

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
MESTRADO EM BIOLOGIA GERAL/BIOPROSPECÇÃO

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM POTENCIAL
PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS**

ANA PAULA AGUERO DE OLIVEIRA

DOURADOS/MS

MARÇO/2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
MESTRADO EM BIOLOGIA GERAL/BIOPROSPECÇÃO

ANA PAULA AGUERO DE OLIVEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM POTENCIAL
PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS**

ORIENTADOR: Prof. Dr. RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Biologia Geral/Bioprospecção, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Biologia Geral área de concentração Bioprospecção.

DOURADOS/MS

MARÇO/2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da UFGD, Dourados, MS, Brasil

O482b Oliveira, Ana Paula Agüero de.
Bioprospeção de micro-organismos com potencial
para produção de enzimas amilolíticas / Ana Paula
Agüero de Oliveira. – Dourados, MS : UFGD, 2013.
64 f.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite.
Dissertação (Mestrado em Biologia
Geral/Bioprospeção) – Universidade Federal da Grande
Dourados.

1. Microorganismos. 2. Enzimas amilolíticas. I. Título.

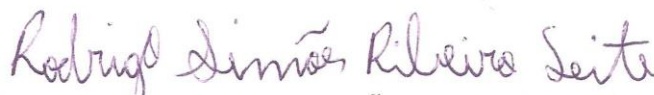
CDD: 576

“Bioprospecção de micro-organismos com potencial para produção de enzimas
amilolíticas”

Por

ANA PAULA AGUERO DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - Área de Concentração: “Bioprospecção”



PROF. DR. RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE
ORIENTADOR - UFGD



PROF^a. DR^a. GIOVANA CRISTINA GIANNESI
MEMBRO TITULAR – UFMS



PROF^a. DR^a. MARCELO FOSSA DA PAZ
MEMBRO TITULAR - UFGD

Aprovada em: 11 de Março de 2013

AGRADECIMENTOS

À Deus, por conceder mais essa vitória em minha vida, ter me abençoado e me iluminado em todos os momentos, a ele toda honra e toda glória.

Ao meu marido Jean e aos meus filhos Jean Lucas e Ana Julia, foi por vocês que cheguei até aqui e é por vocês que seguirei em frente.

Aos meus pais Quirino e Helena, saibam que não há ciência, graduação ou mestrado que possa ensinar os valores e princípios que vocês me deixaram como herança. Essas lições, nunca serão esquecidas.

A todos os meus familiares, em especial meu irmão Quirino Júnior, meu sogro Jorge e principalmente minha sogra Elizabete, por todo apoio e cuidado, por sempre se fazer presente em todos os momentos em que precisei.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, por todo conhecimento transmitido, por ter acreditado no meu potencial e ter me dado a oportunidade de trabalhar ao seu lado, por seu exemplo de dedicação, de doação, de dignidade pessoal e de amor ao próximo. A você, meu carinho, respeito e muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca, pela colaboração e apoio na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz, pela parceria, apoio e contribuição.

Aos amigos do grupo de enzimologia e processos fermentativos: Maria Alice, Nayara, Marília, Marta, Gabriela, Ana Carolina, Rodrigo, Taiza, Vinícius e Flávia. Por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos, por toda parceria e amizade, por serem partes importantes na conclusão desse trabalho.

Aos técnicos de laboratório: Fabiana, Juliana, Mara, Livia, Ediane, Tati, Paulo, Marquinhos e Emerson. Vocês foram amigos, companheiros, sempre tinham uma palavra com demonstrações de afeto, olhares compreensivos e muitos momentos de gargalhadas. A Vocês amigos, muito obrigada.

A amiga Prof. Dra. Zefa Valdivina Pereira, por todo apoio, carinho e companheirismo, você me ensinou que era possível ser mãe, esposa, mulher e profissional ao mesmo tempo. Pelo abraço apertado nos momentos difíceis, por ter me acompanhado sempre nos momentos de alegria e angústia.

Aos amigos, Shaline, Cezes e Roberto por ser parte fundamental para meu ingresso na faculdade.

A UFGD, CAPES e CNPq pelo apoio e suporte financeiro.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, meu muito obrigada.

RESUMO GERAL

Enzimas obtidas de fontes microbianas apresentam menor custo de produção quando comparadas com enzimas extraídas de animais e vegetais, pois podem ser produzidas por processos fermentativos controlados, utilizando resíduos industriais de baixo custo. O objetivo desse trabalho foi selecionar linhagens microbianas com potencial para a produção de enzimas amilolíticas, bem como caracterizar bioquimicamente as enzimas produzidas pelas linhagens selecionadas. Foram avaliadas 54 linhagens de leveduras, pertencentes à Rede Centro-Oeste de Leveduras (RECOL). Dentre elas, 3 se destacaram como produtoras de amilases: *Candida parapsilosis* com 14,68 U/mL, *Rhodotorula mucilaginosa* com 25,00 U/mL e *Candida glabrata* com 25,39 U/mL. As enzimas apresentaram maior atividade catalítica em pH 7,0 e a temperatura de 60 °C. As amilases produzidas apresentaram expressiva estabilidade ao pH e mantiveram-se estáveis após 1h a 50 °C. Todas as enzimas foram estáveis à presença de etanol na mistura de reação apresentando mais de 80% de atividade em concentrações finais de 15% de etanol. Com relação à ação das enzimas sobre diferentes fontes de amido, todas apresentaram maior potencial para hidrolisar amido de milho. No presente trabalho também foi avaliado a produção de amilases por 2 linhagens de fungos filamentosos, sendo uma mesofílica, *Lichtheimia ramosa* e a outra termofílica, *Thermoascus aurantiacus*, utilizando subprodutos da agroindústria para o cultivo em estado sólido. A maior produção de amilase, para ambos os fungos foi obtida em farelo de trigo, com o pH do meio ajustado para 4,0, após 96 horas de cultivo, atingindo 41,72 e 14,45 U/mL para *L. ramosa* e *Thermoascus aurantiacus*, respectivamente. As enzimas apresentaram maior atividade catalítica em pH 6,0 a 60 °C. A enzima produzida pelo fungo *L. ramosa* foi estável em pH 3,0 - 10,5 e a enzima do *Thermoascus aurantiacus* em pH 4,5 - 9,5. A enzima produzida pelo *L. ramosa* manteve-se estável após 1 hora a 55 °C, enquanto a enzima produzida pelo *Thermoascus aurantiacus* apresentou apenas 60% de sua atividade original quando incubada nas mesmas condições. Ambas as enzimas apresentaram estabilidade ao etanol, no entanto a enzima produzida pelo *Thermoascus aurantiacus* foi mais estável. Amidos de diferentes fontes foram hidrolisados pelas enzimas, sendo os melhores resultados obtidos com amido de milho. O extrato enzimático produzido por *L. ramosa* apresentou potencial liqueficante e sacarificante, já o produzido por *Thermoascus aurantiacus* apresentou apenas potencial sacarificante, indicando provável atividade de glucoamilase.

Palavras-chave: Enzimas industriais, Cultivo em Estado Sólido, Amilases fúngicas.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I	PÁGINA
Figura 1: Estrutura do amido: a) amilose b) amilopectina.....	14
Figura 2: Modelo de ação das enzimas envolvidas na degradação do amido	17
CAPITULO II	
Figura 1: Avaliação do etanol sobre a atividade enzimática, com temperatura de 50 °C e pH 7,0. A) <i>Candida parapsilosis</i> . B) <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> . C) <i>Candida glabrata</i>	32
Figura 2: Avaliação do potencial catalítico das enzimas sobre amido de diferentes fontes vegetais, pela quantificação de açúcar redutor pelo método DNS	33
Figura 3: Avaliação das modificações enzimáticas sobre o amido de milho. A) Redução do grau de polimerização do amido quantificado pelo método iodométrico. B) Liberação de açúcares e extremidades redutoras pelo método de DNS. C) Liberação de moléculas de glicose pelo método de glicose/oxidase.	34
CAPITULO III	
Figura 1: Análise de umidade para produção de amilase, por CES utilizando farelo de trigo como substrato em pH 5,0, após 120 horas de crescimento. A) <i>L. ramosa</i> e B) <i>T. aurantiacus</i>	48
Figura 2: Efeito do pH do processo de CES utilizando farelo de trigo como substrato, após 120 horas de cultivo. A) <i>L. ramosa</i> umidade de 60% e B) <i>T. aurantiacus</i> umidade de 65%.	49
Figura 3: Perfil de produção de amilases sob CES, ao longo do tempo utilizando farelo de trigo como substrato pH 4,0. A) <i>L. ramosa</i> , umidade de 60% e B) <i>T. aurantiacus</i> , umidade 65%.....	50
Figura 4: Avaliação do pH ótimo e da temperatura ótima das amilases produzidas. A e C) <i>L. ramosa</i> ; B e D) <i>T. aurantiacus</i>	51
Figura 5: Estabilidade ao pH e termoestabilidade das enzimas produzidas. A e C) <i>L. ramosa</i> ; B e D) <i>T. aurantiacus</i>	53

Figura 6: Avaliação da concentração de etanol sobre a atividade enzimática dos extratos produzidos em CES. A) <i>L. ramosa</i> e B) <i>T. aurantiacus</i>	54
Figura 7: Efeito da atividade amilásica sobre amidos de diferentes fontes vegetais, pela quantificação de açúcar redutor pelo método DNS.	55
Figura 8: Modificações enzimáticas sobre a molécula de amido. A) Redução do grau de polimerização do amido quantificado pelo método iodométrico. B) Liberação de açúcares e extremidades redutoras pelo método DNS. C) Liberação de moléculas de glicose pelo método de glicose/oxidase.....	56

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

PÁGINA

Tabela 1. Produção de amilase pelo cultivo em estado sólido das leveduras por 120 horas a 28 °C, utilizando como substrato farelo de trigo com 70% de umidade.**29**

Tabela 2. Características bioquímicas das amilases produzidas em condições otimizadas de cultivo.....**31**

CAPITULO III

Tabela 1. Produção de amilases em diferentes substratos por CES em 120 horas de cultivo, 75% de umidade e pH 5,0.....**47**

Tabela 2. Resumo das condições ideais de cultivo para produção de amilases pelos micro-organismos.....**50**

SUMÁRIO

CAPITULO I

1. REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1. Tecnologia enzimática.....	12
1.2. Processos de cultivo microbiano para produção de enzimas.....	13
1.3. Amido	14
1.4. Enzimas amilolíticas.....	15
2. REFERÊNCIAS	19

CAPITULO II

BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS

RESUMO	22
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. METODOLOGIA.....	26
2.1. Micro-organismos.....	26
2.2. Manutenção das linhagens.....	26
2.3. Preparo do inóculo.....	27
2.4. Seleção das linhagens promissoras por cultivo em estado sólido	27
2.5. Obtenção dos extratos enzimáticos	27
2.6. Determinação da atividade enzimática	27
2.7. Avaliação da estabilidade ao pH e temperatura sobre a atividade da enzima	27
2.8. Avaliação do etanol sobre a atividade das enzimas.....	28
2.9. Avaliação do potencial catalítico para diferentes fontes de amido	28
2.10. Avaliação do potencial dextrinizante dos extratos enzimáticos	28
2.11. Avaliação do potencial sacarificante dos extratos enzimáticos.....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1. Caracterização das enzimas produzidas por cultivo em estado sólido	30
3.1.1. Avaliação do pH e temperatura sobre a atividade enzimática.....	30
3.1.2. Avaliação do etanol sobre a atividade enzimática.....	32
3.1.3. Avaliação da ação das enzimas sobre diferentes substratos amiláceos	33
3.1.4. Avaliação do potencial dextrinizante e sacarificante dos extratos enzimáticos	34
4. CONCLUSÃO.....	35
5. REFERÊNCIAS.....	36

CAPITULO III	
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMILASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS CULTIVADOS EM ESTADO SÓLIDO	
RESUMO	41
ABSTRACT	42
1. INTRODUÇÃO.....	43
2. METODOLOGIA.....	44
2.1. Micro-organismos.....	44
2.2. Preparo do inóculo.....	45
2.3. Cultivo em estado sólido	45
2.4. Extração da enzima.....	45
2.5. Determinação da atividade de amilases nos extratos enzimáticos	45
2.6. Caracterização bioquímica das amilases produzidas.....	46
2.6.1. Avaliação da estabilidade ao pH e temperatura sobre a atividade das enzimas	46
2.6.2. Avaliação do etanol sobre a atividade das enzimas.....	46
2.6.3. Avaliação do potencial catalítico para diferentes fontes de amido	46
2.6.4. Avaliação do potencial dextrinizante dos extratos enzimáticos	46
2.6.5. Potencial sacarificante dos extratos enzimáticos.....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1. Produção de amilases por cultivo em estado sólido	47
3.2. Caracterização das enzimas produzidas por cultivo em estado sólido	51
3.2.1. Avaliação do pH e temperatura sobre a atividade das enzimas.....	51
3.2.2. Estabilidade ao pH e termoestabilidade das enzimas	52
3.2.3. Avaliação do etanol sobre a atividade da enzima.....	54
3.2.4. Avaliação do potencial catalítico das enzimas sobre amidos de diferentes fontes	55
3.2.5. Avaliação do potencial dextrinizante e sacarificante dos extratos enzimáticos	56
4. CONCLUSÃO.....	58
5. REFERÊNCIAS	59

CAPITULO I

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Tecnologia enzimática

O aumento populacional resulta em uma inevitável necessidade da criação de novas fontes de alimentos e energia, o que só será possível com o melhor aproveitamento dos recursos naturais (VILLAS-BÔAS; ESPOSITO, 2000). Frente a isso, surgem ferramentas da biotecnologia moderna, dentre elas, é possível destacar as tecnologias de processos fermentativos para a obtenção de produtos (UENOJO; PASTORE, 2007).

A tecnologia enzimática concilia o desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias-primas renováveis e a preservação ambiental, tornando-se um dos campos mais promissores para síntese de compostos de alto valor agregado, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e altamente específicas, diminuindo a formação de subprodutos indesejáveis. Tais características contribuem para a utilização de enzimas em processos industriais. (BON et al., 2008).

Enzimas são catalisadores biológicos que apresentam a capacidade de promover e acelerar reações químicas, possibilitando a vida nas mais variadas esferas. Esses biocatalisadores são moléculas de proteínas e seu poder catalítico está associado à conformação nativa, que depende de condições específicas de pH, temperatura e força iônica do meio (MADIGAN et al., 2010).

Embora algumas enzimas possam ser extraídas de tecidos animais e vegetais, as enzimas industriais geralmente são obtidas a partir de micro-organismos (ANTRANIKIAN et al., 2005; OLEMPKA-BEER et al., 2006). Os micro-organismos apresentam elevada variabilidade metabólica, permitindo a produção de enzimas com características diversificadas, as quais podem ser aplicadas nas mais variadas condições físicas e químicas favorecendo a utilização em diferentes processos industriais (MADIGAN et al., 2010). Além disso, as enzimas microbianas podem ser produzidas por processos fermentativos controlados com tempo reduzido, não sofrem influência de fatores climáticos, políticos e sócio-econômicos, podendo ainda, serem utilizados resíduos agroindustriais como meios de cultivo microbiano para reduzir o custo da produção (SAID; PIETRO, 2004). Essas vantagens justificam a constante busca por linhagens microbianas que apresentem expressiva produção

de enzimas industriais (KALOGERIS et al., 2003; LEITE et al., 2007; ALVES-PRADO et al., 2010; DELABONA et al., 2012).

1.2. Processos de cultivo microbiano para produção de enzimas

As enzimas microbianas podem ser produzidas por cultivo submerso (CS) ou cultivo em estado sólido (CES). No cultivo submerso, os micro-organismos são incubados em meio líquido contendo diversos nutrientes dissolvidos ou suspensos como partículas sólidas (SOCCOL et al., 2003). No cultivo em estado sólido, os micro-organismos são inoculados sobre um substrato insolúvel e poroso na ausência de água livre entre as partículas do meio, porém, com umidade suficiente para o crescimento microbiano (SINGHANIA et al., 2009). Os substratos tradicionalmente utilizados são subprodutos da agroindústria como farelo de trigo, farelo de soja, sabugo e palha de milho, casca de arroz, bagaço de cana de açúcar, dentre outros. Por esse processo são produzidas diversas enzimas de interesse industrial, como proteases, amilases, celulases, xilanases e pectinases (BON et al., 2008).

Por simular o ambiente natural, principalmente dos fungos filamentosos, o CES tem demonstrado bons resultados para produção de enzimas fúngicas, com reduzido risco de contaminação do processo por micro-organismos unicelulares (PANDEY et al., 2003; SINGHANIA et al., 2009). Ambos os processos apresentam vantagens e desvantagens, no entanto, o cultivo em estado sólido tem recebido maior atenção por parte dos pesquisadores, devido à redução do custo do processo, além de contribuir para minimizar os problemas causados pelo acúmulo de resíduos da agroindústria no meio ambiente. Dentre as desvantagens desse processo destaca-se: menor acessibilidade aos substratos, resultando em baixo crescimento de algumas espécies de leveduras e bactérias e a baixa homogeneidade do meio que dificulta o controle dos parâmetros operacionais como pH, temperatura, umidade, entre outros (RAIMBAULT, 1998; SINGHANIA et al., 2009).

O processo de cultivo submerso é o mais utilizado para a produção de enzimas em escala industrial devido a facilidade de ampliação de escala e o maior controle dos parâmetros do processo, proporcionado pela homogeneidade do meio de cultivo. As principais desvantagens são: elevado custo de aeração e agitação, menor produção devido à elevada solubilidade de substrato, enzimas e produtos no meio de cultivo (SOCCOL et al. 2003).

Apesar da elevada operacionalidade do cultivo submerso, a utilização de subprodutos agroindustriais em cultivo sólido será imprescindível em um futuro não muito distante, por

representarem uma das maiores fontes renováveis de energia disponíveis em nosso planeta (CORREIA et al., 2004). O que incentiva a busca por tecnologias que utilizem esses resíduos para obtenção de produtos de maior valor agregado (PANDEY et al., 2000), bem como, para redução da quantidade destes materiais no ambiente (JIN et al., 2002).

1.3. Amido

O amido é o mais importante polissacarídeo de reserva do reino vegetal, podendo ser encontrado em sementes de cereais como milho, cevada, trigo, arroz e em raízes e tubérculos como na mandioca e batata. Esse polissacarídeo é constituído de resíduos de glicose ligados uns aos outros através de ligações glicosídicas (LEONEL; CEREDA, 2002). Dois tipos de polímeros estão presentes no amido: amilose e amilopectina (Figura 1). A amilose é formada por uma cadeia linear de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, ela pode conter de 350 a 1000 unidades de glicose em sua estrutura. A amilopectina apresenta uma estrutura ramificada, constituída por cadeias lineares de 20 a 25 unidades de α -D-glicoses unidas em α -1,4. Essas cadeias estão unidas entre si, através das ligações glicosídicas α -1,6. Sendo constituída por 10 a 500 milhões de unidades de glicose, tornando uma das maiores moléculas presentes na natureza, apresenta ainda uma estrutura esférica (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007). O conteúdo relativo de amilose e amilopectina varia com a fonte de amido (HAMILTON et al., 2000; NIRMALA; MURALIKRISHNA, 2003).

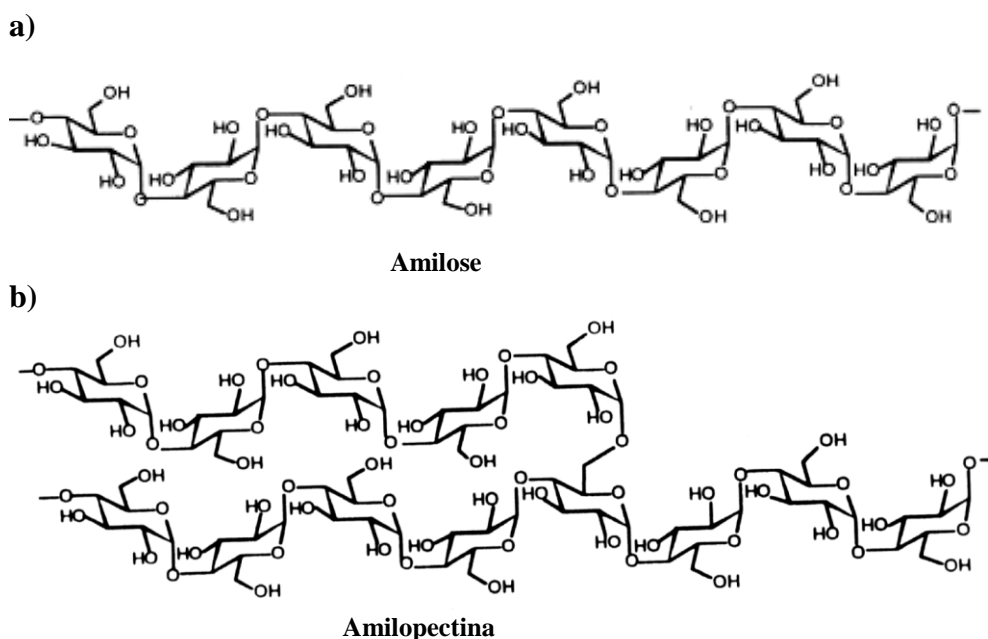


Figura 1. Estrutura do amido: a) amilose b) amilopectina. Fonte: Robyt, 1997.

Os amidos podem ser hidrolisados por via química ou por via enzimática (CEREDA, 2003). Sabe-se hoje, que existe um grande número de enzimas conhecidas por hidrolisar a molécula do amido em diferentes produtos e uma ação combinada de várias enzimas é requerida para hidrolisar o amido completamente (GUPTA et al., 2003). As amilases são amplamente distribuídas na natureza sendo sintetizadas em vários tecidos animais, plantas superiores, fungos, leveduras e bactérias, no entanto, aquelas produzidas por micro-organismos termofílicos e termotolerantes são especialmente interessantes por serem normalmente termoestáveis, podendo ser usadas nos processos de sacarificação que ocorrem em altas temperaturas (PEIXOTO et al., 2003). Com o objetivo de hidrolisar o amido, os micro-organismos produzem enzimas amilolíticas extracelulares com diferentes especificidades. Essas enzimas estão entre as mais importantes produzidas em escala industrial sendo amplamente utilizadas na produção comercial de diversos tipos de xaropes de açúcares e de álcool a partir do amido, além de entrarem na formulação de detergentes, entre outras aplicações (MITIDIERI et al., 2006).

A ação coordenada de muitas enzimas é necessária para se obter uma eficiente conversão do amido em produtos de baixa massa molecular, tais como: glicose, maltose ou maltotriose. Estas moléculas podem ser transportadas facilmente para o interior da célula e dependendo do micro-organismo, serem metabolizadas por vias metabólicas oxidativas ou fermentativas (BON et al., 2008).

1.4. Enzimas amilolíticas

A hidrólise enzimática do amido depende da ação conjunta de diferentes enzimas. Atualmente, quatro tipos de enzimas são capazes de hidrolisar o amido, sendo elas: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificantes e transferases.

As α -amilases (E.C. 3.2.1.1) correspondem as endoamilase, sendo capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4 presentes na parte interna da molécula de amido, sendo o produto final da ação das α -amilases, oligossacarídeos de tamanho variados com configurações α e α -dextrinas limites, que consistem de oligossacarídeos ramificados. Além das ligações α -1,4, existem algumas α -amilases que também podem hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,6 (PANDEY et al., 2006).

As exoamilases agem sobre os resíduos externos de glicose da amilose e da amilopectina produzindo glicose, maltose e β -dextrinas limites, dentre elas: β -amilase, glicoamilase e α -glicosidase.

As β -amilases (EC 3.2.1.2) hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1,4, a partir de extremidades não redutoras da molécula liberando maltose e β -dextrinas limites. Além da hidrólise, a enzima também causa inversão da configuração anomérica da maltose liberada de α para β . (NOROUZIAN et al., 2006).

As glicoamilases (EC 3.2.1.3) são exoenzimas que removem resíduos de glicose a partir da extremidade não-redutora da molécula do amido por hidrólise das ligações α -1,4, liberando glicose. Essa enzima, também converte a configuração do carbono anomérico da glicose de α para β , sendo também capaz de hidrolisar as ligações α -1,6, das ramificações da amilopectina, embora mais lentamente (NOROUZIAN et al., 2006).

As α -glicosidases (EC 3.2.1.20) são exoamilases que catalisam preferencialmente a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4. São diferentes das glicoamilases no seu substrato de preferência, agindo melhor sobre sacarídeos curtos, liberando glicose com configuração α (DE MORAES, 2004).

As pululanases tipo I (EC 3.2.1.41) são enzimas desramificantes que hidrolisam exclusivamente as ligações α -1,6 do pululano, um polissacarídeo linear que consiste de maltotrioses unidas por ligações α -1,6, e de outros oligossacarídeos ramificados como a amilopectina. Existe ainda o grupo II de pululanases, que hidrolisam tanto ligações α -1,4 quanto α -1,6, os produtos principais de degradação são maltose e maltotriose (PANDEY et al., 2006).

As isoamilases (EC 3.2.1.68) hidrolisam exclusivamente as ligações α -1,6 da amilopectina, deixando apenas polissacarídeos lineares de cadeia longa. Porém, não hidrolisam a ligação α -1,6 do pululano, sendo essa a maior diferença entre isoamilases e pululanases (DE MORAES, 2004).

O quarto grupo de enzimas conversoras do amido são as transferases que hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador para um aceptor glicosídico com uma nova formação glicosídica. É o caso da ciclodextrina glucanotransferase (EC 2.4.1.19) essa enzima tem baixa atividade hidrolítica e produz oligossacarídeos cíclicos com 6, 7 ou 8 resíduos de glicose e dextrinas ramificadas de alto peso molecular. As ciclodextrinas são produzidas através de uma reação intramolecular de transglicosilação, na

qual a enzima quebra a ligação α -1,4 e ao mesmo tempo liga a extremidade redutora a não redutora (DEL VALLE, 2004).

A conversão enzimática do amido na indústria inclui as etapas de liquefação e sacarificação, sendo a etapa de liquefação aquela que envolve a dissolução do amido em água a altas temperaturas, nessa etapa ocorre a redução do grau de polimerização do amido. Sua hidrólise ocorre por diferentes enzimas amilolíticas, tais como: α -amilase, pululanase e isoamilase (HAKI; RAKSHIT, 2003). As α -amilases são utilizadas na primeira etapa (liquefação) para converter 30 a 40% do amido em dextrinas solúveis com diferentes graus de polimerização, diminuindo a viscosidade da solução de amido. Durante a segunda etapa (sacarificação), essas dextrinas são hidrolisadas em maltose e glicose pelas glicoamilases e β -amilases (LEVEQUE et al., 2000; GOMES et al., 2003). A Figura 2 sintetiza a ação conjunta das enzimas que degradam a molécula de amido.

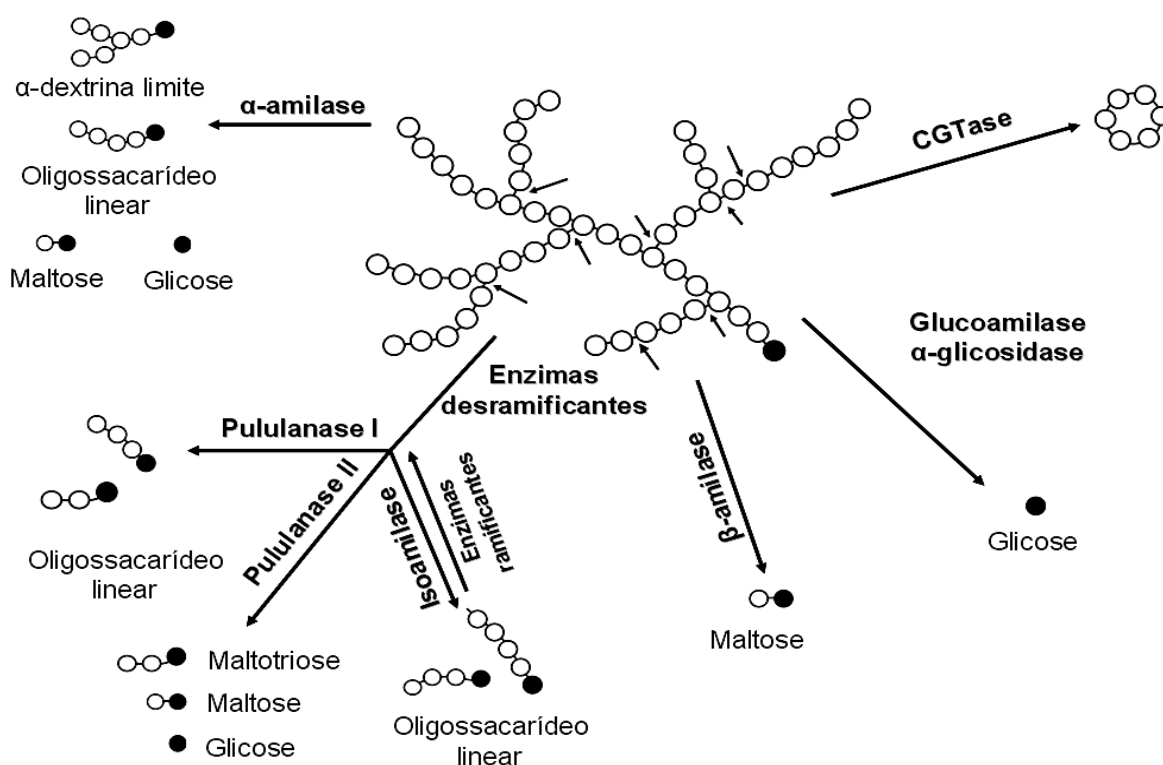


Figura 2. Modelo de ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (•) extremidade redutora; (o) extremidade não redutora; (→) indicam o ponto de clivagem preferido na molécula de amido (Fonte modificada: VAN DER VEEN et al., 2000; HORVATHOVÁ et al., 2001; BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002).

As amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais, destacando-se com grande importância na biotecnologia atual, podendo ser usadas como aditivos em

detergentes, na sacarificação do amido, nas indústrias de alimentos, papel e têxtil. Com o avanço tecnológico, a aplicação das amilases tem se expandido para muitas outras áreas, incluindo a clínica, farmacêutica, médica e químico-analítica (PANDEY et al., 2003). Com isso, as amilases representam um papel muito significativo na indústria de processamento do amido, sendo produzidas comercialmente em grandes quantidades a partir de micro-organismos e representam cerca de 25-33% do mercado de enzimas do mundo, ficando atrás somente das proteases (KIRK et al., 2002; NGUYEN et al., 2002). Tais fatores vêm despertando o interesse de indústrias biotecnológicas para o uso de fontes microbianas com atividades amilolíticas (GUZMÁN-MALDONADO; PAREDEZ-LOPES, 1995; LO et al., 2001; PEIXOTO et al., 2003).

2. REFERÊNCIAS

ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F. C.; LEITE, R. S. R.; OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; DASILVA, R. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p.333-346, 2010.

ANTRANIKIAN, G.; VORGAS, C. E; BERTOLDO, C. Extreme environments a resource for microorganisms and novel biocatalysts. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 96, p. 219-262, 2005.

BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 6, p. 151-160, 2002.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA-JUNIOR, N. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Editora: Interciência, Rio de Janeiro, cap. 10, p. 241-272, 2008.

CEREDA, M. P.; **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**, Editora: Fundação Cargill, São Paulo, cap. 15, p. 377-448, 2003.

CORREIA, R. T. P.; MCCUE, P.; MAGALHÃES, M. M. A.; MACEDO, G. R.; SHETTY, K. Production of phenolic antioxidants by the solid- state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2167-2172, 2004.

DE MORAES, L. M. P. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Editora: Legis Summa, Ribeirão Preto, cap.13, p. 223-241, 2004.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1033-1046, 2004.

DELABONA, P. D. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012.

GOMES, I.; GOMES, J.; STEINER, W. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 207-214, 2003.

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

GUZMÁN-MALDONADO, H.; PAREDES-LÓPEZ, O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 35, p. 373-403, 1995.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 17-34, 2003.

HAMILTON, L. M.; KELLY, C. T.; FOGARTY, W. M. Review: cyclodextrins and their interaction with amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 561-567, 2000.

HORVÁTHOVÁ, V.; JANECEK, S. E STURDÍK, E. Amilolytic enzymes: their specificities, origins and properties. **Biologia/Bratislava**, v. 55, p. 605-615, 2001.

JIN, B.; YAN, X. Q.; YU, Q.; LEEUWEN, J. H. A comprehensive pilot plant system for fungal biomass protein production and wastewater reclamation. **Advances in Environmental Research**, v. 6, p. 179-189, 2002.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Performance of intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 207-213, 2003.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2002.

LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. S. M.; SILVA, D.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pulluans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 281-288, 2007.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 65-69, 2002.

LEVEQUE, E.; JANECEK, S.; HAYE, B.; BELARBI, A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 3-14, 2000.

LO, F. H.; LIN, L. L.; CHEN, H. L.; HSU, W. H.; CHANG, C. T. Enzymic properties of a SDS-resistant *Bacillus sp.* TS-23 α -amylase produced by recombinant *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 36 p. 743-750, 2001.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Editora: Artmed S/A, Porto Alegre, p. 466-467, 2010.

MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1217-1224, 2006.

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓ, J. M.; CLAEYSSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, Á. Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 345-352, 2002.

NIRMALA, M.; MURALIKRISHNA, G. Three α -amylases from malted finger millet (Ragi, Eleusine coracana, Indaf-15) – Purification and partial characterization. **Phytochemistry**, v. 62, p. 21-30, 2003.

- NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SHARER, J. M.; MOO-YOURG, M. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 80-85, 2006.
- OLEMPKA-BEER, Z. S.; MERKER, R. I.; DITTO, M. D.; DINOVI, M. J. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms- a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 144-158, 2006.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: i-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. Editora: Springer, New Delhi , 742 p. 2006.
- PEIXOTO, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCEZ, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. *Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology**, v. 6, p. 269–273, 2003.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p.174-188, 1998.
- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. Editora: Blucher, São Paulo, cap. 2, p. 58-60, 2007.
- ROBYT, J. F. **Essentials of Carbohydrate Chemistry**. Editora: Springer, Nova York, Cap. 8, p. 245-256, 1997.
- SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Editora: Legis Summa, Ribeirão Preto, p. 1-7, 2004.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.
- SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205–218, 2003.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.
- VAN DER VEEN, B. A.; UITDEHAAG, J. C. M.; DIJKSTRA, B. W. E DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1543, p. 336-360, 2000.
- VILLAS- BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço da maçã. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 14, p. 38-42, 2000.

CAPITULO II

BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS

RESUMO

A prospecção de micro-organismos com potencial para produção de amilases é de fundamental importância, devido ao seu grande potencial biotecnológico, estando entre as mais importantes enzimas industriais. O objetivo desse trabalho foi selecionar linhagens de leveduras com potencial para a produção de enzimas amilolíticas, bem como caracterizar bioquimicamente as enzimas produzidas pelas linhagens selecionadas. Foram avaliadas 54 linhagens pertencentes à Rede Centro-Oeste de Leveduras (RECOL). Dentre elas 3 se destacaram como produtoras de amilases: *Candida parapsilosis* com 14,68 U/mL, *Rhodotorula mucilaginosa* com 25,00 U/mL e *Candida glabrata* com 25,39 U/mL. As enzimas apresentaram maior atividade catalítica em pH 7,0 e a temperatura de 60 °C. As amilases produzidas apresentaram expressiva estabilidade ao pH e mantiveram-se estáveis após 1h a 50 °C. Todas as enzimas foram estáveis à presença de etanol na mistura de reação apresentando mais de 80% de atividade em concentrações finais de 15% de etanol. Com relação à ação das enzimas sobre diferentes fontes de amidos, as mesmas apresentaram maior potencial para hidrolisar amido de milho.

Palavras-chave: *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Rhodotorula mucilaginosa*.

ABSTRACT

The prospect of micro-organisms with potential for production of amylase is of fundamental importance, because of their great biotechnological potential, being among the most important industrial enzymes. The aim of this study was to select strains of yeast with potential for the production of amyolytic enzymes and biochemically characterize the enzymes produced by the selected strains. We evaluated 54 strains belonging to the Midwest Yeast Network. Three of these yeast stood out as producing amylases: *Candida parapsilosis* with 14.68 U/mL, *Rhodotorula mucilaginosa* with 25.00 U/mL and *Candida glabrata* with 25.39 U/mL. The enzymes had higher catalytic activity at pH 7.0 and 60 °C. The amylases produced exhibited significant stability to pH and remained stable after 1h at 50 °C. All enzymes were stable in the presence of ethanol in the reaction mixture showing more than 80% of activity at final concentration of 15% ethanol. Regarding the enzyme action on various starch sources, they showed the greatest potential for hydrolyzing corn starch.

Key words: *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Rhodotorula mucilaginosa*.

1. INTRODUÇÃO

O aperfeiçoamento dos processos já existentes para a obtenção de etanol, assim como, o desenvolvimento de novas rotas biotecnológicas para a utilização de polissacarídeo da biomassa vegetal, são de fundamental importância para a manutenção energética da população humana (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007). Frente a isso, surgem ferramentas da biotecnologia moderna, dentre elas é possível destacar as tecnologias de processos fermentativos para a obtenção de produtos microbiológicos (UENOJO; PASTORE, 2007). No Brasil, todo o etanol produzido é resultante da fermentação de monossacarídeos provenientes da hidrólise da sacarose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que em condições adequadas, metaboliza esses monossacarídeos liberando álcool etílico como principal produto do processo fermentativo. Visando suprir a crescente demanda deste biocombustível, diversos trabalhos buscam mecanismos eficientes para hidrolisar amido e celulose, para a obtenção de monossacarídeos livres passíveis de serem metabolizados pela *S. cerevisiae*. Neste contexto, enzimas que catalisam a hidrólise destes polímeros têm ganhado destaque no cenário energético mundial (BON et al., 2008).

As leveduras são micro-organismos capazes de sobreviver em diferentes condições ambientais, por poderem utilizar o oxigênio ou compostos orgânicos como aceptores finais de elétrons. Na ausência de oxigênio algumas linhagens fermentam hidratos de carbono e produzem etanol e dióxido de carbono, o que as torna indispensáveis em processos industriais para produção de biocombustíveis e alimentos (ABBAS et al., 2002; MORENO-ARRIBAS; PÓLO, 2005). As leveduras tem ganhado destaque no cenário mundial, uma vez que são empregadas em muitos setores industriais, tais como: bebidas, biocombustíveis, bioaromas, alimentos, produtos agrícolas, enzimas industriais, dentre outros (AQUARONE et al., 2001). Apresentam ainda, habilidade de utilizar vários substratos para sua nutrição absorviva, podendo colonizar diversos nichos ecológicos. Essas características permitem que elas secretem enzimas capazes de hidrolisar macromoléculas como carboidratos e proteínas, podendo ser utilizadas em diversos processos industriais (MADIGAN et al., 2010).

A utilização de leveduras para produção de enzimas apresentam algumas vantagens: fácil adaptabilidade em diferentes tipos de cultivo, temperaturas moderadas para o crescimento microbiano, podem ser observadas rapidamente devido ao seu crescimento em curto tempo, ciclos de fermentação menores, diversidade de enzimas que catalisam a mesma reação, diversidade metabólica, flexibilidade nas condições de uso de meios de cultivo de

baixo custo como resíduos agroindustriais (SILVA NEVES et al., 2006; KATO et al., 2007). A utilização de resíduos em processos biotecnológicos agrega valor a esse material, além de reduzir o custo de produção das enzimas e minimizar os problemas ambientais causados devido a sua lenta degradação natural (YANG et al., 2001; CORREIA et al., 2004).

O amido é o mais importante polissacarídeo de reserva do reino vegetal, podendo ser encontrado em sementes de cereais como milho, cevada, trigo, arroz e em raízes e tubérculos como na mandioca e batata. Esse polissacarídeo é um polímero de resíduos de glicose ligados uns aos outros através de ligações glicosídicas (DE MORAES, 2004). Os amidos podem ser hidrolisados por via química ou por via enzimática (CEREDA, 2003). As enzimas amilolíticas estão entre as mais importantes produzidas em escala industrial, sendo amplamente utilizadas na produção comercial de diversos tipos de xaropes de açúcares e álcool a partir do amido, além de entrarem na formulação de detergentes, entre outras aplicações. A ação coordenada de amilases é necessária para se obter uma eficiente conversão do amido em produtos de baixa massa molecular, tais como: glicose, maltose ou maltotriose (GUPTA et al., 2003). Estas moléculas podem ser transportadas facilmente para o interior da célula e, dependendo do micro-organismo, serem metabolizadas por vias metabólicas oxidativas ou fermentativas (BON et al., 2008).

Atualmente, as amilases representam 25% do mercado de enzimas, encontrando aplicações em vários processos industriais que necessitam da hidrólise parcial ou completa do amido (SAXENA et al., 2007). De forma geral, os organismos produzem vários tipos de enzimas para hidrolisar o amido, pois as propriedades e especificidades dessas enzimas são bastante diferentes. Basicamente, existem quatro tipos de enzimas conversoras do amido, sendo elas: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificantes e transferases.

Segundo Gupta et al. (2003) as endoamilases catalisam hidrólises no interior da molécula do amido, formando ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos e dessa forma quebram as ligações glicosídicas α -1,4 presentes na parte interna das cadeias de amilose ou amilopectina. A α -amilase (E. C. 3.2.1.1) é a endoamilase mais conhecida. As exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1,4, como a β -amilase (E. C. 3.2.1.2) ou ambas as ligações α -1,4 e α -1,6, como as amiloglicosidases (E. C. 3.2.1.3) e glicosidases (E. C. 3.2.1.20). As enzimas desramificantes são enzimas que hidrolisam ligações α -1,6 sendo que as isoamilases (E. C. 3.2.1.68) hidrolisam apenas amilopectina resultando em polissacarídeos lineares de cadeia longa, e as pululanases tipo

I (E. C. 3.2.1.41) hidrolisam as ligações α -1,6 em pululana e amilopectina. As pululanases do tipo II hidrolisam ligações tanto do tipo α -1,4 quanto α -1,6 sendo os produtos de hidrólise a maltose e a maltotriose. As transferases constituem um quarto grupo de enzimas conversoras ou modificadoras de amido, que quebram ligações glicosídicas α -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador para um aceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica. Enzimas como amilomaltase (E. C. 2.4.1.25) e ciclodextrina glicosiltransferase (E. C. 2.4.1.19) formam uma nova ligação α -1,4 e ao mesmo tempo ligam a extremidade redutora a não redutora (DE MORAES, 2004).

Enzimas aplicadas em processos industriais podem ter origem animal, vegetal e microbiana. No entanto, as enzimas microbianas são produzidas por processos fermentativos controlados com tempo reduzido, além de não sofrerem influência de fatores climáticos, políticos e sócio-econômicos, podendo ainda, ser utilizado resíduos agroindustriais como meio de cultivo microbiano para baratear o custo da produção (SAID; PIETRO, 2004). Tais características justificam a constante busca por linhagens microbianas que apresentem expressiva produção de enzimas industriais (LEITE et al., 2007; ALVES-PRADO et al., 2010; DELABONA et al., 2012). O presente trabalho visou selecionar linhagens de leveduras com potencial para produção de enzimas amilolíticas e caracterizar bioquimicamente as enzimas produzidas pelas linhagens selecionadas.

2. METODOLOGIA

2.1. Micro-organismos

No total foram analisadas 54 linhagens de leveduras, dentre elas, 53 pertencentes à Rede Centro-Oeste de Leveduras (RECOL) e 1 linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* comercial denominada Cat, cedida pela Usina São Fernando Açúcar e Álcool Ltda. Dourados-MS. As linhagens da RECOL foram isoladas de diferentes ambientes tais como: frutos do cerrado, cama de frango e mosto de usinas sucroenergéticas.

2.2. Manutenção das linhagens

As linhagens foram mantidas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio YEPD. Posteriormente ao crescimento, os micro-organismos foram preservados em refrigerador a temperatura de 5 °C e mensalmente repicados. Outro método de conservação para as linhagens foi a submersão da cultura em óleo mineral, sendo repicadas anualmente para garantir a viabilidade das linhagens.

2.3. Preparo do inoculo

As linhagens foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio YEPD inclinado, mantidas por 48 horas a 28 °C. Obteve-se a suspensão da levedura pela raspagem suave da superfície do meio de cultura, empregando 3 mL de solução nutriente (0,5% de sulfato de amônio, 0,5% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,5% nitrato de amônio) devidamente autoclavada. A inoculação das leveduras no substrato foi feita pela transferência de 3 mL da suspensão microbiana para os frascos Erlenmeyer, contendo farelo de trigo previamente preparado.

2.4. Seleção das linhagens promissoras por cultivo em estado sólido

Para seleção das linhagens promissoras os isolados foram cultivados em estado sólido em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5 g de farelo de trigo umedecidos com solução nutriente (descrita anteriormente) a 70% de umidade. O material foi autoclavado a 121 °C durante 20 minutos anteriormente a inoculação dos micro-organismos e posteriormente ao inoculo os frascos foram mantidos a 28 °C por 120 horas. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

2.5. Obtenção dos extratos enzimáticos

As enzimas foram extraídas pela adição de 50 mL de água destilada nos frascos Erlenmeyer contendo os meios de cultivo. Tais frascos foram mantidos em agitação por 1 hora a 150 rpm, em seguida foram filtrados e posteriormente centrifugados a 1000xg por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para os ensaios enzimáticos.

2.6. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada pela adição de 0,1 mL de enzima em 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0 contendo 1% de amido de milho (Maizena®). Após 10 minutos de reação, o açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de DNS (3,5-acido dinitrosalisílico) descrito por Miller em 1959. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de produto por minuto de reação.

2.7. Avaliação da estabilidade ao pH e temperatura sobre a atividade da enzima

O pH ótimo foi determinado mensurando a atividade da enzima a 50 °C em diferentes valores de pH (3,0 - 8,0), utilizando-se o tampão McIlvaine. A temperatura ótima foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em diferentes temperaturas (30 - 75 °C) no

respectivo pH ótimo de cada enzima. A estabilidade das enzimas ao pH foi avaliada incubando-as por 24 horas em temperatura ambiente em diferentes valores de pH; os tampões utilizados foram McIlvaine (3,0 - 8,0), Tris-HCl 0,1M (8,0 - 8,5) e Glicina-NaOH 0,1M (8,5 - 10,5). A termoestabilidade foi estudada incubando as enzimas por 1 hora em diferentes valores de temperaturas que variaram de 30 - 75 °C. As atividades residuais foram determinadas nas condições ótimas de pH e temperatura das enzimas (LEITE et al., 2008).

2.8. Avaliação do etanol sobre a atividade das enzimas

A atividade enzimática foi quantificada com a adição de etanol, em diferentes concentrações na mistura de reação (0 - 30%). Os ensaios foram realizados a 50 °C em tampão McIlvaine com pH 7,0 acrescido 1% de amido de milho (Maizena®).

2.9. Avaliação do potencial catalítico para diferentes fontes de amido

Os extratos enzimáticos foram avaliados quanto ao potencial de hidrolisar amidos provenientes de diferentes fontes vegetais. Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando como substratos: amido de batata, amido de trigo, amido de mandioca, amido comercial (Hexis®) e amido de milho (Maizena®). As reações foram realizadas em tampão McIlvaine pH 7,0. A quantidade de açúcar redutor liberada foi quantificada pelo método de DNS (MILLER, 1959).

2.10. Avaliação do potencial dextrinizante dos extratos enzimáticos

A atividade dextrinizante foi avaliada utilizando amido de milho (Maizena®) 1% como substrato enzimático em tampão McIlvaine pH 7,0 pelo método iodométrico descrito por Fuwa (1954) e Ponsawasdi; Yagisawa (1987), com algumas modificações. A mistura de reação foi composta por 0,1 mL de enzima adicionados a 0,3 mL de solução tampão contendo amido. Após 10 minutos a 60°C a reação foi paralisada pela adição de 4 mL de solução de HCl 0,2 M. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL de reativo de iodo e 10 mL de água destilada. A absorbância foi quantificada a 700 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% a intensidade da cor azul do complexo iodo-amido por minuto de reação.

2.11. Avaliação do potencial sacarificante dos extratos enzimáticos

A atividade sacarificante foi avaliada utilizando amido de milho (Maizena®) 1% como substrato enzimático em tampão McIlvaine pH 7,0 pelo método de glicose-oxidase/peroxidase

descrito por Bergmeyer; Bernt (1974), com algumas modificações. A mistura de reação foi composta por 0,1 mL de enzima adicionado a 0,4 mL de solução tampão contendo amido a 1%. Após 10 minutos a 60 °C a reação foi paralisada em banho de gelo. A glicose liberada foi quantificada com o kit enzimático colorimétrico (Glicose-PP Analisa). A absorbância foi quantificada a 505 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de glicose por minuto de reação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar o potencial de produção de amilases por cultivo em estado sólido, as 54 linhagens de leveduras da Rede Centro-Oeste de Leveduras (RECOL) foram cultivadas em farelo de trigo contendo 70% de umidade (Tabela 1).

TABELA 1. Produção de amilase pelo cultivo em estado sólido das leveduras por 120 horas a 28°C, utilizando como substrato farelo de trigo com 70% de umidade.

Linhagem	Local de coleta do isolado	Atividade Enzimática (U/mL)
Isolado 1	Cereja do Rio Grande	5,07 ± 0,08
Isolado 29	Uvaia	14,68 ± 0,5
Isolado 30	Uvaia	25,00 ± 0,16
Isolado 37	Pêssego do Mato	14,10 ± 0,44
Isolado 39	Acerola	5,39 ± 0,19
Isolado 41	Acerola	11,22 ± 0,27
Isolado 43	Pequi	25,39 ± 0,23
Isolado 44	Pequi	10,17 ± 0,27
Isolado 46	Uvaia	5,54 ± 0,18
Isolado 53	Mosto da Usina	10,30 ± 1,25
Isolado 54	Mosto da Usina	11,77 ± 0,2
Cat (<i>S. cerevisiae</i>)	Linhagem Comercial	0,39 ± 0,05

Cereja do Rio Grande (*Eugenia involucrata* DC); Uvaia (*Eugenia pyriformis*); Pêssego do Mato (*Hexachlamys edulis*); Acerola (*Malpighia glabra* L.); Pequi (*Caryocar brasiliense*).

Nas condições de cultivo, utilizadas no presente trabalho, as linhagens que apresentaram maior produção de amilase extracelular foram os isolados 29 com 14,68 U/mL, o isolado 30 com 25 U/mL, o isolado 37 com 14,10 U/mL e o isolado 43 com 25,39 U/mL. Esses resultados são bastante promissores quando comparados com a literatura, sendo possível observar o potencial biotecnológico da microbiota da região, possibilitando a descoberta de novas linhagens microbianas produtoras de enzimas. Bhatti et al. (2007) cultivaram o fungo *Fusarium solani* em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato e obtiveram 6,13 U/mL de glucoamilase. Anto et al. (2006) relataram a produção de 9,45 U/mL de α -amilase pelo *Bacillus cereus* MTCC1305 também cultivado em estado sólido utilizando o farelo de trigo como substrato. Resultado semelhante ao presente trabalho foi reportado por Ellaiah et al. (2002) cultivando espécies de *Aspergillus* em estado sólido. Os autores obtiveram 24,7 U/mL de glucoamilase após 120 horas de cultivo.

As leveduras que apresentaram maior potencial para produção de amilase foram identificadas pelo grupo do professor doutor André Rodrigues da UNESP de Rio Claro-SP. Os isolados 29 e 37 foram identificados como *Candida parapsilosis*, o isolado 30 *Rhodotorula mucilaginosa* e o isolado 43 identificado como *Candida glabrata*. Dessa forma possibilitando a continuidade do trabalho com espécies ainda não estudadas para essa finalidade. Segundo Saran et al. (2007) a prospecção de micro-organismos potencialmente produtores de enzimas tem se tornado uma necessidade crescente, pois não só nos permitem entender e melhorar a sua aplicação através da biotecnologia como também encontrar atividades desconhecidas em termos biotecnológicos.

3.1. Caracterização das enzimas produzidas por cultivo em estado sólido

3.1.1. Avaliação do pH e temperatura sobre atividade enzimática

A caracterização das amilases foi realizada a partir de soluções enzimáticas obtidas pelo cultivo das leveduras nas condições anteriormente descritas. As amilases produzidas pelas leveduras apresentaram atividade ótima no pH 7,0 (Tabela 2). As enzimas foram estáveis em uma ampla faixa de pH, *Candida parapsilosis* (5 a 10); *Rhodotorula mucilaginosa* (3,5 a 9,5) e *Candida glabrata* (3 a 8,5). No entanto todas as enzimas mantiveram mais de 60% de sua atividade catalítica, quando incubadas em valores extremos de pH como 3,0 e 10,5, confirmando a elevada estabilidade estrutural das enzimas. Os resultados para pH ótimo e estabilidade das enzimas condizem com os encontrados na literatura, Giannesi et al. (2006) observaram que amilases de diversas fontes microbianas exibem pHs ótimos entre 4,5 e 7,0.

Tabela 2. Características bioquímicas das amilases produzidas em condições otimizadas de cultivo.

Isolado	pH ótimo	Temperatura ótima	pH estabilidade	Temperatura estabilidade
<i>Candida parapsilosis</i>	7,0	60 °C	5 a 10	30 a 50 °C
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	7,0	60 °C	3,5 a 9,5	30 a 50 °C
<i>Candida glabrata</i>	7,0	60 °C	3 a 8,5	30 a 50 °C

Karakas et al. (2010) avaliaram as características da α -amilase recombinante em *Pichia pastoris* obtendo melhor atividade em pH 7,0. Rahardjo et al. (2005) constataram pH 7,0 como ótimo para *Aspergillus oryzae* quando cultivado em estado sólido, bem como Rao; Satyanatayana (2007) quando estudaram *Geobacillus thermoleovorans*. Resultados semelhantes também foram descritos por Figueira; Hirooka (2000) que produziram amilases a partir do fungo *Fusarium moniliforme*, obtendo valores de pH ótimos em torno de 6,7, demonstrando a tendência de produção de amilases levemente neutras por fungos. Segundo Pandey et al. (2000) e Gupta et al. (2003), fungos em geral apresentam pH ótimo em faixas que vão de ácida à neutra.

A atuação das enzimas em uma ampla faixa de pH é uma vantagem para a indústria, uma vez que um menor ajuste do pH seria necessário entre os tratamentos sequenciais de liquefação e sacarificação do amido (MICHELIN et al., 2008).

A temperatura ótima para todas as enzimas estudadas nesse trabalho foi obtida a 60 °C. Esses resultados se assemelham com o de outros autores: Li et al. (2007) encontraram resultados semelhantes para a levedura *Aerobasidium pullulans* N13d. A temperatura de 60 °C foi ótima para a α -amilase do fungo *Scytalidium thermophilum* estudada por Aquino et al. (2003).

Quanto à estabilidade da enzima frente à variação de temperatura, todas se mantiveram estáveis após 1 hora a 50 °C. Em temperaturas superiores a essa foi observado uma queda acentuada da atividade catalítica. Sahnoum et al. (2012), observaram que a enzima produzida por *Aspergillus oryzae* manteve mais de 50% da sua atividade após 1 hora de incubação a 50 °C, com uma diminuição rápida na atividade quando a temperatura foi além de 60 °C.

3.1.2. Avaliação do etanol sobre a atividade enzimática

A inibição por etanol é uma forte tendência no estudo de algumas enzimas, pois estas podem ser expostas a concentrações substanciais durante diversas aplicações comerciais (LO et al., 1990; SUN; CHENG, 2002). Os resultados foram muito promissores, considerando que todas as enzimas apresentaram atividade residual superior a 70% da original, quando incubadas em concentrações de 15% de etanol (Figura 1).

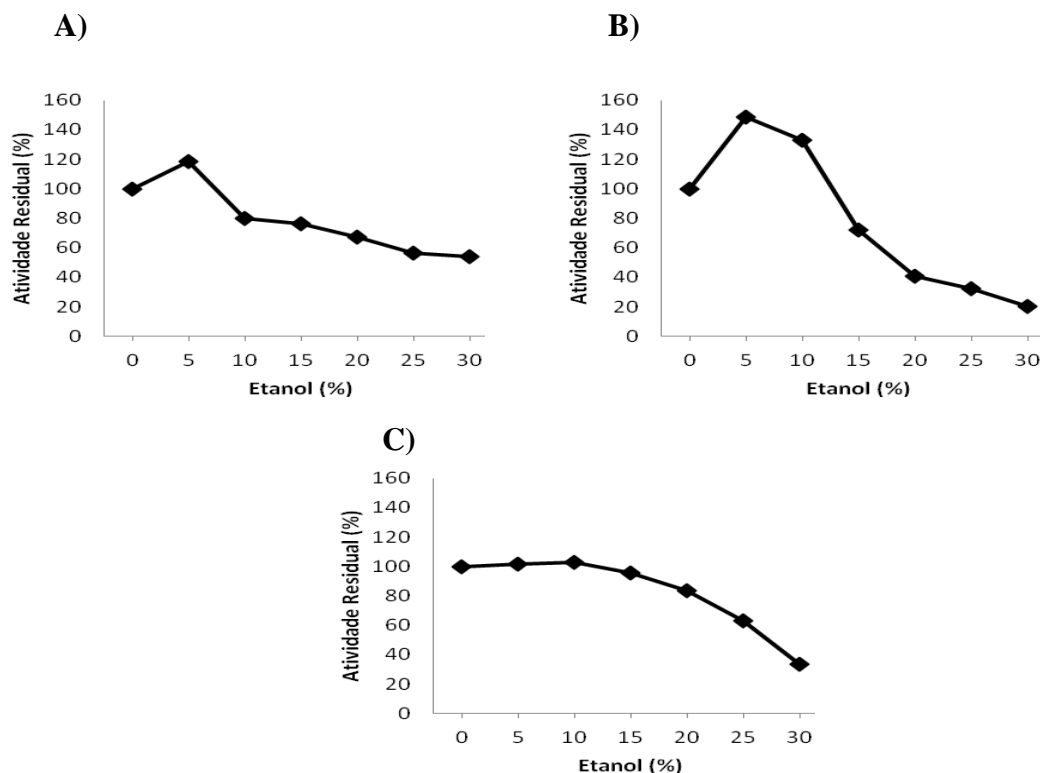


Figura 1. Avaliação do etanol sobre a atividade enzimática, com temperatura de 50 °C e pH 7,0. **A)** *Candida parapsilosis*. **B)** *Rhodotorula mucilaginosa*. **C)** *Candida glabrata*.

Nos processos convencionais de produção alcoólica, concentrações superiores a 10% de etanol podem ser extremamente nocivas para o próprio micro-organismo fermentador (GU et al., 2001). Os resultados obtidos demonstram que todas as enzimas apresentam estabilidade ao etanol, o que capacita sua utilização em processos de produção alcoólica a partir de fontes amiláceas. A estabilidade à presença de etanol é uma característica muito apreciável em processos de sacarificação e fermentação simultâneas, onde os açúcares fermentescíveis liberados pela ação enzimática são simultaneamente convertidos em etanol por micro-organismos fermentadores (LEITE et al, 2008; CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

O aumento do potencial catalítico pelo etanol pode estar associado à utilização do álcool como aceptor para o cátion glicosil intermediário aumentando a velocidade da reação, atuando

como aceptores preferenciais durante a catálise enzimática (BARBAGALLO et al., 2004; VILLENA et al., 2006).

3.1.3. Avaliação da ação das enzimas sobre diferentes substratos amiláceos

A ação das enzimas sobre diferentes fontes amiláceas foi avaliada utilizando amido de batata, trigo, mandioca, milho (Maizena®) e amido comercial (Hexis) como substratos enzimáticos. Os extratos enzimáticos apresentaram maior potencial catalítico para hidrolisar amido de milho, sendo obtido 15,18 U/mL para *Candida parapsilosis*; 24,13 U/mL para *Rhodotorula mucilaginosa* e 20,1 U/mL para *Candida glabrata* (Figura 2).

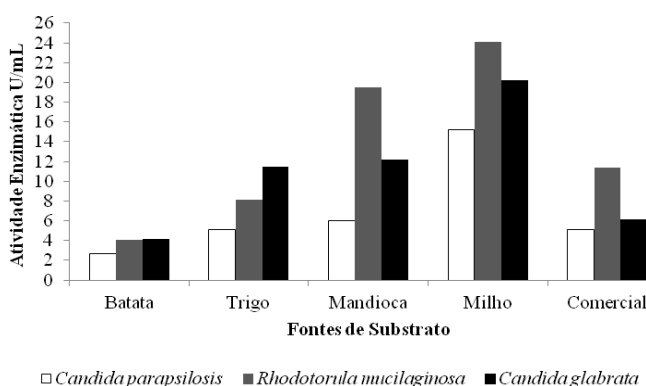


Figura 2: Avaliação do potencial catalítico das enzimas sobre amido de diferentes fontes vegetais, pela quantificação de açúcar redutor pelo método DNS.

A diferença na ação das enzimas amilolíticas sobre distintos tipos de amido pode estar relacionada com o conteúdo relativo à composição da molécula, em particular, no teor de amilose e no comprimento de suas cadeias, além dos teores de lipídeos, proteínas e minerais. As características específicas do amido variam de acordo com sua fonte botânica, sendo que as proporção de amilose e amilopectina afeta a textura e a arquitetura do grânulo, assim como as propriedades de geleificação (THOMAS, ATWELL, 1999; CEREDA, 2002).

Cruz et al. (1997) sugerem que a composição e variação da estrutura molecular do amido podem afetar a ação de enzimas amilolíticas. O amido de milho apresenta maior valor de amilose em relação aos outros amidos e por consequência, teores menores de amilopectina, o que favorece a degradação pela enzima, pois a amilose é formada por cadeias lineares de unidades de glicose, apresentando peso molecular de 50.000 a 200.000. A amilopectina apresenta estrutura ramificada com alto peso molecular variando de 100.000 a vários milhões, dificultando o desempenho catalítico das amilases (FENNEMA et al., 2010).

3.1.4. Avaliação do potencial dextrinizante e sacarificante dos extratos enzimáticos

Considerando os resultados anteriormente apresentados, o amido de milho foi utilizado para avaliar as modificações de cada extrato enzimático sobre a molécula do amido, por meio de diferentes métodos analíticos.

As enzimas produzidas por *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* ocasionaram uma expressiva redução do grau de polimerização da molécula de amido, refletindo no aumento das extremidades reductoras. No entanto, também foi observado a presença de glicose livre após o tratamento enzimático, indicando que os extratos apresentam ação sinérgica de enzimas liqueficientes e sacarificantes, apesar da predominância do potencial despolimerizante ser evidente. O extrato enzimático produzido por *Rhodotorula mucilaginosa* não reduziu de forma eficiente a polimerização da molécula de amido. Mas foi evidenciado o aumento na concentração de açúcares redutores totais e glicose após a hidrólise enzimática. Dessa forma, é possível inferir que esse extrato apresenta predominantemente potencial sacarificante (Figura 3).

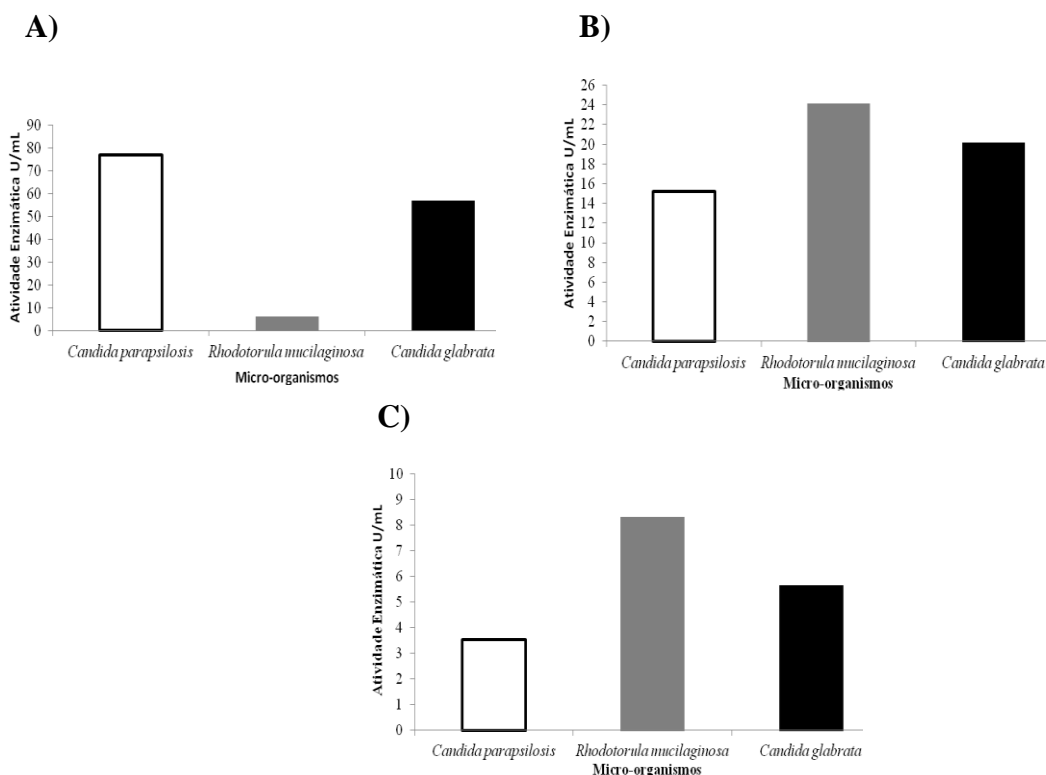


Figura 3: Avaliação das modificações enzimáticas sobre o amido de milho. **A)** Redução do grau de polimerização do amido quantificado pelo método iodométrico. **B)** Liberação de açúcares e extremidades reductoras pelo método de DNS. **C)** Liberação de moléculas de glicose pelo método de glicose/oxidase.

A hidrólise da molécula de amido é dividida em duas etapas: liquefação e sacarificação. A etapa de liquefação são realizadas por endoamilases e enzimas desramificantes dentre elas: α -amilase, isoamilase e pululanases. Para a sacarificação do amido geralmente são utilizadas exoamilases como glucoamilases, β -amilases e amiloglicosidase (VAN DER MAAREL et al., 2002). Dessa forma, os resultados obtidos permitem inferir que os extratos enzimáticos de *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* apresentam exo e endoamilases, enquanto o extratos de *Rhodotorula mucilaginosa* apresenta predominantemente exoamilases.

Trabalhos anteriores confirmam a produção de enzimas liqueficientes e sacarificantes por diferentes espécies fúngicas. Karakas et al. (2010) encontraram atividade de α -amilase na levedura *Pichia pastoris*. Bem como Wanderley et al. (2004) para a levedura *Cryptococcus flavus*. Outros autores como: Shafique et al. (2009), Cruz et al. (2011) e Sahnoun et al. (2012) reportam atividade de endoamilases para diferentes espécies de *Aspergillus*, tais como: *A. flavus*, *A. níger* e *A. oryzae* respectivamente. Para atividades de exoamilases, resultados para fungos filamentosos também são reportados por diversos autores, Gonçalves et al. (2008) estudando *Thermomyces lanuginosus*, Gomes et al. (2005) e Silva et al. (2005) também reportam resultados semelhantes para os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus níger*, bem como Michelin et al. (2008) para o fungo *Paecilomyces variotii*. Para leveduras são reportados resultados para *Aureobasidium pullulans* e *Schizosaccharomyces pombe* com atividade de exoamilase (LI et al., 2007; OKUYAMA et al., 2005).

4. CONCLUSÃO

Dentre as leveduras avaliadas três linhagens apresentaram expressivo potencial para produção de enzimas amilolíticas.

As enzimas produzidas apresentaram elevada estabilidade estrutural e foram consideravelmente estáveis ao etanol.

As enzimas apresentaram potencial para hidrolisar amidos de diferentes fontes, com predominância para o amido de milho.

Diferentes perfis catalíticos foram observados para os extratos produzidos, predominantemente liqueficientes para os extratos produzidos por *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* e sacarificantes para o extrato produzido por *Rhodotorula mucilaginosa*.

As características estimulam a aplicação destas enzimas em processos de produção de etanol a partir de fontes amiláceas.

5. REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.; HIOL, A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor sp* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 968-975, 2002.
- ALVES-PRADO, H. F.; PAVEZZI, F. C.; LEITE, R. S. R.; OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; DASILVA, R. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian cerrado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 333-346, 2010.
- ANTO, H.; TRIVEDI, U.; PATEL, K. Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 241-245, 2006.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotechnologia Industrial**, Editora: Edgarg Blücher Ltda, São Paulo, p. 1-43, 2001.
- AQUINO, A. C. M. M.; JORGE, J. A. ; TERENCE, H. F. ; POLIZELI, M. L. T. M. Studies on a thermostable α -amylase from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 323-328, 2003.
- BARBAGALLO, R. N.; SPAGNA, G.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 58-66, 2004.
- BHATTI, H. N.; RASHID, M. H.; NAWAZ, R.; ASGHER, M.; PERVEEN, R.; JABBAR, A. Optimization of media for enhanced glucoamylase production in solid state fermentation by *Fusarium solani*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, p. 51-56, 2007.
- BERGMAYER, H. U.; BERNT, E. **Methods of Enzymatic Analysis**, Editora: Verlag – Chimie, New York, p. 1205-1215, 1974.
- BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA-JUNIOR, N. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Editora: Interciência, Rio de Janeiro, cap. 10, p. 241-272, 2008.
- CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2415-2457, 2007.
- CEREDA, M. P. **Propriedades gerais do amido**. Editora Fundação Cargill, São Paulo, cap. 6, p. 101-133, 2002.
- CEREDA, M. P.; **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**, Editora: Fundação Cargill, São Paulo, cap. 15, p. 377-448, 2003.
- CORREIA, R. T. P.; MCCUE, P.; MAGALHÃES, M. M. A.; MACEDO, G. R.; SHETTY, K. Production of phenolic antioxidants by the solid- state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2167-2172, 2004.

CRUZ, R.; SOUZA, E. L.; HOFFMANN, E. H. E.; BELLINI, M. Z.; CRUZ, V. A.; VIEIRA, C. R. Relationship between carbon source, production and pattern action of α -amylase from *Rhizopus* sp. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 101-105, 1997.

CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Alpha-amylase production by *Aspergillus Niger* in cassava peels waste. **Unopar Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, p. 245-249, 2011.

DE MORAES, L. M. P. **Enzimas como agentes biotecnológicos: Amilases**. Editora: Legis Summa, Ribeirão Preto, cap.13, p. 223-241, 2004.

DELABONA, P. D. S.; PIROTA, R. D. P. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012.

ELLAIHAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 615-620, 2002.

FENNEMA, O. R.; PARKIN, L. K.; DAMODARAN, S. **Química de alimentos de fennema**. Editora Artmed, Porto Alegre, cap.3, 2010.

FIGUEIRA, E. L. Z.; HIROOKA, E. I. Culture médium for amylase production by toxigenic fung. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 461-467, 2000.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954.

GIANNESI, G. C.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A. A novel α -glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. coprophilum that converts maltose into trehalose: purification and partial characterization of the enzymes. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1729-1735, 2006.

GOMES, E.; SOUZA, S. R.; GRANDI, R. P.; SILVA, R. Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* A1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A13.37, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 75-82, 2005.

GONÇALVES, A. Z. L.; CARVALHO, A. F. A.; SILVA, R.; GOMES, E. Localization and partial characterization of thermostable glucoamylase produced by newly isolated *Thermomyces lanuginosus* TO3 in submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 857-865, 2008.

GU, Y.; QIAO, M.; ZHOU, Q.; ZHOU, Z.; CHEN, G. Hyperproduction of alcohol using yeast fermentation in highly concentrated molasses medium. **Tsinghua Science and Technology**, v. 6, p. 225-230, 2001.

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

KARAKAS, B.; INAN, M.; CERTEL, M. Expression and characterization of *Bacillus subtilis* PY22-amylase in *Pichia pastoris*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 129-134, 2010.

KATO, M.; FUCHIMOTO, J.; TANINO, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H.; UEDA, M. Preparation of a whole-cell biocatalyst of mutated *Candida antarctica* lipase B (mCALB) by a yeast molecular display system and its practical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 549-555, 2007.

LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, p. 281- 288, 2007.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.; SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391-395, 2008.

LI, H.; CHIZ, Z.; WANG, X.; DUAN, X.; MA, L.; GAO, L. Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1006-1012, 2007.

LO, A. C.; BARBIER, J. R.; WILLICK, G. E. Kinetics and specificities of two closely related β -glucosidases secreted by *Schizophyllum commune*. **European Journal of Biochemistry**, v.192, p. 175-181, 1990.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Editora: Artmed S/A, Porto Alegre, p. 466-467, 2010.

MICHELIN, M.; RULLER, R.; WARD, R. J.; MORAES, L. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and biochemical of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus *Paecilomyces variotti*. **Journal Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, p. 17-25, 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. Winemaking: biochemistry and microbiology current knowledge and future trends. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 265-286, 2005.

OKUYAMA, M.; TANIMOTO, Y.; ITO, T.; ANZAI, A.; MORI, H.; KIMURA, A. Purification and characterization of the hyper-glycosylated extracellular α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 37, p. 472-280, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomalto-dextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal Fermentation Technology**, v. 65, p. 463-467, 1987.

RAHARDJO, Y. S. P.; WEBER, F. J.; HAEMERS, S.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate α -amylase production in a model solid-state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 900-902, 2005.

RAO, J. L. U. M.; SATYANARAYANA, T. Improving production of hyperthermostable and high maltose-forming α -amylase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* using response surface methodology and its applications. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 345-352, 2007.

SHAFIQUE, S.; BAJWA, R.; SHAFIQUE, S. Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular alpha-amylase activity. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, p. 897-905, 2009.

SAHNOUN, M.; BEJAR, S.; SAYARI, A.; TRIKI, M. A.; KRIAA, M.; KAMMOUN, R. Production, purification and characterization of two α -amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus oryzae* strain S2. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 18-25, 2012.

SARAN, S.; ISAR, J.; SAXENA, R. K. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 697-699, 2007.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Generalidades sobre aplicação industrial de enzimas Editora: Legis Summa, Ribeirão Preto, p. 1-7, 2004.

SAXENA, R. K.; DUTT, K.; AGARWAI, L.; NAYYAR, P. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus sp.* PN5. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 260-265, 2007.

SILVA, T. M.; ANGELIS, A. D.; CARVALHO, A. F. A.; SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Production of saccharogenic and dextrinogenic amylases by *Rhizomucor pusillus* A13.36. **Journal of Microbiology**, v. 43, p. 561-568, 2005.

SILVA NEVES, K. C.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da região amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 299-306, 2006.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

THOMAS, D. J.; ATWELL, W. A. **Starches: practical guides for the food industry**. Eagan Press Handbook, Minnesota, p.19-22, 1999.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 137- 155, 2002.

VILLENA, M. A.; IRANZO, J. F. U.; GUNDLLAPALLI, S. B.; OTERO, R. R. C.; PÉREZ, A. I. B. Characterization of an exocellular β -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 39, p. 229-234, 2006.

WANDERLEY, K. J.; TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P.; ULHOA, C. J. Biochemical characterization of α -amilase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **FEMS Microbiology letters**, v. 231, p. 165-169, 2004.

YANG, X.; CHEN, H.; GAO, H.; LI, Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 277-280, 2001.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMILASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS CULTIVADOS EM ESTADO SÓLIDO

RESUMO

As enzimas amilolíticas merecem destaque no cenário biotecnológico, podendo ser aplicadas em vários processos industriais. Enzimas obtidas de fontes microbianas, apresentam menor custo de produção quando comparadas com enzimas extraídas de animais e vegetais, pois podem ser produzidas por processos fermentativos utilizando resíduos industriais, agregando valor a materiais de baixo custo. No presente trabalho, foi estudada a produção de amilases por 2 linhagens de fungos filamentosos, sendo uma mesofílica, *Lichtheimia ramosa* e a outra termofílica, *Thermoascus aurantiacus*, utilizando subprodutos da agroindústria para o cultivo em estado sólido. A maior produção de amilase, para ambos os fungos foi obtida em farelo de trigo, com o pH do meio ajustado para 4,0, após 96 horas de cultivo, atingindo 41,72 e 14,45 U/mL para *L. ramosa* e *Thermoascus aurantiacus* respectivamente. As enzimas apresentaram maior atividade catalítica em pH 6,0 a 60 °C. A enzima produzida pelo fungo *L. ramosa* foi estável em pH 3,0 - 10,5 e a enzima do *Thermoascus aurantiacus* em pH 4,5 - 9,5. A enzima produzida pelo *L. ramosa* manteve-se estável após 1 hora a 55 °C, enquanto a enzima produzida pelo *Thermoascus aurantiacus* apresentou 60% de sua atividade original quando incubada nas mesmas condições. Ambas as enzimas apresentaram estabilidade ao etanol, no entanto a enzima produzida pelo *Thermoascus aurantiacus* foi mais estável. Amidos de diferentes fontes foram hidrolisados pelas enzimas, sendo os melhores resultados obtidos com amido de milho. O extrato enzimático produzido por *L. ramosa* apresentou potencial liqueficante e sacarificante, já o produzido por *Thermoascus aurantiacus* apresentou apenas potencial sacarificante, indicando provável atividade de glucoamilase.

Palavras-chave: Enzimas microbianas, Cultivo em estado sólido, Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

The amylolytic enzymes are noteworthy in biotech and can be applied in various industrial processes. Enzymes obtained from microbial sources have lower production costs when compared with enzymes extracted from animals and vegetables, because they can be produced by fermentation processes using industrial waste, adding value to low-cost materials. In this work, we studied the production of amylases by two filamentous fungi, one mesophilic, *Lichtheimia ramosa* and the other thermophilic, *Thermoascus aurantiacus*, using agro industrial by products for solid state growing. The highest yield of amylase to both fungi was obtained in wheat bran, in pH 4,0, after 96 hours of culture, reaching 41,72 and 14.45 U/mL for *L. ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* respectively. The enzymes showed higher catalytic activity at pH 6,0 at 60 °C. The enzyme produced by the fungus *L. ramosa* was stable at pH 3,0 to 10,5 and in enzyme from *Thermoascus aurantiacus* pH 4,5 to 9,5. The enzyme produced by *L. ramosa* remained stable after 1 hour at 55 °C, while the enzyme produced by *Thermoascus aurantiacus* showed 60% of its original activity when incubated under the same conditions. Both enzymes showed stability to ethanol, however the enzyme produced by the *Thermoascus aurantiacus* was more stable. Starches from different sources were hydrolyzed by enzymes, with best results obtained with corn starch. The enzyme extract produced by *L. ramosa* showed potential liquefaction and saccharogenic, on the other hand the extract produced by *Thermoascus aurantiacus* showed only potential saccharogenic, indicating probable activity of glucoamylase.

Key words: Microbial enzymes, Solid state growing, Agroindustrial by products.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de fungos em bioprocessos, cujos produtos são comercialmente importantes não é um fenômeno recente, sabe-se que desde a época dos antigos egípcios já se fazia uso destes micro-organismos em processos fermentativos para a produção de bebidas alcoólicas (PAPAGIANNI, 2007). Com o rápido aumento populacional surge a inevitável necessidade da criação de novas fontes de alimentos e energia, o que só será possível, com melhor aproveitamento dos recursos naturais (VILLAS-BÔAS; ESPOSITO, 2000). Diante da necessidade de se obter enzimas industriais de maneira economicamente viável, é crescente a busca por matérias-primas de baixo custo para a produção das mesmas. Neste contexto, subprodutos agroindustriais podem ser utilizados como substratos, para o cultivo em estado sólido (CES) de micro-organismos. Por esse tipo de processo são produzidas diversas enzimas de interesse industrial, como proteases, amilases, celulasas, xilanases e pectinases (PANDEY, 2003; BON et al., 2008).

O CES apresenta similaridade com o ambiente natural dos micro-organismos, principalmente para os fungos filamentosos, sendo uma alternativa bastante promissora para o cultivo destas espécies microbianas (PANDEY et al., 2000; SINGHANIA et al., 2009). No entanto, algumas desvantagens podem ser destacadas: menor acessibilidade aos substratos e a baixa homogeneidade do meio, dificultam o controle dos parâmetros operacionais como pH, temperatura, umidade, entre outros. Estes problemas estimulam trabalhos que visam contribuir para viabilizar a utilização do CES em processos industriais (RAIMBAULT, 1998; SINGHANIA et al., 2009).

O amido é um dos principais compostos de reserva vegetal, evolutivamente tem sido usado como uma das principais fontes de energia para os níveis subsequentes da cadeia alimentar nos ecossistemas (ZEEMAN et al., 2004). Este polissacarídeo é composto por unidades de glicose, organizadas em dois homopolissacarídeos, a amilose e a amilopectina. A amilose é um polímero linear de milhares de resíduos de glicose ligados por ligação α -1,4. A amilopectina é um polímero altamente ramificado em que as cadeias lineares de resíduos α -1,4 estão interligadas por ligações α -1,6 a cada 24 a 30 resíduos de glicose. As moléculas de amilopectina contêm até 10.000.000 resíduos de glicose, representando uma das maiores moléculas presentes na natureza. O conteúdo relativo de amilose e amilopectina varia com a fonte de amido (HAMILTON et al., 2000; NIRMALA; MURALIKRISHNA, 2003).

A hidrólise enzimática do amido em monossacarídeos envolve duas etapas: liquefação e sacarificação. No processo de liquefação, os grânulos de amido são dispersos em solução aquosa, aquecidos (levando à gelatinização) hidrolisados parcial e irreversivelmente pelas enzimas envolvidas nesta etapa, sendo elas, as endoamilases e enzimas desramificantes, como: α -amilase, isoamilase e pululanases. Para a sacarificação do amido, geralmente, são utilizadas exoamilases como glucoamilases, β -amilases e amiloglicosidase, atuando sobre as ligações glicosídicas α -1,4 da amilopectina. O resultado dessa segunda etapa é uma solução de sacarídeos de baixo peso molecular como glicose e maltose (VAN DER MAAREL et al., 2002).

Além da produção de biocombustíveis a partir de fontes amiláceas, as amilases também são utilizadas para a produção de xaropes de maltose e glicose utilizados na elaboração de doces e bebidas; apresentam aplicabilidade em processos de panificação suplementando a atividade amilolítica de farinhas; na indústria de detergentes para limpeza industrial; em processos de desengomagem de fibras têxteis, dentre outras (MITIDIARI et al., 2006). Dessa forma, as amilases representam um papel muito significativo na indústria de processamento do amido, sendo produzidas comercialmente a partir de micro-organismos e representam cerca de 25-33% do mercado de enzimas do mundo, ficando atrás somente das proteases (KIRK et al., 2002; NGUYEN et al., 2002).

Em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo de enzimologia e processos fermentativos, foram selecionadas duas linhagens de fungos filamentosos com potencial para produção de amilases, sendo uma termofílica e outra mesofílica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros de cultivo em estado sólido para produção de amilase por essas linhagens e avaliar o potencial industrial das enzimas através da caracterização bioquímica e do perfil catalítico dos extratos enzimáticos produzidos.

2. METODOLOGIA

2.1. Micro-organismos

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens de fungos filamentosos, sendo uma mesofílica, *Lichtheimia ramosa* e outra termofílica, *Thermoascus aurantiacus*. *Lichtheimia ramosa* foi isolado de bagaço de cana-de-açúcar, na região de Dourados/MS (GONÇALVES et al., 2013). *Thermoascus aurantiacus* foi isolado pelo grupo de pesquisa, a partir de amostras de serrapilheira de fragmento de floresta estacional semidecidual atlântica (mata do azulão)

localizada na região de Dourados-MS. Os micro-organismos foram mantidos a 4 °C em tubos de ensaio com meio Sabouraud Dextrose inclinado. Para manter a viabilidade das linhagens, repiques foram feitos mensalmente e todas as cepas foram mantidas em tubos de ensaio contendo óleo mineral sobre a cultura.

2.2. Preparo do inoculo

Os micro-organismos foram cultivados em Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio ágar Sabouraud Dextrose inclinado, mantidos por 48 horas nas respectivas temperaturas, *L. ramosa* a 28 °C e *T. aurantiacus* a 45 °C. A suspensão do micro-organismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 30 mL de solução nutriente composta por 0,1% de sulfato de amônio, 0,1% de sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% de nitrato de amônia, devidamente autoclavada. A inoculação do fungo no substrato se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão para os frascos Erlenmeyer contendo os substratos previamente preparados.

2.3. Cultivo em estado sólido

As linhagens selecionadas foram cultivadas em diferentes resíduos agroindustriais a fim de estabelecer o substrato ideal para produção de amilases por CES. Os resíduos avaliados foram: sabugo de milho, bagaço de cana de açúcar, palha de milho, casca de arroz, farelo de soja e farelo de trigo. A umidade do substrato foi variada de 50 a 90%. O pH da solução nutriente utilizada para umedecer o substrato foi variado de 3,0 a 9,0. O tempo de cultivo foi variado utilizando as condições pré-estabelecidas nos ensaios anteriores, amostras foram retiradas a cada 24 horas perfazendo o total de 168 horas de cultivo.

2.4. Extração da enzima

A enzima foi extraída pela adição de 50 mL de água destilada nos frascos Erlenmeyer contendo os meios fermentados. Tais frascos foram mantidos em agitação por 1 hora a 150 rpm, em seguida foram filtrados e posteriormente centrifugados a 1500xg. O sobrenadante foi utilizado para os ensaios enzimáticos.

2.5. Determinação da atividade de amilases nos extratos enzimáticos

A atividade enzimática foi determinada pela adição de 0,1 mL de enzima em 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0 contendo 1% de amido de milho (Maizena®). Após 10 minutos de reação, o açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de DNS (3,5-acido

dinitrosalisílico) descrito por Miller em 1959. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de produto por minuto de reação.

2.6. Caracterização bioquímica das amilases produzidas

2.6.1. Avaliação da estabilidade ao pH e temperatura sobre a atividade das enzimas

O pH ótimo foi determinado mensurando a atividade da enzima a 50 °C em diferentes valores de pH (3,0-8,0), utilizando tampão McIlvaine. A temperatura ótima foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em diferentes temperaturas (30-75 °C) no respectivo pH ótimo de cada enzima. A estabilidade das enzimas ao pH foi avaliada incubando-as por 24 horas em temperatura ambiente em diferentes valores de pH; os tampões utilizados foram McIlvaine (3,0-8,0), Tris-HCl 0,1M (8,0-8,5) e Glicina-NaOH 0,1M (8,5-10,5). A termoestabilidade das enzimas foi estudada incubando as enzimas por 1 hora em diferentes valores de temperaturas que variaram de 30 - 75 °C. As atividades residuais foram determinadas nas condições ótimas de pH e temperatura das enzimas (LEITE et al., 2008).

2.6.2. Avaliação do etanol sobre a atividade das enzimas

A atividade enzimática foi quantificada com a adição de etanol, em diferentes concentrações na mistura de reação (0 - 30%). Os ensaios foram realizados a 50 °C em tampão McIlvaine com pH 6,0 acrescido de 1% de amido de milho (Maizena®).

2.6.3. Avaliação do potencial catalítico para diferentes fontes de amido

Os extratos enzimáticos foram avaliados quanto ao potencial de hidrolisar amidos provenientes de diferentes fontes vegetais. Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando como substratos: amido de batata, amido de trigo, amido de mandioca e amido de milho (Maizena®). As reações foram realizadas em tampão McIlvaine pH 6,0. A quantidade de açúcar redutor liberada foi quantificada pelo método de DNS (MILLER, 1959).

2.6.4. Avaliação do potencial dextrinizante dos extratos enzimáticos

A atividade dextrinizante foi avaliada utilizando amido de milho (Maizena®) 1% como substrato enzimático em tampão McIlvaine pH 6,0, pelo método iodométrico descrito por Fuwa (1954) e Ponsawasdi; Yagisawa (1987) com algumas modificações. A mistura de reação

foi composta por 0,1 mL de enzima adicionada a 0,3 mL de solução tampão contendo amido. Após 10 minutos a 60 °C, a reação foi paralisada pela adição de 4 mL de solução de HCl 0,2 M. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL de reativo de iodo e 10 mL de água destilada. A absorbância foi quantificada a 700 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% a intensidade da cor azul do complexo iodo-amido por minuto de reação.

2.6.5. Potencial sacarificante dos extratos enzimáticos

A atividade sacarificante foi avaliada utilizando amido de milho (Maizena®) 1% como substrato enzimático em tampão McIlvaine pH 6,0, pelo método de glicose-oxidase/peroxidase descrito por Bergmeyer; Bernt (1974) com algumas modificações. A mistura de reação foi composta por 0,1 mL de enzima adicionada a 0,4 mL de solução tampão contendo amido. Após 10 minutos a 60 °C, a reação foi paralisada em banho de gelo. A glicose liberada foi quantificada com o kit enzimático colorimétrico (Glicose-PP Analisa). A absorbância foi quantificada a 505 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por minuto de reação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção de amilases por cultivo em estado sólido

Dentre os substratos analisados, o cultivo em farelo de trigo apresentou maior produção de amilases para ambos os micro-organismos, atingindo 32,04 U/mL para *L. ramosa* e 4,42 U/mL para *T. aurantiacus*, após 120 horas de cultivo (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de amilases em diferentes substratos por CES em 120 horas de cultivo, 75% de umidade e pH 5,0.

Substrato	<i>Lichtheimia ramosa</i> U/mL	<i>Thermoascus aurantiacus</i> U/mL
Bagaço de cana	-	0,37
Palha de milho	0,88	0,62
Farelo de soja	1,05	0,76
Casca de arroz	0,39	0,47
Sabugo de milho	0,92	0,52
Farelo de trigo	32,04	4,42

Os cultivos realizados em outros substratos apresentam quantidade de enzima muito inferior quando comparado aos obtidos em farelo de trigo, desta forma, este substrato foi utilizado nos cultivos subsequentes. O farelo de trigo possui maior quantidade de macro e micro nutrientes disponíveis comparado com os demais resíduos agroindustriais, como o bagaço de cana de açúcar, palha de arroz, palha de trigo e farelo de arroz (DIAS, 2003). Segundo Haque et al. (2002) o farelo de trigo consiste em um meio complexo e rico em proteínas, carboidratos, minerais, lipídeos e vitaminas, favorecendo o crescimento microbiano e a produção de enzimas.

Kunamneni et al. (2005) também reportam o farelo de trigo como sendo o melhor substrato para produção da enzima amilase pelo fungo *Thermomyces lanuginosus*. Moreira et al. (2001) encontraram valores para amilases que aumentaram em 10 vezes a produção da enzima quando cultivado por diferentes espécies de *Aspergillus* na presença de farelo de trigo. Oliveira et al. (2011) também confirmam o farelo de trigo como sendo o melhor substrato para a produção de amilase por fungos filamentosos.

Parâmetros como fontes de carbono, nitrogênio, pH, umidade e temperatura representam variáveis operacionais determinantes no processo de cultivo (SINGHANIA et al., 2010). A umidade do meio de cultivo foi variada de 50 a 90%. A maior produção de amilase foi obtida pelo cultivo do *L. ramosa* a 60% de umidade apresentando valor máximo de 36,98 U/mL e mínimo de 14,19 U/mL quando a umidade foi igual a 90% (Figura 1A). Para *Thermoascus aurantiacus* a maior produção foi obtida a 65% de umidade com valor de 6,51 U/mL e mínimo de 1,93 U/mL quando cultivado com 90% (Figura 1B).

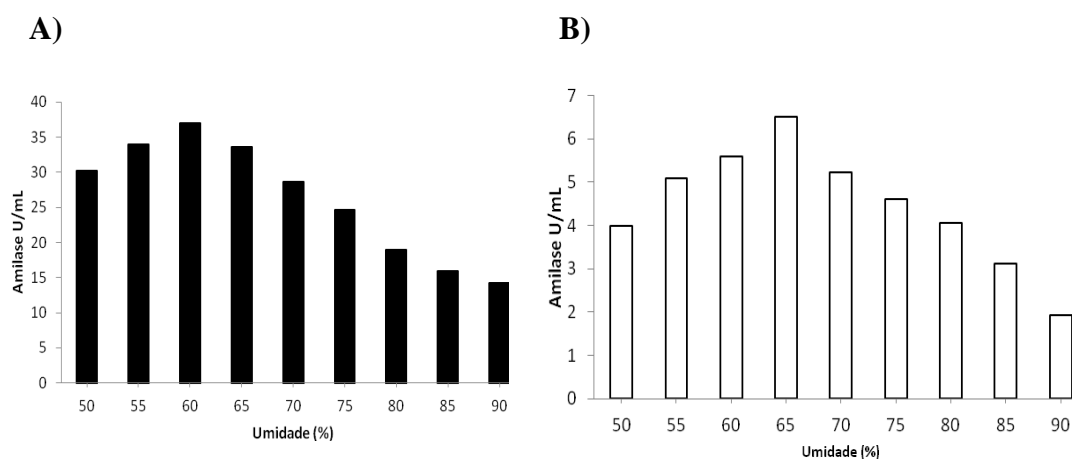


Figura 1. Análise de umidade para produção de amilase, por CES utilizando farelo de trigo como substrato em pH 5,0, após 120 horas de crescimento. **A)** *L. ramosa* e **B)** *T. aurantiacus*.

A umidade do meio é um parâmetro fundamental nos cultivos em estado sólido. O meio deve conter umidade suficiente para permitir as atividades fisiológicas microbianas mas não pode exceder o limite de absorção do meio, deixando água livre entre as partículas do substrato. Umidades acima de 80% podem favorecer a contaminação bacteriana (CRUZ et al., 2011). O excesso de umidade resulta ainda na diminuição da porosidade, na baixa difusão de oxigênio e na redução de trocas gasosas, que prejudicam o crescimento microbiano (HOLKER et al., 2004; DALSENTER et al., 2005).

Durante o processo de cultivo foi observado a variação na produção das enzimas quando o pH da solução nutriente foi ajustado para diferentes valores, onde o pH inicial foi variado de 3,0 a 9,0. A maior atividade enzimática foi obtida quando os micro-organismos foram cultivados em pH 4,0 com valores de 40,79 U/mL para *L. ramosa* e 10,31 U/mL para *T. aurantiacus*.

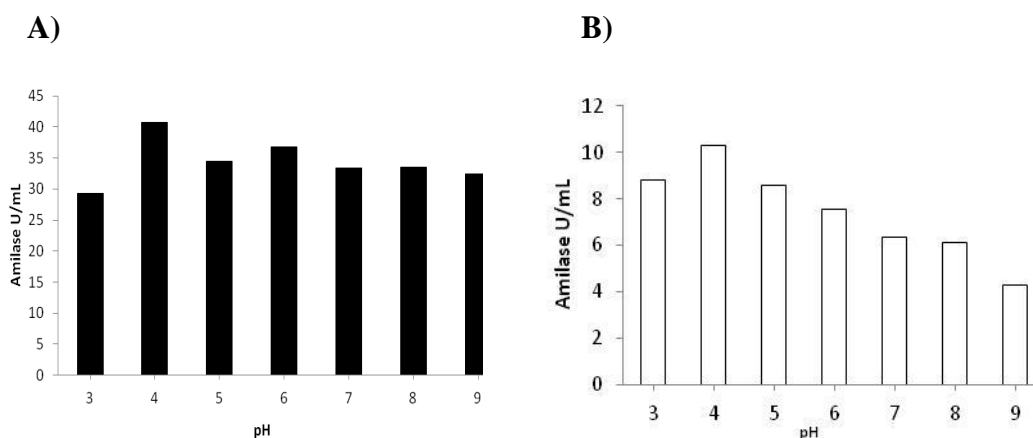


Figura 2. Efeito do pH do processo de CES utilizando farelo de trigo como substrato, após 120 horas de cultivo. **A)** *L. ramosa* umidade de 60% e **B)** *T. aurantiacus* umidade de 65%.

Tais valores corroboram com Omemu et al. (2005) que relata pH 4,0 como o ideal para produção de amilases pelo fungo *Aspergillus niger*. Resultado semelhante também é reportado por Gomes et al. (2005) na produção de *Aspergillus flavus* e Wallis et al. (2001) quando cultivaram *Aspergillus niger* para a produção de glucoamilase.

Quanto ao tempo de cultivo, *L. ramosa*, atingiu uma produção máxima de 41,72 U/mL, em 96 horas de cultivo (Figura 3A) *T. aurantiacus* apresentou produção máxima de 14,45 U/mL, também em 96 horas de cultivo (Figura 3B).

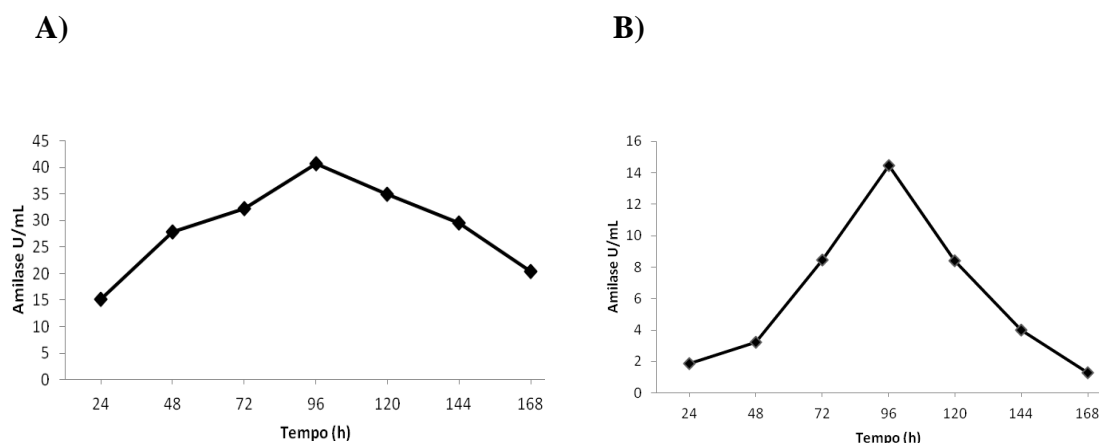


Figura 3. Perfil de produção de amilases sob CES, ao longo do tempo utilizando farelo de trigo como substrato pH 4,0. **A)** *L. ramosa*, umidade de 60% e **B)** *T. aurantiacus*, umidade 65%.

Posteriormente ao pico de produção foi possível observar uma considerável queda nas atividades enzimáticas presente nos substratos. Tal redução, em função do tempo de cultivo, pode ser ocasionada pelo esgotamento de nutrientes, o que inibe o crescimento do fungo e a secreção da enzima (ALVA et al., 2007; SHAFIQUE et al., 2009). Após a realização dos experimentos foi possível otimizar os parâmetros para a produção de amilases pelos micro-organismos, resumidamente descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo das condições ideais de cultivo para produção de amilases pelos micro-organismos.

Micro-organismos	Substrato	Umidade	pH	Tempo cultivo	Atividade (U/mL)
<i>L. ramosa</i>	Farelo trigo	60%	4,0	96h	41,72
<i>T. aurantiacus</i>	Farelo trigo	65%	4,0	96h	14,45

Quando comparados com a literatura, nossos resultados são muito satisfatórios, Moreira et al. (2001) cultivaram diferentes espécies de *Aspergillus* na produção de amilases, sendo os valores obtidos inferiores aos do presente trabalho com produção de 9,0 U/mL, 7,8 U/mL e 6,4 U/mL para *A. flavus*, *A. tamarii* e *A. fumigatus*, respectivamente. Wallis et al. (2001) obtiveram 10,96 U/mL de amilase produzida por *Aspergillus niger* bem como Thorsen et al. (2006) obtiveram 7,4 U/mL na produção de glucoamilases pelo fungo *Thermomyces lanuginosus*. Produções maiores também são descritas. Kunamneni et al. (2005) obtiveram 53,40 U/mL de amilase produzida por *Thermomyces lanuginosus*. Omemu

et al. (2005) obtiveram 806 U/mL na produção de amilases por espécies de *Aspergillus*. No entanto, a ausência de trabalhos com *L. ramosa* e a termofilia apresentada por *T. aurantiacus* estimulam os estudos das características das enzimas produzidas por estes micro-organismos.

3.2. Caracterização das enzimas produzidas por cultivo em estado sólido

3.2.1. Avaliação do pH e temperatura sobre a atividade das enzimas

As amilases produzidas pelos micro-organismos apresentaram atividade ótima no pH 6,0 (Figura 4A e 4B) e temperatura ótima de 60 °C (Figura 4C e 4D).

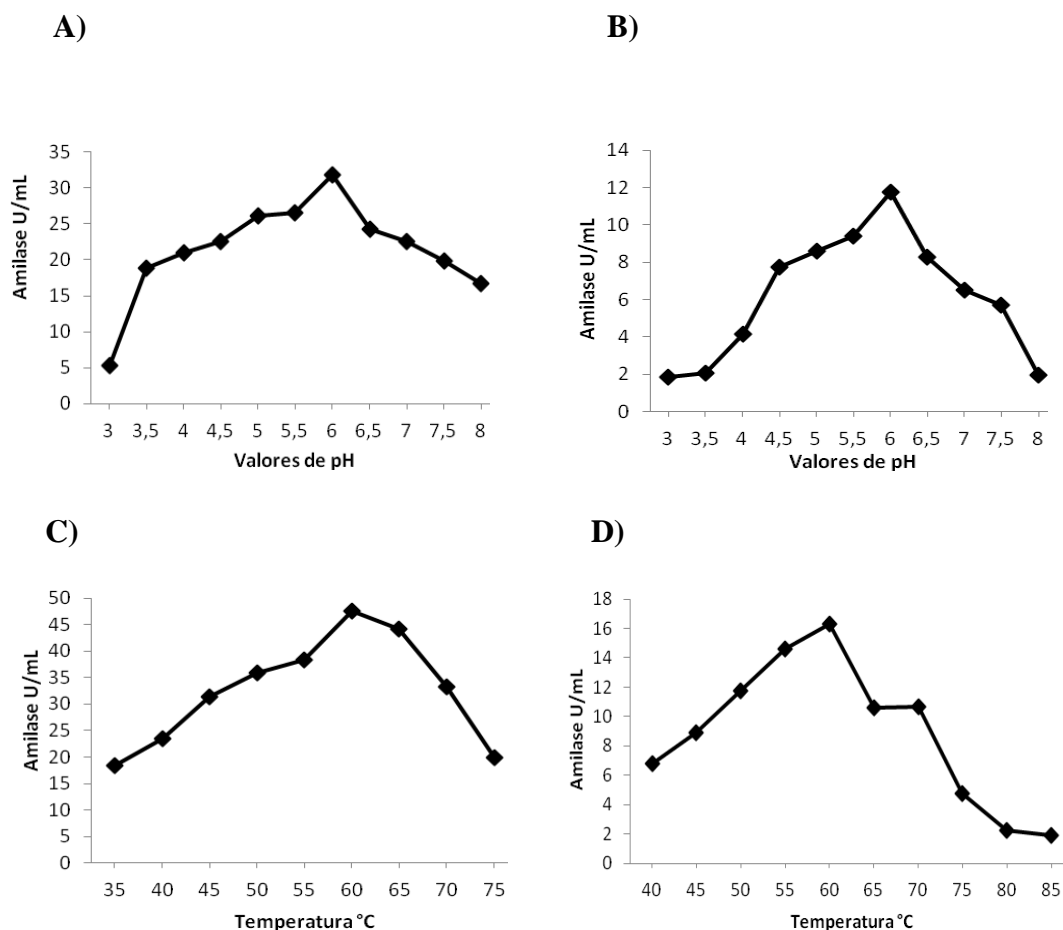


Figura 4. Avaliação do pH ótimo e da temperatura ótima das amilases produzidas A e C) *L. ramosa*; B e D) *T. aurantiacus*.

Os resultados de pH ótimo condizem aos encontrados na literatura, uma vez que muitas amilases de diversas fontes microbianas exibem pHs ótimos de atividade que variam de 4,5 a 7,0 (GIANNESI et al., 2006). Resultado semelhante, também é descrito

por Kunamneni et al. (2005), que encontraram pH 6,0 como sendo ótimo para a amilase produzida pelo fungo *Thermomyces lanuginosus*, corroborando também com os resultados de Cereia et al. (2000) para a glucoamilase produzida pela mesma espécie fúngica. Segundo Soni et al. (2003) a glucoamilase produzida por *Aspergillus sp* apresentou pH 6,0 como ótimo. Rahardjo et al. (2005) também reportam pH ótimo de 6,0 na caracterização de α -amilase de diferentes espécies de *Aspergillus*.

O efeito de temperatura foi observado, primeiramente, pelo aumento da velocidade de formação do produto, por consequência da interação entre enzima e substrato. No entanto, existe uma temperatura limite para cada enzima, acima da qual se observa, gradativamente, a desnaturação da proteína pelo calor (GONÇALVES et al., 2008). Os resultados encontrados se assemelham com a literatura, Aquino et al. (2003) obtiveram como temperatura ótima 60 °C para amilases produzidas pelo fungo *Scytalidium thermophilum*. Nguyen et al. (2002) obtiveram temperatura ótima de 60 °C para a glucoamilase produzida pelo fungo *Humicola grisea*. Resultados semelhantes, foram encontrados por Silva et al. (2005) caracterizando a enzima de *Aspergillus niger* e por Camassola et al. (2004) para amilase do *Penicillium echinulatum*.

3.2.2. Estabilidade ao pH e termoestabilidade das enzimas

As enzimas em estudo foram estáveis em uma ampla faixa de pH. A amilase produzida por *L. ramosa* manteve sua atividade entre o pH 3,5 a 10,5 (Figura 5A) e a enzima produzida por *T. aurantiacus* foi estável do pH 4,5 a 9,5 (Figura 5B). Quanto a temperatura de estabilidade, a amilase produzida pelo fungo *L. ramosa* manteve sua atividade catalítica após 1 hora a 55 °C, retendo 75% de sua atividade original, quando incubada pelo mesmo período a 60 °C (Figura 5C). A amilase produzida por *T. aurantiacus* manteve-se estável após 1 hora a 50 °C, quando a temperatura foi aumentada para 60 °C a enzima apresentou 25% de sua atividade inicial (Figura 5D).

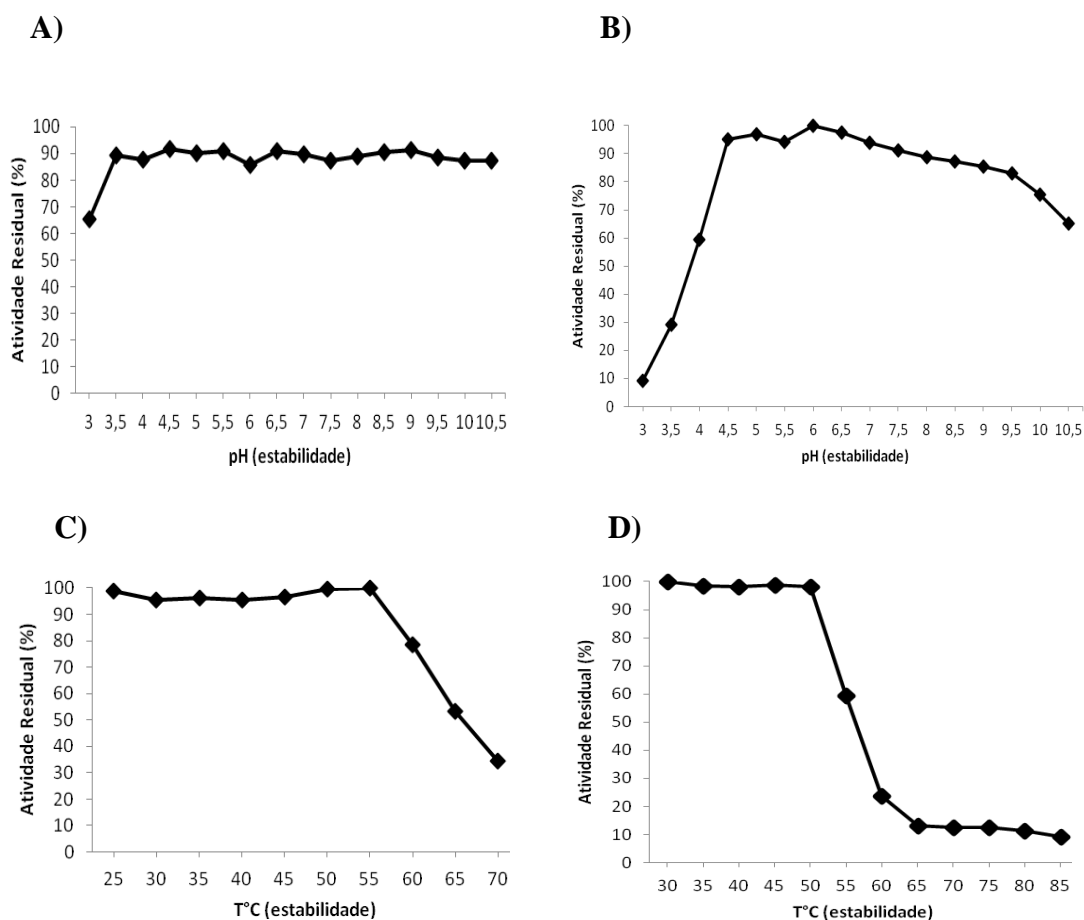


Figura 5. Estabilidade ao pH e termoestabilidade das enzimas produzidas. **A e C)** *L. ramosa* ; **B e D)** *T. aurantiacus*.

Os resultados da estabilidade das enzimas ao pH se assemelha com os encontrados na literatura. Gomes et al. (2005) e Gonçalves et al. (2008) reportam ampla faixa de pH para glucoamilase de *Thermomyces lanuginosus*, variando 3,0 a 10. Segundo Michelin et al. (2008) a atuação das enzimas em ampla faixa de pH pode ser uma vantagem para indústria, sendo necessário um menor ajuste de pH entre os tratamentos sequenciais de α -amilase (liquefação) e glucoamilase (sacarificação).

Quanto aos resultados de termoestabilidade das enzimas, os mesmos permitem inferir que a amilase produzida pelo micro-organismo mesofílico *L. ramosa* é mais termoestável que a amilase produzida pelo fungo termofílico *T. aurantiacus*. Essa capacidade catalítica pode estar intimamente associada com a sua estrutura tridimensional que são mantidas por pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. Algumas vezes, a primeira interação da enzima com seu substrato resulta em uma série de mudanças na estrutura tridimensional da enzima. E uma pequena alteração nessa estrutura pode deixá-la mais estável facilitando a interação com o substrato.

Apesar de não ser usual elevada estabilidade térmica em enzimas de micro-organismos mesofílicos, trabalhos anteriores confirmam essa possibilidade (LEITE et al., 2007; LEITE et al., 2008). A termoestabilidade também é reportada por outros autores. Gomes et al. (2005) observaram estabilidade térmica de 10 a 60 °C para amilases produzidas por *Aspergillus flavus* e 10 a 40 °C para amilases de *Thermomyces lanuginosus* após 1 hora de incubação. Bem como Oliveira et al. (2011) reportam estabilidade térmica de 10 a 37 °C para amilases de *Penicillium sp.*

3.2.3 Avaliação do etanol sobre a atividade da enzima

Os resultados demonstram que as amilases produzidas por *L. ramosa* apresentaram atividade residual superior a 60% da original, quando incubadas em concentrações de 10% de etanol, e as amilases produzidas por *T. aurantiacus* apresentaram atividade residual maior que 80% da original (Figura 6).

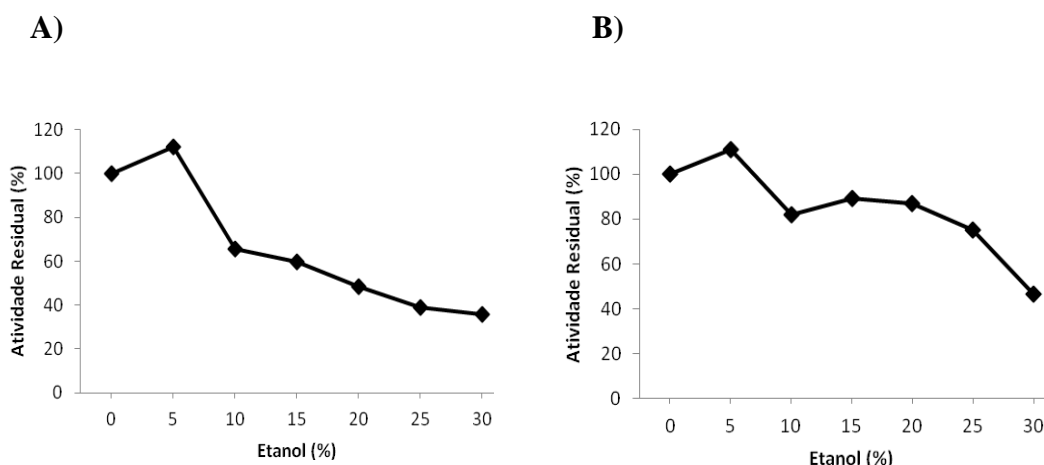


Figura 6. Avaliação da concentração de etanol sobre a atividade enzimática dos extratos produzidos em CES. **A)** *L. ramosa* e **B)** *T. aurantiacus*.

A inibição por etanol é uma forte tendência no estudo de algumas enzimas, pois estas podem ser expostas a concentrações substanciais durante diversas aplicações comerciais (LO et al., 1990; SUN; CHENG, 2002). Nos processos convencionais de produção alcoólica, concentrações superiores a 10% de etanol podem ser extremamente nocivas para o próprio micro-organismo fermentador (GU et al., 2001).

O aumento do potencial catalítico pelo etanol, evidenciado para a enzima produzida pelo fungo *L. ramosa* e por *T. aurantiacus*, pode estar relacionado com a utilização do etanol

pela enzima como acceptor intermediário, aumentando a velocidade da reação. (BARBAGALLO et al., 2004; VILLENA et al., 2006).

3.2.4. Avaliação do potencial catalítico das enzimas sobre amidos de diferentes fontes

A ação das amilases sobre amidos de diferentes fontes vegetais foram avaliadas. Os extratos enzimáticos apresentaram maior potencial catalítico quando o amido de milho foi utilizado como substrato, sendo obtido 34,94 U/mL para a amilase produzida por *L. ramosa* e 12,26 U/mL para a amilase produzida pelo *T. aurantiacus* (Figura 7).

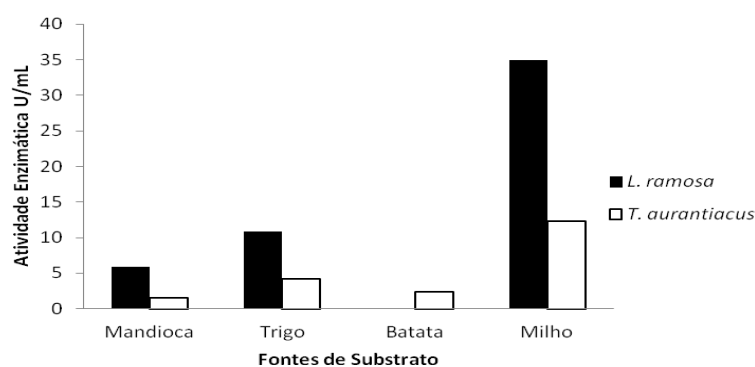


Figura 7. Efeito da atividade amilásica sobre amidos de diferentes fontes vegetais, pela quantificação de açúcar redutor pelo método DNS.

A diferença observada na ação das enzimas amilolíticas pode estar relacionada com a composição da molécula, em particular, no teor de amilose e no comprimento de suas cadeias, além dos teores de lipídeos, proteínas e minerais. Outro fator que pode estar relacionado à susceptibilidade do grânulo de amido ao ataque enzimático é o tamanho dos poros existentes na superfície do grânulo (HUBER e BEMILLER, 2000).

O conteúdo relativo de amilose e amilopectina varia de acordo com a fonte botânica, o que irá conferir características específicas ao amido (CEREDA, 2002). O conteúdo desses polissacarídeos afeta a arquitetura do grânulo, as propriedades de geleificação e os atributos texturais (THOMAS; ATWELL, 1999).

Segundo Cruz et al. (1997) a composição e variação da estrutura molecular do amido podem afetar a ação de enzimas amilolíticas. O amido de milho apresenta maior valor de amilose em relação aos outros amidos e por consequência, teores menores de amilopectina, o que favorece a degradação da enzima, pois a amilose é formada por cadeias lineares de unidades de glicose, apresentando peso molecular de 50.000 a 200.000. A amilopectina

apresenta estrutura altamente ramificada com alto peso molecular variando de 100.000 a vários milhões dificultando o desempenho catalítico das amilases (FENNEMA et al., 2010).

3.2.5. Avaliação do potencial dextrinizante e sacarificante dos extratos enzimáticos

O amido de milho foi utilizado como substrato, considerando os resultados anteriormente apresentados, para avaliar as modificações de cada extrato enzimático sobre a molécula do amido, por meio de diferentes métodos analíticos (Figura 8).

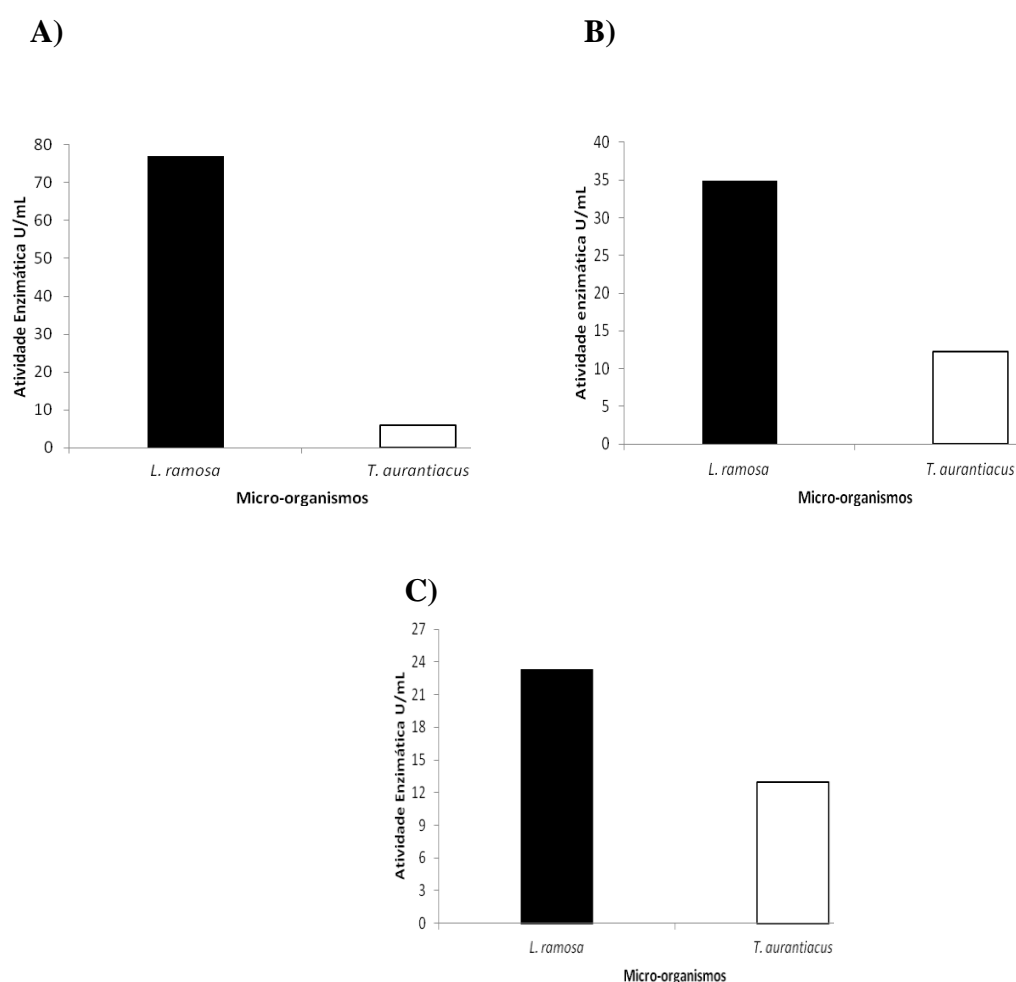


Figura 8: Modificações enzimáticas sobre a molécula de amido. **A)** Redução do grau de polimerização do amido quantificado pelo método iodométrico. **B)** Liberação de açúcares e extremidades redutoras pelo método de DNS. **C)** Liberação de moléculas de glicose pelo método de glicose/oxidase.

Comparando a ação das enzimas sobre a molécula do amido por diferentes métodos foi possível observar que a amilase produzida pelo fungo *L. ramosa* apresenta elevada

atividade despolimerizante, o que reflete em elevada quantidade de extremidades redutoras liberadas (Figura 8A). Pelo método de glicose oxidase foi possível observar que grande parte das extremidades redutoras é composta por glicose (Figura 8C), demonstrando atividade sinérgica de enzimas liqueficientes e sacarificantes.

A ação sinérgica de enzimas produzidas por um único micro-organismo não é comumente encontrada. No entanto, trabalhos anteriores confirmam essa possibilidade, López et al. (2005) constataram a ação de enzimas sacarificantes e liqueficientes, justificando a conversão total do amido em glicose. Ezeji; Bahl, (2006) também reportam o efeito sinérgico entre uma α -amilase e glucoamilase em estudos realizados com uma linhagem de *Geobacillus thermodenitrificans*.

A enzima produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* apresentou baixo potencial despolimerizante (Figura 8A), sendo a quantidade de açúcar redutor (Figura 8B) semelhante a obtida de glicose livre (Figura 8C), sugerindo assim o potencial sacarificante com possível atividade de glucoamilase.

São duas as etapas envolvendo a hidrólise da molécula do amido: liquefação, realizadas por endoamilases e enzimas desramificantes dentre elas: α -amilase, isoamilase, pululanases e sacarificação, onde são utilizadas exoamilases como glucoamilases, β -amilases e amiloglicosidase (VAN DER MAAREL et al., 2002). Dessa forma, os resultados obtidos permitem inferir que os extratos enzimáticos produzido por *L. ramosa* apresentam exo e endoamilases, enquanto os extratos de *T. aurantiacus* apresentam predominantemente exoamilases. Trabalhos anteriores confirmam a produção de enzimas liqueficientes e sacarificantes por diferentes espécies fúngicas. Shafique et al. (2009), Cruz et al. (2011) e Sahnoun et al. (2012) reportam atividade endoamilases para diferentes espécies de *Aspergillus*, tais como: *A. flavus*, *A. níger* e *A. oryzae* respectivamente. Para atividades exoamilases, resultados para fungos filamentosos também são reportados por diversos autores: Gonçalves et al. (2008) estudando *Thermomyces lanuginosus*, encontraram atividade exoamilase; Gomes et al. (2005) e Silva et al. (2005) também reportam resultados semelhantes para os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus níger*, bem como Michelin et al. (2008) para o fungo *Paecilomyces variotii*.

4. CONCLUSÃO

O fungo mesofílico *L. ramosa* e o termofílico *T. aurantiacus* apresentaram bom potencial para a produção de amilases. Sendo a produção desta enzima expressivamente maior quando utilizado o farelo de trigo como meio de cultivo.

Os resultados permitem inferir que a maior produção de amilases pelo micro-organismo *L. ramosa* foi obtida em farelo de trigo, umedecido com 60% de umidade, com pH inicial 4,0 após 96 horas de cultivo. Para *T. aurantiacus* a maior produção de amilase foi obtida em farelo de trigo, umedecido com 65% de umidade, com pH inicial 4,0 após 96 horas de cultivo.

O fungo *L. ramosa*, destaca-se pela expressiva produção de enzimas amilolíticas, associada à elevada estabilidade da enzima frente à variação da temperatura, pH, etanol e o potencial catalítico para liberação de açúcares livres, capacitando a aplicação desta enzima em processos de sacarificação e fermentação simultânea para produção de etanol a partir de fontes amiláceas, principalmente de milho. Essas características também são observadas para as enzimas do *T. aurantiacus*, porém com valores inferiores aos apresentados por *L. ramosa*.

5. REFERÊNCIAS

- ALVA, S.; ANUPAMA, J.; SAVLA, J.; CHIU, Y. Y.; VYSSHALI, P.; SHRUTI, M. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus sp.* JGI 12 in solid state culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 576-581, 2007.
- AQUINO, A. C. M. M.; JORGE, J. A. ; TERENCEZI, H. F. ; POLIZELI, M. L. T. M. Studies on a thermostable α -amylase from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Applied Microbiol and Biotechnology**, v. 61, p. 323-328, 2003.
- BARBAGALLO, R, N.; SPAGNA, G.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 58-66, 2004.
- BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. **Methods of Enzymatic Analysis**, Editora: Verlag – Chemie, New York, p. 1205-1215, 1974.
- BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA-JUNIOR, N. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Editora: Interciência, Rio de Janeiro, cap. 10, p. 241-272, 2008.
- CAMASSOLA, M.; BITTENCOURT, L. R.; SHENEM, N. T.; ANDREAUS, J. DILLON, A. J. P. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22, p. 391-396, 2004.
- CEREDA, M. P. **Propriedades gerais do amido**. Editora Fundação Cargill, São Paulo, cap. 6, p. 101-133, 2002.
- CEREIA, M.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; GREENE, L. J.; ROSA, J. C.; POLIZELI, M. L. T. M. Glucoamylase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. Biochemical and regulatory properties. **Journal Basic Microbiology**, v. 40, p. 83-92, 2000.
- CRUZ, R.; SOUZA, E. L.; HOFFMANN, E. H. E.; BELLINI, M. Z.; CRUZ, V. A.; VIEIRA, C. R. Relationship between carbon source, production and pattern action of α -amylase from *Rhizopus sp.* **Revista de Microbiologia** , v. 28, p. 101-105, 1997.
- CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção de alfa-amilase por *Aspergillus niger* em resíduo de cascas de mandioca. **Unopar Científica. Ciências Biológicas e Saúde**, v.13, p. 245-249, 2011.
- DALSENTER, F. D. H.; VICCINI, G.; BARGA, M. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. A. Mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 801-807, 2005.

DIAS, E. S.; KOSHIKUMO, E. M. S.; SCHWAN, R. F.; SILVA, R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência Agrotecnologia**, v. 27, p. 1363-1369, 2003.

EZEJI, T. C.; BAHL, H. Purification, characterization, and synergistic action of phytate - resistant α -amylase and α -glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 27-38, 2006.

FENNEMA, O. R.; PARKIN, L. K.; DAMODARAN, S. **Química de alimentos de fennema**. Editora Artmed, Porto Alegre, cap.3, 2010.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954.

GIANNESI, G. C.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A. A novel α -glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. coprophilum that converts maltose into trehalose: purification and partial characterization of the enzymes. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1729-1735, 2006.

GOMES, E.; SOUZA, S. R.; GRANDI, R. P.; SILVA, R. Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* a 1.1 and *Thermomyces lanuginosus* a 13.37. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 75-82, 2005.

GONÇALVES, F. A.; LEITE, R. S. R.; RODRIGUES, A.; ARGANDOÑA, E. J. S.; FONSECA, G. G. Isolation and characterization of a novel high level β -glucosidase-producing *Lichtheimia ramosa* strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 8, 2013.

GONÇALVES, A. Z. L.; CARVALHO, A. F. A.; SILVA, R.; GOMES, E. Localization and partial characterization of thermostable glucoamylase produced by newly isolated *Thermomyces lanuginosus* TO3 in submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 857-865, 2008.

GU, Y.; QIAO M.; ZHOU Q.; ZHOU Z.; CHEN G. Hyperproduction of alcohol using yeast fermentation in highly concentrated molasses medium. **Tsinghua Science and Technology**, v. 6, p. 225-230, 2001.

HAMILTON, L. M.; KELLY, C. T.; FOGARTY, W. M. Review: cyclodextrins and their interaction with amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 561-567, 2000.

HAQUE, M. A.; SHAMS, U. D.; HAQUE, A. The effect of aqueous extracted wheat bran on the baking quality of biscuit. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 453-462, 2002.

HOLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

HUBER, K. C.; BEMILLER, J.N. Channels of maize and sorghum starch granules. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 269-276, 2000.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2002.

KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 100, p. 168-171, 2005.

LEITE, R. S. R.; GOMES, E.; SILVA, R. Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1101-1106, 2007.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.; SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391-395, 2008.

LO, A. C.; BARBIER, J. R.; WILLICK, G.E. Kinetics and specificities of two closely related β -glucosidases secreted by *Schizophyllum commune*. **European Journal of Biochemistry**, v. 192, p. 175-181, 1990.

LOPEZ, C.; TORRADO, A.; GUERRA, N. P.; PASTRANA, L. Optimization of solid-state enzymatic hydrolysis of chestnut using mixtures of α -amylase and glucoamylase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 989-995, 2005.

MICHELIN, M.; RULLER, R.; WARD, R. J.; MORAES, L. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and biochemical of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus *Paecilomyces variotti*. **Journal Industrial Microbiology & Biotechnology**. V. 35, p.17-25, 2008.

MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1217-1224, 2006.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOREIRA, F. G.; LENARTOVICS, V.; SOUZA, C. G. M.; RAMOS, E. P.; PERALTA, R. M. The use of methyl-d-glucoside, a synthetic analogue of maltose, as inducer of amylase by *Aspergillus sp* in solid-state and submerged fermentations, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 15-19, 2001.

NGUYEN, Q. D.; REZESSY-SZABÓ, J. M.; CLAEYSSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, Á. Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 345-352, 2002.

NIRMALA, M.; MURALIKRISHNA, G. Three α -amylases from malted finger millet (*Ragi*, *Eleusine coracana*, Indaf-15) – Purification and partial characterization. **Phytochemistry**, v. 62, p. 21-30, 2003.

OLIVEIRA, A. C. D.; WATANABE, F. M. F.; RODRIGUES, M. L. F. Comparison between fermentation in solid state and submerged fermentation to product α -amylase by *Penicillium* sp. and enzyme characterization. **Biociências, Biotecnologia e Saúde**, v. 1, p. 43-54, 2011.

OMEMU, A. M.; AKPAN, I.; BANKOLE, M. O.; TENIOLA, O. D. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. **African Journal Biotechnology**, v. 4, p. 19-25, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. review. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2007.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and indentification of a cyclomaltoextrin glucoamylase-producing bacteria. **Journal Fermentation Technology**, v. 65, p. 463-467, 1987.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p.174-188, 1998.

RAHARDJO, Y. S. P.; WEBER, F. J.; HAEMERS, S.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate α -amylase production in a model solid-state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 900–902, 2005.

SAHNOUN, M.; BEJAR, S.; SAYARI, A.; TRIKI, M. A.; KRIAA, M.; KAMMOUN, R. Production, purification and characterization of two α -amylase isoforms from a newly isolated *Aspergillus oryzae* strain S2. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 18-25, 2012.

SHAFIQUE, S.; BAJWA, R.; SHAFIQUE, S. Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular alpha-amylase activity. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, p. 897-905, 2009.

SILVA, T. M.; ANGELIS, A. D.; CARVALHO, A. F. A.; SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Production of saccharogenic and dextrinogenic amylases by *Rhizomucor pusillus* A 13.36. **Journal of Microbiology**, v. 43, p. 561-568, 2005.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541-549, 2010.

SONI, S. K.; KAUR, A.; GUPTA, J. K. Solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolyses of wheat starch. **Process Biochemistry**, v.39, p. 185-192, 2003.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

THOMAS, D. J.; ATWELL, W. A. **Starches: practical guides for the food industry**. Eagan Press Handbook, Minnesota, p.19-22, 1999.

THORSEN, T. S.; JOHNSEN, A. H.; JOSEFSEN, K.; JENSEN, B. Identification and characterization of glucoamylase from the fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 671-676, 2006.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 137- 155, 2002.

VILLAS- BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço da maçã. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 14, p. 38-42, 2000.

VILLENA, M. A.; IRANZO, J. F. U.; GUNDLLAPALLI, S. B.; OTERO, R. R. C.; PÉREZ, A. I. B. Characterization of an exocellular β -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 39, p. 229-234, 2006.

WALLIS, G. L. F.; SWIFT, R. J.; ATTERBURY, R.; TRAPPE, S.; RINAS, U.; HEMMING, F. W.; WIEB, M. G.; TRINCI, A. P. J.; PEBERDY, J. F. The effect of pH on glycoamylase production, glycosylation and chemostat evolution of *Aspergillus niger*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1527, p. 112-122, 2001.

ZEEMAN, S. C.; SMITH, S. M.; SMITH, A. M. The breakdown of starch in leaves. **New Phytologist**, v. 163, p. 247-261, 2004.

22/10/13

ANMI: A manuscript number has been assigned ... - Rodrigo Simões Ribeiro Leite

ANMI: A manuscript number has been assigned to Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation

em.anmi.0.36218d.f53f27af@editorialmanager.com em nome de
Annals of Microbiology - Editorial Office <belle.mojado@springer.com>

seg 30/09/2013 00:03

Para: Rodrigo Simões Ribeiro Leite <RodrigoLeite@ufgd.edu.br>;

Dear Dr. Leite,

Your submission entitled "Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation" has been assigned the following manuscript number: ANMI-D-13-00565.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.
The URL is <http://anmi.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office
Annals of Microbiology