

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

**GABRIELA FINOTO CAVALHEIRO**

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E  
PROPRIEDADES CATALÍTICAS DE AMILASES PRODUZIDAS  
PELOS FUNGOS *Cunninghamella echinulata* E *Rhizopus microsporus***

**Dourados/MS  
Setembro de 2019**

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

**GABRIELA FINOTO CAVALHEIRO**

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E  
PROPRIEDADES CATALÍTICAS DE AMILASES PRODUZIDAS  
PELOS FUNGOS *Cunninghamella echinulata* E *Rhizopus microsporus***

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

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite**

**Dourados/MS  
Setembro de 2019**

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

C377p Cavalheiro, Gabriela Finoto

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PROPRIEDADES  
CATALÍTICAS DE AMILASES PRODUZIDAS PELOS FUNGOS  
Cunninghamella echinulata E Rhizopus microsporus [recurso eletrônico] /  
Gabriela Finoto Cavalheiro. -- 2020.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Rodrigo Simões Ribeiro Leite.

Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade  
Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:  
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Enzimas amilolíticas. 2. Cultivo em estado sólido. 3. Farelo de trigo. I.  
Leite, Rodrigo Simões Ribeiro. II. Título.

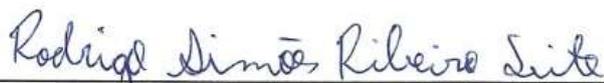
**Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

**©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.**

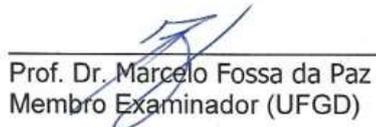


### Termo de Aprovação

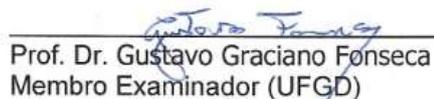
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a tese intitulada: **“Produção, caracterização bioquímica e propriedades catalíticas de amilases produzidas pelos fungos *Cunninghamella echinulata* e *Rhizopus microsporus*”**, de autoria de **Gabriela Finoto Cavalheiro**, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



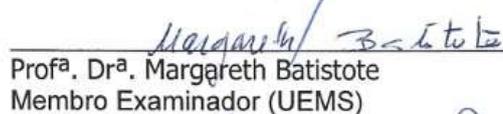
Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite  
Presidente da banca examinadora



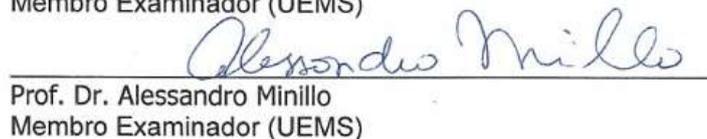
Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz  
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca  
Membro Examinador (UFGD)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margareth Batistote  
Membro Examinador (UEMS)



Prof. Dr. Alessandro Minillo  
Membro Examinador (UEMS)

Dourados/MS, 13 de Setembro de 2019.

## **Agradecimentos**

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me agraciar com tantas bênçãos e ter conduzido meus caminhos por onde passei durante minha trajetória acadêmica e me presenteado com tantas pessoas iluminadas que hoje as chamo de amigos.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Rodrigo S. R. Leite pelo imensurável aprendizado, conhecimento, generosidade, exemplo de entrega pelo seu trabalho e de zelar pela honestidade e compromisso com os sentimentos das pessoas.

A minha mãe Lucinda Finoto a quem amo incondicionalmente, e que será sempre minha maior professora, minha fortaleza e minha essência.

As minhas amigas Fernanda, Flavia M., Flavia T. e Jéssica com quem sempre pude contar para tudo.

A minha amiga e parceira de pesquisa Ana Carolina que esteve sempre comigo me apoiando e me acalmando nos momentos de aflição.

A minha amiga e parceira de pesquisa Nayara Fernanda que não mediu esforços para me ajudar, me apoiando e aconselhando.

As técnicas Fabiana, Livia, Juliana, Marcos, Suellen e Renata que sempre atenderam aos mais variados pedidos da melhor forma possível.

Ao meu companheiro de vida Walter Azambuja por todo amor, carinho, incentivo, compreensão, companheirismo e paciência.

## Lista de Figuras

### CAPITULO I

- Figura 1.** (A) Estrutura química da amilose; (B) conformação espacial da amilose....12
- Figura 2.** (A) Estrutura química da amilopectina; (B) representação geral da molécula de amilopectina.....13
- Figura 3.** Resumo da hidrólise enzimática da molécula do amido.....14
- Figura 4.** 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.....16
- Figura 5.** Características macroscópicas de *Cunninghamella echinulata* isolada do solo do Cerrado, no Centro-Oeste do Brasil. Fotografia de crescimento em ágar Sabouraud dextrose a 28°C.....19
- Figura 6.** Características macroscópicas de *Rhizopus microsporus* isolado de um fruto do Cerrado, no Centro-Oeste do Brasil. Fotografia de crescimento em ágar Sabouraud dextrose a 45°C.....20

### CAPITULO II

- Figura 1.** Produção de amilase por CES dos fungos *C. echinulata* e *R. microsporus* em farelo de trigo. (A) umidade inicial de *C. echinulata*, (B) umidade inicial de *R. microsporus*, (C) tempo de cultivo de *C. echinulata*, (D) tempo de cultivo de *R. microsporus*.....35
- Figura 2.** Efeito do pH e temperatura sobre atividade enzimática. (A) pH ótimo *C. echinulata*, (B) pH ótimo *R. microsporus* (C) temperatura ótima *C. echinulata*, (D) temperatura ótima *R. microsporus*.....38
- Figura 3.** Caracterização de amilase por CES dos fungos *C. echinulata* e *R. microsporus* em farelo de trigo. (A) pH de estabilidade *C. echinulata*, (B) pH de estabilidade *R. microsporus*, (C) temperatura de estabilidade *C. echinulata*, (D) temperatura de estabilidade *R. microsporus* (E) atividade residual das amilases de *C. echinulata* e *R. microsporus* em função do tempo de incubação a 55°C.....40

**Figura 4.** Avaliação da concentração de etanol sobre a atividade enzimática dos extratos produzidos em CES. **A)** *C. echinulata* e **B)** *R. microsporus*.....41

**Figura 5.** Avaliação do potencial catalítico das enzimas sobre amido de diferentes fontes vegetais, pela quantificação de açúcar redutor pelo método DNS .....42

**Figura 6.** Avaliação das modificações enzimáticas sobre o amido de trigo pelos microrganismos *C. echinulata* e *R. microsporus*. **Coluna branca** - Liberação de moléculas de glicose pelo método de glicose/oxidase; **Coluna tachada** - Redução do grau de polimerização do amido quantificado pelo método iodométrico; **Coluna preta** - Liberação de açúcares e extremidades redutoras pelo método de DNS .....44

**Figura 7.** Cromatografia de camada fina do hidrolisado de amido de milho de: **A)** *C. echinulata* e **B)** *R. microsporus*. **Padrões:** (1) glicose; (2) maltose; (3) maltotriose. **Hidrolisado em diferentes tempos:** (4) 10 min; (5) 15 min; (6) 20 min. ....44

## Lista de Tabelas

### CAPITULO II

**Tabela 1.** Produção de amilase pelo fungo *Cunninghamella. echinulata e Rhizopus microsporus* em diferentes resíduos agroindustriais à 30°C com 65% de umidade no meio e 120 h de cultivo.....33

**Tabela 2.** Produção de amilases de diferentes linhagens fúngicas em condições de cultivo otimizadas em CES.....36

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	11
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivos gerais .....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
<b>CAPÍTULO I</b> .....	15
1. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
1.1. Estrutura do amido .....	15
1.2. Enzimas amilolíticas.....	17
1.3. Aplicações e mercado de amilases fúngicas.....	19
1.4. Resíduos agroindustriais e CES.....	20
1.5. Fungos <i>Cunninganella echinulata</i> e <i>Rhizopus microsporus</i> .....	21
<b>CAPÍTULO II</b> .....	32
RESUMO .....	32
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1. Microrganismos.....	34
2.2. Inóculo.....	34
2.3. Produção de amilases por CES.....	34
2.4. Extração da enzima.....	34
2.5. Determinação da atividade de amilase .....	35
2.6. Caracterização bioquímica das amilases produzidas.....	35
2.6.2. Avaliação do potencial catalítico para diferentes fontes de amido. ....	35
2.6.4. Avaliação do potencial dextrinizante dos extratos enzimáticos .....	36
2.6.5. Potencial sacarificante dos extratos enzimáticos.....	36
2.6.6. Cromatografia de camada delgada dos produtos de hidrólise. ....	36
2.6.7. Análise Estatística. ....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
3.1. Produção de amilase por CES .....	37
3.2. Caracterização bioquímica das amilases produzidas.....	41
3.2.1 Efeito de pH e temperatura .....	41
3.2.2. Efeito de etanol sobre a atividade das enzimas .....	45
3.2.3. Avaliação do potencial catalítico para diferentes fontes de amido .....	45

3.2.4. Potencial dextrinizante e sacarificante dos extratos enzimáticos produzidos por <i>C. echinulata</i> e <i>R. microsporus</i> .....	47
4. CONCLUSÕES .....	49
5. REFERÊNCIAS .....	50

## RESUMO

Amilases apresentam aplicabilidade em diversos processos biotecnológicos, tais como: produção de biocombustível, reaproveitamento de resíduos para ração animal, aditivos para silagem, redução do impacto ambiental pelas indústrias de papel e têxtil. No entanto, existem entraves a serem superados para viabilizar a aplicação industrial destas enzimas, dentre eles: elevado custo de produção e reduzida estabilidade estrutural das enzimas.

Atualmente algumas alternativas são propostas para transpor esses problemas, entre elas a seleção de linhagens hiperprodutoras da enzima de interesse, a otimização do processo de cultivo em meios de baixo valor agregado e prospecção de linhagens termófilas ou termotolerantes com elevada estabilidade estrutural. No capítulo I é apresentada uma revisão bibliográfica do estudo, a importância das pesquisas envolvendo enzimas industriais e as aplicações biotecnológicas dessas enzimas. Em seguida, no capítulo II, é apresentada a otimização da produção de amilases dos fungos *Cunninghamella echinulata* e *Rhizopus microsporus* por cultivo em estado sólido e as propriedades catalíticas da amilases produzida.

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

## ABSTRACT

**Keywords:** Amylolytic enzymes; solid state cultivation; wheat bran.

## INTRODUÇÃO GERAL

A produção industrial de enzimas é frequentemente limitada devido ao alto custo dos substratos utilizados para o cultivo dos microrganismos. Estima-se que por volta de 30 a 40% do custo envolvido na produção de enzimas esteja relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo (CARVALHO et al., 2008). Portanto, sua otimização é de grande importância para a diminuição dos custos de produção (JOO; CHANG, 2005).

O cultivo em estado sólido (CES) é uma forma de cultivo para produção de enzimas que vem chamando bastante interesse já que pode ser utilizado resíduos agroindustriais como fontes alternativas de substratos para a produção de enzimas (BOCCHINI et al., 2005), devido à disponibilidade local e por representar uma fonte alternativa de baixo valor comercial, principalmente quando se visa à produção de enzimas em larga escala.

O CES é definido como um processo de cultivo que ocorre na ausência de água livre entre as partículas e na qual se emprega um material natural ou sintético como substrato sólido (RODRIGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005; HOLKER; LENZ, 2005).

O uso do CES na produção de algumas enzimas, em especial aquelas envolvidas na degradação de polímeros vegetais complexos tem se tornado muito atrativo (RODRIGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005). Pois o CES se mostra promissor na produção de enzimas fúngicas devido ao crescimento microbiano, principalmente para fungos filamentosos, ocorrer em condições mais próximas ao habitat natural desses microrganismos (SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

As amilases correspondem de 25 - 33% do mercado mundial de enzimas, perdendo colocação apenas para as proteases (BON; FERRARA; CORVO, 2008; HASAN, et al., 2014). Amilases apresentam grande importância biotecnológica tais como aplicações nas indústrias têxteis (ANDREAUS; CAVACO-PAULO, 2008), papel e celulose (DURAN et al., 2008), cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, produção de xaropes, ração animal (COURI et al., 2008), indústria química e farmacêutica (CRUZ et al., 2008; BON; FERRARA; CORVO, 2008).

As amilases podem ser divididas em três categorias, quanto ao seu modelo de ação: as endoamilases que atacam a molécula a partir do interior da cadeia, as exoamilases que clivam a partir de suas extremidades e as enzimas desramificantes que hidrolisam exclusivamente as ramificações da amilopectina (GUPTA et al., 2003). A ação das  $\alpha$ -amilases, que pertencem ao primeiro grupo, dá origem a oligossacarídeos lineares e ramificados de diversos tamanhos, esta enzima é amplamente distribuída entre os microrganismos.

Já as exoamilases atuam no substrato a partir da extremidade não redutora, em etapas sucessivas, resultando em produtos de baixa massa molecular, dentro desse grupo estão as  $\beta$ -amilase, glicoamilase e  $\alpha$ -glicoamilase. E as enzimas desramificantes atuam exclusivamente nas ligações  $\alpha$ -1,6 nas ramificações da amilopectina, como é o caso das pululanases e das isoamilases (GOMES et al., 2007; VAN DER MAAREL et al., 2002).

Neste contexto, teve-se como objetivo a produção e caracterização bioquímica das enzimas amilolíticas de dois fungos filamentosos denominados *Cunningamella echinulata* e *Rhizopus microsporus* isolados do cerrado brasileiro.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

- O presente trabalho visou delinear as condições de cultivo dos fungos *Cunninghamella echinulata* e *Rhizopus microsporus* em resíduos agroindustriais para produção de amilases, caracterizar bioquimicamente e avaliar as propriedades catalíticas das amilases produzidas.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Otimizar os parâmetros de cultivo do fungo *C. echinulata* e *R. microsporus* em estado sólido como: diferentes resíduos agroindustriais, umidades e tempos de cultivo;
- Caracterizar o extrato enzimático bruto quanto ao efeito de pH e temperatura;
- Avaliar o efeito de etanol na atividade das enzimas;
- Avaliar o potencial dos extratos enzimáticos para hidrolisar amidos provenientes de diferentes fontes vegetais;
- Avaliar o potencial dextrinizante e sacarificante dos extratos enzimáticos obtidos nas condições ótimas de cultivo.

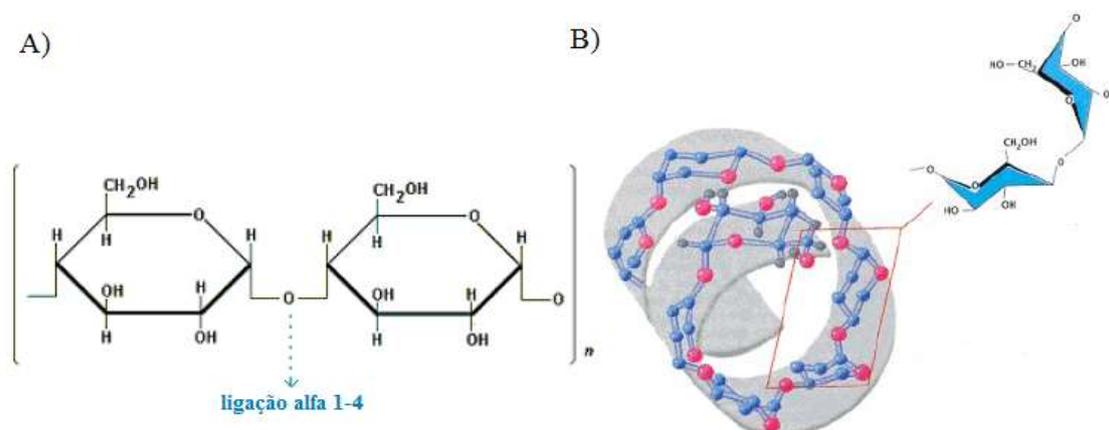
# CAPÍTULO I

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Estrutura do amido

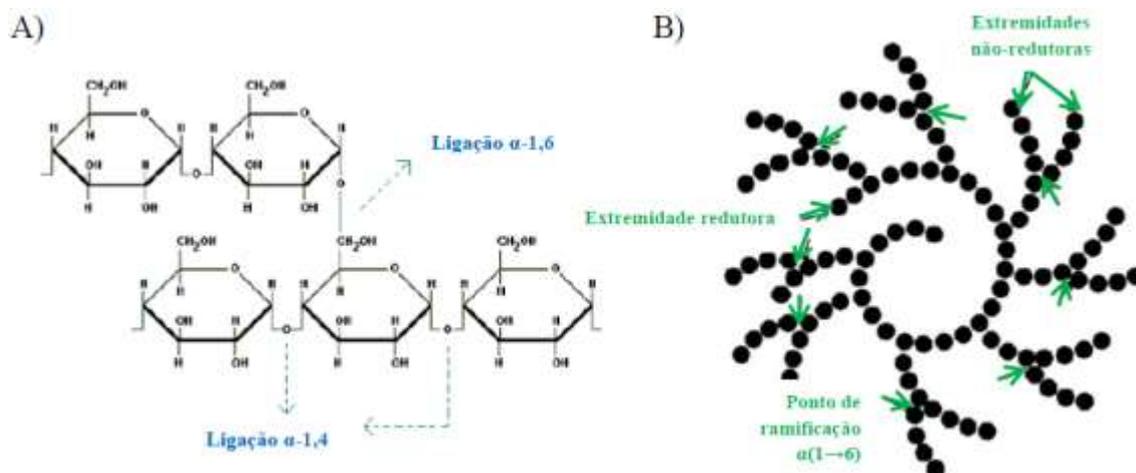
O amido, depois da celulose, é o carboidrato mais abundante na natureza. O mesmo é considerado a principal reserva de carbono armazenada em células vegetais, sendo amplamente distribuído em diversas espécies vegetais. O amido é abundante em grãos de cereais (40% a 90% do peso seco), leguminosas (30% a 50% do peso seco), tubérculos (65% a 85% do peso seco) e frutas verdes (40% a 70% do peso seco) (LAJOLO; MENEZES, 2006).

Este carboidrato é composto por dois tipos de polímeros, a amilose e a amilopectina, ambos constituídos de moléculas de glicose. A amilose (Figura 1) é constituída de cadeias lineares longas de unidades de D-glicose unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,4. A amilopectina (Figura 2), por sua vez, é altamente ramificada, contendo ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 na parte linear e ligações  $\alpha$ -1,6 nos pontos de ramificação unindo pequenas cadeias laterais de 15 a 45 resíduos de glicose (NELSON; COX, 2014).



**Figura 1.** (A) estrutura química da amilose; (B) conformação espacial da amilose (Fonte: BOBBIO; BOBBIO, 2003).

A forma do amido puro é um pó branco com textura granular, inerte, sem sabor, inodoro e não tóxico. Estruturalmente é estável, densamente condensado e insolúvel em água e álcool, sendo rompido na presença de enzimas. O tamanho e o formato dos grânulos são específicos para cada espécie de planta (PINTO, 2009).



**Figura 2.** (A) estrutura química da amilopectina; (B) representação geral da molécula de amilopectina (Fonte modificada: JACQUES; LYONS; KELSALL, 1999).

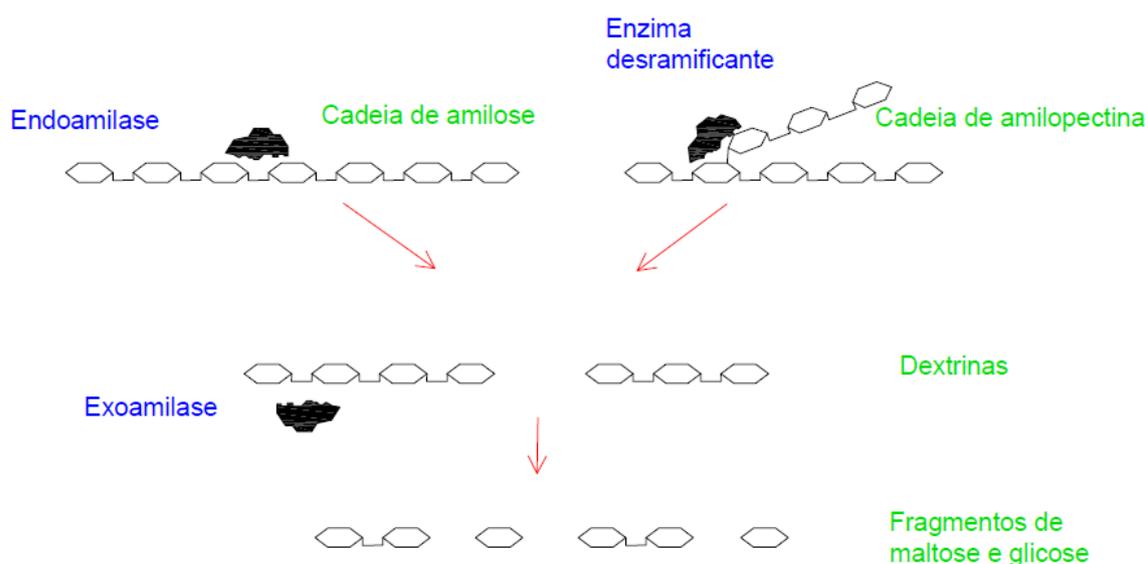
O amido é uma macromolécula de massa molecular elevada (BULÉON et al., 1998; MYERS et al., 2000). Os amidos provenientes de diferentes fontes botânicas e em diferente grau de maturação apresentam características estruturais distintas, dentre as quais pode-se citar a variações nos graus de ramificações de suas cadeias e nos teores de amilose e amilopectina (HOOVER, 2001; LOBO; SILVA, 2003; SINGH et al., 2003).

O amido não é diretamente fermentescível, necessitando de uma hidrólise prévia de suas cadeias para a obtenção de glicose. No processo de hidrólise do amido, além de água, há necessidade de catalizadores químicos ou enzimáticos capazes de romper as ligações glicosídicas (ZANIN et al., 2000). Atualmente, grande quantidade de amilases microbianas está disponível comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005). Devido a essa demanda, há um enorme interesse na descoberta microrganismos produtores de enzimas robustas, bem como no desenvolvimento de novas técnicas que reduzam o custo de produção dos derivados do amido (BURHAN et al., 2003).

As enzimas responsáveis pela degradação desse carboidrato são as amilases, essas enzimas são utilizadas pelas plantas, animais e microrganismos procariotos e eucariotos que usam o amido como fonte de carbono (PEIXOTO et al., 2003).

## 1.2. Enzimas amilolíticas

As amilases estão entre as principais enzimas industriais, e atualmente são aplicadas na produção de biocombustíveis através da degradação do amido. Atuam sobre o seu substrato, hidrolisando essa molécula em dextrinas, oligossacarídeos de diferentes tamanhos e glicose. As enzimas amilolíticas são divididas em três categorias: as endoamilases, exoamilases e as desramificantes (Figura 3) (OLIVEIRA; FLOR; OLIVEIRA, 2010).



**Figura 3.** Resumo da hidrólise enzimática da molécula do amido (Fonte: o autor).

As endoamilases catalisam a hidrólise do amido no interior da molécula, quebrando-a em partículas de tamanhos variados (VAN DER MAAREL et al., 2002). Dentro da classe das endoamilases encontra-se a  $\alpha$ -amilase. A  $\alpha$ -amilase (E.C.3.2.1.1) é uma enzima que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 internas no amido

tendo como principal produto oligossacarídeos de tamanhos variados (SUNDARRAM; MURTHY, 2014).

As exoamilases atuam nas extremidades não redutoras da molécula de amido, resultando em moléculas menores (VAN DER MAAREL et al., 2002). Dentre as exoamilases mais estudadas estão as  $\beta$ -amilases, glucoamilases e  $\alpha$ -glicosidases. As  $\beta$ -amilases (EC 3.2.1.2) são enzimas exo-hidrolases que atuam a partir da extremidade não redutora da cadeia por hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4-glucano produzindo sucessivas unidades de maltose. Por serem incapazes de clivar ligações ramificadas de polissacarídeos ramificados como o glicogênio ou a amilopectina, a hidrólise é incompleta e as unidades de oligossacarídeos mantem-se em sua integralidade.

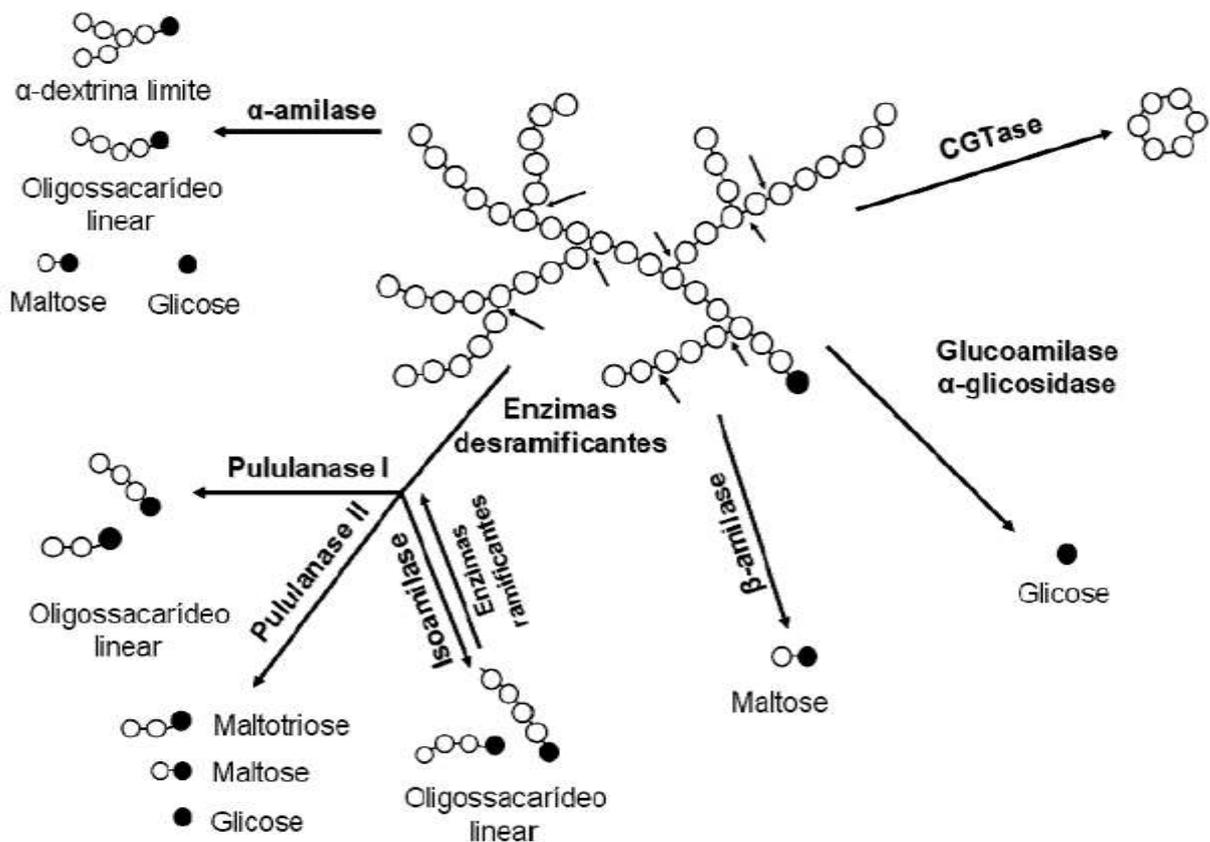
As  $\beta$ -amilases podem ser usadas em diferentes aplicações nas pesquisas bem como nas indústrias. Na pesquisa são utilizadas para estudar a estrutura do amido e a estrutura das moléculas de glicogênio. Na indústria, são usadas na etapa prévia a fermentação nas indústrias cervejeiras e destiladoras. Além disso, são usadas também para a produção de xaropes de maltose concentrado (SWETHA et al., 2006).

Glucoamilases e  $\alpha$ -glicosidases agem sobre as extremidades das cadeias da amilose e da amilopectina produzindo somente glicose e aquelas diferem entre si quanto aos seus substratos de preferencia:  $\alpha$ -glicosidases hidrolisam ligações  $\alpha$ -1,4 apenas, agem eficientemente sobre pequenos maltooligossacarídeos liberando glicose com configuração  $\alpha$ , enquanto que as glucoamilases hidrolisam tanto ligações  $\alpha$ -1,4 quanto  $\alpha$ -1,6 e hidrolisam melhor polissacarídeos de cadeia longa liberando glicose com a conformação  $\beta$  (MORAES, 2004).

As enzimas desramificantes atuam exclusivamente nas ligações  $\alpha$ -1,6 nas ramificações da amilopectina, como é o caso das pululanases e das isoamilases. 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 (VAN DER MAAREL et al., 2002).

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 (Figura 4) (MORAES, 2004).

A atuação sinérgica das principais enzimas amilolíticas favorecem a hidrólise do amido aumentando a taxa de reação e diminuindo a inibição dos produtos (LYND et al., 2002). Colocar a referencia de LYND nas referencias bibliograficas



**Figura 4.** 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: BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002).

### 1.3. Aplicações e mercado de amilases fúngicas

As amilases constituem cerca de 25-33% das enzimas vendidas no mercado mundial. Estas enzimas são usadas nas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil, na produção de etanol, na indústria de papel, na indústria de xaropes (SOUZA; MAGALHAES, 2010; PASIN et al., 2017).

Devido à importância industrial das amilases, há um grande interesse no isolamento de novas fontes microbianas produtoras de enzimas amilolíticas adequadas para novas aplicações industriais. Nas últimas décadas, o uso de fungos em bioprocessos tem sido valorizado devido à produção de enzimas com diferentes características bioquímicas e com excelente potencial para aplicação industrial. A capacidade de síntese enzimática em grande escala, bem como a facilidade que estas

enzimas são secretadas para o meio extracelular são algumas das características de interesse encontradas em fungos filamentosos. Além disso, as enzimas secretadas pelos fungos podem apresentar várias vantagens industriais, como resistência a solventes orgânicos, estabilidade térmica e à variação do pH (PASIN et al., 2017).

As amilases possuem várias aplicações na indústria e cada uma dessas aplicações requer enzimas com características específicas de pH, temperatura e estabilidade. A importância da bioprospecção consiste na descoberta de novos microrganismos produtores de enzimas, com características únicas, que podem contribuir para processos de produção mais eficientes (DHALI et al., 2016; SINGH et al., 2014).

Além da importância econômica que as amilases apresentam, as novas metodologias que vêm sendo desenvolvidas buscam utilizar resíduos como substrato para muitos processos industriais, uma vez que a maioria das atividades agroindustriais geram, além do produto final, grande volume de resíduos (SOCCOL et al., 2017).

#### **1.4. Resíduos agroindustriais e CES**

A produção industrial de enzimas é frequentemente limitada devido ao alto custo dos substratos utilizados para o cultivo dos microrganismos. Estima-se que por volta de 30 a 40% do custo envolvido na produção de enzimas esteja relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo (CARVALHO et al., 2008). Portanto, a otimização do bioprocessamento é de grande importância para diminuir os custos de produção (JOO; CHANG, 2005). Vários resíduos agroindustriais são usados como fontes alternativas de substratos para produção de enzimas (dentre eles: bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, farelo de trigo, casca de arroz e palha de milho) devido à disponibilidade local e por representar uma fonte de baixo valor comercial, principalmente quando se visa à produção de enzimas em larga escala (ESCARAMBONI, 2011; SANTOS et al., 2016; CAVALHEIRO et al., 2017; COSTA et al., 2019).

O CES é definido como um processo onde há cultura de microrganismos sobre uma matriz sólida (substrato ou material inerte), em que o substrato atua como fonte de carbono, onde o conteúdo líquido ligado a ele está a um nível de atividade de água que,

por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (SOCCOL et al., 2017).

Sistemas de CES se mostram promissores na produção de enzimas fúngicas devido ao crescimento microbiano ocorrer em condições mais próximas ao habitat natural desses microrganismos (SOUZA; MAGALHÃES, 2010). No CES podem ser destacadas como principais vantagens: a simplicidade dos biocatalisadores, o baixo custo, a alta produtividade, a alta concentração dos produtos, menor requerimento de espaço físico e energia (MITCHELL et al., 2000; PANDEY et al., 2000). Porém, existe um fator limitante, que se refere à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer em baixos teores de umidade, o que acaba por restringir o processo ao uso de fungos filamentosos, que se adaptam bem a essa condição. Desse modo, o CES tem se mostrado adequado para a produção de enzimas por fungos filamentosos (PANDEY et al., 2000), ao se considerar a possibilidade de reprodução das condições de crescimento natural desses organismos (PANDEY, 2000; RODRIGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005).

Além disso, as enzimas produzidas por CES são menos suscetíveis a problemas de inibição por substrato e são mais estáveis em relação às mudanças de temperatura ou pH (SAQIB et al., 2010). A eficiência da produção de enzima por CES é dependente tanto do microrganismo utilizado como de fatores como temperatura, pH, umidade e substrato (SILVEIRA, 2017).

Resíduos agroindustriais, como farelo de trigo (SANTOS et al., 2016; CAVALHEIRO et al., 2017; GARCIA, et al., 2018; COSTA et al., 2019); farelo de arroz (SILVEIRA, 2007); farelo de aveia (SILVEIRA, 2007); bagaço de laranja (SILVEIRA, 2007); bagaço de mandioca (ESCARAMBONI, 2011), bagaço de cana-de-açúcar (GARCIA et al., 2015; CAVALHEIRO et al., 2017) entre outros, têm sido empregados com sucesso como substratos na produção de enzimas por CES (DE GREGORIO et al., 2002; MARTINS et al., 2002; SILVA et al., 2002; SILVA et al., 2005).

### **1.5. Fungos *Cunninghamella echinulata* e *Rhizopus microsporus***

O fungo *Cunninghamella echinulata* é conhecido por ser um bom produtor de ácido  $\gamma$ -linoleico e lipídeos, uma de suas substâncias produzidas mais estudadas (VICENTE et al., 2010; ROSSI et al., 2011). Importante ferramenta para a obtenção de

compostos com atividade farmacológica melhorada e uma alternativa a obtenção e isolamento desses compostos de interesse. Pois exibe uma capacidade de metabolizar uma ampla diversidade de xenobióticos (entre eles: compostos aromáticos e drogas farmacológicas) (AMADIO et al., 2010; LUSTOSA et al., 2012; PALUDO et al., 2013).

*C. echinulata* é classificado como fungo filamentososo, da Família *Cunninghamellaceae*, e um dos mais comuns na Ordem Mucorales (estabelecido por Blakeslee em 1905). Esses microrganismos são encontrados em solos e plantas de zonas mediterrâneas e subtropicais (MARINHO et al., 2004; ASHA et al., 2009; AMADIO et al., 2010). O *C. echinulata* possui colônias em cor creme pálido a castanho claro e algodão, seus esporófolos apresentam ramos primários monopodiais (Figura 5) (ZHENG; CHEN, 1996).



**Figura 5.** Características macroscópicas de *C. echinulata* isolada do solo do Cerrado, no Centro-Oeste do Brasil. Fotografia de crescimento em ágar Sabouraud dextrose a 28°C (Fonte: o autor).

O fungo *Rhizopus microsporus* pertence a um dos gêneros fúngicos mais conhecidos e utilizado, atualmente classificado como *Rhizopus*. Este gênero de fungo é um modelo biológico clássico e, em geral, tem grande importância prática, porque existem espécies que produzem enzimas industriais, ácidos orgânicos e outros produtos comercialmente importantes. Devido à grande produção de enzimas extracelulares, elas são amplamente utilizadas em processos biotecnológicos (PASIN et al., 2017).

*R. microsporus* é classificado como fungo filamentososo, da família Mucolaceae, e da Ordem Mucorales. São encontrados em quase todos os lugares: matéria vegetal, pães

e frutas em decomposição, fezes, solo e raízes (ABE et al., 2010). Esta espécie cresce rapidamente à temperatura de 40 a 45°C (termófilo).

O fungo *R. microsporus* var. *oligosporus* é bastante utilizado na produção de alimentos fermentados em países da Ásia (China, Coréia, Indonésia, Malásia, Cingapura) como na produção de molho de soja (também conhecido como tempeh) (TAVARES; KIYAN, 2002; GROS, 2008), recebendo inclusive a denominação GRAS (Generally Regarded as Safe) pela FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), classificação dada a microrganismos de reconhecida segurança para uso alimentar (BAKIR et al., 2001; RANDHIR; VATTEM; SHETTY, 2004).

Estudos anteriores mostraram também que *R. microsporus* é um bom produtor de diferentes enzimas, como pectinases (SEMENOVA et al., 2003),  $\beta$ -frutofuranosidase (WHANG; ZHOU, 2006),  $\beta$ -glicosidase (DECKER et al., 2000), celulases (SANYAL et al., 1988), amilases (FREITAS et al., 2014), tanases (BRADDOO et al., 1997), fitases (MALLER et al., 2010), lipases (VORA et al., 1988), xilanases (FACCHINI et al., 2011) e  $\beta$ -xilosidases (SEMENOVA et al., 2009).

*R. microsporus* possui crescimento rápido e colônia algodonosa, visto como cor castanho escuro e acinzentado. Seus esporos são acastanhados e seus esporângios possuem formato esférico com a cor preta (Figura 6).



**Figura 6.** Características macroscópicas de *R. microsporus* isolado de um fruto do Cerrado, no Centro-Oeste do Brasil. Fotografia de crescimento em ágar Sabouraud dextrose a 45°C (Fonte: o autor).

Os dois microrganismos possibilitam a visualização clara da diferença no perfil enzimático porque ambos são fungos filamentosos, entretanto *C. echinulata* é caracterizado pela condição de mesofilia enquanto *R. microsporus* é caracterizado pela condição de termofilia acarretando em diferentes temperaturas ótimas e termoestabilidade das enzimas de ambos microrganismos.

Além do que a produção amilolítica de *C. echinulata* é pouco relatada na literatura ao contrario da produção amilolítica de *R. microsporus* que é amplamente relatada na literatura, sendo inclusive conhecido como fungo produtor de enzimas amilolíticas.

### 3. REFERÊNCIAS

- ABE, A.; ASANO, K.; SONE, T. A molecular phylogeny-based taxonomy of the genus *Rhizopus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 74, n. 7, p. 1325-1331, 2010.
- ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A. *Enzimas no processamento de fibras têxteis*. In: BON, E, P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro, RJ : Ed. Interciencia, 2008.
- AMADIO, J.; GORDON, K.; MURPHY, C.D. Biotransformation of flurbiprofen by *Cunninghamella* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 18, p. 6299-303, 2010.
- ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* - A microbial model for drug metabolism studies - a review. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 1, p. 16-29, 2009.
- BAKIR, U.; YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F.; ERSAYIN, A. An endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 29, n. 6-7, p. 328-334, 2001.
- BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 6, n. 2, p. 151-160, 2002.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. *Introdução a química de alimentos*. 3. ed. Sao Paulo: Varela, 2003.
- BOCCHINI, D.A. et al. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 12, p. 3653-3659, 2005.
- BON, E.P.S.; GIRIO, F. PEREIRA JR., N. *Enzimas na produção de etanol*. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro, RJ : Ed. Interciencia, 2008.
- BRADDOO, S.; GUPTA, R.; SAXENA, R.K. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. *Process Biochemistry*, v. 32, n. 2, p. 135-139, 1997.
- BULEON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.
- BURHAN, A.; NISA, U.; GOKHAN, C.; OMER, C.; ASHABIL, A.; OSMAN, G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 10, p. 1397-1403, 2003.

CARVALHO, R.V.; CORRÊA, T.L.R.; SILVA, J.C.M.; VIANA, A.P.; MARTINS, M.L.L. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 2, p. 380-386, 2008.

CAVALHEIRO, G.F.; SANGUINE, I.S.; SANTOS, F.R.S.; COSTA, A.C.; FERNANDES, M.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. Catalytic properties of amyolytic enzymes produced by *Gongronella butleri* using agroindustrial residues on solid-state fermentation. *BioMed Research International*, v. 2017, p. 1-8, 2017.

COSTA, A.C.; CAVALHEIRO, G.F.; PAZ, M.F.; VIEIRA, E.R.Q.; FONSECA, G.G.; GANDRA, J.; GOES, R.; LEITE, R.S.R. Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application na additives in bovine feeding. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019.

COURI, S.; TERZI, S.C.; PINTO, G.A.S.; FREITAS, S.P.; DA COSTA, A.C.A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 3, p. 255-261, 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  $\alpha$ -amylase from *Rhizopus* sp. *Revista de Microbiologia*, v. 28, n. 2, p. 101-105, 1997.

CRUZ, M.E.M.; MARTINS, M.B.; CORVO, M.L.; GASPAR, M.M.; OLIVEIRA, E.M. M.; FERRARA, M.A. *Enzimas em medicamentos e diagnostico*. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Rio de janeiro, RJ : Ed. Interciencia, 2008.

DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; LOCURTO, R.B. SCP and crude pectinase by slurry - state fermetation of lemon pulps. *Bioresource Techonology*, v. 83, n. 2, p. 89-94, 2002.

DECKER, C.H.; VISSER, J.; SCHREIER, P.  $\beta$ -glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physic-chemical and biocatalytic properties. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 10, p. 4929-4936, 2000.

DHALI, R.; DEY, A.; CHATTOPADHYAY, A. N.; SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, S. K.; ROY, P.; CHATTERJEE, S. Isolation, characterization and study of amylase activity of microorganisms from arctic soil sample. *AOBR*, v. 3, n. 1, p. 5-15, 2016.

ESCARAMBONI, B. Produção de amilases fúngicas: comparação entre *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* em substratos de trigo e mandioca. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Assis, 2011.

FACCHINI, F.D.A.; VICI, A.C.; BENASSI, V.M.; FREITAS, L.A.P.; REIS, R.A.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Optimization of fibrolytic enzyme production by *Aspergillus japonicus* C03 with potential application in ruminant feed and their effects on tropical forages hydrolysis. *Bioprocess Biosystem Engineering*, v. 34, n. 8, p. 1027-1038, 2011.

FREITAS, A.C.; ESCARAMBONI, B.; CARVALHO, A.F.A.; LIMA, V.M.G.; OLIVA-NETO, P. Production of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* from industrial waste in acquisition of glucose. *Chemical papers*, v. 68, n. 4, p. 442-450, 2014.

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*, v. 18, n. 4, p. 314-319, 2015.

GARCIA, N.F.L.; SANTOS, F.R.S.; BOCCHINI, D.A.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. Catalytic properties of cellulases and hemicellulases produced by *Lichtheimia ramosa*: Potential for sugarcane bagasse saccharification. *Industrial Crops & Products*, v. 122, p. 49-56, 2018.

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GROS, J.B. *Fermentation media: design and properties, advances in fermentation (Solid-State Fermentation)* Nova Deli: Editora, 2008.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.

HASAN, S.M.; SANTOS, J.P.; ZEMPULSKI, M.L.F. GOMES, S.D.; LUCENA, S.L. Otimização da extração de proteases fúngicas obtidas por fermentação em estado sólido de resíduos de cervejaria. *ENGEVISTA*, v. 16, n. 2, p. 244-254, 2014.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, p. 301-306, 2005.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 45, n. 3, p. 253-267, 2001.

JACQUES, K.; LYONS, T.P.; KELSALL, D.R. *The alcohol textbook*. 3. ed. Nottingham: Nottingham Press, 386p, 1999.

JOO, H.S.; CHANG, C.S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.

LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. *Carboidratos em alimentos regionais Iberoamericanos*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 2006.

LOBO, A.R.; SILVA, G.M.L. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. *Revista de Nutrição*, v.16, n.2, p. 219-226, 2003.

- LUSTOSA, K.R.M.D.; MENEGATTI, R.; BRAGA, R.C.; LIÃO, L.M.; OLIVEIRA, V. Microbial  $\beta$ -glycosylation of entacapone by *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 113, n. 5, p. 611-613, 2012.
- MALLER, A.; DAMASIO, A.R.L.; SILVA, T.M.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Potential application in animal feed of phytase produced from agro-industrial residues by *Aspergillus japonicus*. *Journal of Biotechnology*, v. 150, p. 514-514, 2010.
- MARINHO, P.H.C. Aspectos bioquímicos e ultraestruturais de *Cunninghamella elegans* cultivada em meio contendo naftaleno. Dissertação (Mestrado). Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004
- MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, v. 37, n. 9, p. 949-954, 2002.
- MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; STUART, D.M.; PANDEY, A. New developments in solid state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 10, p. 1211-1225, 2000.
- MORAES, L.M.P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.
- MYERS, A.M.; MORELL, M.K.; JAMES, M.G.; BALL, S.G. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiology*, v. 122, n. 4, p. 989- 997, 2000.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- OLIVEIRA, L.A.D.; FLOR, N.S.; OLIVEIRA, A.N.D. Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. *Acta Amazonica*, v. 40, n. 2, p. 401-404, 2010.
- PALUDO, C.R.; SILVA-JUNIOR, E.A.; SANTOS, R.A.; PUPO, M.T.; EMERY, F.S.; FURTADO, N.A.J.C. Microbial transformation of  $\beta$ -lapachone to its glycosides by *Cunninghamella elegans* ATCC 10028b. *Phytochemistry Letters*, v. 6, n. 4, p. 657-661, 2013.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresouce Technology*, v. 74, n. 1, p. 81-87, 2000.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; FERNANDES, M.; LARROCHE, C. *Enzyme technology*. 1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005.
- PASIN, T.M.; BENASSI, V.M.; HEINEN, P.R.; DAMASIO, A.R.L.; CEREIA, M.; JORGE, J.L.; POLIZELI, M.L.T.L. Purification and functional properties of a novel

glucoamylase activated by manganese and lead produced by *Aspergillus japonicus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 102, p. 779-788, 2017.

PEIXOTO, S.C.; JORGE, J.A.; TERENCEI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformes*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. *International Microbiology*. v. 6, n. 4, p. 269-273, 2003.

PINTO, M.P. Otimização dos processos de produção de xaropes de glucose e dextrose monohidratada. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica), Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

RANDHIR, R.; VATTEM, D.; SHETTY, K. Solid-state bioconversion of fava bean by *Rhizopus oligosporus* for enrichment of phenolic antioxidants and l-DOPA. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 5, n. 2, p. 235-244, 2004.

RODRIGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 22, n. 3, p. 211-219, 2005.

ROSSI, M.; AMARETTI, A.; RAIMOND, S.; LEONARD, A. Getting lidis for biodiesel production from oleaginous fungi, biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies. Ed. Dr. Margarita Stoytcheva., 2011.

SANTOS, F.R.S.; GARCIA, N.F.L.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. Production and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Gongronella butleri* by solid-state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, v. 15, n. 16, p. 633-641, 2016.

SANYAL, A.; KUNDU, R.K. SINHA, S.N.; DUBE, D.K. Extracellular cellulolytic enzyme system of *Aspergillus japonicus*: 1. Effect of different carbon sources, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, n. 2, p. 85-90, 1988.

SAQIB, A.A.N.; HASSAN, M.; KHAN, N.F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). *Process Biochemistry*, v. 45, n. 5, p. 641-646, 2010.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Engenharia bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, (Biotecnologia industrial, v. 2), 2001.

SEMENOVA, M.V.; DRACHEVSKAYA, M.I.; SINITSYNA, O.A.; GUSAKOV, A.V.; SINITSYN, A.P. Isolation and properties of extracellular beta-xylosidases from fungi *Aspergillus japonicus* and *Trichoderma reesei*. *Biochemistry*, v. 74, n. 9, p.1002-1008, 2009.

SEMENOVA, M.V.; GRISHUTIN, S.G.; GUSAKOV, A.V.; OKUNEV, O.N.; SINITSYN, A.P. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry*, v. 68, n. 5, p. 559-569, 2003.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, n. 4, p. 318-324, 2002.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E.S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solidstate fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 8, p. 2885-2889, 2005.

SILVEIRA, G.G. Resíduos agroindustriais como potenciais substratos para a produção de renina microbiana por *Mucor miehei* utilizando fermentação em estado sólido. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

SILVEIRA, L.A. Produção de fitase por fungos endofíticos dos manguezais do Estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

SINGH, R.P.; PANDEY, J.K.; RUTOT, D.; DEGÉE, P.; DUBOIS, P. Biodegradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/starch blends and composites in composting and culture environments: the effect of compatibilization on the inherent biodegradability of the host polymer. *Carbohydrate Research*, v. 338, n. 17, p. 1759-1769, 2003.

SINGH, S.; SINGH, S.; BALI, V.; SHARMA, L.; MANGLA, J. 2014. Production of fungal amylases using cheap, readily available agriresidues, for potential application in textile industry. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-9, 2014.

SWETHA, S.; DHANYA, G.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.  $\alpha$ -Amylases from microbial sources - an overview on recent developments. *Food Technology & Biotechnology*, v. 44, n. 2, p. 173-184, 2006.

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

SPIER, M.R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas ( $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase) por fermentação no estado sólido. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T.P.K.  $\alpha$ -Amylase production and applications: a review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, v. 2, n. 4, 166-175, 2014.

TAVARES, S.G.; KIYAN, C. Avaliação da qualidade nutricional da proteína de farinha de tempeh, produto fermentado, obtido a partir da soja. *Alimentos e Nutrição*, v. 13, p. 23-33, 2002.

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.

VICENTE, G; BAUTISTA, L.F.; RODRIGUEZ, R.; GUTIERREZ, F.J.; S\_ADABA, I.; RUIZ-VAZQUEZ, R.R.; TORRES-MARTINEZ, S.; GARRE, V. Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel. *Biochemistry*, 2010.

VORA, K.A.; BHANDARE, S.S.; PRADHAN, R.S.; AMIN, A.R.; MODI, V.V. Characterization of extracellular lipase produced by *Aspergillus japonicus* in response to *Calotropis gigantea* látex. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 10, p. 465-472, 1988.

WHANG, L.M. e ZHOU, H.M. Isolation and identification of a novel *Aspergillus japonicus* JN19 producing  $\beta$ -fructofuranosidase and characterization of enzyme, *Journal of Food Biochemistry*, v. 30, p. 641-658, 2006.

ZANIN, G.M.; SANTANA, C.C.; BON, E.P.S.; GIORDANO, R.C.L.; MORAES, F.F. DE; ANDRIETTA, S.R.; CARVALHO NETO, C.C. DE; MACEDO, I.C.; LAHR FO., D.; RAMOS, L.P.; FONTANA. J.D. Brazilian bioethanol program. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84-86, p. 1147-1161, 2000.

ZHENG, R.Y.; CHEN, G.Q. *Cunninghamella echinulata* (Thaxt.) Thaxt. ex Blakeslee var. *echinulata* and var. *verticillata* (Paine) comb. nov. *Mycosystema*, v. 8, p. 1-13, 1996.

## CAPÍTULO II

---

### PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PROPRIEDADES CATALÍTICAS DE AMILASES PRODUZIDAS PELOS FUNGOS

*Cunninghamella echinulata* E *Rhizopus microsporus*

#### RESUMO

As amilases compreendem uma importante classe de enzimas com numerosas aplicações industriais, estas constituem 25% do mercado mundial de enzimas. O presente trabalho teve como objetivo otimizar a produção de amilases pelo cultivo em estado sólido dos fungos *Cunninghamella echinulata* e *Rhizopus microsporus* e avaliar as propriedades catalíticas dessas enzimas. Dentre os parâmetros fermentativos avaliados o fungo *C. echinulata* produziu maior quantidade de amilases, cerca de 234,94 U/g de substrato seco (ou 23,49 U/mL), pelo cultivo em farelo de trigo com 50-55% de umidade inicial a 28°C por 48 h. A maior produção de amilases pelo fungo *R. microsporus*, cerca de 224,85 U/g de substrato seco (ou 22,48 U/mL), foi obtida pelo cultivo em farelo de trigo com 65% de umidade inicial a 45°C por 24 h. O pH e a temperatura ótimos das amilases foram de 5,0 e 60°C e 4,5 e 65°C para as enzimas de *C. echinulata* e *R. microsporus*, respectivamente. As amilases produzidas por *C. echinulata* foram estáveis em pH 4,0-8,0, enquanto as enzimas de *R. microsporus* foram estáveis em pH 4,0-10,0. A temperatura de estabilidade das amilases produzidas por *C. echinulata* permaneceram estáveis à 50°C quando incubadas por 1 h, e as amilases de *R. microsporus* mantiveram suas atividades catalíticas à 55°C por 1 h. O extrato enzimático de ambos os fungos hidrolisaram amidos de diferentes fontes vegetais e apresentaram potencial para liquefação do amido, porém o complexo amilolítico do fungo *C. echinulata* apresentou maior potencial sacarificante quando comparado com *R. microsporus*, indicando ação sinérgica entre endo e exoamilases no extrato produzido por *C. echinulata*.

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

## 1. INTRODUÇÃO

As amilases compreendem uma importante classe de enzimas com numerosas aplicações industriais e biotecnológicas, representando 25% do mercado mundial (HASAN et al., 2014). No cenário atual há uma gama extensiva de aplicações tais como nas indústrias de alimentos, detergentes, papéis, têxteis, panificação, indústria química e farmacêutica e na fabricação de etanol (SOUZA; MAGALHÃES, 2010; BARATTO et al., 2011; SILVA et al., 2013).

A principal vantagem do uso de microrganismos para produção de enzimas é o potencial econômico e capacidade de produção em larga escala, além da relativa facilidade de manipulação e obtenção de enzimas com características específicas. O cultivo em estado sólido (CES) tem ganhado atenção das pesquisas nos últimos 20 anos, e credibilidade entre muitas corporações industriais, por exibir algumas vantagens sobre o processo de cultivo submerso, muitas delas estão relacionadas à aspectos morfológicos e fisiológicos dos fungos filamentosos (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012; GARCIA et al., 2015).

A maioria das enzimas estudadas podem ser agrupadas sob o mesmo modelo estrutural, apesar de apresentarem características bioquímicas diferentes, como efeito da temperatura, pH, inibidores e outros. Em geral, são diferenciadas em função da sua atividade catalítica, termo-estabilidade e faixas ótimas de pH de atuação, fatores que determinam sua adequação aos processos industriais (PANDEY et al., 2005).

Tendo em vista o reduzido número de trabalhos utilizando o fungo filamentoso *C. echinulata* para produção de enzimas industriais e o potencial do microrganismo *R. microsporus* para produzir enzimas hidrolíticas, este estudo teve como objetivo comparar a produção e as propriedades catalíticas das enzimas amilolíticas produzidas pelos fungos filamentosos *C. echinulata* e *R. microsporus*.

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

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

**2.1. Microrganismos:** No presente trabalho foram utilizados os fungos filamentosos *C. echinulata* colatado na Serra da Bodoquena - MS, vegetação Floresta Estacional Decidual – Mata Atlantica e *R. microsporus*, isolado de frutos em decomposição do Cerrado na região de Dourados-MS. As linhagens foram identificadas pela Micoteca URM (University Recife Mycologia) da Universidade Federal de Pernambuco. Os microrganismos *C. echinulata* e *R. microsporus* foram cultivados a 28°C e 45°C, respectivamente, em meio ágar Sabouraud Dextrose e mantidos 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.

**2.2. Inóculo:** Os microrganismos foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio ágar Sabouraud Dextrose inclinado, mantidos por 48 h a 28°C e 45°C, para *C. echinulata* e *R. microsporus*, respectivamente. A suspensão dos microrganismos 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 dos fungos nos substratos (resíduos agroindustriais) se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão (GARCIA et al., 2018).

**2.3. Produção de amilases por CES:** 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, bagaço de cana-de açúcar e farelo de trigo) umedecidos com solução nutriente (descrita no item anterior). Todos os substratos foram devidamente lavados com água destilada e posteriormente secos em estufa a 50°C por 48 h. O material foi esterilizado a 121°C durante 20 min. O substrato que apresentou melhor produção da enzima foi adotado para avaliação de outros parâmetros fermentativos, como: umidade (50-80%) e tempo cultivo (24-96 h) sendo adotada a condição ótima de cada experimento, nos ensaios subsequentes (COSTA et al., 2019).

**2.4. 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 h a 100 rpm. Posteriormente, todo conteúdo foi filtrado em tecido sintético (nylon) e centrifugado a 1500 x *gravidade* por 5 min. O sobrenadante foi denominado extrato enzimático e utilizados nos ensaios subsequentes (GARCIA et al., 2018).

**2.5. Determinação da atividade de amilase:** A atividade de amilase foi determinada pela adição de 0,1 mL de extrato enzimático em 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,5 contendo 1% de amido de milho. Após 10 min 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.

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

**2.6.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade da enzima:** O pH ótimo das enzimas foi determinado 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 (30-85°C) no respectivo pH ótimo de cada enzima. A estabilidade das enzimas ao pH foi avaliada incubando-as por 24 h a 25°C 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 8,5-11). A termoestabilidade das enzimas foi avaliada incubando as enzimas por 1 hora em diferentes faixas de temperatura (30-75°C). As atividades residuais foram determinadas nas condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima (OLIVEIRA et al., 2015).

O percurso de tempo de termoinativação das amilases foi medido incubando as enzimas (em tampão acetato de sódio 0,1 M no respectivo pH ótimo de cada enzima) à 55°C. Amostras foram removidas em diferentes tempos de incubação e a atividade catalítica residual foi quantificada nas condições ótimas de cada enzima. O tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) das enzimas foi definido como o tempo no qual a atividade residual da enzima foi 50% da atividade original, após incubação a 55°C (TOMAZIC e KLIBANOV, 1988).

**2.6.2. 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 milho, amido de mandioca, amido de arroz, amido de trigo e amido de aveia. As reações ocorreram em meios com tampão acetato

de sódio (0,1M) nos valores de pH e temperatura ótima de cada enzima. A quantidade de açúcar redutor liberada foi quantificada pelo método de DNS (MILLER, 1959).

**2.6.3. Efeito de etanol sobre a atividade das enzimas:** A atividade enzimática foi quantificada com a adição de etanol em diferentes concentrações (0-30%), no meio reacional. Os ensaios foram realizados em tampão acetato de sódio 0,1 M nas condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima (OLIVEIRA et al., 2016)

**2.6.4. Avaliação do potencial dextrinizante dos extratos enzimáticos:** A atividade dextrinizante foi realizada pelo método iodométrico descrito por Fuwa (1954) e Pongsawadi; Yagisawa (1987). A mistura de reação foi composta por 0,1 mL de enzima adicionada a 0,3 mL de solução tampão acetato de sódio contendo 1% de amido. Após 10 min a reação foi paralisada pela adição de 4 mL de solução de HCl 0,2 M. Os ensaios foram conduzidos nas condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL de reativo de iodo e 10 mL de água destilada. A absorvância 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 realizada 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 0,9 mL de solução tampão acetato de sódio (0,1 M) contendo amido 0,5%. Após 10 min a reação foi paralisada em banho de gelo. Os ensaios foram conduzidos nas condições ótimas de pH e temperatura de cada enzima. A glicose liberada foi quantificada com o kit enzimático colorimétrico (Glicose-PP Analisa). A absorvância foi quantificada a 505 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de glicose por minuto de reação.

**2.6.6. Cromatografia de camada delgada dos produtos de hidrólise:** A análise cromatográfica dos produtos finais da reação da atividade da amilase sobre amido solúvel foi realizada utilizando cromatografia em camada delgada (CCD). Um volume de 0,01 mL da mistura da reação foi aplicada sobre placas de sílica gel (G-60, 10 x 15 cm) e submetidos a corrida cromatográfica ascendente sequencial utilizando como

sistema solvente a solução de butanol/etanol/água (5:3:2). Depois de secar a placa ao ar, as manchas foram reveladas pela pulverização da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e metanol (1:9) contendo 0,2% de orcinol e posterior aquecimento a 100°C (SILVA et al., 2013).

**2.6.7. Análise Estatística:** Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados são apresentados como a média de três testes independentes. A análise estatística dos dados incluiu uma ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey com nível de significância de 5%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Produção de amilase por CES

O substrato que apresentou maior potencial para produção de amilase pelos microrganismos foi o farelo de trigo, com atividade enzimática de 157,66 U/g e 144,80 U/g para *C. echinulata* e *R. microsporus*, respectivamente (Tabela 1). Vários estudos tem apontado o farelo de trigo como excelente substrato para o cultivo de fungos filamentosos visando à produção de enzimas industriais (GARCIA et al., 2018; KUMAR et al., 2019; COSTA et al., 2019). A composição do farelo de trigo compreende aproximadamente 13-18% de proteína, 3,5% de gordura e 56% de carboidratos (APPRICH et al., 2014). Zimbardi et al. (2013) ainda ressaltam que o uso do farelo de trigo como substrato pode até suplementar o uso de fontes de nitrogênio e alguns minerais, uma vez que o mesmo possui uma rica composição nutricional, com vitamina B, proteínas, carboidratos, lipídios, minerais e uma grande quantidade de nitrogênio.

**Tabela 1.** Produção de amilase pelos fungos *C. echinulata* e *R. microsporus* em diferentes resíduos agroindustriais à 28°C e 45°C, respectivamente, ambos com 70% de umidade inicial no meio e 96 h de tempo de cultivo.

Atividade amilolítica (U/g de substrato seco)		
Resíduos agroindustriais	<i>C. echinulata</i>	<i>R. microsporus</i>
Farelo de trigo	157,66±0,37 <sup>a</sup>	144,80±0,77 <sup>a</sup>
Farelo de soja	15,88±0,0 <sup>b</sup>	3,46±0,06 <sup>b</sup>

Palha de milho	7,78±0,05 <sup>c</sup>	8,55±0,02 <sup>b</sup>
Casca de arroz	5,84±0,04 <sup>cd</sup>	6,10±0,00 <sup>b</sup>
Sabugo de milho	5,62±0,56 <sup>cd</sup>	5,36±0,13 <sup>b</sup>
Bagaço de cana-de açúcar	2,14±0,21 <sup>d</sup>	3,31±0,00 <sup>b</sup>

Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os valores ( $\pm$ ) representam os desvios padrão das triplicatas no experimento.

Meijer et al. (2011) demonstraram que o farelo de trigo favorece a produção de uma grande variedade de hidrolases pelo microrganismo *Aspergillus* utilizando assim o farelo de trigo como substrato. Fernandez-Nunez et al. (2017) obtiveram produção enzimática de 392,5 U/g quando utilizaram farelo de trigo na produção de amilase por CES, pelo fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, após um período de 120h de cultivo, com 55% de umidade inicial a 30°C. Em virtude dos relatos da literatura e a observação dos nossos resultados o farelo de trigo foi adotado como substrato para os cultivos subsequentes.

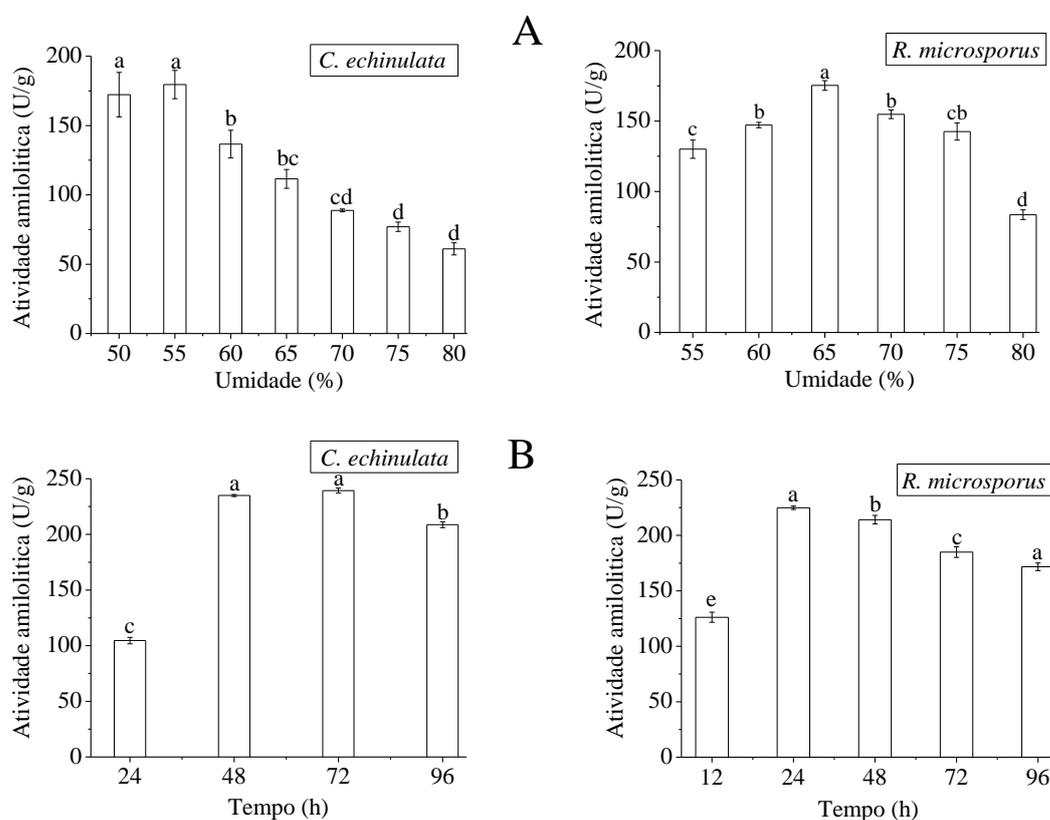
Outros parâmetros de cultivo também foram avaliados para otimização da produção de amilase pelos fungos filamentosos *C. echinulata* e *R. microsporus*, como: umidade e tempo de cultivo (Figura 1).

A umidade inicial ótima para produção de amilase pelo fungo mesófilo *C. echinulata* em farelo de trigo foi entre 50-55% (179,61 U/g). Isto demonstra que este microrganismo requer menores níveis de umidade quando comparado com os microrganismos descritos na literatura o que diminui as chances de contaminações bacterianas no processo de cultivo (PRAKASHAM, et al., 2007; GARCIA et al., 2018). Para o fungo *R. microsporus* encontrou-se como umidade ótima 65% (175,28 U/g) em farelo de trigo (Figura 1A e 1B).

A umidade do meio de cultivo é um dos principais fatores que influencia no CES. O substrato com a umidade adequada deverá apresentar condições para que haja transferência de nutrientes e oxigênio para o fungo. Portanto, um alto teor de umidade diminui as trocas gasosas, além de aumentar o risco de contaminação, enquanto um baixo teor de umidade prejudica o crescimento do microrganismo em questão (SINGHANIA, 2009; CAVALHEIRO et al., 2017).

A produção máxima de amilase pelo fungo *R. microsporus* (224,85 U/g) foi obtida em 24 h de cultivo. Para o fungo filamentoso *C. echinulata* a produção máxima (234,94 U/g) foi observada entre 48-72 h de cultivo (Figuras 1C e 1D), não havendo

diferença significativa pela análise estatística. Dessa forma 48 h foi adotado como tempo ótimo de cultivo para a produção da enzima.



**Figura 1.** Produção de amilase por CES dos fungos *C. echinulata* e *R. microsporus* em farelo de trigo a 28°C e 45°C respectivamente. (A) umidade inicial de *C. echinulata* por 96 h, (B) umidade inicial de *R. microsporus* por 96 h, (C) tempo de cultivo de *C. echinulata* com 55% de umidade, (D) tempo de cultivo de *R. microsporus* com 65% de umidade. Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O tempo de cultivo mais adequado para a produção de amilases pelos fungos *C. echinulata* (48 h) e *R. microsporus* (24 h) é inferior ao tempo encontrado por Mazumdar e Maumdar (2018) para o fungo termotolerante *Aspergillus oryzae*, que foi de 96 h de cultivo, em casca de banana como substrato. O tempo de cultivo obtido foi também inferior ao relatado por Chaturvedi et al. (2018), com o fungo *Saccharomyces pastorianus* por cultivo em meio YPD, o qual mostrou maior produção de amilases após 216 h de cultivo. No trabalho realizado por Santana et al. (2012), o fungo *Aspergillus*

*niger* apresentou o tempo de cultivo de 24 h como o mais adequado para a produção de amilase, por CES de farelo de cacau, valor similar ao obtido para o fungo *R. microsporus*. Trabalhos anteriores confirmam o reduzido tempo para produção de amilases para o gênero *R. microsporus*. Ferreira et al., 2015 relata produção de 63,5 U/g pelo fungo filamentosso *Rhizopus oryzae* por 24 h em farelo de trigo.

Dados da literatura apresentam valores de produção de enzimas amilolíticas menores ou próximos dos descritos neste trabalho, corroborando assim para a validação e importância dos resultados obtidos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Produção de amilases de diferentes linhagens fúngicas em condições de cultivo otimizadas em CES.

<b>Linhagem</b>	<b>Substrato</b>	<b>Atividade amilolítica</b>	<b>Autor (es)</b>
<i>Rhizomucor miehei</i>	Quirera de milho	13,0 U/g	Bernardes et al. (2014)
<i>Gongronella butleri</i>	Farelo de trigo	63,25 U/g	Cavalheiro et al. (2017)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de trigo	63,5 U/g	Ferreira et al. (2015)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Farelo de trigo	144,5 U/g	Oliveira et al. (2016)
<i>Candida parapsilosis</i>	Farelo de trigo	146,8 U/g	Oliveira et al. (2015)
<i>Aspergillus sp.MK07</i>	Farelo de trigo	164,0 U/g	Chimata et al. (2010)
<i>C. echinulata</i>	Farelo de trigo	234,39 U/g	Este trabalho
<i>R. microsporus</i>	Farelo de trigo	224,85 U/g	Este trabalho

Para a produção de enzimas industriais quanto menor for o tempo, mais viável é o processo, pois o gasto com energia, e conseqüentemente os custos de produção, são menores (BERNARDES et al. 2014).

Após a otimização do processo de cultivo, constatou-se que a produção de *C. echinulata* em farelo de trigo aumentou de 157,66 para 234,39 U/g nas condições de 55% de umidade durante 48 h de cultivo, portanto um aumento de 48% de enzimas produzidas. A produção de *R. microsporus* em farelo de trigo aumentou de 144,80 para 224,85 U/g nas condições de 65% de umidade durante 24 h de cultivo, portanto um aumento de 55% de enzimas produzidas.

Vale ressaltar também que além do aumento da produção da enzima, também há redução do tempo de cultivo de *C. echinulata* e *R. microsporus* para produção de enzimas

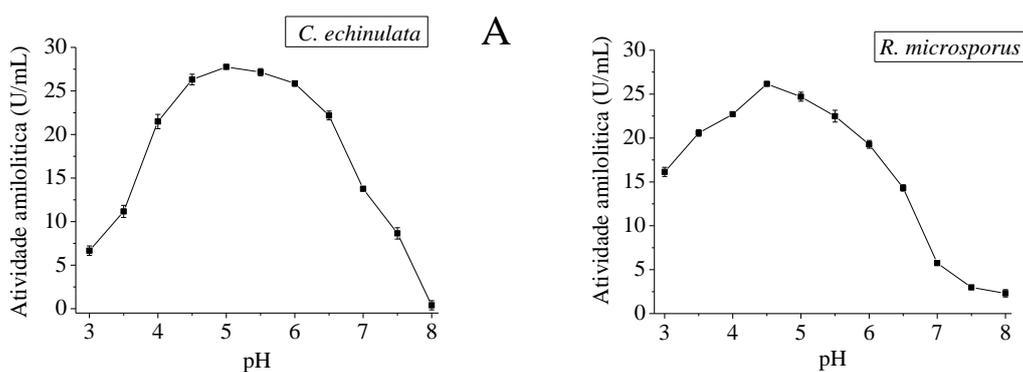
amilolíticas, contribuindo assim para a redução do custo da enzima de interesse e favorecendo a sua aplicação em larga escala.

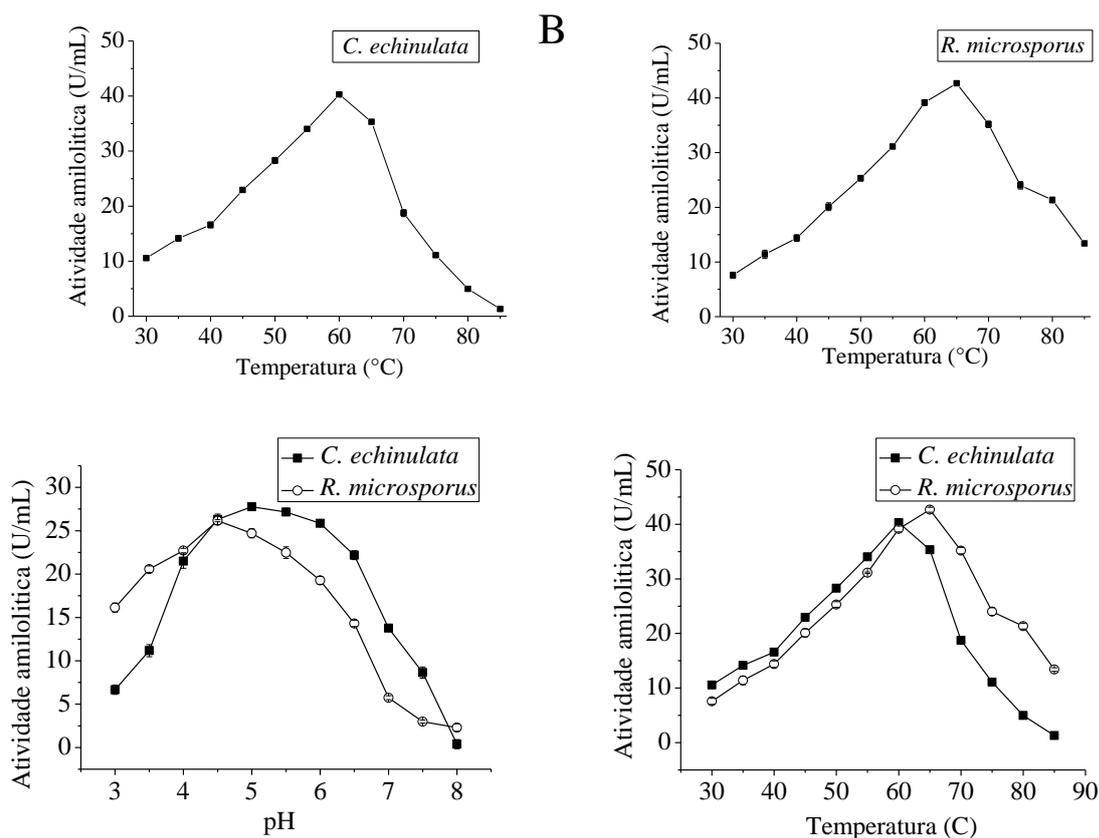
### 3.2. Caracterização bioquímica das amilases produzidas

#### 3.2.1 Efeito de pH e temperatura

A enzima de *C. echinulata* teve maior atividade em valores de pH entre 4,5 e 6,0, com pH ótimo em 5,0. A enzima de *R. microsporus* apresentou atividade ótima no pH 4,5 (Figura 2A e 2B). Os resultados indicam que os fungos estudados produzem amilases que podem ser aplicadas em processos que tendem a valores de pH mais ácidos, especialmente entre 4,5 a 6,0. Obafemi et al. (2018) obtiveram como pH ótimo para amilase parcialmente purificada do fungo *Aspergillus niger* o pH 6,0 e o pH ótimo demonstrado pela amilase do fungo *Aspergillus fumigatus* NTCC 1222 foi 6,0 (SINGH; KAYASTHA, 2014).

A enzima de *C. echinulata* apresentou temperatura ótima à 60°C e a de *R. microsporus* à 65°C (Figura 2C e 2D), alta em relação à maioria dos fungos filamentosos produtores de amilase relatados na literatura. A temperatura ótima para amilase do fungo *Aspergillus awamori* foi 60°C (KARAM et al., 2017). Cavalheiro et al. (2017) relataram para a amilase do fungo *Gongronella butleri* a temperatura de 55°C como ótima.





**Figura 2.** Efeito do pH e temperatura sobre atividade enzimática. (A) pH ótimo de *C. echinulata* e *R. microsporus* (B) temperatura ótima de *C. echinulata* e *R. microsporus*.

Quanto à estabilidade ao pH a atividade da amilase de *C. echinulata* manteve valores superiores a 85% da atividade inicial por 24 h em faixa de pH 4,0-8,0 (Figura 3A). A amilase do microrganismo *R. microsporus* manteve atividade maior que 82% da atividade original por 24 h em faixa de pH 3,5-10,0 (Figura 3B).

Pasin et al. (2017) relatam estabilidade ao pH da glucoamilase do microrganismo *Aspergillus jabonicus*, aproximada de 65% de sua atividade inicial entre a faixa de pH de 3,0-6,0. A amilase do microrganismo *Bacillus* sp. cepa TSCVKK mostrou estabilidade na faixa de pH 6,5-10,5, sugerindo desta forma que este microrganismo possui natureza alcali-tolerante (KONDEPUDI; CHANDRA, 2008).

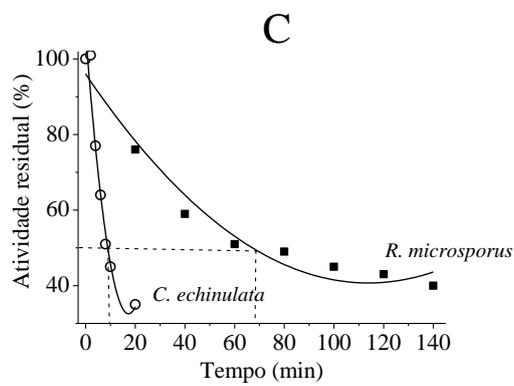
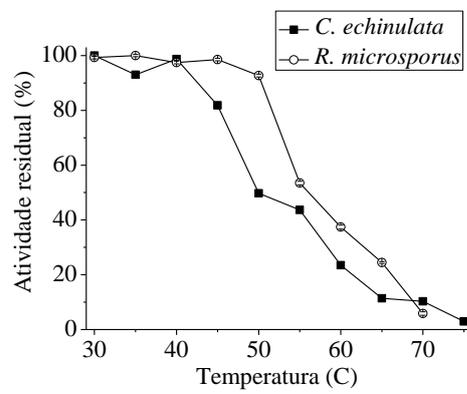
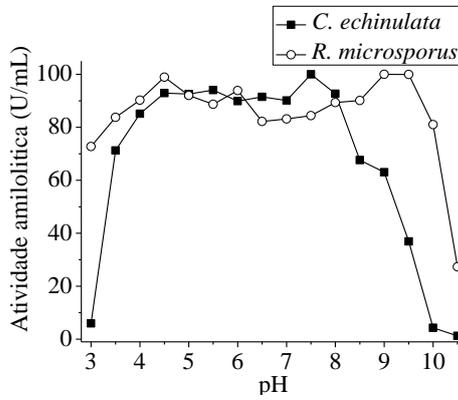
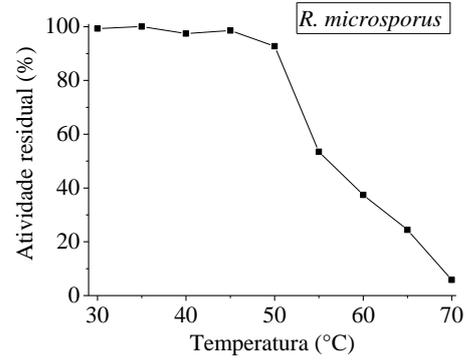
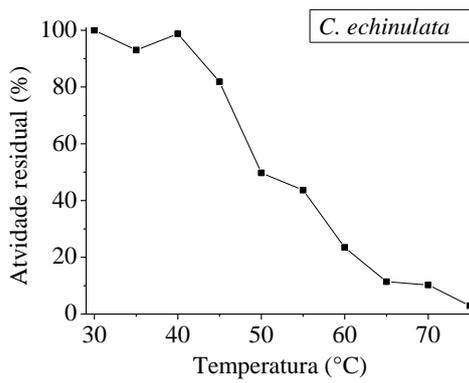
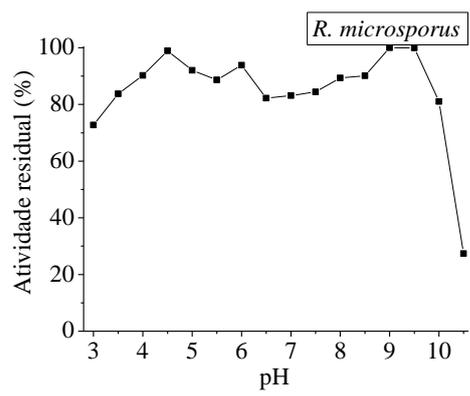
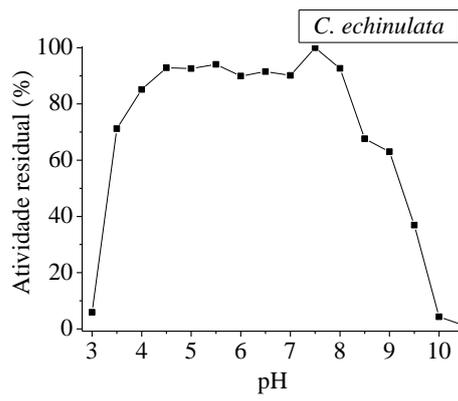
A enzima do fungo *C. echinulata* apresentou estabilidade superior a 80% quando incubada por 60 min na temperatura de 30-45°C, quando a temperatura foi elevada para 50°C a estabilidade foi reduzida para 50% da atividade inicial da enzima (Figura 3C). A enzima do fungo *R. microsporus* apresentou estabilidade superior a 90% quando incubada por 60 min na temperatura de 30-50°C, quando a temperatura foi elevada para 55°C a estabilidade foi reduzida para 50% da atividade inicial da enzima (Figura 3D).

Fato importante para aplicação industrial já que a maioria dos processos industriais requerem enzimas tolerantes a altas temperaturas.

Pasin et al. (2017) relatam à termoestabilidade da glucoamilase do microrganismo *Aspergillus jabonicus* cerca de 70% de sua atividade inicial quando incubada por 60 min a 50°C. Cavalheiro et al. (2017) apresentaram para a amilase do fungo *Gongronella butleri* uma atividade residual de 70% quando incubada a 40°C por 60 min.

O tratamento a 55°C resultou em uma progressiva inativação de ambas as enzimas, no entanto, a amilase produzida pelo microrganismo termofílico *R. microsporus* apresentou uma termoestabilidade muito maior quando comparado com a enzima produzida pelo microrganismo mesofílico *C. echinulata*. A 55°C a meia vida  $t(1/2)$  da enzima do *R. microsporus* foi obtida após 70 min de incubação, enquanto a do *C. echinulata* após 10 min apresentava 50% de sua atividade original (Figura 3E).

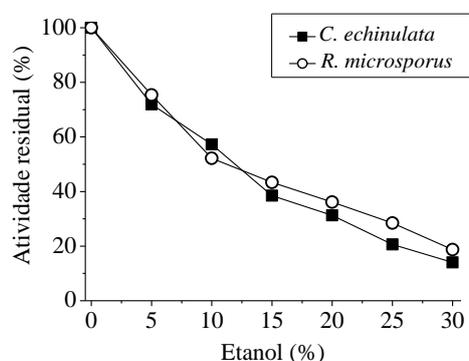
De forma geral, enzimas produzidas por microrganismos termófilos apresentam maior estabilidade térmica comparadas as enzimas produzidas por mesófilos. Em geral, enzimas termofílicas tendem a apresentar um maior número de ligações covalentes (ligações dissulfeto) e interações não covalentes, como interações hidrofóbicas, electrostáticas, iónicas, e ligações de hidrogênio. No entanto, não existe modelo estrutural que diferencie significamente uma proteína estável de uma proteína não estável, isto é, pequenas diferenças na quantidade de ligações e interações mencionadas acima podem contribuir eficazmente para a estabilização estrutural de uma proteína (GOMES et al., 2007; MORAIS et al., 2018).



**Figura 3.** Efeito do pH e temperatura sobre atividade enzimática. (A) pH de estabilidade *C. echinulata* e *R. microsporus*, (B) temperatura de estabilidade *C. echinulata* e *R. microsporus*, (C) atividade residual das amilases de *C. echinulata* e *R. microsporus* em função do tempo de incubação a 55°C.

### 3.2.2. Efeito de etanol sobre a atividade das enzimas

As amilases dos fungos *C. echinulata* e *R. microsporus* mantiveram cerca de 60% de atividades catalítica na mistura de reação contendo 10% (v/v) (Figura 4). Os resultados permitem inferir que as amilases produzidas pelos microrganismos apresentam potencial para serem aplicadas em processos de sacarificação e fermentação simultâneos. Nesse tipo de processo os açúcares fermentescíveis liberados pela ação das enzimas são simultaneamente convertidos em etanol por microrganismos fermentadores, no entanto, para que isso seja possível os biocatalisadores utilizados no processo devem suportar a presença de etanol na mistura da reação (SANTOS et al., 2016).



**Figura 4.** Avaliação da concentração de etanol sobre a atividade enzimática dos extratos produzidos em CES.

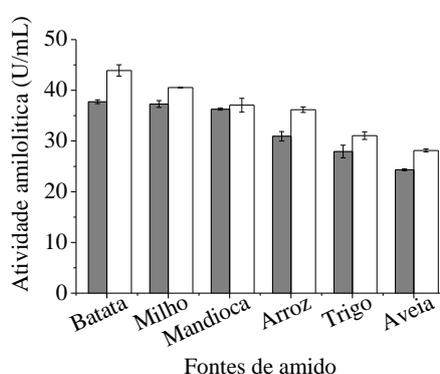
Considerando que concentrações superiores a 10% de etanol são nocivas até mesmo para o microrganismo fermentador (*Saccharomyces cerevisiae*) (COT et al., 2007), é possível inferir que as enzimas avaliadas no presente trabalho são suficientemente estáveis para serem aplicadas nesse tipo de processo.

### 3.2.3. Avaliação do potencial catalítico para diferentes fontes de amido

As enzimas apresentaram potencial de hidrolisar amidos de diferentes fontes vegetais, demonstrando assim potencial para serem utilizadas em um amplo espectro de aplicações industriais (Figura 5).

Dentre os amidos avaliados os mais susceptíveis à ação das amilases produzidas pelo fungo *R. microsporus* foram amidos de batata, milho, mandioca e arroz, e pelo extrato enzimático do fungo *C. echinulata* foram os amidos de batata, milho e mandioca (Figura 5). No entanto, enzimas de ambos microrganismos mostraram excelente habilidade para degradar os demais amidos avaliados. Os resultados indicaram que os extratos enzimáticos produzidos por *C. echinulata* e *R. microsporus* são capazes de degradar amidos com características estruturais distintas.

Dependendo da origem e variedade do amido, estes possuem variações nos graus de ramificações de suas cadeias internas e nos teores de amilose e amilopectina, fato este que influencia na sua cristalinidade e nos processos de gelatinização e de hidrólise enzimática. Quanto maior for a cristalinidade, maior será a estabilidade estrutural do grânulo e sua resistência a gelatinização, o que dificulta o acesso das enzimas a região específica de hidrólise do amido (HOOVER, 2001; SINGH et al., 2003; LOBO; SILVA, 2003).



**Figura 5.** Avaliação do potencial catalítico dos extratos enzimáticos sobre amido de diferentes fontes vegetais, pela quantificação de açúcar redutor pelo método DNS. **Coluna cinza - *C. echinulata*; Coluna branca - *R. microsporus*.**

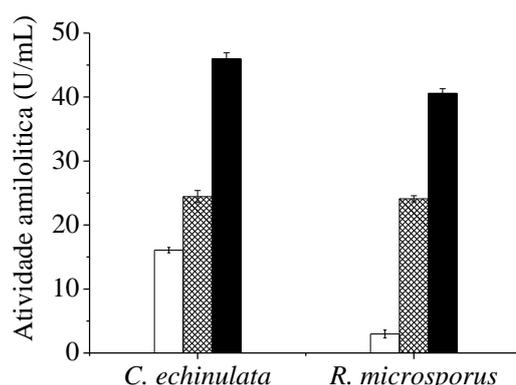
De forma geral o amido de milho é hidrolisado com maior facilidade pela ação de enzimas amilolíticas devido ao reduzido número de ramificações presente em sua estrutura (TESTER; KARKALAS, 2004). Oliveira et al. (2015) avaliaram o potencial catalítico dos extratos enzimáticos produzidos pelas leveduras *Candida parapsilosis*,

*Rhodotorula mucilaginosa* e *Candida glabrata* sendo observado maior eficiência catalítica para amido de milho. Resultados distintos foram obtidos no presente trabalho onde os extratos enzimáticos apresentaram potencial de hidrolisar amidos provenientes de diferentes fontes botânicas.

Cavalheiro et al. (2017) relatam um amplo espectro de ação do extrato enzimático produzido pelo fungo *Gongronella butleri*. Os autores sugerem a possibilidade da produção de mais de uma classe de amilases pelo mesmo microrganismo, agindo de forma sinérgica sobre a molécula de amido, reduzindo drasticamente o grau de ramificação e polimerização.

#### 3.2.4. Potencial dextrinizante e sacarificante dos extratos enzimáticos produzidos por *C. echinulata* e *R. microsporus*

Os extratos enzimáticos de ambos o fungos apresentaram similar potencial dextrinizante quantificado pelo método iodométrico, que permite avaliar a despolimerização da molécula de amido ocasionada pela ação de endoamilases e enzimas desramificantes (Figura 6). No entanto, na hidrólise realizada com extrato enzimático produzido por *C. echinulata* foi evidenciada maior conversão de amido em glicose, indicando a ação sinérgica de endo e exoamilases (Figura 6). A atividade sinérgica entre endo e exoamilases também é descrita para o extrato enzimático produzido pelo fungo *Lichtemia ramosa* quando cultivado em farelo de trigo (OLIVEIRA et al., 2016).

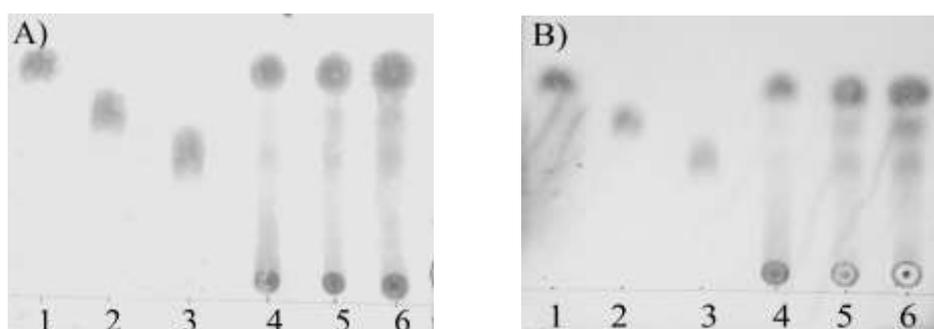


**Figura 6.** Avaliação das modificações enzimáticas sobre o amido de milho pelos microrganismos *C. echinulata* e *R. microsporus*. **Coluna branca** - Liberação de moléculas de glicose pelo método de glicose/oxidase; **Coluna tachada** - Redução do

grau de polimerização do amido quantificado pelo método iodométrico; **Coluna preta** - Liberação de açúcares e extremidades redutoras pelo método de DNS.

O extrato enzimático produzido por *R. microsporus* apresentou reduzido potencial de conversão de amido em glicose, sendo recuperada pequena quantidade desse monossacarídeo ao final do tratamento enzimático. A reduzida quantidade de glicose sugere reduzida atividade de exoamilases no extrato enzimático, o que possibilita concluir a existência predominante de atividade despolimerizante, geralmente medida por  $\alpha$ -amilases. As modificações ocasionadas na molécula de amido durante a redução do seu grau de polimerização também refletira no aumento de extremidades redutoras quantificadas pelo método DNS.

Através da cromatografia de camada delgada é possível observar com clareza a formação tanto de dextrinas quanto de monômeros de glicose como produtos finais da hidrólise do amido por ambas as enzimas de *C. echinulata* e *R. microsporus* (Figura 7). Vijayaraghavan, Remya e Prakash Vicent (2011) confirmam a produção de  $\alpha$ -amilase pelo fungo *R. microsporus*, o que corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho.



**Figura 7.** Cromatografia de camada fina do hidrolisado de amido de milho de: **A)** *C. echinulata* e **B)** *R. microsporus*. **Padrões:** (1) glicose; (2) maltose; (3) maltotriose. **Hidrolisado em diferentes tempos:** (4) 10 min; (5) 15 min; (6) 20 min.

Os resultados da cromatografia de camada delgada corroboram para os resultados descritos anteriormente. Dessa forma, é possível inferir que o extrato

enzimático produzido por *C. echinulata* pode ser aplicado em processos que envolvam a liquefação e sacarificação do amido visando a obtenção de açúcares fermentescíveis, enquanto o extrato enzimático produzido por *R. microsporus* apresenta maior eficiência em processos que envolvam a liquefação do amido, podendo ser utilizado em processos com temperaturas mais elevadas.

#### **4. CONCLUSÕES**

Neste estudo foi demonstrado que o farelo de trigo foi o melhor substrato para produção de altos níveis de enzimas amilolíticas para ambos os microrganismos.

O fungo termofílico *R. microsporus* teve como tempo ótimo para produção de enzimas amilolíticas o período de 24 h de cultivo em CES, o que é considerado um dos menores tempos de produção de amilase já relatado para esta enzima em CES.

As enzimas produzidas foram estáveis em ampla faixa de pH e temperatura e mantiveram 60% de atividade residual em soluções contendo 10% de etanol. As análises do efeito de temperatura sobre a estabilidade das enzimas amilolíticas confirmam a maior estabilidade da enzima produzida pelo microrganismo termofílico *R. microsporus* quando comparada a *C. echinulata*.

Ambas as amilases hidrolisaram amidos de diferentes fontes vegetais, sugerindo uma ampla gama de aplicação para as duas, porém, com perfis de hidrólise distintos.

## 5. REFERÊNCIAS

APPRICH, S.; TIRPANALAN, Ö.; HELL, J.; REISINGER, M.; BÖHMDORFER, S.; SIEBENHANDL-EHN, S.; NOVALIN, S.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 2: valorisation of products. *Food Science and Technology*, v. 56, n. 2, p. 222-23, 2014.

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*, v. 11, n. 2, p. 15-28, 2011.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 175-185, 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.; EMERENCIANO, O. Utilização de subprodutos agroindustriais para produção de  $\alpha$ -amilase por *Rhizomucor miehei*, *Revista Brasileira de Tecnologia Industrial*, v. 08, n. 2, p. 1439-1451, 2014.

CAVALHEIRO, G.F.; SANGUINE, I.S.; SANTOS, F.R.S.; COSTA, A.C.; FERNANDES, M.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. Catalytic properties of amylolytic enzymes produced by *Gongronella butleri* using agroindustrial residues on solid-state fermentation. *BioMed Research International*, v. 2017, p. 1-8, 2017.

CHATURVEDI, S.; KUMARI, A.; NAIN, L.; SUNIL K. Bioprospecting microbes for single cell oil production from starchy wastes. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 48, n. 3, p. 296-302, 2018.

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, n. 32, p. 5162-5169, 2010.

COSTA, A.C.; CAVALHEIRO, G.F.; PAZ, M.F.; VIEIRA, E.R.Q.; FONSECA, G.G.; GANDRA, J.; GOES, R.; LEITE, R.S.R. Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application na additives in bovine feeding. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 19, p. 1-8, 2019.

COT, M.; LORET, M.O.; FRANÇOIS, J.; BENBADIS, L. Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS Yeast Research*, v. 7, n. 1, p. 22-32, 2007.

FERNÁNDEZ NÚÑEZ, E.G.; BARCHI, A.C.; ITO, S.; ESCARAMBONI, B.; HERCULANO, R.D.; MAYER, C.R.M.; OLIVA NETO, P. Artificial intelligence approach for high level production of amylase using *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* and different agro-industrial wastes. *Journal of Chemical Tecgnology and Biotechnology*, v. 92, n. 3, p. 684-692, 2017.

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

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *Journal of Biochemistry*, v. 41, n. 5, 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*, v. 18, n. 4, p. 314-319, 2015.

GARCIA, N.F.L.; SANTOS, F.R.S.; BOCCHINI, D.A.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. Catalytic properties of cellulases and hemicellulases produced by *Lichtheimia ramosa*: Potential for sugarcane bagasse saccharification. *Industrial Crops & Products*, v. 122, p. 49-56, 2018.

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review, *Carbohydrate Polymers*, v. 45, n. 3, p. 253-267, 2001.

KARAM, E.A.; WAHAB, W.A.A.; SALEH, S.A.A.; HASSAN, M.E.; KANSOH, A.L.; Esawy, M.A. Production, immobilization and thermodynamic studies of free and immobilized *Aspergillus awamori* amylase. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 102, p. 694-703, 2017.

KLIBANOV, A. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechnology*, v. 15, n. 3, p. 97-101, 1997.

KONDEPUDI, K.K.; CHANDRA, T.S. Production of surfactant and detergent stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by moderately halophilic *Bacillus* sp. strain TSCVKK. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 77, n. 5, p. 1023-1031, 2008.

KUMAR, B.A.; AMIT, K.; ALOK, K.; DHARM, D. Wheat bran fermentation for the production of cellulase and xylanase by *Aspergillus niger* NFCCI 4113. *Research Journal of Biotechnology* v. 13, n. 5, p. 11-18, 2018.

LI, Z.; WU, J.; ZHANG, B.; WANG, F.; YE, X.; HUANG, Y.; HUANG, Q.; CUI, Z. Characterization of a novel maltohexaose-forming  $\alpha$ -amylase 2 AmyM from *Corallocooccus* sp. strain EGB. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, n. 6, p. 1977-1987, 2015.

LOBO, A.R.; SILVA, G.M.L. Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. *Revista de Nutrição*, v.16, n. 2, 2003.

MAZUMDAR, A.; MAUMDAR, H. Bio-processing of banana peel for alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid state fermentation. *The Clarion International Multidisciplinary Journal*, v. 7, n. 1, p. 36-42, 2018.

MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.A.M.P.; DALHUIJSEN, S.; SAMSON, R.A.; VRIES, R.P. Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black *aspergilli*. *Studies in Mycology*, v. 69, n. 1, p. 19-30, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAIS, T.P.; BARBOSA, P.M.G.; GARCIA, N.F.L.; GARZON, N.G.R.; FONSECA, G.G.; PAZ, M.F.; CABRAL, H.; LEITE, R.S.R. Catalytic and thermodynamic properties of  $\beta$ -glucosidases produced by *Lichtheimia corymbifera* and *Byssoschlamys spectabilis*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, v. 48, n. 9, p. 777-786, 2018.

OBAFEMI, Y. D.; AJAYI, A. A.; OLASEHINDE, G. I.; ATOLAGBE O.M.; ONIBOKUN, E.A. Screening and partial purification of amylase from *Aspergillus niger* isolated from deteriorated tomato (*Lycopersicon esculentum* mill.) fruits. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, v. 19, n.1, p. 47-57, 2018.

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, n. 14, p. 1215-1223, 2015.

OLIVEIRA, A.P.A.; SILVESTRE, M.A.; GARCIA, N.F.L.; ALVES-PRADO, H.F.; RODRIGUES, A.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation. *The Scientific World Journal*, v. 2016, p. 1-10, 2016.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. *Enzyme Technology*. 1<sup>a</sup> ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 760p, 2005.

PASIN, T.M.; BENASSI, V.M.; HEINEN, P.R.; DAMASIO, A.R.L.; CEREIA, M.; JORGE, J.L.; POLIZELI, M.L.T.L. Purification and functional properties of a novel glucoamylase activated by manganese and lead produced by *Aspergillus japonicus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 102, p. 779-788, 2017.

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

PRAKASHAM, R.S.; SUBBA RAO, C.; SREENIVAS RAO, R.; SARMA, P.N. Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, n. 1, p. 204-211, 2007.

SANTANA, R. S. M.; GONÇALVES, Z. S.; FRANCO, M. Produção de amilase a partir da fermentação em estado sólido do farelo de cacau. *Enciclopédia Biosfera*, v. 8, n. 14, p. 1981-1987, 2012.

SANTOS, F.R.S.; GARCIA, N.F.L.; PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. Production and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Gongronella butleri* by solid-state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, v. 15, n. 16, p. 633-641, 2016.

SILVA, T.M.; DAMÁSIO, A.R.L.; MALLER, A.; MICHELIN, M.; SQUINA, F.B.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification, partial characterization, and covalente

immobilization-stabilization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niveus*. *Folia Microbiologica*, v. 58, n. 6, p. 495-502, 2013.

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.

SINGH, K.; KAYASTHA, A.M.  $\alpha$ -Amylase from wheat (*Triticum aestivum*) seeds: Its purification, biochemical attributes and active site studies. *Food Chemistry*, v. 162, p. 1-9, 2014.

SINGH, R.P.; PANDEY, J.K.; RUTOT, D.; DEGÉE, P.; DUBOIS, P. Biodegradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/starch blends and composites in composting and culture environments: the effect of compatibilization on the inherent biodegradability of the host polymer. *Carbohydrate Research*, v. 338, n. 17, p. 1759-1769, 2003.

SOCCOL, C.R.; COSTA, E.S.F.; LETTI, L.A.J.; KARP, S.G.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S. Recent development and innovations in solid state fermentation. *Bioprocess Engineering and Biotechnology*, v. 1, p. 52-71, 2017.

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

TESTER, R.F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, v. 39, n. 2, p. 151-165, 2004.

TOMAZIC, S.J.; KLIBANOV, A.M. Mechanisms of irreversible thermal inactivation of *Bacillus* alpha-amylases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 263, n. 5, p. 3086-3091, 1988.

VIJAYARAGHAVAN, P.; REMYA, C.S.; PRAKASH VINCENT, S.G. Production of  $\alpha$ -amylase by *Rhizopus microsporus* using agricultural by-products in solid state fermentation. *Research Journal of Microbiology*, v. 6, n. 4, p. 366-375, 2011.

ZIMBARDI, A.L.; SEHN, C.; MELEIRO, L.M.; SOUZA, F.H.M.; MASUI, D.C.; NOZAWA, M.S.F.; GUIMARÃES, L.H.S.; JORGE, J.A.; FURRIEL, R.P.M. Optimization of  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 2, p. 2875-2902, 2013.