mestre em Agroenergia, Universidade Federal do Tocantins. Palmas, Tocantins, Brasil.

2. Professor Associado I, Laboratório de Microbiologia Aplicada, Universidade Federal do Tocantins. Palmas, Tocantins, Brasil.

3. Professor Adjunto I, Laboratório de Cinética e Modelagem de Processos, Universidade Federal do Tocantins. Palmas, Tocantins, Brasil.

4. Professor Associado I, Laboratório de Separação de Biomoléculas e Desidratação de Alimentos, Universidade Federal do Tocantins. Palmas, Tocantins, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: crislane@uft.edu.br

culturas iniciadoras tem sido um padrão na fermentação industrial, não apenas para alimentos e bebidas, mas também em uma grande variedade de produtos das indústrias química, farmacêutica, de enzimas e bioetanol (Satyanarayana & Kunze 2009).

Por serem facilmente manipuladas geneticamente e consideradas excelentes hospedeiros para expressão de proteínas recombinantes em função de sua fácil manipulação e cultivo, podem ser utilizadas em inúmeros setores da biotecnologia, da bioenergia e farmacêutica à biorremediação e proteção ambiental (Satyanarayana & Kunze 2009). Embora muitos açúcares possam ser fermentados e assimilados pelas leveduras, a capacidade para degradar amido não é uma característica comum entre elas. No entanto, leveduras capazes de degradar amido têm sido consideradas microrganismos promissores na conversão de matérias primas amiláceas em *single cell protein* (SCP) e etanol, hidrolisando o amido e fermentando os sacarídeos liberados simultaneamente (Satyanarayana & Kunze 2009).

Dessa maneira, o estudo da capacidade amilolítica desses microrganismos representa um importante avanço no conhecimento das possibilidades de aplicação de seu potencial para produção de enzimas de interesse industrial, como as amilases. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito das condições de cultivo para produção de α -amilase e glicoamilase pelas linhagens de leveduras AC1 e L15.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMA/UFT) e no Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC/UFT), ambos da Universidade Federal do Tocantins (UFT).

Linhagens Utilizadas

Foram utilizadas neste trabalho duas linhagens de leveduras (AC1 e L15), isoladas de variedades de batata-doce (*Ipomea batatas* Lam), provenientes de estudos de seleção de leveduras amilolíticas, realizados no LAMA/UFT e no LABIOTEC/UFT.

Durante a execução dos experimentos as linhagens foram preservadas em GYMP líquido com glicerol 60% à razão de 3:1 (biomassa:glicerol 60%) e mantidas a -20 °C.

Obtenção do Pré-Inóculo

As linhagens foram reativadas a 26 °C por 48 h em meio Ágar Sabouraud-glicose (2% de glicose; 1% peptona; 0,5% de extrato de levedura; 1,8% de ágar; 0,02% de cloranfenicol), pela técnica de estriamento.

As linhagens reativadas foram inoculadas em caldo Sabouraud-glicose e incubadas a 28 °C a 160 rpm durante 24 h. Após a incubação, a biomassa foi separada por centrifugação a 1.400 g por 20 min, e ressuspendida em tampão acetato de sódio 0,5 mol/L estéril, conforme pH de cada ensaio.

Para estimativa de biomassa úmida, 1 mL do meio foi transferido para microtubos previamente pesados,

os tubos foram submetidos a centrifugação de 12.700 g por 5 min, o sobrenadante foi drenado e os tubos com as células foram pesados novamente. A biomassa (g.L^{-1}) foi o resultado da diferença entre o peso final e inicial dos tubos, dividida pelo volume centrifugado (Costa 2010). Foi adicionada biomassa úmida na concentração de 20 g/L em cada ensaio para produção de amilase.

Fermentação Submersa para produção de Amilase

Com a finalidade de avaliar o efeito das variáveis na produção de amilase foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), por meio de um esquema fatorial completo 2^3 , com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 17 ensaios, de acordo com Rodrigues & Iemma (2005).

Para os ensaios de produção de amilase, a levedura foi cultivada em 50 mL de meio líquido contendo 0,5% de amido solúvel e 0,5% de extrato de levedura, como parâmetros fixos. Os meios foram aquecidos para gelatinização do amido e em seguida foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min.

Os frascos foram incubados em banhos termostáticos sem agitação sob diferentes condições de temperatura, pH e concentração de carbonato de cálcio (CaCO_3), conforme o planejamento experimental proposto (Tab. 1).

Os ensaios foram conduzidos por 144h. Em intervalos de 24 h foram colhidas amostras de 2 mL para acompanhamento do consumo de amido e determinação de células viáveis. Os extratos brutos do tempo de incubação de 144 h foram utilizados para medida de atividade enzimática. Os extratos brutos obtidos em cada intervalo de incubação foram armazenados sob refrigeração a 4 °C.

Medida da atividade amilásica extracelular

Para determinação da atividade enzimática, a reação consistiu em acrescentar 40 μL de tampão acetato de sódio (0,5 mol/L, pH 5,5) e 60 μL de extrato bruto enzimático em 100 μL de solução de amido 0,5% (p/v). A mistura foi incubada a 40 °C por 60 min (Galdino 2008).

A atividade amilásica foi determinada pela ação dextrinizante por α -amilase, baseada na variação da intensidade da cor do complexo iodo-amido (Fuwa 1954). A ação sacarificante da glicoamilase foi determinada por dois métodos: dosagem de açúcares redutores (Miller 1959) e dosagem de glicose liberada através do método da glicose oxidase, utilizando um kit comercial (LabTest®).

Análise do Efeito das Variáveis

Por meio de um Delineamento Composto Central Rota-

Tabela 1: Variáveis e níveis estudados no Delineamento Composto Central Rotacional para a produção de amilase pelas linhagens L15 e AC1.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura (°C)	24	27,3	32	36,8	40
pH	4,5	4,9	5,5	6,1	6,5
CaCO_3 (% p/v)	0	0,1	0,25	0,4	0,5

cional, composto de um fatorial completo 2^3 , incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, associado à Metodologia de Superfície de Resposta, foram avaliados os efeitos da concentração de íons de cálcio (CaCO_3), temperatura e pH (Tab. 1), sobre a produção das enzimas (Rodrigues & Iemma 2005).

Os resultados obtidos no delineamento experimental foram avaliados por meio da Metodologia de Superfície de Resposta e Análise de Variância (ANOVA), utilizando-se o programa *Statistica 10 trial*¹.

RESULTADOS

O planejamento experimental completo 2^3 foi realizado para avaliar o efeito de três variáveis independentes (concentração de CaCO_3 , pH e temperatura) na produção de amilase pelas linhagens de levedura, tendo como resposta as atividades de α -amilase e glicoamilase.

A atividade de glicoamilase não foi detectada nos testes de determinação dessa enzima. A Tabela 2 apresenta a atividade de α -amilase observados após 144h de fermentação nos 17 ensaios realizados com as linhagens AC1 e L15.

A linhagem AC1 apresentou maior atividade enzimática (0,934 U/mL) no ensaio 14, com pH 5,5, temperatura 32 °C e 0,5% de concentração de carbonato de cálcio. Já a linhagem L15 apresentou maior atividade enzimática (0,756 U/mL) no ensaio 7, com pH 4,9, temperatura 36,8 °C e 0,4% de concentração de carbonato de cálcio.

Os coeficientes de regressão para as duas linhagens foram determinados e estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. Para a linhagem AC1 (Tab. 3), os parâmetros significativos ($p < 0,05$) foram pH (linear e quadrático)

e temperatura (quadrático). O pH apresentou influência positivo na produção de amilase, enquanto a influência da temperatura foi negativa. A interação entre as variáveis não foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dentro da faixa estudada, indicando que a influência de cada uma das variáveis sobre a atividade enzimática é independente.

Para a linhagem L15 (Tab. 4), todos os parâmetros estudados foram significativos ($p < 0,05$), com exceção dos termos lineares para pH e temperatura e a interação da variável pH com a concentração de CaCO_3 . Ao contrário da linhagem AC1, a atividade enzimática da linhagem L15 foi sensível à variação da concentração de CaCO_3 , sofrendo influência positiva desta variável.

Foi possível elaborar modelos matemáticos de 2ª ordem com os coeficientes de regressão dos parâmetros significativos para as duas linhagens (Eq. 1 para a linhagem AC1 e Eq. 2 para a linhagem L15). Os coeficientes de regressão estatisticamente não significativos ($p < 0,05$) foram excluídos do modelo e incorporados no resíduo total.

Nas equações, as variáveis dependentes estão codificadas para melhor visualização. Dessa maneira, considera-se: $\text{pH} = X_1$; Temperatura = X_2 e $\text{CaCO}_3 = X_3$, e a variável independente está abreviada, Atividade Enzimática = AE.

$$AE \text{ (U/mL)} = 0,721 + 0,113X_1 - 0,070X_1^2 - 0,062X_2^2$$

Eq. (1)

$$AE \text{ (U/mL)} = 0,67 - 0,086X_1 - 0,073X_2^2 + 0,102X_3 - 0,052X_1X_2 + 0,1X_2X_3$$

Eq. (2)

Tabela 2: Produção de α -amilase pelas linhagens AC1 e L15 utilizando planejamento fatorial 2^3 completo.

Ensaios	Variáveis			Linhagem AC1	Linhagem L15
	pH	T (°C)	CaCO_3 (%)	Atividade de α -amilase (U/mL)	Atividade de α -amilase (U/mL)
1	4,9 (-1)	27,2 (-1)	0,1 (-1)	0,469	0,365
2	6,1 (+1)	27,2 (-1)	0,1 (-1)	0,846	0,483
3	4,9 (-1)	36,8 (+1)	0,1 (-1)	0,403	0,391
4	6,1 (+1)	36,8 (+1)	0,1 (-1)	0,587	0,136
5	4,9 (-1)	27,2 (-1)	0,4 (+1)	0,531	0,494
6	6,1 (+1)	27,2 (-1)	0,4 (+1)	0,701	0,402
7	4,9 (-1)	36,8 (+1)	0,4 (+1)	0,567	0,756
8	6,1 (+1)	36,8 (+1)	0,4 (+1)	0,665	0,623
9	4,5 (-1,68)	32 (0)	0,25 (0)	0,351	0,461
10	6,5 (+1,68)	32 (0)	0,25 (0)	0,777	0,409
11	5,5 (0)	24 (-1,68)	0,25 (0)	0,560	0,417
12	5,5 (0)	40 (+1,68)	0,25 (0)	0,613	0,527
13	5,5 (0)	32 (0)	0 (-1,68)	0,803	0,395
14	5,5 (0)	32 (0)	0,5 (+1,68)	0,934	0,649
15	5,5 (0)	32 (0)	0,25 (0)	0,708	0,664
16	5,5 (0)	32 (0)	0,25 (0)	0,718	0,675
17	5,5 (0)	32 (0)	0,25 (0)	0,721	0,667

Variáveis codificadas entre parênteses.

1. Disponível em <http://www.statsoft.com/support/free-statistica-10-trial>

Tabela 3: Coeficientes de regressão para produção de α -amilase pela linhagem AC1.

Parâmetro	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	T (7)	p-valor	Lim. Conf -95%	Lim. Conf +95%
Média*	0,721	0,039	18,260	0,000	0,627	0,814
pH (L)*	0,113	0,019	6,107	0,000	0,069	0,157
pH (Q)*	-0,070	0,020	-3,445	0,011	-0,119	-0,022
T (L)	-0,017	0,019	-0,934	0,381	-0,061	0,027
T (Q)*	-0,062	0,020	-3,047	0,019	-0,111	-0,014
CaCO ₃ (L)	0,028	0,019	1,505	0,176	-0,016	0,072
CaCO ₃ (Q)	0,038	0,020	1,842	0,108	-0,011	0,086
pH x T	-0,033	0,024	-1,370	0,213	-0,090	0,024
pH x CaCO ₃	-0,036	0,024	-1,506	0,176	-0,094	0,021
T x CaCO ₃	0,041	0,024	1,675	0,138	-0,017	0,098

*Parâmetros significativos a 95% de confiança; L, termos lineares; Q, termos quadráticos.

Tabela 4: Coeficientes de regressão para produção de α -amilase pela linhagem L15.

Parâmetro	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	T (7)	p-valor	Lim. Conf -95%	Lim. Conf +95%
Média*	0,670	0,031	21,659	<0,0001	0,596	0,743
pH (L)	-0,033	0,015	-2,261	0,058	-0,067	0,002
pH (Q)*	-0,086	0,016	-5,371	0,001	-0,124	-0,048
T (L)	0,026	0,015	1,756	0,122	-0,009	0,060
T (Q)*	-0,073	0,016	-4,555	0,003	-0,111	-0,035
CaCO ₃ (L)*	0,102	0,015	7,008	0,000	0,067	0,136
CaCO ₃ (Q)*	-0,049	0,016	-3,044	0,019	-0,087	-0,011
pH x T*	-0,052	0,019	-2,721	0,030	-0,096	-0,007
pH x CaCO ₃	-0,011	0,019	-0,583	0,578	-0,056	0,034
T x CaCO ₃ *	0,100	0,019	5,296	0,001	0,056	0,145

*Parâmetros significativos a 95% de confiança; L = termos lineares; Q = termos quadráticos

A validade do modelo foi então verificada pela Análise de Variância (ANOVA) apresentada nas Tabelas 5 e 6. Para a linhagem AC1, o coeficiente de determinação obtido foi de 70,6% e o F calculado para foi 2,73 vezes maior que o F tabelado, indicando que o modelo de segunda ordem é estatisticamente significativo ($p < 0,05$) pelo teste F. Para a linhagem L15, o F calculado foi 4,17 vezes maior que o tabelado. De acordo com Barros Neto *et al.* (2003, *apud* Severo Júnior 2007), quando a relação F_{calc}/F_{tab} for maior que 4, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo e preditivo.

Com os parâmetros significativos, pH e temperatura, obteve-se as superfícies de resposta e curvas de contorno

que descrevem o comportamento da linhagem AC1 na produção de α -amilase nas condições estudadas.

Analisando a superfície de resposta e a curva de contorno traçadas para a linhagem AC1 (Fig. 1A e 1B), é possível visualizar a área ótima de operação para produção de amilase na faixa de pH de 5,4 a 6,6 e temperatura de 25 a 36 °C. Analisando a superfície de resposta e curvas de contorno traçadas para a linhagem L15 (Fig. 2A e 2B), é possível observar que existe uma área ótima de operação para produção de amilase na faixa de pH de 4,6 a 5,9 e de temperatura de 28 a 39,5 °C. Dentro da área estudada, a faixa de interesse da concentração de CaCO₃ situa-se entre 0,3% a 0,5% (Fig. 3A e 3B).

Tabela 5: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes na produção de α -amilase pela linhagem AC1.

Fonte de Variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{cal}	F _{tab} *
Regressão	0,2767	3	0,09223	10,43	3,81
Resíduos	0,1150	13	0,00884		
Total	0,3917	16			

R²=70,60%

Tabela 6: Análise de variância no estudo do efeito das variáveis independentes na produção de α -amilase pela linhagem L15.

Fonte de Variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{cal}	F _{tab} *
Regressão	0,356956	6	0,05949	13,44	3,22
Resíduos	0,04427	10	0,00443		
Total	0,40123	16			

R²=88,97%

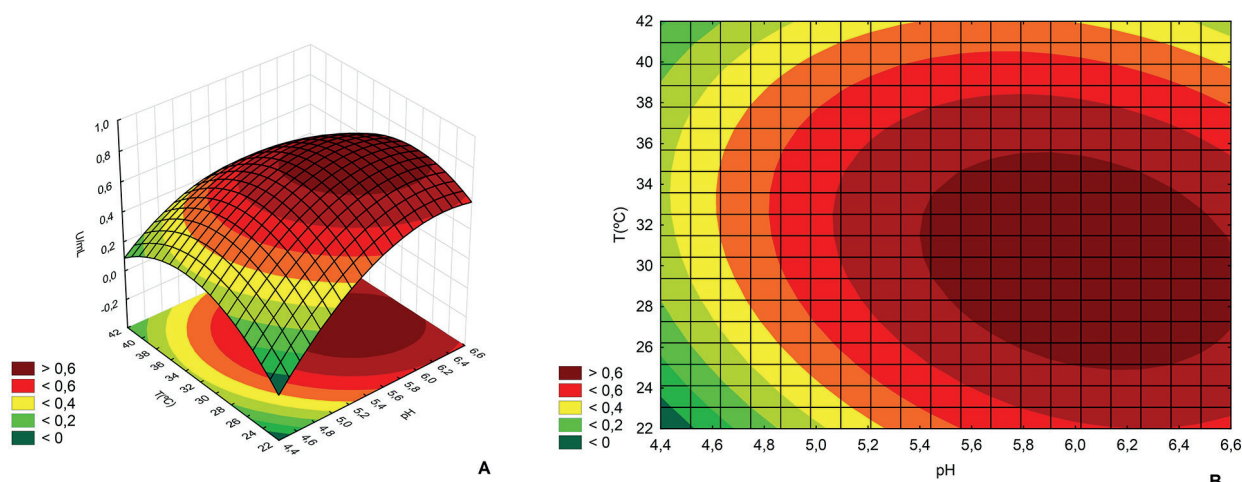


Figura 1. Produção de amilase pela linhagem AC1 em função do pH e da temperatura. A. Superfície de resposta. B. Curvas de contorno.

DISCUSSÃO

Os cultivos das linhagens de levedura não apresentaram atividade de glicoamilase, porém apresentaram atividade de α -amilase em valores compatíveis com os relatados por outros pesquisadores. Linhagens da levedura *Cryptococcus flavus* produziram apenas α -amilase (Iefugi *et al.*, 1996; Wanderley *et al.*, 2004), as leveduras *Aureobasidium pullulans*N13d e *Pichia subpelliculosa* ABWF-64 secretaram apenas glicoamilase (Li *et al.* 2007, Kumar & Satyanarayana 2001).

Wanderley *et al.* em 2004 observou atividade amilolítica extracelular de 0,25 U/mL de no cultivo de uma linhagem de *C. flavus*. Esta atividade é mais baixa que todas as obtidas no presente trabalho, com exceção do ensaio 4 com a linhagem L15 (0,136 U/mL).

A atividade de α -amilase (0,78 U/mL) produzida por uma linhagem de *D. occidentalis* utilizada no trabalho de Ghang *et al.* (2007) está próxima da observada com a linhagem L15 (0,756 U/mL) utilizada neste trabalho. A maior atividade apresentada pela linhagem AC1 (0,934 U/mL) é próxima à apresentada uma linhagem de *Sac-*

charomyces cerevisiae recombinante (0,95 U/mL) no trabalho de Yamada *et al.* (2009).

Culturas bacterianas, principalmente do gênero *Bacillus*, são as mais utilizados atualmente na produção industrial de α -amilase, por apresentarem maiores atividades de α -amilase (Konsula & Liakopoulou-kyriakides 2004, Gangadharan *et al.* 2008, Kar & Ray 2009, Sumrin *et al.* 2011).

Nos ensaios com a linhagem L15, o efeito da concentração de CaCO_3 , bem como a interação entre a concentração deste sal e da temperatura influenciaram positivamente a atividade enzimática. No entanto, para verificação e validação desse indicativo são necessários delineamentos subsequentes com valores das variáveis independentes em faixas mais altas que as estudadas neste trabalho.

Os íons cálcio têm demonstrado capacidade de estabilizar a estrutura terciária da α -amilase frente ao incremento de temperatura (Souza & Magalhães 2010), e consequentemente aumentar a atividade enzimática dessa enzima no cultivo de microrganismos (Teodoro & Martins 2000, Konsula & Liakopoulou-kyriakides 2004).

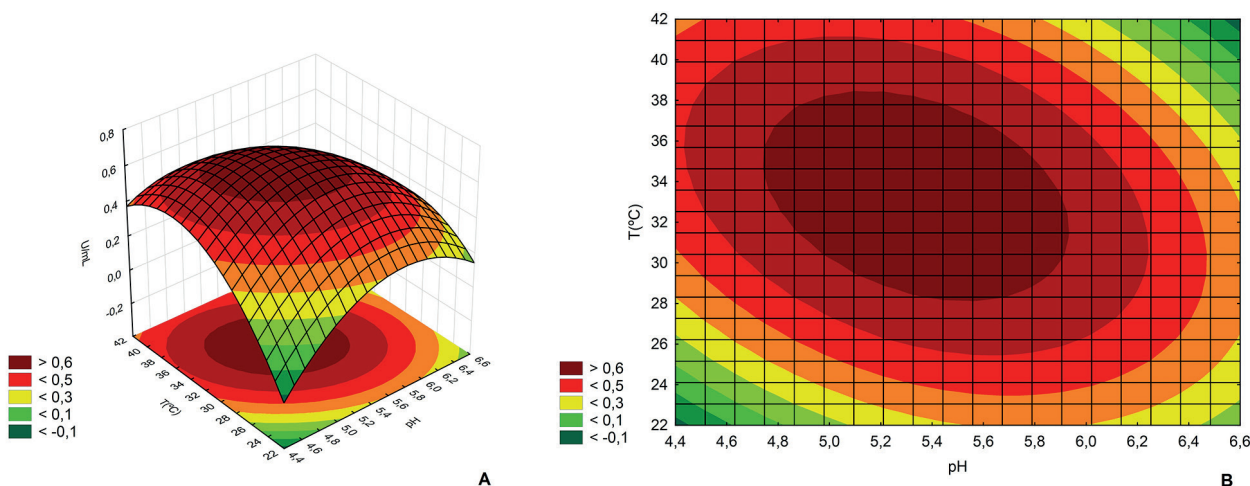


Figura 2. Produção de amilase pela linhagem L15 em função do pH e da temperatura. A. Superfície de resposta. B. Curvas de contorno.

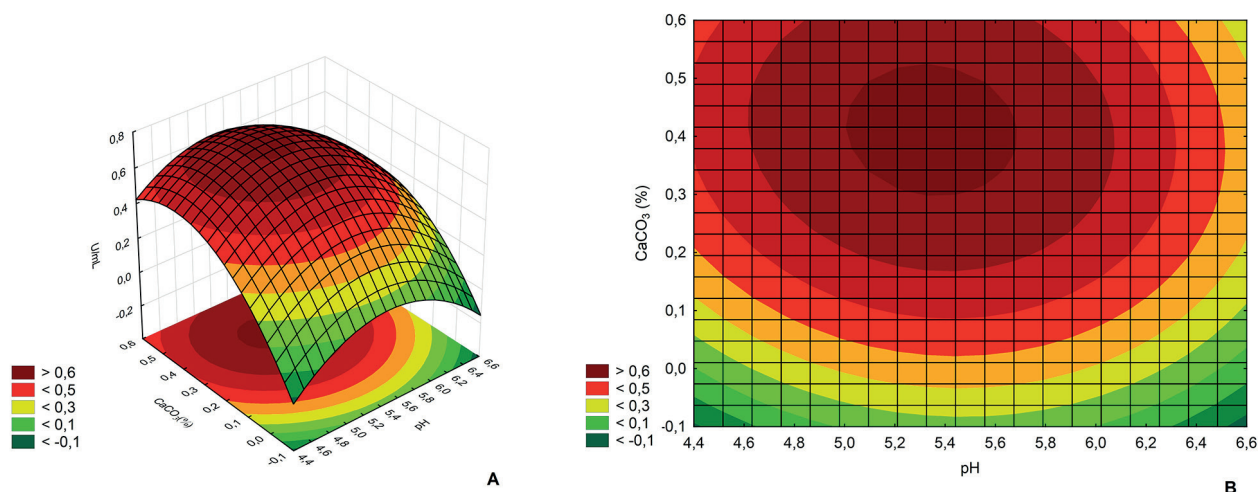


Figura 3. Produção de amilase pela linhagem L15 em função da concentração de CaCO₃ e pH. A. Superfície de resposta. B. Curvas de contorno.

As variáveis pH e temperatura, assim como a interação entre essas variáveis, influenciaram negativamente a atividade enzimática, indicando que o aumento simultâneo do valor dessas variáveis pode levar ao decréscimo na atividade enzimática.

Efeito semelhante sobre a produção de enzima foi relatada por Burket *et al.* (2006), na produção de inulase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 e por Fleuri (2006) na produção de protease pela linhagem bacteriana B26.

A obtenção de uma faixa ótima das variáveis é mais relevante do que um valor pontual, pois ele fornece informação sobre a robustez do processo (Rodrigues & Iemma 2005). No caso deste trabalho, a faixa ótima operacional para a linhagem AC1 seria temperatura entre 26 e 37 °C e pH entre 4,4 e 5,6.

As faixas ótimas de valores de pH e temperatura observadas nas duas linhagens podem estar relacionadas com as condições ótimas de crescimento celular para a maioria das leveduras: pH próximo a neutralidade a levemente ácido e temperatura entre 28 e 38 °C (Reguly 1998, Deak 2006).

Costa (2010) utilizou um planejamento fatorial 2³ com três repetições no ponto central, para avaliar o efeito da suplementação com carbonato de cálcio, sulfato de amônio e extrato de levedura na fermentação de amido solúvel para produção de amilase por leveduras selvagens. Assim como verificado no presente trabalho, a concentração ótima de carbonato de cálcio foi de 0,3%.

Embora a utilização da metodologia de superfície de resposta alcance resultados mais abrangentes e pertinentes, ela ainda é pouco utilizada para o estudo das condições de cultivo para produção de amilase por leveduras. Foi observada, na literatura, a utilização da técnica univariada para escolha dos melhores parâmetros para produção de amilase por leveduras (Buzzini & Martini 2002, Kumar & Satyanarayana 2001) ou apenas a utilização de condições fixas (Peixoto 2006, Bignell *et al.* 2000). A ferramenta permitiu estabelecer modelos estatisticamente válidos capazes de descrever as interações existentes entre as variáveis do processo e os resultados. O pH foi o parâmetro que mais influenciou a produção

de amilase pela linhagem AC1, já a produção de amilase pela linhagem L15 foi influenciada intensamente pela concentração de íons de cálcio.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro da CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R. E. 2003. *Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2. ed. Campinas: EDUNICAMP. 302 p.
- BIGNELL, G. R., BRUCE, I. J. & EVANS, I. H. 2000. Amylolytic enzymes of *Lipomyces starkeyi*: purification and size-determination. *Biotechnology Letters*, 22: 1713-1718. <<http://dx.doi.org/10.1023/A:1005692300345>>
- BON, E. P. S., PEREIRA JÚNIOR, N., GOTTSCHALK, L. M. F., SÁ-PEREIRA, P., ROSEIRO, J. C. & FERRARA, M. A. 2008. Bioprocessos para produção de Enzimas. In: BON, E. P. S., FERRARA, M. A. & CORVO, M. L. (Org.). *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência. p 95-118.
- BURKERT, J. F. M., KALIL, S. J., MAUGERI FILHO, F. & RODRIGUES, M. I. 2006. Parameters optimization for enzymatic assays using experimental design. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 23, (02): 163- 170. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66322006000200002>
- BUZZINI, P. & MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 1020-1025, 2002. <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01783.x>>
- CASTRO, A. M., CASTILHO, L. R. & FREIRE, D. M. G. 2011. An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non-conventional processes. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1(4):1-12. <<http://dx.doi.org/10.1007/s13399-011-0023-1>>
- COSTA, S. T. C. 2010. *Avaliação da produção de enzimas amilolíticas por leveduras isoladas da batata-doce (Ipomoea batatas (L.) Lam)*. 63f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia), Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2010.
- DEAK, T. Environmental factors influencing yeasts. 2006. In: ROSA, C. A. & PÉTER, G. (Org.). *The yeast handbook*. Disponível em: <<http://books.google.com>>. Acesso em: 17 out. 2011.
- FLEURI, L. F. *β -1,3 glucanases, proteases e quitinases: produção, purificação e aplicação*. 231f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- FUWA, H. 1954. A new method for microdetermination of amylase

- activity by the use of amylose as the substrate. *The Journal of Biochemistry*, 41: 583-603.
- GALDINO, A. S. 2008. *Clonagem e expressão de uma α -amilase de *Cryptococcus flavus* e sua aplicação na degradação do amido*. 2008. 149f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Molecular), Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- GANGADHARAN, D., SIVARAMAKRISHNAN, S., NAMPOOTHIRI, K. M., SUKUMARAN, R. K. & PANDEY, A. 2008. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresource Technology*, 99: 4597-4602. <http://dx.doi:10.1016/j.biortech.2007.07.028>
- GHANG, D. M., YU, L., LIM, M. H., KO, H., IM, S., LEE, H.B. & BAI, S. 2007. Efficient one-step starch utilization by industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the glucoamylase and α -amylase genes from *Debaryomyces occidentalis*. *Biotechnology Letters*, 29(8): 1203-1208. <http://dx.doi:10.1007/s10529-007-9371-0>
- GOLDEMBERG, J. & MOREIRA, J.R. 2005. Política energética no Brasil. *Estudos avançados*, 19(55): 215-228. <http://dx.doi:10.1590/S0103-40142005000300015>
- IEFUJI, H., CHINO, M., KATO, M. & IIMURA, Y. 1996. Raw-starch-digesting and thermostable α -amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. *Biochemical Journal*, 318: 989-996.
- KAR, S. & RAY, R. C. 2009. Statistical optimization of α -amylase production by *Bacillus brevis* MTCC 7521 in solid-state fermentation using cassava bagasse. *Biologia, Section Cellular and Molecular Biology*, 64(5):864-870. <http://dx.doi:10.2478/s11756-009-0160-1>
- KONSULA, Z. & LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. 2004. Hydrolysis of starches by the action of α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 39: 1745-1749. <http://dx.doi:10.1016/j.procbio.2003.07.003>
- KUMAR, S. & SATYANARAYANA, T. 2001. Medium optimization for glucoamylase production by a yeast, *Pichia subpelliculosa* ABWF-64, in submerged cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1): 83-87. <http://dx.doi: 10.1023/A:1016699314244>
- LI, H., CHI, Z., WANG, X., DUAN, X., MA, L. & GAO, L. 2007. Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1006-1012. <http://dx.doi:10.1016/j.enzmictec.2006.07.036>
- LIN, Y. & TANAKA, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology Biotechnology*, 69: 627-642. <http://dx.doi: 10.1007/s00253-005-0229-x>
- LORA, E. S. & ANDRADE, R. V. 2009. Biomass as energy source in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13: 777-788. <http://dx.doi:10.1016/j.bbr.2011.03.031>
- MILLER, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428.
- PEIXOTO, A. B. 2006. *Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil*. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- REGULY, J. C. 1998. *Biotechnologia dos processos fermentativos: Fermentações Industriais, biomassa celular*. Pelotas: Ed. Universitária/UFPel, p. 34 -41.
- RODRIGUES, M. I. & IEMMA, A. F. 2005. *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. Campinas: Casa do Pão Editora. 325 p.
- RODRÍGUEZ, V. B., ALAMEDA, E. J., GALLEGOS, J. F. M., REQUENA, A. R. & LÓPEZ, A. I. G. 2006. Enzymatic hydrolysis of soluble-starch with an α -Amylase from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Progress*, 22(3): 718-722. <http://dx.doi: 10.1021/bp060057a>
- SACHS, I. 2005. Da civilização do petróleo a uma nova civilização verde. *Estudos avançados*, 19(55): 197-214. <http://dx.doi:10.1590/S0103-40142005000300014>
- SATYANARAYANA, T. & KUNZE, G. 2009. *Yeast Biotechnology: Diversity and Application*. New Delhi: Springer Science. 744 p.
- SEVERO JUNIOR, J. P., OLIVEIRA, L. S. S., SARDEIRO, F. S., SOUZA, R. R., LOPES, F. L. G., SANTANA, J. C. C. & TAMBOURGI, E. B. 2007. Response surface methodology to evaluation the recovery of amylases by hollow fiber membrane. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(4), p. 713-718. <http://dx.doi:10.1590/S1516-89132007000400017>
- SILVEIRA, M.A., coord. 2007. *A Cultura da Batata-doce como fonte de matéria-prima para produção de etanol*: Boletim Técnico. Universidade Federal do Tocantins/LASPER. Palmas-TO. 64 p.
- SOUZA, P. M. & MAGALHÃES, P. O. 2010. Application of microbial α -amylase in industry - a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4): 850-861. <http://dx.doi: 10.1590/S1517-83822010000400004>
- STATISTICA 10 TRIAL. Disponível em: <http://www.statsoft.com/support/free-statistica-10-trial/>. Acesso em: 2 ago. 2011.
- SUMRIN, A., AHMAD, W., IJAZ, B., SARWAR, M. T., GULL, S., KAUSAR, H., SHAHID, I., JAHAN, S., ASAD, S., HUSSAIN, M. & RIAZUDDIN, S. 2011. Purification and medium optimization of α -amylase from *Bacillus subtilis* 168. *African Journal of Biotechnology*, 10(11): 2119-2129.
- TEODORO, C. E. S. & MARTINS, M. L. L. 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31 (4): 298-302. <http://dx.doi: 10.1590/S1517-83822000000400011>
- WANDERLEY, K. J., TORRES, F. A. G., MORAES, L. M. P. & ULHOA, C. J. 2004. Biochemical characterization of α -amilase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology Letters*, 231: 165-169. <http://dx.doi:10.1016/S03781097(03)00955-8>
- YAMADA, R., BITO, Y., ADACHI, T., TANAKA, T., OGINO, C., FUKUDA, H. & KONDO, A. 2009. Efficient production of ethanol from raw starch by a mated diploid *Saccharomyces cerevisiae* with integrated α -amylase and glucoamylase genes. *Enzyme and Microbial Technology*, 44: 344-349. <http://dx.doi:10.1016/j.enzmictec.2009.01.001>