



## Produção de amilases por levedura selvagem em resposta à diferentes condições de cultivo

Ana Letícia Silva Coelho<sup>a\*</sup>, Fernanda Oliveira Scariot<sup>b</sup>, Thiago Lucas de Abreu-Lima<sup>a</sup>, Solange Cristina Carreiro<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Tocantins, Brasil

<sup>b</sup> Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Mato Grosso, Brasil

\* Autor correspondente ([alscoelho@uft.edu.br](mailto:alscoelho@uft.edu.br))

### INFO

#### Keywords

central composite rotatable design  
enzyme  
Plackett Burman design  
response surface methodology  
starch

#### Palavras-chaves

delineamento composto central rotacional  
enzima  
delineamento de Plackett e Burman  
metodologia de superfície de resposta  
amido

### ABSTRACT

#### *Production of amylases by wild yeasts in response to different culture conditions*

Ethanol can be produced from several raw starch species, as well as from their wastes. Hence, in view of several raw material for ethanol production it is necessary to study and select wild microorganism strains, which demonstrate the ability to hydrolyze starch into fermentable sugars. Thus, the aim of this study was investigated, under submerged culture, the statistical effect of culture parameters on the amylases activity produced by wild yeasts, isolated from puba flour production. Plackett e Burman design (PB) was used to screen and evaluate the influence of temperature, initial pH, inoculum, starch, peptone and yeast extract concentrations on the enzyme activity. By PB results, it was observed that temperature, inoculum, and starch concentration showed significant influence ( $p < 0.10$ ) over process. Central Composite Rotatable Design (CCRD) showed that amylase activity is influenced by linear effect of temperature and soluble starch concentration ( $p < 0.05$ ). Finally, response surface methodology revealed that the optimum amylase activity could be obtained with increasing of starch concentration and temperature. Thus, the results obtained in the current study suggest that the amylases produced by the PB-34 strain have potential for future studies related with the production of ethanol from starchy materials.

### RESUMO

Etanol pode ser produzido a partir de diversas fontes amiláceas, bem como dos resíduos oriundos das mesmas. Assim, em vista da variedade de matéria-prima para produção de etanol, faz-se necessário estudar e selecionar linhagens de microrganismos selvagens que demonstrem a capacidade de hidrolisar o amido em açúcares fermentescíveis. Desta forma, o presente estudo consiste em investigar a influência de parâmetros de cultivo sobre a atividade de amilases, produzidas por leveduras isoladas do processamento de farinha de puba. O delineamento de Plackett e Burman (PB) foi aplicado com o intuito de selecionar e avaliar a influência da temperatura, do pH inicial e das concentrações de inóculo, amido, peptona e extrato de levedura sobre a atividade enzimática. Por meio dos resultados para tal delineamento, verificou-se influência estatisticamente significativa ( $p < 0,10$ ) da temperatura e das concentrações de amido e inóculo. Em relação aos resultados do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), observou-se que o efeito linear da temperatura e da concentração de amido foram significativos ( $p < 0,05$ ) sobre a atividade enzimática. Com a metodologia de superfície de resposta observou-se que a condição ótima para atividade da enzima amilase é obtida quando se aumenta a temperatura e a concentração de amido do meio. Assim, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que as amilases produzidas pela linhagem PB-34 apresentam potencial para estudos futuros visando a produção de etanol a partir de materiais amiláceos.

Received 12 February 2020; Received in revised from 24 June 2020; Accepted 24 July 2020

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o aumento da contaminação ambiental por CO<sub>2</sub> e as mudanças climáticas causadas por combustíveis fósseis, juntamente com o declínio das reservas de petróleo, levou governos e centros de pesquisa a desenvolver e produzir biocombustíveis (Viktor et al., 2013).

Nesse sentido, o amido, um dos polissacarídeos mais abundantes da natureza, tem sido amplamente aplicado na produção de bioetanol (Viktor et al., 2013). Para tal fim, pode-se empregar uma diversidade de matérias-primas, dentre as quais: amidos crus, tubérculos, raízes e grãos (Xu et al., 2016). Nos últimos, a comunidade científica do setor tem devotado atenção para a produção de bioetanol a partir de resíduos de materiais amiláceos, conforme observado nos estudos de Wang et al. (2016) e Pothiraj et al. (2015).

Em todos os casos, a adição de enzimas amilolíticas no meio de cultura faz-se necessária para liquefazer e sacarificar a matéria-prima convertendo o amido em açúcares fermentáveis, uma vez que os agentes de fermentação alcoólica não produzem amilases (Pothiraj et al., 2015). Segundo Galdino et al. (2011), considerando a variedade de materiais amiláceos, o estágio de liquefação requer amilases com propriedades únicas, por isso é frequentemente necessário buscar novas fontes desses biocatalisadores.

Portanto, o uso de leveduras como recursos biotecnológicos para produção de enzimas tem sido estimulado, pois estas oferecem certas vantagens, tais como temperatura moderada de crescimento, alta diversidade metabólica e rápido crescimento celular, o que resulta em ciclos de fermentação mais curtos e fácil adaptação a diferentes condições de cultivo. Além disso, esses microrganismos são excelentes hospedeiros para a expressão de proteínas recombinantes devido à sua fácil manipulação e cultivo (Oliveira et al., 2015).

Nesse ínterim, o crescimento de leveduras e a produção de enzimas são fortemente influenciados pelos parâmetros da cultura, e sua otimização é um critério importante para a eficácia do processo de produção, bem como para a estimativa de custos na produção em larga escala (Abdel-Rahman et al., 2016; Swetha et al., 2014).

Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi investigar as variáveis do processo que afetam a produção de amilases por isolados de levedura selvagem previamente selecionados. Os delineamentos estatísticos foram utilizados para otimizar as condições de cultura e maximizar a produção desses biocatalisadores.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismos

A levedura PB-34 empregada neste estudo foi isolada do processo de produção de farinha de puba, e é mantida na Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia Aplicada e do Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins.

A linhagem foi acondicionada em glicerol a -20°C, sendo reativada em ágar Sabouroud-glicose (2% de glicose (p/v); 1% de peptona (p/v), 1,8% de ágar (p/v), 0,5% extrato de levedura (p/v), cloranfenicol 0,02% (p/v)), à 25 ° C por 48 horas.

A capacidade amilolítica da linhagem foi testada previamente em meio sólido contendo: 1% de amido solúvel, 0,5% de extrato de levedura e 1,8% de ágar. A levedura foi inoculada na superfície do meio, e incubada por sete dias à 25°C. A produção de amilases foi expressa em Índice Enzimático (IE), que corresponde à razão dos diâmetros do halo de hidrólise e de crescimento da colônia do microrganismo. Os halos de hidrólise foram evidenciados após coloração do meio com solução de lugol, contendo 1,5% de iodeto de potássio e 3% de iodo conforme método relatado por Hankin e Anagnostakis (1975). O teste foi realizado em triplicata.

### Produção de amilases em cultura submersa

O pré-inóculo foi obtido por meio do cultivo da linhagem PB-34 em meio Sabouraud-glicose (5%), a qual foi incubada sob agitação (150 rpm), a 25°C por 24 horas. Em seguida, a biomassa obtida foi separada por centrifugação (10000 g/30 minutos) e ressuspendidas em 10 mL de água destilada estéril. A partir desta suspensão padronizou-se a concentração de inóculo, conforme as concentrações descritas nos Delineamento de Plackett e Burman (PB) e no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Os ensaios para produção de amilases foram conduzidos em frascos Erlenmeyer (250 mL) com 50 mL de meio líquido em diferentes faixas de pH, sendo estas, 3, 5 e 7 para PB e 3,5; 4,2; 5; 5,7 e 6,5 para DCCR, e diferentes concentrações de amido solúvel, peptona e extrato de levedura (segundo o planejamento experimental proposto)

Os frascos foram então incubados por 72 horas em banho-Maria sob diferentes condições de temperaturas 20, 35 e 50°C para PB e 30, 35, 40, 45 e 50°C para DCCR. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos, e o sobrenatante obtido (extrato bruto enzimático) foi empregado na quantificação da atividade amilolítica.

## Efeito das variáveis

O delineamento de Plackett e Burman proposto é composto por 12 condições experimentais, com três repetições no ponto central (0) e dois níveis axiais (-1 e +1), e visa avaliar a significância dos parâmetros de cultivo, temperatura, pH, concentração de inóculo, extrato de levedura, amido e peptona na atividade das amilases produzidas.

A análise estatística dos parâmetros usados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA,  $p < 0,10$ ). Posteriormente, as variáveis significativas para o delineamento de Plackett e Burman foram selecionadas e os componentes de cultivo relevantes foram empregados no projeto do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), sendo cada fator examinado em cinco níveis diferentes ( $-\alpha$ , -1, 0, +1,  $+\alpha$ ).

A análise estatística para DCCR foi realizada por meio de ANOVA ( $p < 0,05$ ), empregando-se o software R (R Development Core Team, 2011).

Em seguida, a superfície de resposta foi plotada para obtenção das condições ótimas de produção/atividade das amilases.

## Ensaio de atividade amilolítica

A atividade amilolítica foi determinada por meio da dosagem de grupos redutores liberados, empregando-se para tal fim o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). O protocolo experimental consistiu em misturar 500  $\mu\text{L}$  de enzima bruta (item produção de amilases em cultura submersa), à 500  $\mu\text{L}$  de solução de amido solúvel à 1% a pH 4,5, sendo a mistura resultante incubada em banho-Maria a 60°C por 30 minutos. Após isto, foi feita a adição de 4 mL de água destilada à solução formada por enzima e substrato. Alíquotas de 1 mL foram colhidas e acrescidas de 1 mL de solução DNS. A mistura formada foi mantida em ebulição por 5 minutos, resfriada em banho de água, e adicionada de 9,5 mL de água destilada para determinação da dosagem de açúcares redutores.

A absorbância do produto da reação entre o DNS e os açúcares redutores liberados no meio de cultura foi determinada espectrofotometricamente pelo espectrofotômetro BioSpectro a 540 nm.

A atividade enzimática foi expressa em Unidades Internacionais (U), sendo 1 U definida como a quantidade de enzima que leva à liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por mL por minuto ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sob reação condições testadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Produção de amilases em meio sólido

A linhagem PB-34 apresentou valores de IE variando de 2,1 a 2,5. Guedes et al. (2019), ressaltam que IE iguais ou maiores que 2, indicam atividade potencial de produção de enzimas.

Costa et al. (2011) avaliaram a atividade amilolítica de 16 linhagens de leveduras isoladas de diferentes cultivares de batata doce, empregando para tal fim amido solúvel, amido de milho e amido de mandioca. Os resultados obtidos corroboram com aqueles observados no presente estudo, sendo valor médio de  $\text{IE} \geq 2,1$  para todas as linhagens testadas sob diferentes condições de fonte de carbono.

Paludo et al. (2019) observaram que leveduras isoladas de folhas em decomposição foram capazes de hidrolisar amido solúvel em meio sólido com IE variando entre 1,37 e 4,55.

Por meio de tais dados, é possível inferir o potencial da linhagem PB-34 para estudos de produção de amilases em cultivo submerso.

### Produção de amilases sob fermentação submersa

A capacidade da levedura PB-34 para hidrolisar amido em condições de processo, segundo o delineamento de Plackett e Burman, é apresentada na Tabela 1. Os valores de atividade amilolítica variaram de 0,215  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  (experimento 1) a 0,61  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  (experimento 11). O efeito das variáveis para o delineamento de Plackett e Burman, bem como os coeficientes de regressão podem ser observados na Tabela 2. Os parâmetros temperatura, concentração de inóculo e amido foram estatisticamente significativos ( $p < 0,10$ ).

Os dados obtidos indicam que a concentração de amido solúvel e a temperatura tem efeito positivo sobre a atividade enzimática, enquanto a concentração de inóculo apresenta comportamento contrário. Ainda conforme os dados, a atividade máxima da amilase é obtida quando inóculo estiver em baixa concentração e as variáveis temperatura e concentração de amido estiverem em seus valores máximos, conforme delineamento proposto.

Tais resultados assemelham-se aquele reportado por Swetha et al. (2014), os quais demonstraram por meio do delineamento de PB que o aumento da produção de amilases pela linhagem *Piriformospora indica*, está condicionada ao aumento na concentração de amido solúvel. Ademais o efeito linear desta variável também foi o mais significativo (efeito = 4,9329) dentre os demais parâmetros, com a atividade da amilase variando de 0,2555 a 0,4554  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Tabela 1 - Resultado para produção de amilases pela linhagem PB-34 conforme delineamento estatístico de Plackett e Burman.

Ensaio	Inóculo (%)	Amido (%)	Peptona (%)	Extrato de levedura (%)	T (°C)	pH inicial	AE (U.mL <sup>-1</sup> )
1	10 (+1)	1 (-1)	1 (+1)	0 (-1)	20 (-1)	3 (-1)	0,215
2	10 (+1)	4 (+1)	0 (-1)	1 (+1)	20 (-1)	3 (-1)	0,502
3	5,5 (0)	4 (+1)	1 (+1)	0 (-1)	50 (+1)	3 (-1)	0,656
4	10 (+1)	1 (-1)	1 (+1)	1 (+1)	20 (-1)	7 (+1)	0,395
5	10 (+1)	4 (+1)	0 (-1)	1 (+1)	50 (+1)	3 (-1)	0,647
6	10 (+1)	4 (+1)	1 (+1)	0 (-1)	50 (+1)	7 (+1)	0,660
7	5,5 (0)	4 (+1)	1 (+1)	1 (+1)	20 (-1)	7 (+1)	0,617
8	5,5 (0)	1 (-1)	1 (+1)	1 (+1)	50 (+1)	3 (-1)	0,446
9	5,5 (0)	1 (-1)	0 (-1)	1 (+1)	50 (+1)	7 (+1)	0,450
10	10 (+1)	1 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	50 (+1)	7 (+1)	0,413
11	5,5 (0)	4 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	20 (-1)	7 (+1)	0,667
12	5,5 (0)	1 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	20 (-1)	3 (-1)	0,428
13	1 (-1)	2,5 (0)	0,5 (0)	0,5 (0)	35 (0)	5 (0)	0,565
14	1 (-1)	2,5 (0)	0,5 (0)	0,5 (0)	35 (0)	5 (0)	0,590
15	1 (-1)	2,5 (0)	0,5 (0)	0,5 (0)	35 (0)	5 (0)	0,548

AE- atividade enzimática

Tabela 2 - Coeficientes de regressão para produção de amilases pela linhagem PB-34 conforme delineamento estatístico de Plackett e Burman.

Variáveis	Estimativa	Erro Padrão	Pr(> t )
Intercepto*	0,5301	0,0135	1,98.e <sup>-10</sup>
Inóculo*	-0,0512	0,0174	0,0188
Amido*	0,01168	0,0146	4,39.e <sup>-5</sup>
Peptona	-0,0098	0,0146	0,5200
Extrato de levedura	0,0015	0,0146	0,9208
Temperatura*	0,0373	0,0146	0,0339
pH	0,0256	0,0146	0,1171

\*Variáveis estatisticamente significativas R<sup>2</sup> = 0,9117, R<sup>2</sup><sub>Adj</sub> = 0,8455

Andualem e Gessesse (2013) estudaram a atividade de amilases produzidas por leveduras selvagens, e observaram uma alta atividade enzimática quando a concentração de amido do meio variou de 1 a 3%. Por outro lado, os autores concluíram que na faixa de 4 a 9% da concentração do substrato amiláceo, a atividade enzimática foi levemente reduzida. Isso implica que a sobrecarga de nutrientes no meio de cultivo diminuiria a síntese de enzimas, o que pode ser atribuído à forte pressão osmótica causada pela elevada concentração de amido (Ray et al., 2013).

Na literatura (Lee, 1992) é relatado que a taxa máxima de reação enzimática é proporcional à concentração inicial de enzima. Assim, considerando os resultados estatísticos do delineamento de PB, pode-se inferir que os resultados obtidos com relação à concentração do inóculo estão relacionados à cinética microbiana.

Durante a fase de adaptação, que ocorre imediatamente após a inoculação do microrganismo no meio de cultura, a síntese enzimática é direcionada apenas para a metabolização de substratos. Por sua vez, na fase logarítmica, a composição do meio de cultura varia muito, devido ao crescimento e reprodução da cepa. Finalmente, na fase de morte, há uma depleção de nutrientes com acúmulo de inibidores enzimáticos. Isso levou à conclusão de que uma menor concentração de inóculo permite que a fase de retardo seja mantida por mais tempo, atrasando a fase de morte microbiana.

Ainda nesta abordagem, pode-se inferir que oscilações da temperatura entre os pontos máximo e mínimo pode ter dois efeitos antagônicos sobre a atividade das enzimas produzidas: (i) por um lado, o aumento da agitação das moléculas devido a elevação da temperatura, resultando em um maior número de colisões entre a enzima e o substrato; (ii) por outro lado, a desnaturação da enzima proteica, aumentando a vibração molecular, responsável pela quebra das ligações intramoleculares (Scriban, 1985; Amid et al., 2014).

Da mesma forma, as enzimas são muito sensíveis à concentração de H<sup>+</sup> no meio de reação, devido a grupos ionizáveis, que modificam os locais ativos nos quais ocorre a fixação do substrato (Scriban, 1985).

No que concerne aos parâmetros concentração de peptona e extrato de levedura, os mesmos não foram estatisticamente significativos, a peptona, todavia, foi mantida nos ensaios de CCRD com concentração fixa de 0,5%. Isto está relacionado com o fato de que dentre as fontes de nitrogênio, a

forma peptídica (peptona) é relatada como a mais positiva para o metabolismo das leveduras, induzindo maior biomassa e preservando a viabilidade das linhagens (Casey et al., 1984; Lei et al., 2012).

Ainda segundo Hashemi et al. (2015), durante um processo de cultivo as fontes de nitrogênio devem ser suficientes para suportar o crescimento dos microrganismos, enquanto o carbono seria direcionado majoritariamente para a geração de energia. Além disso, na presença de uma quantidade adequada de carbono e nitrogênio, as leveduras podem sintetizar todos os L-aminoácidos, os quais são empregados na síntese de proteínas (Divya e Padma, 2016).

Portanto, com o objetivo de determinar as condições mais apropriadas para a atividade da amilase pela linhagem PB-34, em cultivo submerso, as concentrações de inóculo e amido,

bem como o pH e a temperatura, foram selecionadas para os ensaios CCRD. Por meio da Tabela 3 é possível observar a matriz de projeto para CCRD e o efeito dos fatores experimentais na atividade da amilase.

A atividade máxima ( $1,14 \text{ U.mL}^{-1}$ ) da enzima foi obtida na condições do experimento 12 (pH 5,7,  $45^\circ\text{C}$  e 3,2% de concentração de inóculo e substrato), sendo a mínima atividade ( $0,333 \text{ U.mL}^{-1}$ ) observada para os parâmetros do ensaio 23.

Dentre os quatro parâmetros selecionados, o efeito linear da temperatura, a concentração de amido solúvel e a interação entre temperatura e carga do inóculo mostraram influência significativa ( $p < 0,05$ ) sobre a atividade da amilase (Tabela 4), com a concentração de amido (valor  $t = 13,04$ ) demonstrando efeito dominante comparativamente à temperatura (valor  $t = 2,070$ ) e o efeito da interação temperatura e inóculo (valor  $t = -2,296$ ).

Tabela 3 - Atividade da amilase produzida pela PB-34 segundo CCRD.

Ensaio	pH	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Inóculo (%)	Amido (%)	AE ( $\text{U.mL}^{-1}$ )
1	4,2(-1)	35(-1)	3,2(-1)	1,7(-1)	0,485
2	5,7(+1)	35(-1)	3,2(-1)	1,7(-1)	0,509
3	4,2(-1)	45(+1)	3,2(-1)	1,7(-1)	0,636
4	5,7(+1)	45(+1)	3,2(-1)	1,7(-1)	0,674
5	4,2(-1)	35(-1)	7,7(+1)	1,7(-1)	0,533
6	5,7(+1)	35(-1)	7,7(+1)	1,7(-1)	0,652
7	4,2(-1)	45(+1)	7,7(+1)	1,7(-1)	0,542
8	5,7(+1)	45(+1)	7,7(+1)	1,7(-1)	0,501
9	4,2(-1)	35(-1)	3,2(-1)	3,2(+1)	0,900
10	5,7(+1)	35(-1)	3,2(-1)	3,2(+1)	0,876
11	4,2(-1)	45(+1)	3,2(-1)	3,2(+1)	0,903
12	5,7(+1)	45(+1)	3,2(-1)	3,2(+1)	1,140
13	4,2(-1)	35(-1)	7,7(+1)	3,2(+1)	0,900
14	5,7(+1)	35(-1)	7,7(+1)	3,2(+1)	0,881
15	4,2(-1)	45(+1)	7,7(+1)	3,2(+1)	0,887
16	5,7(+1)	45(+1)	7,7(+1)	3,2(+1)	0,981
17	3,5(-2)	40(0)	5,5(0)	2,5(0)	0,779
18	6,5(+2)	40(0)	5,5(0)	2,5(0)	0,617
19	5(0)	30(-2)	5,5(0)	2,5(0)	0,719
20	5(0)	50(+2)	5,5(0)	2,5(0)	0,879
21	5(0)	40(0)	1(-2)	2,5(0)	0,803
22	5(0)	40(0)	10(+2)	2,5(0)	0,703
23	5(0)	40(0)	5,5(0)	1(-2)	0,323
24	5(0)	40(0)	5,5(0)	4(+2)	1,07
25	5(0)	40(0)	5,5(0)	2,5(0)	0,717
26	5(0)	40(0)	5,5(0)	2,5(0)	0,684
27	5(0)	40(0)	5,5(0)	2,5(0)	0,649

AE- atividade enzimática

Conforme mencionado anteriormente, o pH desempenha papel relevante na atividade das enzimas produzidas, além de acarretar em alterações na morfologia/metabolismo dos microrganismos e por consequência na secreção de enzimas. Assim, os resultados do presente estudo,

mostraram que em ambos os delineamentos estatísticos, o pH apresentou comportamento semelhante, sugerindo que a amilase resultante da cepa PB-34 pode ser empregada em processos produtivos realizados sob condições ácidas e neutras. Montgomery (2013) enfatiza que a

significância do modelo pode ser analisada por meio do pressuposto de normalidade e variância constante. Os resíduos do modelo ajustado (Figura 1.A – material suplementar), considerando as variáveis significativas na Tabela 4, não apresentaram padrões detectáveis, sendo validada a suposição de variância constante. No entanto, o gráfico probabilístico normal (Figura 1.B – material suplementar) mostrou que os resíduos apresentaram um padrão sigmóide no canto inferior esquerdo e no canto superior direito. Assim, o

termo interativo entre temperatura e concentração do inóculo foi removido do modelo e um novo teste foi realizado (Figuras 1C e 1D – material suplementar). O resultado foi mais adequado para a distribuição normal de resíduos. Além disso, foi aplicado o teste de normalidade Shapiro, obtendo-se um valor p de 0,5501 (valor p > 0,05), confirmando que os resíduos seguem a distribuição normal padrão, assumindo a qualidade do ajuste dos dados para os coeficientes de regressão dos resultados do CCRD.

Tabela 4 - Coeficientes de regressão para atividade de amilase produzida pela linhagem PB-34, conforme CCRD.

Variáveis	Estimativa	Erro padrão	t-value	Pr(> t )	-95% LC	+95% LC
Intercepto*	0,6833	0,0401	17,034	9,01.e <sup>-10</sup>	0,6118	0,7548
(1) pH (L)	0,0043	0,0141	0,306	0,7652	-0,0205	0,0296
pH (Q)	0,0059	0,0150	0,392	0,7020	-0,0209	0,0327
(2) Temperatura (L)*	0,0353	0,0141	2,491	0,0284	0,0100	0,0606
Temperatura (Q)	0,0031	0,0150	2,070	0,0606	0,0043	0,0579
(3) Inóculo (L)	-0,0185	0,0141	-1,310	0,2146	0,0430	0,0066
Inóculo (Q)	0,0196	0,0150	1,306	0,2161	-0,0071	0,0464
(4) Amido (L)*	0,1845	0,0141	13,014	1,95.e <sup>-8</sup>	0,1593	0,2098
Amido (Q)	0,0055	0,0150	0,367	0,7200	-0,0212	0,0323
1L X 2L	0,0142	0,0017	0,820	0,4280	-0,0167	0,0452
1L X 3L	-0,0076	0,0017	-0,439	0,6685	-0,0385	0,0233
1L X 4L	0,0092	0,0017	0,533	0,6041	-0,0217	0,0402
2L X 3L*	-0,0398	0,0017	-2,296	0,0405	-0,0708	-0,0089
2L X 4L	0,0011	0,0017	0,648	0,5294	-0,0197	0,0422
3L X 4L	-0,00058	0,0017	-0,338	0,7410	-0,0368	0,0250

LC – Intervalo de confiança

A partir dos dados observados na tabela 4 foi proposto um modelo matemático (equação 1) que descreve a atividade enzimática (EA) em função da concentração de amido e da temperatura, codificados como  $X_1$  e  $X_2$  respectivamente.

$$AE (U.mL^{-1}) = 0,6833 + 0,1845.X_1 + 0,0353.X_2 \quad (1)$$

O coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,8714$ ) apresentado na Tabela 5 indica que a equação 1 pode descrever satisfatoriamente os dados experimentais. Além disso, o valor de  $R^2$  ajustado ( $R^2_{ADJ}$ ) de 86,07% indica que o modelo é

significativo e há uma boa concordância entre os valores reais e previstos (Chupron et al., 2016).

Como observado na Figura 2 a condição ideal para a produção/atividade das amilases é obtida com o aumento da concentração de amido e da temperatura. No entanto, altas temperaturas podem ser prejudiciais ao crescimento celular da levedura PB-34, mesmo quando a concentração da fonte de carbono aumenta. Assim, é possível alcançar níveis mais altos de produção celular e atividade enzimática, mantendo a temperatura no ponto médio e aumentando a concentração de amido.

Tabela 5 - Resultados da análise de regressão para a atividade da amilase.

Parâmetros	GL	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Valor F	Pr(> F )
Regressão	2	0,84767	0,42383	81,324	<0,0001
Resíduos	24	0,12508	0,00521		

$R^2 = 0,8714$ ;  $R^2_{ADJ} = 0,8607$ ; GL - graus de liberdade

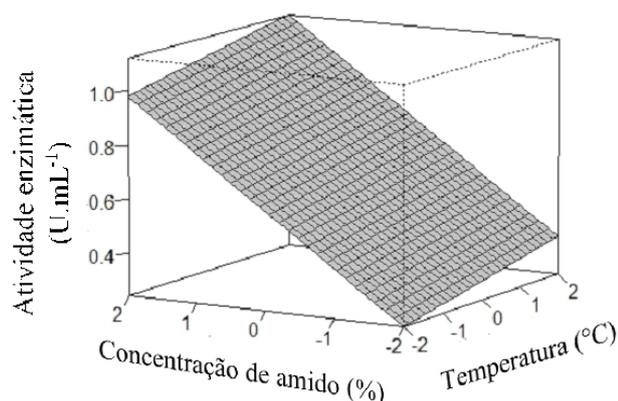


Figura 2 - Superfície de resposta para atividade de amilase conforme variação da concentração de amido e da temperatura.

## CONCLUSÕES

As variáveis temperatura, concentração de amido e inóculo apresentaram influência significativa ( $p < 0,1$ ) na atividade amilolítica para os experimentos realizados de acordo com o planejamento de PB. Para o desing CCDR os parâmetros significativos foram temperatura, concentração de amido e a interação entre a concentração de inóculo e a temperatura. Em relação ao ajuste do modelo, devido aos resultados do CCDR, a presença da interação invalidou o modelo matemático, pois não foi verificada a suposição de normalidade. Assim, o modelo foi ajustado apenas considerando a temperatura e a concentração de amido. Finalmente, as condições ideais de operação foram definidas com altas concentrações de fontes de carbono e condições de temperatura média.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Rahman ES, Abdel-Raheem HED, Ragab W. Optimization of  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase productions from some amyolytic yeast strains. *Pakistan Journal of Food Sciences*, v.26, n.4, p.187-197, 2016.
- Amid M, Manap A, Yazid M, Zohdi N. Optimization of processing parameters for extraction of amylase enzyme from dragon (*Hylocereus polyrhizus*) peel using response surface methodology. *The Scientific World Journal*, v.2014, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/640949>
- Anduaem B, Gessesse A. Isolation and identification of amylase producing yeasts in 'Tella' (Ethiopian local beer) and their amylase contribution for 'Tella' production. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, v.3, n.1, p.30, 2013.
- Casey GP, Magnus CA, Ingledew WH. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. *Applied and Environmental Microbiology*, v.48, n.3, p.639-646, 1984.
- Chupron J, Bovornreungroj P, Ahmad M, Kantachote D, Enomoto T. Statistical optimization for the improved production of an extracellular alkaline nuclease by halotolerant *Allobacillus halotolerans* MSP69: Scale-up approach and its potential as flavor enhancer of fish sauce. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.8, p.236-247, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cbac.2016.09.011>
- Costa STC, Abreu-Lima TL, Carreiro SC. Atividade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Revista Biociências*, v.17, n.2, 2011.
- Divya K, Padma PN. Screening of diverse organic and inorganic nitrogen sources for cold-active polygalacturonase and amylase production by *Geotrichum* sp using Plackett-Burman design. *International Journal for Technological Research in Engineering*, v.3, p. 875-878, 2016.
- Galdino AS, Silva RN, Lottermann MT, Álvares ACM, Moraes LMP, Torres FAG, Freitas SM, Ulhoa CJ. Biochemical and structural characterization of amyl 1: an  $\alpha$ -amylase from *Cryptococcus flavus* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Research*, v.2011, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/157294>
- Guedes EHS, de Almeida DT, Abreu-Lima TL, Carreiro SC. Atividade celulolítica de leveduras isoladas de frutos de palmeiras. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v.36, n.1, 2019. <http://dx.doi.org/10.5380/bceppa.v36i1.57644>
- Hankin L, Anagnostakis SL. Solid medium containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of microorganisms. *Microbiology*, v.98, n.1, p.109-115, 1977. <https://doi.org/10.1099/00221287-98-1-109>
- Hashemi M, Shojaosadati SA, Razavi SH, Mousavi SM. Different catalytic behavior of  $\alpha$ -amylase in response to the nitrogen substance used in the production phase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v.21, p.772-778, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.04.011>
- Lee JM. *Biochemical Engineering*. Englewood Cliffs: Prentice, NJ: Prentice Hall. 321p. 1992.
- Lei H, Zhao H, Yu Z, Zhao M. Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and formation of flavor volatiles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.166, n.6, p.1562-1574, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9560-8>.
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v.31, n.3, p.226-248, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Montgomery DC. *Design and analysis of experiments*. USA: John Wiley e Sons. 287p. 2013.
- Oliveira APA, Silvestre MA, Alves-Prado HF, Rodrigues A, Paz MF, Fonseca GG, Leite RSR. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. *African Journal of Biotechnology*, v.14, n.14, p.1215-1223,

2015.

<https://doi.org/10.5897/AJB2014.14062>

Paludo GB, de Abreu-Lima TL, Carreiro SC. Potencial enzimático de leveduras isoladas de folhas em decomposição. *Acta Tecnológica*, v.13, n.2, p.65-77, 2019.

<http://dx.doi.org/10.35818/acta.v13i2.666>.

Pothiraj C, Arun A, Eyinis M. Simultaneous saccharification and fermentation of cassava waste for ethanol production. *Biofuel Research Journal*, v.2, n.1, p.196-202, 2015.

<https://doi.org/10.18331/BRJ2015.2.1.5>

R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Ray RR, Dutta W, Sur D, Kundu A. Optimization of fermentation parameters for the production of extracellular endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase and endoxylanase by a chromium resistant strain of *Trichoderma pseudokoningii*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, v.3, n.1, p.54-58, 2013.

Scriban R. *Biocologia*. São Paulo: Manole. 488p. 1985.

Swetha S, Varma A, Padmavathi T. Statistical evaluation of the medium components for the production of high biomass,  $\alpha$ -amylase and protease enzymes by *Piriformospora indica* using Plackett–Burman experimental design. *3 Biotech*, v.4, n.4, p.439-445, 2014.

<https://doi.org/10.1007/s13205-013-0168-7>

Viktor MJ, Rose SH, Van Zyl WH, Viljoen-Bloom M. Raw starch conversion by *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Aspergillus tubingensis* amylases. *Biotechnology for Biofuels*, v.6, n.1, p.167-175, 2013.

<https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-167>.

Wang F, Jian Y, Guo W, Niu K, Zhang R, Hou S, Wang M, Yi Y, Zhu C, Jia C, Fang, X. An environmentally friendly and productive process for bioethanol production from potato waste. *Biotechnology for Biofuels*, v.9, n.1, p.50, 2016.

<https://doi.org/10.1186/s13068-016-0464-7>

Xu Q-S, Yan Y-S, Feng J-X. Efficient hydrolysis of raw starch and ethanol fermentation: a novel raw starch-digesting glucoamylase from *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology for Biofuels*, v.9, n.1, p.216-233, 2016.

<https://doi.org/10.1186/s13068-016-0636-5>