

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

GABRIÉLA FINOTO CAVALHEIRO

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA  
PRODUÇÃO DE AMILASES PELO FUNGO FILAMENTOSO**  
*Gongronella butleri*

Dourados/MS

Março de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

GABRIÉLA FINOTO CAVALHEIRO

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA  
PRODUÇÃO DE AMILASES PELO FUNGO FILAMENTOSO**  
*Gongronella butleri*

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Dourados/MS

Março de 2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

C376u	<p>Cavalheiro, Gabriela Finoto. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amilases pelo fungo filamentoso <i>Gongronella butleri</i>. / Gabriela Finoto Cavalheiro . – Dourados, MS : UFGD, 2016. 32f.</p> <p>Orientador: Rodrigo Simões Ribeiro Leite. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Enzimas amilolíticas. 2. Fermentação em estado sólido. 3. Farelo de trigo. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD – 632.4</p>
-------	---

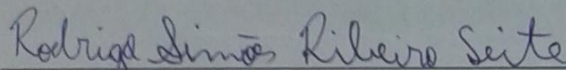
**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**

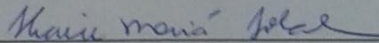


### Termo de Aprovação

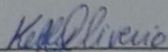
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "**Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amilases pelo fungo filamentosso *Gongronella butleri***", de autoria de **Gabriéla Finoto Cavalheiro**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite  
Presidente da banca examinadora (UFGD)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thaise Mariá Tobal  
Membro Examinador (UFGD)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kelly Mari Pires de Oliveira  
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 22 de março de 2016.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO.....	11
2.1. Resíduos agroindustriais.....	11
2.2. Estrutura do amido .....	11
2.3. Enzimas amilolíticas e suas aplicações .....	12
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivos gerais .....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Microrganismo: .....	17
4.2. Inóculo:.....	17
4.3. Produção de amilases por Fermentação em Estado Sólido (FES).....	17
4.4. Extração da enzima.....	17
4.5. Determinação da atividade de amilase .....	18
4.6. Caracterização bioquímica das amilases produzidas.....	18
4.6.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade da enzima .....	18
4.6.2. Avaliação do potencial catalítico para diferentes fontes de amido .....	18
4.6.3. Avaliação do potencial dextrinizante dos extratos enzimáticos .....	19
4.6.4. Potencial sacarificante dos extratos enzimáticos.....	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
5.1. Produção de amilase por Fermentação em Estado Sólido (FES) .....	20
5.2. Caracterização físico-química das amilases produzidas.....	22
5.2.1. Efeito do pH e temperatura.....	22
5.2.2. Avaliação do potencial catalítico para diferentes fontes de amido .....	24
5.2.3. Avaliação do potencial dextrinizante e sacarificante do extrato enzimático .....	25
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	27
7. REFERÊNCIAS .....	28

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Estrutura das moléculas de amilose (A); e amilopectina (B).....8
- 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 .....10
- Figura 3.** Produção de amilase por Fermentação em Estado Sólido do fungo *G.butleri* em farelo de trigo. (A) umidade inicial, (B) temperatura de cultivo, (C) tempo de cultivo. ....17
- Figura 4.** Caracterização bioquímica da amilase produzida por cultivo em estado sólido do fungo *G. butleri* em farelo de trigo. (A) pH ótimo, (B) temperatura ótima, (C) pH de estabilidade, (D) temperatura de estabilidade.....19
- Figura 5.** Avaliação do potencial catalítico da amilase produzida por *G. butleri* sobre amido de diferentes fontes vegetais.....21
- Figura 6.** Avaliação das modificações enzimáticas sobre o amidos de trigo, milho, mandioca, batata.....22

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Produção de amilase pelo fungo <i>G. butleri</i> em diferentes resíduos agroindustriais à 30°C com 65% de umidade no meio e 120 horas de cultivo. ....	17
---	----

## RESUMO

Os resíduos agroindustriais são importantes matérias-primas para produção de enzimas microbianas de baixo custo. Dentre as enzimas que podem ser obtidas utilizando estes subprodutos agroindustriais, estão as amilases. As amilases são responsáveis pela degradação de moléculas de amido, polissacarídeo encontrado em abundância na natureza e utilizado como ingrediente de vários produtos alimentícios, além disso essas enzimas podem ser aplicadas nas indústrias de produtos de limpeza, panificação, têxtil, farmacêutica, sucroalcooleira, papel e celulose. O objetivo deste trabalho foi delinear as condições ótimas de cultivo para produção de enzimas amilolíticas pelo fungo filamentosso *Gongronella butleri* e avaliar as propriedades bioquímicas dessas enzimas. Dentre os parâmetros fermentativos avaliados o fungo expressou maior produção de amilases, cerca de  $63,25 \text{ U.g}^{-1}$  ( $6,32 \text{ U.mL}^{-1}$ ), pelo cultivo em farelo de trigo com 55% de umidade inicial a  $25^\circ\text{C}$  por 96 horas. A enzima apresentou atividade ótima em pH 5,0 e a temperatura de  $55^\circ\text{C}$ . A amilase produzida foi estável em ampla faixa de pH (3,5 a 9,5) e manteve sua atividade catalítica por uma hora a  $40^\circ\text{C}$ . O extrato enzimático hidrolisou amido de diferentes fontes vegetais e apresentou maior potencial para liquefação do amido. Os resultados obtidos mostraram que a enzima apresenta características para aplicação industrial.

**Palavras-chave:** Enzimas amilolíticas; fermentação em estado sólido; farelo de trigo.



## 1. INTRODUÇÃO

Os resíduos provenientes da atividade agroindustrial necessitam de destinos adequados, pois causam problemas ambientais, e o não aproveitamento desses, resulta em perdas de matérias-primas e energia. Uma alternativa para o aproveitamento desses resíduos é a utilização como substratos em processos de cultivo microbiano para produção de enzimas (BENTO e CASARIL, 2012).

Por apresentarem uma ampla disponibilidade e por ser uma alternativa de baixo valor comercial, o aproveitamento destes materiais pode contribuir para a redução do custo operacional da produção enzimática, além de minimizar possíveis impactos ambientais decorrentes do seu descarte inadequado. Fungos filamentosos são considerados os mais adequados para Fermentação em Estado Sólido (FES), pois suas hifas podem crescer sobre a superfície de partículas sólidas e adentrar entre elas para um melhor crescimento (LEITE et al., 2007; SILVA et al., 2013).

A Fermentação em Estado Sólido é definida como o crescimento de microrganismos em substratos sólidos na ausência de água livre entre as partículas de substrato. Esse tipo de cultivo é vantajoso, pois além de simular o hábitat natural dos fungos filamentosos, apresenta maior produtividade, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas a variações de temperatura e pH (RODRIGUEZ-ZÚNIGA et al., 2011).

O amido é um importante constituinte da dieta humana e é um dos principais produtos de armazenamento energético vegetal, sendo abundante em trigo, arroz, milho, mandioca, batata. Enzimas de conversão de amido são utilizados na produção de maltodextrina, amidos modificados, ou xaropes de glucose e maltose (SOUZA e MAGALHÃES, 2010; SILVA et al., 2013).

Amilases são uma das famílias de enzimas mais importantes na área de biotecnologia. Estas enzimas hidrolisam as moléculas de amido em oligossacarídeos e monossacarídeos de glicose. A hidrólise enzimática do amido envolve a ação sinérgica de endo-amilases ( $\alpha$ -amilase), exo-amilases ( $\beta$ -amilase e glucoamilase), enzimas desramificadoras, entre outras (MICHELIN et al., 2010; SOUZA e MAGALHÃES, 2010). Elas podem ser obtidas a partir de plantas, animais e microrganismos. No entanto, as enzimas de fontes fúngicas e bacterianas têm predominância nos setores industriais (SILVA et al, 2009; SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

Estas enzimas possuem diversas aplicações em processos industriais, como na produção de biocombustíveis, alimentos, fármacos, tecidos, detergentes, cerveja, panificação, ração animal, papel e celulose (SOUZA e MAGALHÃES, 2010; BARATTO et al., 2011; SILVA et al., 2013).

Na literatura são encontrados diversos microrganismos produtores de enzimas amilolíticas, destacando-se as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus* que têm sido empregadas em processos industriais (SUGANTHI, et al., 2011; SOARES et al., 2010). O fungo filamentoso *Gongronella butleri* foi isolado de solo do cerrado sul mato-grossense e é conhecido pela sua produção de quitosana (TAN, et al., 1996; NWE, et al., 2008). Porém, nenhum estudo foi realizado na produção de amilases pelo microrganismo *G. butleri*.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a produção e caracterização bioquímica de enzimas amilolíticas obtidas por fermentação em estado sólido do fungo filamentoso *G. butleri*.

## **2. REVISÃO**

### **2.1. Resíduos agroindustriais e fermentação em estado sólido**

O Brasil apresenta grande atividade agrícola, o que resulta na produção de elevada quantidade de resíduos agroindustriais. Apesar dos subprodutos da agroindústria serem biodegradáveis, necessitam de um tempo mínimo para serem degradados constituindo-se numa fonte de poluentes ambientais (CAMPOS, 2005).

Um resíduo não é, por princípio, algo nocivo, muitos resíduos podem ser transformados em subprodutos ou em matérias-primas para outras linhas de produção (SILVA et al., 2011; SCHNEIDER et al., 2012). A manipulação correta de um resíduo tem grande importância para o controle do risco que ele representa, a manipulação incorreta de um resíduo pode transformá-lo num risco ambiental (BASTOS, 2007).

No sentido de preservar o meio ambiente contra o despejo de resíduos poluidores, passou-se a motivar o aproveitamento dos resíduos agroindustriais para o cultivo microbiano visando a geração de produtos com elevado valor agregado (DO NASCIMENTO FILHO et al., 2015).

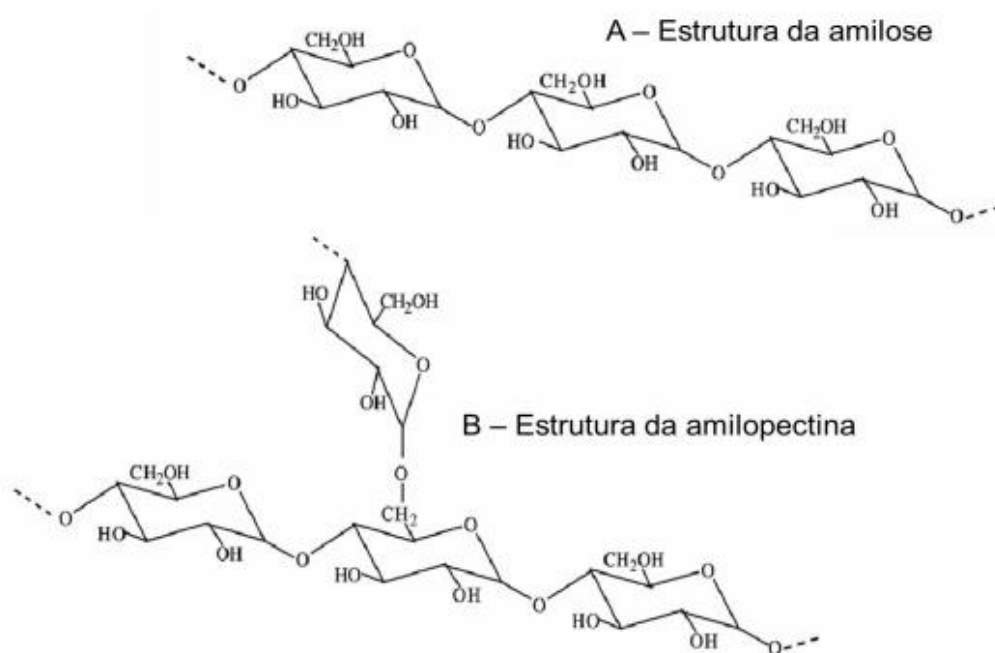
A fermentação em estado sólido (FES) embora seja aplicada principalmente em escala laboratorial, possui diversas vantagens biotecnológicas, tais como o aumento da produtividade de fermentação, maior concentração final de produtos, maior estabilidade do produto, menor repressão catabólica, além de permitir o cultivo de diferentes linhagens fúngicas ou até mesmo o cultivo misto de vários fungos. Por último, mas não menos importante, requer menor demanda de esterilidade devido à baixa atividade de água. A FES reproduz processos microbiológicos naturais como compostagem e ensilagem. A utilização de resíduos agrícolas de baixo custo acrescenta viabilidade econômica ao processo e contribui para reduzir os problemas ambientais gerados por estes subprodutos da agroindústria (SINGHANIA, et al. 2009).

### **2.2. Estrutura do amido**

O amido é um homopolímero formado por dois polissacarídeos muito semelhantes, a amilose e a amilopectina, em proporções que variam entre as diferentes espécies de origem e de acordo com o grau de maturação da planta. A amilose é formada de cadeias lineares helicoidais de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4. A amilopectina apresenta estrutura altamente ramificada, possuindo

cadeias de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 das quais partem ramificações unidas por ligações  $\alpha$ -1,6 (NELSON e COX, 2014).

Amilose, geralmente, é constituída de 20 a 25% de peso do amido e tem um tamanho médio de 100 unidades de glicose. O perfil das cadeias da amilopectina, normalmente tem uma distribuição bimodal com longas e curtas cadeias tendo uma média de 40 a 60 e 11 a 25 resíduos de glicose, respectivamente (NELSON e COX, 2014).



**Figura 1.** Estrutura das moléculas de amilose (A); e amilopectina (B) (SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

O amido pode ser obtido de diversas fontes vegetais, como cereais, raízes e tubérculos, e também de frutas e legumes, no entanto, a extração em nível comercial de amido se restringe aos cereais, raízes e tubérculos (LIMA, 2004).

### 2.3. Enzimas amilolíticas e suas aplicações

As amilases são enzimas que realizam a hidrólise do amido e estão entre as mais utilizadas para fins industriais. Estas enzimas são empregadas na sacarificação do amido podendo ser utilizadas em indústrias de alimentos, na obtenção de biocombustíveis, como aditivos em detergentes, na indústria de papel e têxtil. Com o advento de novas fronteiras biotecnológicas, o espectro de aplicação das amilases tem se expandido para

muitas outras áreas, incluindo a clínica, farmacêutica, médica e químico-analítica (PANDEY, 2000).

As amilases são divididas em quatro grupos principais, as endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases (MORAES, 2004):

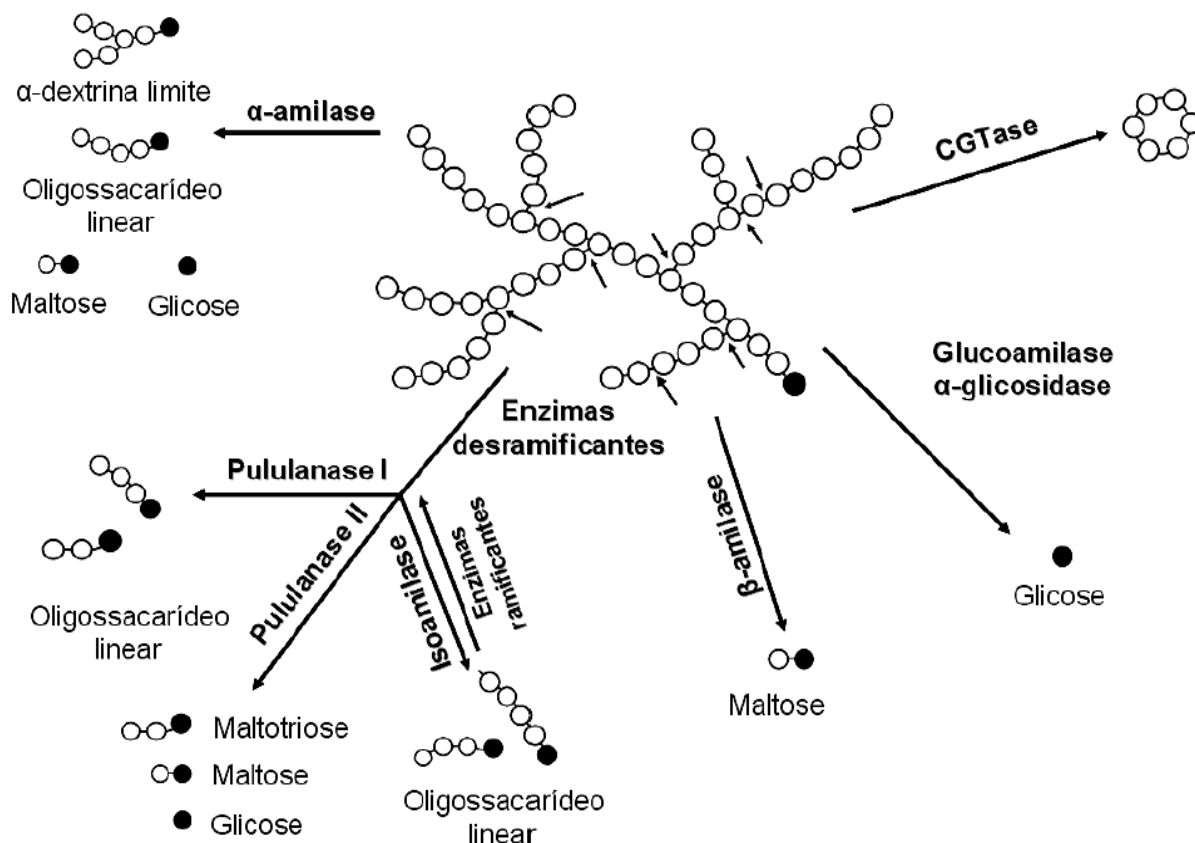
Endoamilases são capazes de quebrar as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1-4, presentes na parte interna (endo) das cadeias de amilose ou amilopectina.  $\alpha$ -Amilase (E.C. 3.2.1.1) é uma endoamilase amplamente estudada e encontrada em uma grande variedade de microrganismos, entre Archea, Eubactéria e Eucaria. O produto final da ação da  $\alpha$ -amilase é oligossacarídeos de tamanho variado com configuração linear ou ramificado ( $\alpha$ -dextrinas limites).

Enzimas pertencentes ao grupo das exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, como a  $\beta$ -amilase (EC 3.2.1.2.) ou ambas ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 como amiloglicosidade ou glicoamilase (EC 3.2.1.3) e  $\alpha$ -glicosidase (EC 3.2.1.20). Exoamilase agem sobre os resíduos externos de glicose da amilose e da amilopectina produzindo somente glicose (glicoamilase e  $\alpha$ -glicosidase) ou maltose e  $\beta$ -dextrinas limites ( $\beta$ -amilase).  $\beta$ -Amilase e glicoamilase também convertem a configuração do carbono anomérico do produto liberado de  $\alpha$  para  $\beta$ . Glicoamilase e  $\alpha$ -glicosidase diferem no seu substrato de preferência:  $\alpha$ -glicosidase age bem melhor sobre pequenos maltooligosacarídeos liberando glicose com configuração  $\alpha$ , enquanto que a glicoamilase hidrolisa melhor, polissacarídeos de cadeia longa.  $\beta$ -Amilases e glicoamilases tem sido encontradas em uma larga variedade de microrganismos.

O terceiro grupo de enzimas conversoras de amido são as enzimas desramificadoras que hidrolisam exclusivamente ligações  $\alpha$ -1,6: isoamilase (EC 3.2.1.68) e pululanase (EC 3.2.1.41). A maior diferença entre isoamilase e pululanase é a habilidade de hidrolisar pululana, um polissacarídeo com unidades repetidas de maltotriose ligadas por ligações  $\alpha$ -1,6. Pululanases hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,6 em pululana e amilopectina, enquanto que isoamilases são capazes de hidrolisar apenas amilopectina. Estas enzimas degradam exclusivamente amilopectina deixando apenas polissacarídeos lineares de cadeia longa.

O quarto grupo de enzimas conversoras, ou simplesmente modificadoras de amido, são as transferases que quebram ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, da molécula doadora e transfere parte do doador para o aceptor glicosídico com a formação de um novo rearranjo glicosídico, como as ciclodextrina glicosiltransferases (EC 2.4.1.19).

Ciclodextrina glicosiltransferase tem baixa atividade hidrolítica e produz oligossacarídeos cíclicos com 6, 7 ou 8 resíduos de glicose e dextrinas ramificadas de alto peso molecular. Ciclodextrinas são produzidas através de uma reação intramolecular de transglicosilação, na qual a enzima quebra a ligação  $\alpha$ -1,4 e ao mesmo tempo liga a extremidade redutora a não-redutora.



**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).

Durante as últimas três décadas, amilases têm sido exploradas pela indústria de processamento de amido como uma substituição da hidrólise ácida na produção de hidrolisados de amido. A substituição dos catalisadores químicos por biocatalizadores traz diversas vantagens: as enzimas são derivadas de recursos renováveis, são biodegradáveis, atuam sob condições relativamente moderadas de temperatura e de pH, e possuem alta especificidade entre reagentes e produtos. Como exemplo, é possível citar uma substituição bem sucedida: detergentes para roupa com elevadas concentrações de fosfato foram trocados por produtos menos nocivos ao meio ambiente,

pela adição de lipases, proteases e celulases em suas formulações (CHERRY e FIDANTSEF, 2003).

A produção comercial de amilases é realizada em vários passos, essencialmente porque os parâmetros de cultivo necessários para o crescimento ótimo do microrganismo, podem diferir daqueles exigidos para produção das enzimas. Estes parâmetros incluem: suplementação nutricional, pH do meio, pressão osmótica, grau de aeração, temperatura e controle da contaminação durante a fermentação (SINGHANIA, 2009).

Embora as amilases possam ser produzidas por diversos microrganismos, continua sendo uma tarefa desafiadora obter uma cepa capaz de produzir rendimentos aceitáveis comercialmente. A seleção de uma estirpe adequada é o fator mais significativo no processo de produção de amilase. Existe a possibilidade de uma única cepa produzir mais de uma enzima do complexo amilolítico (PANDEY et al., 2000). Dessa forma, diferentes trabalhos buscam selecionar linhagens com expressiva capacidade de produzir amilases em meios de reduzido custo (resíduos agroindustriais), comumente utilizados em fermentações em estado sólido.

O uso de enzimas amilolíticas para processamento de amido tem crescido rapidamente no mercado mundial e ganhado especial importância por apresentar diversas vantagens em relação aos processos quimicamente catalisados. Um dos desafios atuais é a obtenção de microrganismos com potencial de produzir elevada quantidade de enzima, em meios de cultivo de baixo custo, favorecendo a redução do preço final destes biocatalisadores, o que contribui para sua aplicação em processos industriais. As multinacionais oferecem enzimas para uma ampla variedade de aplicações industriais, como: na indústria de panificação, indústria têxtil, produção de etanol, indústria de papel, indústria de xaropes de glicose, indústria de detergentes entre outros (SOUZA e MAGALHÃES, 2010; NIELSEN et al., 2000).

Considerando a importância biotecnológica das amilases microbianas este trabalho visa estudar uma nova fonte microbiana para produção dessas enzimas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos gerais**

- O presente trabalho visa delinear as condições de cultivo do fungo *G. butleri* em resíduos agroindustriais para produção de amilases, caracterizar bioquimicamente e avaliar as propriedades catalíticas das amilases produzidas.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Otimizar os parâmetros de cultivo do fungo *G. butleri* em estado sólido como: diferentes resíduos agroindustriais, umidades, temperaturas e tempos de cultivo;

- Caracterizar o extrato enzimático bruto quanto ao melhor pH e temperatura de atuação e sua estabilidade frente às variações de pH e temperatura;

- Avaliar o potencial dos extratos enzimáticos em hidrolisar amidos provenientes de diferentes fontes vegetais;

- Avaliar o potencial dextrinizante e sacarificante do extrato enzimático obtido nas condições ótimas de cultivo.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

**4.1. Microrganismo:** Neste trabalho foi utilizado o fungo filamentosso mesófilo *Gongronella butleri*, isolado do solo do Cerrado na região de Dourados-MS. A linhagem foi identificada pela Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente (CBMAI) da Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas – SP. O microrganismo foi cultivado a 28°C em meio ágar Sabouraud Dextrose e mantido a 4°C no Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados – FCBA/UFGD.

**4.2. Inóculo:** O microrganismo foi cultivado em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio ágar *Sabouraud Dextrose* inclinado, mantido por 48 horas a 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de cálcio m/v). A inoculação do fungo nos substratos (resíduos agroindustriais) se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão (GARCIA et al., 2015).

**4.3. Produção de amilases por Fermentação em Estado Sólido (FES):** O cultivo microbiano ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 mL com 5 g de resíduos agroindustriais (palha de milho, sabugo de milho, casca de arroz, farelo de soja e farelo de trigo) umedecidos com solução nutriente (descrita anteriormente). Todos os substratos foram devidamente lavados com água destilada e posteriormente secos em estufa a 50°C por 48 horas. O material foi esterilizado a 121°C durante 20 minutos. Foi realizada a inoculação do microrganismo, e os frascos erlenmeyer foram mantidos a 30°C por 96h. O substrato que apresentou melhor produção da enzima foi adotado para a avaliação de outros parâmetros fermentativos, como: umidade (de 50% a 75%, variando 5 em 5%), temperatura (20 a 40°C, variando de 5 em 5°C) e tempo cultivo (24 a 120h variando de 24 em 24h), sendo adotada a condição ótima de cada experimento, nos ensaios subseqüentes. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas e os resultados descritos representam as respectivas médias (GARCIA et al., 2015).

**4.4. Extração da enzima:** Para a extração da enzima foi adicionado 50 mL de água destilada nos resíduos agroindustriais fermentados, sendo mantidos em agitação por 1

hora a 100 rpm. Posteriormente, todo conteúdo foi filtrado em tecido sintético (nylon) e centrifugado a 1500 x g por 5 min. O sobrenadante foi denominado extrato enzimático e utilizados nos ensaios subsequentes (GARCIA et al. 2015).

**4.5. Determinação da atividade de amilase:** A atividade enzimática foi determinada pela adição de 0,1 mL de extrato enzimático em 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 contendo 1% de amido de milho. Após 10 minutos de reação, o açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de DNS (3,5-acido dinitrosalisílico) descrito por Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu$ mol de produto por minuto de reação

#### **4.6. Caracterização bioquímica das amilases produzidas**

**4.6.1. Efeito do 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 tampão McIlvaine. A temperatura ótima foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em diferentes condições de temperatura (30-75°C) no respectivo pH ótimo da 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 (pH 3,0-8,0), Tris-HCl 0,1M (pH 8,0-8,5) e Glicina-NaOH 0,1M (pH 8,5-10,5). A termoestabilidade das enzimas foi estudada incubando as enzimas por 1 hora em diferentes condições de temperatura (30 a 75°C). As atividades residuais foram determinadas nas condições ótimas de pH e temperatura das enzimas (OLIVEIRA et al., 2015).

**4.6.2. 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 de lentilha, amido de feijão, amido de arroz, amido de aveia, amido de batata-doce e amido de milho. As reações ocorreram em meios com tampão acetato de sódio (0,1M pH 5,0). A

quantidade de açúcar redutor liberada foi quantificada pelo método de DNS (MILLER, 1959).

**4.6.3. Avaliação do potencial dextrinizante dos extratos enzimáticos:** A atividade dextrinizante foi avaliada nos amidos que apresentaram maior susceptibilidade a ação das amilases presentes (amido de trigo, milho, mandioca e batata) 1% como substrato enzimático em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0, pelo método iodométrico descrito por Fuwa (1954) e Pongsawadi; 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 55°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.

**4.6.4. Potencial sacarificante dos extratos enzimáticos:** A atividade sacarificante foi avaliada utilizando os amidos que apresentaram maior susceptibilidade a ação das amilases presentes (amido de trigo, milho, mandioca e batata)1% como substrato enzimático em tampão acetato de sódio (0,1M pH 5,0), pelo método de glicose-oxidase/peroxidase descrito por Bergmeyer; Bernt (1974). A mistura de reação foi composta por 0,1 mL de enzima adicionada a 0,4 mL de solução tampão contendo amido 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 1 µmol de glicose por minuto de reação.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Produção de amilase por Fermentação em Estado Sólido (FES)

Dentre os substratos avaliados no presente trabalho, o cultivo em farelo de trigo resultou em maior produção de amilase pelo fungo *G. butleri*, cerca de 35,57 U.g<sup>-1</sup> (Tabela 1).

**Tabela 1.** Produção de amilase pelo fungo *G. butleri* em diferentes resíduos agroindustriais à 30°C com 65% de umidade no meio e 120 horas de cultivo.

Substratos (resíduos agroindustriais)	Amilase (U.g <sup>-1</sup> )
Palha de Milho	6,03±0,63
Sabugo de Milho	2,29±0,50
Casca de Arroz	2,71±0,40
Farelo de Soja	9,56±0,20
Farelo de Trigo	35,57±1,01

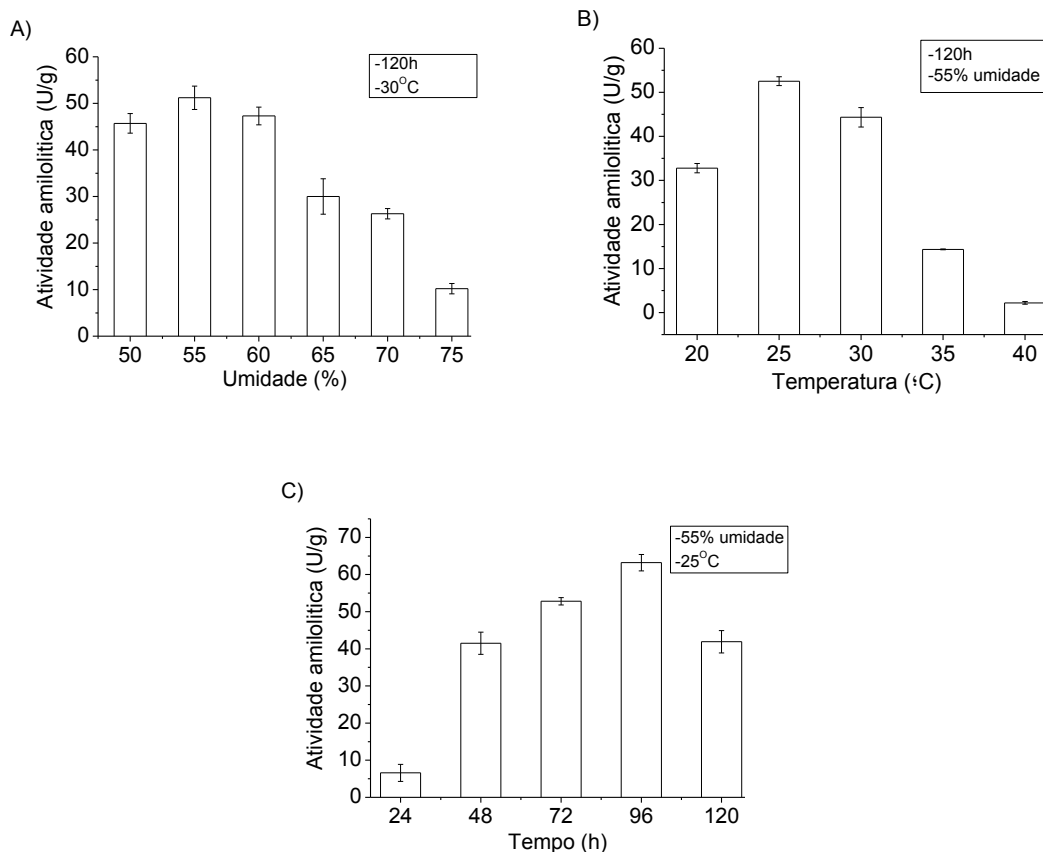
A maioria dos fungos filamentosos quando cultivados em estado sólido apresenta maior produção em farelo de trigo devido suas propriedades nutricionais, aeração e penetração eficiente dos micélios (EL-SHISHTAWY et al., 2014). Chimata et al. (2010) relatam maior produção de amilases por diferentes espécies de *Aspergillus*, utilizando farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido.

Trabalhos anteriores confirmam o farelo de trigo como excelente substrato para o cultivo de fungos filamentosos visando a produção de diferentes enzimas, não só para amilases, como também para  $\beta$ -glicosidase, xilanases e FPases (LEITE et al. 2008; GARCIA et al., 2015; PIROTA et al., 2015). Dessa forma o farelo de trigo foi utilizado nos ensaios subsequentes.

A umidade ótima para produção de amilase pelo fungo em farelo de trigo foi obtida entre 50 e 60% apresentando uma tendência a produzir mais enzimas, cerca de 51,26 U/g, quando a umidade inicial do meio foi ajustada para 55% (Figura 3A).

O teor de umidade do substrato é um dos fatores que mais influenciam o cultivo microbiano em estado sólido. A água tem a função de difusão de nutrientes no meio de cultivo e contribui para a absorção destes pelos microrganismos, auxilia na dispersão de metabólitos e na manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas. Em

relação ao cultivo de fungos filamentosos, a reduzida atividade de água pode afetar o processo de germinação, esporulação e formação de metabólitos, o que pode comprometer a produção de enzima (CASTRO, et al., 2010).



**Figura 3.** Produção de amilase por Fermentação em Estado Sólido do fungo *G.butleri* em farelo de trigo. (A) umidade inicial, (B) temperatura de cultivo, (C) tempo de cultivo.

Diferentes temperaturas foram avaliadas para o cultivo do microrganismo em farelo de trigo. A temperatura ótima de cultivo para produção de amilase foi 25°C com 52,54 U.g<sup>-1</sup> (Figura 3B), em temperaturas superiores a 30°C foi observado uma redução considerável na produção enzimática, isso pode ser explicado por se tratar de um microrganismo mesófilo.

A influência da temperatura na produção de enzimas está diretamente relacionada com o crescimento do microrganismo. A maioria das linhagens mesófilas utilizadas para produção de amilases apresenta maior produção enzimática quando cultivadas entre 25 a 35°C (FRANCIS et al., 2003).

Uma das maiores dificuldades da FES é a dissipação de calor metabólico gerado pelo crescimento microbiano, por isso o estudo da temperatura ótima de cultivo é fundamental nesse tipo de processo (PANDEY, 2003). Temperaturas muito baixas reduzem a permeabilidade da membrana plasmática e a velocidade das reações metabólicas. No entanto, temperaturas muito elevadas podem desnaturar proteínas estruturais e enzimas (GARCIA et al., 2015).

Para determinar o tempo ótimo de cultivo, amostras foram retiradas a cada 24 horas perfazendo um total de 168 horas. A maior produção da enzima foi obtida com 96 horas de cultivo, cerca de  $63,25 \text{ U.g}^{-1}$ , utilizando os demais parâmetros obtidos como ótimos nos ensaios anteriores (Figura 3C). O melhor tempo de cultivo do presente trabalho (96 horas) foi próximo ou menor que o descrito para produção de amilases por outras linhagens fúngicas, fator este importante do ponto de vista industrial. Kunamneni et al. (2005) relatam maior produção de amilase após 120 horas de cultivo em estado sólido do fungo *Thermomyces lanuginosus* em farelo de trigo. Ahmed (2011) descreve maior produção de amilase pelo fungo *Aspergillus oryzae* também em 120 horas de cultivo em estado sólido.

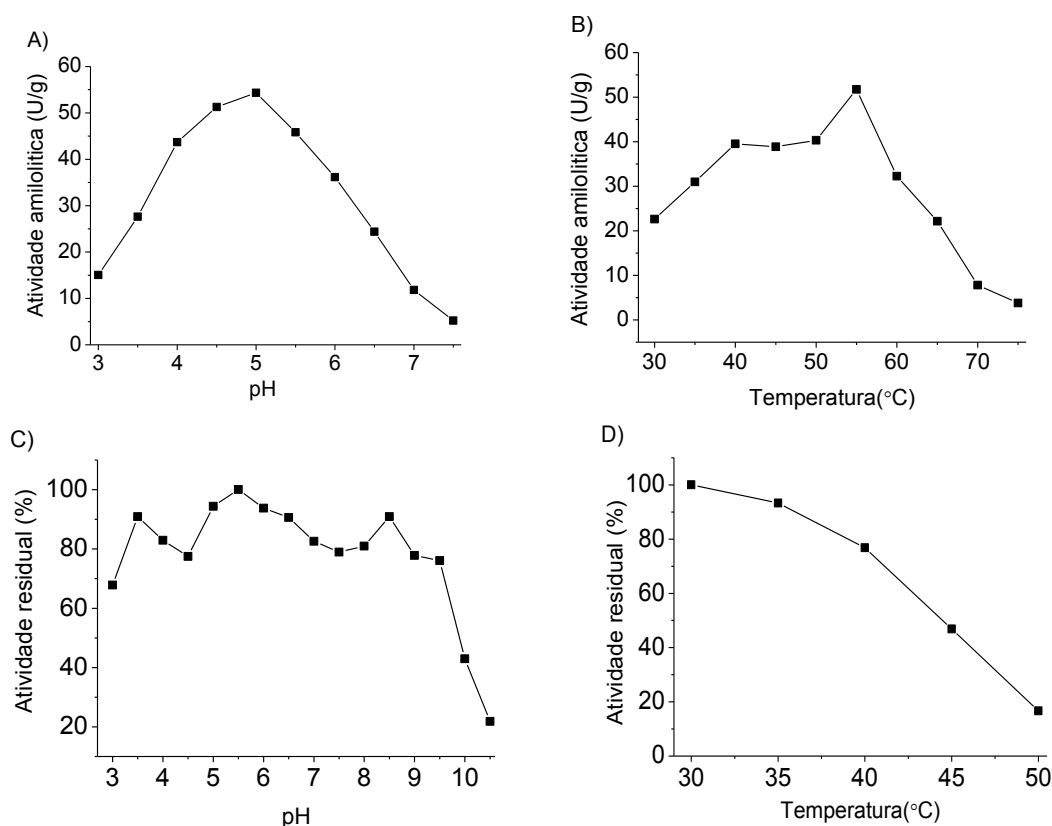
Trabalhos anteriores descrevem valores próximos ou inferiores aos obtidos no presente estudo para produção de enzimas amilolíticas por microrganismos distintos. Ferreira et al., (2012) relatam a produção de  $16,58 \text{ U.g}^{-1}$  pelo fungo *Chrysosporium zonatum*, e  $55,06 \text{ U.g}^{-1}$  pelo fungo *Malbranchea pulchella*. O microrganismo *Rhizopus oryzae* apresentou uma produção de  $63,50 \text{ U.g}^{-1}$  quando cultivados em farelo de trigo (FERREIRA et al., 2015). Bernardes et al., (2014) relatam produção de aproximadamente  $13,00 \text{ U.g}^{-1}$  pelo fungo *Rhizomucor miehei*.

## **5.2. Caracterização físico-química das amilases produzidas**

### **5.2.1. Efeito do pH e temperatura**

A amilase produzida pelo fungo *G. butleri* apresentou atividade ótima em pH 5,0 e temperatura de  $55^\circ\text{C}$  (Figura 4A e 4B). Os dados indicam que o fungo produz uma amilase que pode ser aplicada em processos com valores de pH mais ácidos, especialmente entre 4,0 e 5,5. O pH ótimo da enzima foi inferior aos valores encontrados para o fungo *Penicillium rugulosum*, que foi de 7,0 (TIWARI, et al. 2007), e para o fungo *Thermomyces lanuginosus*, que produziu uma amilase de pH ótimo 6,0 (KUNAMNENI, et al. 2005). Oliveira et. al. (2011) observou que a  $\alpha$ -amilase produzida

por *Penicillium* sp. apresentou pH ótimo em 6,5 caracterizando-se como uma  $\alpha$ -amilase neutra. Neste contexto, a aplicação da amilase obtida no presente trabalho em processos distintos das amilases produzidas pelas linhagens tradicionalmente estudadas.



**Figura 4.** Caracterização bioquímica da amilase produzida por cultivo em estado sólido do fungo *G. butleri* em farelo de trigo. (A) pH ótimo, (B) temperatura ótima, (C) pH de estabilidade, (D) temperatura de estabilidade.

A enzima apresentou atividade máxima em temperatura elevada (55°C) em relação à maioria dos fungos filamentosos produtores de amilase relatados na literatura. A maioria das amilases relatadas exibem sua atividade máxima na faixa de temperatura de 40 a 60°C (AFIFI et al., 2008 MAHDAVI et al., 2010). A diminuição da atividade enzimática nas maiores temperaturas está associada à desnaturação da enzima (GONÇALVES et al., 2008). Soni et al., (2003) relataram que a temperatura de 50°C foi a que proporcionou maior atividade da glucoamilase do microrganismo *Aspergillus* sp. AS-2. Mahdavi et al., (2010) encontraram a temperatura ótima para o microrganismo *Bacillus cereus* de 50°C. A temperatura ótima encontrada por Kumar et al (2012) foi de 40°C com o microrganismo *Fusarium solani* NAIMCC-F-02956. A temperatura ótima

encontrada por Kunamneni et al. (2005) para o fungo termotolerante *Thermomyces lanuginosus* foi 50°C.

Com relação à estabilidade ao pH a enzima foi ácido-alcalino-tolerante, mantendo 78% da atividade por 24 horas em faixa de pH de 3,5 a 9,5. Em pH 3,5 apresentou 90% de estabilidade, e em pH 5,0 e 6,0 mostrou mais de 90% de estabilidade, sendo 100% estável no pH 5,5 (Figura 4C). Esses dados mostram que a amilase do fungo *G. butleri* é mais estável ao pH que enzimas produzidas por outros microrganismos, sendo interessante para aplicação em processos com ampla variação de pH. Nwagu e Okolo (2011) relataram que a amilase do fungo *Aspergillus fumigatus* manteve 94% de sua atividade, na faixa de pH entre 4,5 e 6,5, quando incubada por 24h. Freitas et al. (2014) observaram que as amilases do fungo *Syncephalastrum racemosum* apresentaram valores de pH de estabilidade de 4,0 a 8,0.

A amilase produzida pelo fungo *G. butleri* apresentou 78% de sua atividade inicial após 60 minutos a 40°C. Quando incubada por igual período a 45°C a enzima manteve 50% da atividade catalítica original (Figura 4D). Fato importante para aplicação industrial já que a maioria dos processos industriais requerem enzimas tolerantes a altas temperaturas. Varalakshmi et al (2013) relataram temperatura de estabilidade para a  $\alpha$ -amilase de *Aspergillus oryzae* JGI 21 onde a enzima reteve 70% de sua atividade original por 60 minutos na temperatura de 24 a 28°C e em 37°C reteve 60% de sua atividade. Adeniran e Abiose (2011) apresentaram em seu trabalho a estabilidade para amiloglicosidase de *Aspergillus niger* de 60% de sua atividade inicial a 35°C por 60 minutos e 50% da sua atividade inicial a 40°C quando incubada por igual período.

### **5.2.2. Avaliação do potencial catalítico para diferentes fontes de amido**

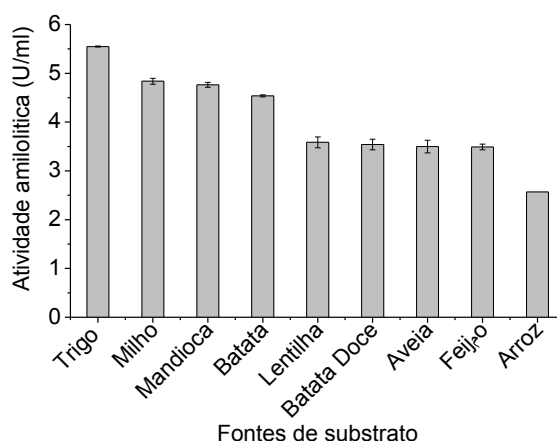
A amilase produzida foi avaliada quanto o potencial de hidrolisar amidos provenientes de diferentes fontes vegetais. Nessa etapa do trabalho foram utilizados amido de milho (controle), amido de trigo, amido de arroz, amido de feijão, amido de aveia, amido de lentilha, amido de batata e amido de batata-doce. A enzima degradou de forma eficiente todos os amidos testados no presente trabalho, no entanto, o maior potencial catalítico foi evidenciado para amido de trigo (Figura 5). Essa característica habilita o emprego dessa enzima na hidrólise de diferentes fontes amiláceas. A equivalência catalítica para amidos de diferentes fontes vegetais não é comumente



observado, principalmente se considerarmos que amidos provenientes de diferentes fontes botânicas apresentam características estruturais distintas, características essas que inferem na catalise enzimática (CRUZ, et al., 1997).

Segundo Fennema et al., (2010) quanto maior a quantidade de ramificações (amilopectina) da estrutura do amido menor será a eficiência catalítica das enzimas amilolíticas. Oliveira et al., (2015) comparam o potencial catalítico de amilases produzidas por diferentes espécies de leveduras em amido extraídos de milho, trigo, batata e mandioca. Os autores relatam maior eficiência para o amido de milho em comparação aos demais.

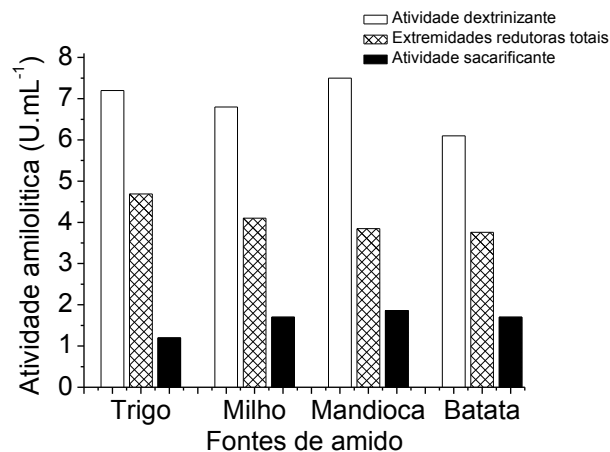
Considerando os resultados anteriormente apresentados, os amidos de trigo, milho, mandioca e batata foram utilizados para avaliar as modificações de cada extrato enzimático sobre a molécula do amido, por meio dos métodos iodométrico e glicose-oxidase.



**Figura 5.** Avaliação do potencial catalítico da amilase produzida por *G. butleri* sobre amido de diferentes fontes vegetais.

### 5.2.3. Avaliação do potencial dextrinizante e sacarificante do extrato enzimático

Na avaliação do potencial liquificante e sacarificante da enzima pode-se notar sua tendência para atividade liquificante, pois nota-se elevada atividade enzimática no método dextrinizante (iodométrico) e reduzida atividade enzimática no método (glicose-oxidase) (1,86 U/mL), que quantifica especificamente moléculas de glicose livre (Figura 6).



**Figura 6.** Avaliação das modificações enzimáticas sobre o amidos de trigo, milho, mandioca, batata.

As enzimas produzidas por *G. butleri* ocasionaram considerável redução do grau de polimerização da molécula de amido, refletindo no aumento das extremidades redutoras (Figura 6). A hidrólise da molécula de amido é dividida em duas etapas: liquefação e sacarificação. A etapa de liquefação é realizada por endoamilases e enzimas desramificantes dentre elas:  $\alpha$ -amilase, isoamilase e pululanases. Para a sacarificação do amido geralmente são utilizadas exoamilases como glucoamilases,  $\beta$ -amilases e amiloglicosidase (LEVÊQUE et al. a, 2000; VAN DER MAAREL et al., 2002).

Dessa forma, os resultados obtidos permitem inferir que o extrato enzimático de *G. butleri* apresenta predominantemente atividade endoamilolítica, com reduzida atividade sacarificante devido a presença de glicose nos hidrolisados. Trabalhos anteriores confirmam a produção de enzimas liqueficientes (atividade endoamilolítica) por diferentes espécies fúngicas. Shafique et al. (2009), Cruz et al. (2011), Sahnoun et al. (2012) e Pervez et al. (2014) reportam atividade de endoamilases para diferentes espécies de *Aspergillus*, tais como: *A. flavus*, *A. níger*, *A. oryzae*, *A. fumigatus* KIBGE-IB33 respectivamente.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitem inferir que o fungo filamentoso *G. butleri* apresenta potencial para produção de amilases em meios de cultivo com reduzido valor comercial e com tempo de produção relativamente baixo.

Ao final do trabalho foi obtido aumento na produção de enzimas amilolíticas, com a otimização dos parâmetros fermentativos de produção enzimática. Estas características são muito apreciáveis para redução do custo final destas enzimas, favorecendo sua aplicação em processos industriais.

A enzima obtida apresenta características interessantes para aplicação industrial, como atividade e estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura. A enzima mostrou excelente habilidade em degradar os amidos testados, com predominância para o amido de trigo, e atividade predominantemente liquificante.

Outro aspecto importante que deve ser ressaltado é o reduzido número de trabalhos utilizando o fungo *G. butleri* para produção de enzimas industriais, o que incentiva a continuidade do trabalho com a referida linhagem.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADENIRAN, H. A.; ABIOSE, S. H. Partial purification, characterization and hydrolytic activities of amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* cultured on agricultural residues. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 6, p. 1465-1477, 2011.
- AFIFI, A. F.; KAMEL, E. M.; KHALIL, A. A.; FOUAAD, E.; FAZZI, M.; HOUSERY, M. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Penicillium olsonii* under the effect some antioxidant vitamins. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, v. 3, n. 1, p. 14-21, 2008.
- AHMED, S.A. Alpha amylase production by *Aspergillus Oryzae* using solid state fermentation. *Journal of Engineering & Technology*, v. 29. n. 14, 2011.
- ANTRANIKIAN, G.; VORGIAS, C. E; BERTOLDO, C. Extreme environments a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, v. 96, p. 219-262, 2005.
- BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. *Evidência*, Joaçaba. v. 11, n. 2, p. 15-28, 2011.
- BASTOS, D.V. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, 2007.
- BENTO, C. B. P.; CASARIL, K. B. P. B.. Bioconversão de resíduos agroindustriais lignocelulósicos por fungos causadores da podridão branca: uma alternativa à produção de alimentos. *Revista Faz Ciência*, Unioeste, v. 20, p. 151-180, 2012.
- BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. *Methods of Enzymatic Analysis*, Editora: Verlag – Chimie, New York, p. 1205-1215, 1974.
- BERNARDES, A. V.; MARTINS, E. S.; MATA, J. F.; FERREIRA, O. E. Utilização de subprodutos agroindustriais para produção de  $\alpha$ -Amilase por *Rhizomucor Miehei*. *Revista Brasileira de Tecnologia Ambiental*, v. 08, n. 02, p. 1439-1451, 2014.
- BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 6, p. 151-160, 2002.
- CAMPOS, L. Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): parâmetros de processo e modelagem matemática. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- CASTRO, A. M. de; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, p. 181-188, 2010.

CHERRY, J.R.; FIDANTSEF, A.L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, p. 438-443, 2003.

CHIMATA, M. K.; SASIDHAR, P.; SURESH, C. Production of extracellular amylase from agricultural residues by a newly isolated *Aspergillus* species in solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, v. 9 (32), p. 5162-5169, 2010.

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  $\alpha$ -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.

DO NASCIMENTO FILHO, W.B.; FRANCO, C.R. Avaliação do potencial dos resíduos produzidos através do processamento agroindustrial no Brasil. *Revista Virtual de Química*, v. 20, n. 20, 2015.

EL-SHISHTAWY, R. M.; MOHAMED, S. A.; ASIRI, A. M.; GOMAA, A. M.; IBRAHIM, I. H.; AL-TALHI, H. A. Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megatherium*. *BMC Biotechnology*, v. 14, p. 29, 2014.

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

FERREIRA, O. M.; MONTIJO, M. A.; CACIA, M. L.; MUTTON, M. R. J. Atividade de  $\alpha$ -amilase em *Malbranchea pulchella* e *Chrysosporium zonatum*. *Ciência & Tecnologia: Fatec-JB, Jaboticabal*, v. 4, 2012.

FERREIRA, O. M.; MONTIJO, M. A.; MARTINS, E. S.; MUTTON, M. R. J. Production of  $\alpha$ -amylase by solid state fermentation by *Rhizopus oryzae*. *African Journal of Biotechnology*, v. 14, n. 7, p. 622-628, 2015.

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K.M.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical-Engineering Journal*, v. 15, p. 107-115, 2003.

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. S.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização de  $\alpha$ -amilase termoestável de *Syncephalastrum racemosum*. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 12, n. 4, 2014.

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.

GARCIA, N. F. L.; SANTOS, R. F. S.; GONÇALVES, F. A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production of  $\beta$ -glucosidase on solid-state fermentation

by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 18, n. 4, 2015.

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.

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

KUMAR, D.; MUTHUKUMAR, M.; GARG, N.; Kinetics of fungal extracellular alpha-amylase from *Fusarium solani* immobilized in calcium alginate beads. *Journal of Environmental Biology*, v. 33, n. 6, p. 1021-1025, 2012.

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, n. 2, p. 168-171, 2005.

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.; DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 43, n. 6, p. 391-395, 2008.

LEVÊQUE, E.; JANEČEK, Š.; HAYE, B.; BELARBI, A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzyme Microbial Technology*, v. 26, p. 3–14, 2000.a

LEVÊQUE, E.; JANEČEK, Š.; HAYE, B.; BELARBI, A. Cloning and expression of an  $\alpha$ -amylase encoding gene from the hyperthermophilic archaebacterium *Thermococcus hydrothermalis* and biochemical characterisation of the recombinant enzyme. *FEMS Microbiology letters*, v. 186 , p. 67-71, 2000.b

LIMA, S. L. T. Reciclagem e biodegradação de plásticos. *Revista Científica do IMAPES*, Sorocaba, v. 2, n. 2, p. 28-34, 2004.

MAHDAVI, A.; SAJEDI, R. H.; RASSA, M.; JAFARIAN, V. Characterization of an  $\alpha$ -amylase with broad temperature activity from an acid-neutralizing *Bacillus cereus* strain. *Iranian Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 2, 2010.

MICHELIN, M.; SILVA, T. M.; BENASSI, V. M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MORAES, L. A. B.; LEÃO, J. M.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. *Carbohydrate Research*, v. 345, p. 2348–2353, 2010.

- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MORAES, L.M.P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. Enzimas como agentes Biotecnológicos. Ribeirão Preto:Legis Summa, 2004.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- NIELSEN, J.E.; BORCHERT, T.V. Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochim Biophys Acta*, v. 1543, p. 253-274, 2000.
- NWAGU, T. N.; OKOLO, B. N.; Growth profile and amylolytic activity of a thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from soil. *Asian Journal of Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 46-57, 2011.
- NWE, N.; STEVENS, W.F.; TOKURA, S.; TAMURA, H. Characterization of chitosan and chitosan–glucan complex extracted from the cell wall of fungus *Gongronella butleri* USDB 0201 by enzymatic method. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 42, p. 242–251, 2008.
- OLIVEIRA, A. C. D.; WATANABE, F. M. F.; RODRIGUES, M. L. F. Comparação entre fermentação no estado sólido e fermentação submersa para produção de  $\alpha$ -amilases por *Penicillium* sp. e caracterização da enzima. *Revista Eletrônica Biociências: Biotecnologia e Saúde*, v. 1, p. 1-12, 2011.
- OLIVEIRA, A.P.A.; SILVESTRE, M.A.; ALVES-PRADO, H.F.; RODRIGUES, A., PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. *African Journal of Biotechnology*, v. 14, p. 1215-1223, 2015.
- PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 31, p. 135-152, 2000.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 81–84, 2003.
- PERVEZ, S.; AMAN, A.; IQBAL, S.; SIDDIQUI, N.N.; QADER, S.A.U. Saccharification and liquefaction of cassava starch: an alternative source for the production of bioethanol using amylolytic enzymes by double fermentation process. *BMC Biotechnology*, p. 14-49, 2014.
- PINTO, P.H.M.; CAMILI, E.A.; CABELO, C. Processo de flotação no tratamento da manipueira originada da fabricação de farinha de mandioca. *Revista de Tecnologias FATEC Ourinhos*, v. 3, n. 1, p. 53-62, 2010.
- PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; TREMACOLDI, C. R.; FARINASE, C. S. Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao

potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. *Ciência Rural*, v. 45, n. 9, p. 1606-1612, 2015.

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

RAMESH, M.V.; LONSANE, B.K. Ability of a solid-state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus licheniformis* M27. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 591-593, 1991.

RODRIGUEZ-ZÚNIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

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.

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

SATO, K.; SUDO, S. Small-scale solid-state fermentations. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, p. 60-79, 1999.

SCHNEIDER, C. F.; SCHULZ, D. G.; LIMA, P. R.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C. Formas de gestão e aplicação de resíduos da cana-de-açúcar visando redução de impactos ambientais. *Revista Verde* (Mossoró - RN - Brasil), v. 7, n. 5, p. 8-17, 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.; ALARCON, R. F.; DAMASIO, A. R. L.; MICHELIN, M.; MALLER, A.; MASUI, D. C.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Use of cassava peel as carbon source for production of amylolytic enzymes by *Aspergillus niveus*. *International Journal of Food Engineering*, v. 5, n. 5, 2009.

SILVA, J. V. H., BITTAR, A. P., SERRA, J. C. V., JUNIOR, J. C. Z. Diagnóstico do reaproveitamento de resíduos com potencial energético no município de Palmas-TO. *Engenharia Ambiental*, v. 8, n. 2, p. 226-233, 2011.

SILVA, C. A. A.; LACERDA, M. P. F.; LEITE, R. S. R.; FONSECA, G. G. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 16, n. 5, 2013.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; TREVISOL, L. R.; CARVALHO, R. D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C. L. M. S. C.; BARONI, S. Identificação do potencial amilolítico de



linhagens mutantes do fungo filamentososo *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

SONI, K. S.; KAUR, A.; GRUPTA, K. J. A solid state fermentation based bacterial  $\alpha$ -amilase and fungal glucoamilase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 185-192, 2003.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 4, p. 850-861, 2010.

SPIER, M.R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGUE, L.; SOCCOL, C.R. Production and characterization of amylases by *Aspergillus niger* under solid fermentation using agro industrial products. *International Journal of Food Engineering*, v. 2, p. 1-19, 2006.

SUGANTHI, R., BENAZIR, J. F., SANTHI, R., RAMESH KUMAR, V., ANJANA HARI, NITYA MEENAKSHI, NIDHIYA, K. A., KAVITHA, G., LAKSHMI, R. Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. *International Journal of Engineering Science and Technology*, v. 3, n. 2, p. 1756-1763, 2011.

TAN, S.C.; TAN, T.K.; WONG, S.M.; KHOR, E. The chitosan yield of Zygomycetes at their optimum harvesting time. *Carbohydrate Polymers*, v. 30, p. 239-242, 1996.

TIWARI, K.L.; JADHAV, S.K.; FATIMA, A. Culture condition for the production of thermostable amylase by *Penicillium rugulosum*. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, v. 2, n. 1, p. 21-24, 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  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*, v. 94, p. 137-155, 2002.

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.

VARALAKSHMI, K.N.; TAMRAKAR, B.; KUMARI, K.; KUMARI, P.; NAVALE, S.; POKHREL, S.; Purification and biochemical characterization of pH tolerant and acid stable  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae* JGI 21 isolated from soil. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, v. 8 n. 1-2, p. 14-20, 2013.