



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**Produção de amilase por *Aspergillus flavus* isolado a partir da mandioca  
(*Manihot esculenta*)**

**RICARDO GOMES DE BRITO**

**COARI, AMAZONAS  
2017**

**RICARDO GOMES DE BRITO**

**Produção de Amilase por *Aspergillus flavus* isolado a partir da mandioca  
(*Manihot esculenta*)**

**Orientador:** Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

**Co-orientador:** Prof. Dr. Edson Junior do Carmo

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração “Biotecnologias para a Área Agroflorestal”, como parte do requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

**COARI, AMAZONAS  
2017**

## Ficha Catalográfica

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

B862p Brito, Ricardo Gomes de  
Produção de Amilase por *Aspergillus flavus* isolado a partir da  
mandioca (*Manihot esculenta*) / Ricardo Gomes de Brito. 2017  
54 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho  
Coorientador: Edson Junior do Carmo  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal  
do Amazonas.

1. amilase. 2. fungos filamentosos. 3. amido. 4. enzimas  
amilolíticas. I. Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade Federal do  
Amazonas III. Título

**RICARDO GOMES DE BRITO**

**Produção de Amilase por *Aspergillus flavus* isolado a partir da mandioca  
(*Manihot esculenta*)**

“Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração “Biotecnologias para a Área Agroflorestal”, como parte do requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia”.

Parecer: \_\_\_\_\_ em 20 de dezembro de 2017.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho  
Universidade Federal do Amazonas

---

Prof. Dr. Josemar Gurgel da Costa  
Universidade Federal do Amazonas

---

Profa. Dra. Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi  
Universidade Federal do Amazonas

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS, por conceder mais essa vitória em minha vida.

Aos meus pais Raimundo Brito e Ana Maria, por sempre estarem presentes, responsáveis pela minha educação. Agradeço pelos incentivos e conselhos constantes.

Ao meu orientador Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, pela confiança depositada e pela sua valiosa orientação durante a produção deste trabalho.

Ao professor Dr. Edson pela co-orientação e ajuda nos experimentos.

Ao professor MSc. Rogério Neves pelos seus ensinamentos e pela contribuição valorosa em todas as etapas deste trabalho.

À Ellen Catarina pelo companheirismo, dedicação, carinho e amor durante todo esse tempo que estamos juntos.

Aos meus irmãos que sempre torceram por mim, para a realização de mais uma etapa da minha vida.

Ao Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM/UFAM por disponibilizar recursos e instalações para realização dos experimentos.

Aos membros da Banca Examinadora pela atenção, correção e contribuição na finalização deste trabalho.

Aos técnicos do Centro de Apoio multidisciplinar (CAM) - UFAM, em especial a Dina que sempre esteve disposta a ajudar.

A Profa. Dra. Francisca Simas por disponibilizar os recursos do Laboratório de micologia do ICB/UFAM, durante a autenticação morfológica da linhagem fungica.

A mestranda Larissa Paiva pela ajuda técnica durante a autenticação morfológica da linhagem fungica.

Aos grandes amigos Michel, Rafael, Renato e Uatyla, pela amizade e colaboração durante todo o período do curso.

Ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia – UFAM.

Aos Colegas Gleucinei e Adan pela colaboração durante os experimentos, bem como terem cedido os microorganismos utilizados neste trabalho.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

“Uma experiência nunca é um fracasso, pois sempre vem demonstrar algo.” (Thomas Edison).

## RESUMO

Nas últimas quatro décadas graças ao avanço da biotecnologia a indústria de enzimas teve um rápido e grade desenvolvimento chegando ao patamar que conhecemos hoje . Quanto às amilases, estas estão entre as principais classes de enzimas industriais tendo aproximadamente 25% do mercado mundial de enzimas. As enzimas amilolíticas são amplamente utilizadas em aplicações biotecnológicas que vão desde a Indústria de alimentos, fermentação, têxtil, de papel, entre outras. Varias amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e são utilizadas na hidrólise do amido, que é um homopolissacarídeo formado por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas. É composto por dois polissacarídeos, a amilose e a amilopectina, as amilases atuam na quebra das ligações glicosídicas presentes nas cadeias de amilose e amilopectina. Objetivou-se no presente estudo a produção de enzimas amilolíticas a partir de fungos filamentosos, através de fermentação no estado líquido, visando a potencial utilização em processos biotecnológicos. A atividade amilolítica foi determinada pelo método que baseia-se na variação da intensidade da cor do complexo iodo-amido, denominado de atividade dextrinizante (FUWA, 1954). Para dosagem foram usados pH 6 e temperatura a 50° C, parâmetros esses definidos como sendo os que as amilases em estudo apresentaram sua máxima atividade que foi de 79,2 U/mL. Também foi feita caracterização cinética das amilases em estudo e de acordo com o método de Lineweaver-Burk foi possível determinar a constante Michaelis-Menten  $K_M$  e também o valor de  $V_{m\acute{a}x}$  que foram 37,2 mg/mL para  $K_M$  e 4,0 mg/mL/min. para  $V_{m\acute{a}x}$ . Quanto à identificação do isolado selecionado, tanto a análise morfológica quanto a molecular tiveram como resultado a espécie *Aspergillus flavus* sendo que na identificação molecular foram analisadas duas regiões do DNA as regiões ITS e RSU ambas com 100% para a espécie em questão.

**Palavras – chave:** amilase, fungos filamentosos, amido, enzimas amilolíticas.

## ABSTRACT

In the last four decades thanks to the advancement of biotechnology the enzyme industry has had a rapid and rapid development reaching the threshold we know today. As for amylases, these are among the major classes of industrial enzymes having approximately 25% of the world market for enzymes. Amylolytic enzymes are widely used in biotechnology applications ranging from the food industry, fermentation, textile, paper, among others. Several microbial amylases are commercially available and are used in the hydrolysis of starch, which is a homopolysaccharide formed by glucose units linked by glycosidic bonds. It consists of two polysaccharides, amylose and amylopectin; amylases act to break the glycosidic bonds present in the amylose and amylopectin chains. The objective of this study was the production of amylolytic enzymes from filamentous fungi, through fermentation in the liquid state, aiming at the potential use in biotechnological processes. The amylolytic activity was determined by the method based on the color intensity variation of the iodo-starch complex, called the dextrinizing activity (FUWA, 1954). For dosing, pH 6 and temperature at 50 ° C were used, which parameters were defined as being the ones that the amylases under study had their maximum activity, which was 79.2 U / mL. It was also possible to determine the Michaelis-Menten KM constant and the Vmax value, which were 37.2 mg / mL for KM and 4.0 mg / mL for KM, ml / min. for Vmax. As for the identification of the selected isolate, both the morphology and molecular analysis resulted in the *Aspergillus flavus* species. In the molecular identification, two regions of the DNA were analyzed in the ITS and RSU regions, both with 100% for the species in question.

**Key words:** amylase, filamentous fungi, amido, amylolytic enzymes



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Amido.....	3
2.2 Enzimas .....	5
2.3 Fungos filamentosos produtores de enzimas .....	8
2.4 Enzimas Amilolíticas .....	11
3. OBJETIVOS .....	15
3.1 Objetivo Geral .....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Seleção dos microrganismos.....	16
4.2 Testes <i>Cup-Plate</i> .....	16
4.3 Seleção da linhagem para produção das amilases .....	17
4.4 Produção de amilases em meio líquido .....	18
4.5 Determinação da atividade amilolítica .....	18
4.6 Atividade amilolítica dextrinizante .....	18
4.7 Determinação do pH ótimo .....	19
4.8 Determinação da temperatura ótima.....	19
4.9 Determinação das constantes cinéticas.....	19
4.10 Identificação molecular do microorganismo.....	20
4.11 Autenticação morfológica da linhagem fúngica.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
5.1 Detecção da produção da enzima pelo teste <i>cup-plate</i> .....	23
5.2 Seleção da linhagem com qual o trabalho foi desenvolvido .....	23
5.3 Determinação do pH ótimo .....	24
5.4 Determinação da temperatura ótima.....	25
5.5 Produção enzimática .....	26
5.6 Caracterização cinética das amilases.....	28
5.7 Identificação molecular .....	31
5.8 Autenticação das características morfológicas .....	32

6 CONCLUSÃO .....	35
REFERÊNCIAS .....	36

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura linear da molécula de amilose composta por D-glicose ligadas poligações $\alpha$ -1,4. (CASTRO et al., 2011).....	3
<b>Figura 2:</b> Estrutura helicoidal molécula de amilose composta por D-glicose ligadas por ligações $\alpha$ -1,4. (NELSON & COX, 2011).....	3
<b>Figura 3:</b> Estrutura da molécula de amilopectina composta por D-glicose ligadas por ligações $\alpha$ -1,4 e $\alpha$ -1,6 nas ramificações (CASTRO et al., 2011).....	4
<b>Figura 4:</b> Estrutura da amilopectina. Cada um dos hexágonos representa um resíduo de glicose (LEHNINGER, 1995). .....	4
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática da ação sinérgica de amilases em direção a uma amilopectina estrutura. Acima da figura: sinergias endoamilase / exoamilase e endoamilase / desmantelamento amilase. Abaixo da figura: sinergias desmantelando amilase / exoamilase e exoamilase / exoamilase (CASTRO et al., 2011).....	12
<b>Figura 6:</b> Atividade amiolítica .....	17
<b>Figura 7:</b> Variação da intensidade de cor do complexo iodo amido dos isolados analisados .....	24
<b>Figura 8:</b> Atividade relativa (%) das amilases extracelulares do extrato enzimático bruto de <i>A. flavus</i> em relação à variação de pH ( 2 a 10 ). pH ótimo aparente em 6,0. ....	25
<b>Figura 9:</b> Atividade relativa (%) das amilases extracelulares do extrato enzimático bruto de <i>A. flavus</i> em relação à variação de temperatura (20°C a 100°C). Temperatura ótima aparente de 50°C. ....	26
<b>Figura 10:</b> Produção das amilases extracelulares do extrato enzimático bruto de <i>A. flavus</i> sobre o amido solúvel em temperatura de 50°C e pH de 6,0. Atividade amilásica dextrinizante. ....	28
<b>Figura 11:</b> Efeito da concentração de amido sobre a velocidade da reação catalisada pelas amilases ph 6,0 e temperatura 50°C. ....	30
<b>Figura 12:</b> Gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do amido a pH 6,0°C e temperatura 50°C. ....	31
<b>Figura 13:</b> Eletroforese dos produtos de PCR das regiões ITS e RSU. Em: 1 e 2 produto da região ITS, 3 e 4 produto da região LSU.....	32

<b>Figura 14:</b> Características macromorfológicas de <i>A. flavus</i> nos cultivos obtidos em sete dias em meio sólido (A) CYA; (B) CZ; (C) Malte.....	33
<b>Figura 15:</b> Microestruturas de <i>A. flavus</i> : (A) Conídios e hifa septada; (B) Conidióforo, vesícula, esterigmas e conídios. ....	33
<b>Figura 16:</b> Cabeças conidiais de <i>A. flavus</i> radiadas ou levemente colunares quando mais maduras no cultivo em ágar malte.....	34

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação Internacional das Enzimas.....	6
<b>Tabela 2:</b> Fungos produtores de enzimas comerciais. ....	9
<b>Tabela 3:</b> Produção de amilases por <i>Aspergillus</i> spp.....	10
<b>Tabela 4:</b> Protocolo utilizado para amplificação por PCR.....	21
<b>Tabela 5:</b> Velocidade e atividade das amilases em reação com diferentes concentrações de substrato .....	29

## 1 INTRODUÇÃO

Enzimas são moléculas majoritariamente de caráter proteico e atuam como catalisadoras de reações químicas, sendo essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos (ORLANDELLI et al., 2012). Dentre outras funções as enzimas, são capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores, como polissacarídeos em açúcares (SOARES et al., 2010).

Os microorganismos são uma das principais fontes produtoras de enzimas utilizadas industrialmente, essa ampla utilização é resultado de algumas características atrativas que os mesmos apresentam, dentre elas baixo custo na produção dos metabólitos; podem ser cultivados em grandes quantidades e em tempo relativamente curto e também usam matérias-primas pouco dispendiosas (ZIMMER et al., 2009).

Nas últimas quatro décadas graças ao avanço da biotecnologia a indústria de enzimas teve um rápido e grande desenvolvimento (KIRK et al., 2002). Quanto às amilases, estas estão entre as principais classes de enzimas industriais tendo aproximadamente 25% do mercado mundial de enzimas (SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

O interesse em pesquisa para produção de amilases foi impulsionado quando no início do século passado o mercado industrial começou demonstrar interesse na produção de glicose a partir fontes amiláceas. As amilases produzidas apresentaram alta atividade catalítica e eficiência em condições reacionais amenas quando comparadas aos catalisadores químicos (BASTOS-NETO et al., 2012).

As enzimas amilolíticas são amplamente utilizadas em aplicações biotecnológicas que vão desde a Indústria de alimentos, fermentação, têxtil, de papel, entre outras (KATHIRESAN & MANIVANNAN, 2006; OLIVEIRA et al., 2007). As amilases podem ser produzidas a partir de várias fontes, como plantas, animais e uma variedade de microorganismos principalmente bacterias e fungos (OLIVEIRA, et al., 2007; ONOFRE et al., 2012).

Atualmente várias amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e são utilizadas na hidrólise do amido, nas indústrias de processamento (PANDEY et al., 2005; SOARES et al., 2010). Essas enzimas atuam na quebra das ligações glicosídicas presentes nas cadeias de amilose e amilopectina (GUPTA et al., 2003).

O amido é um dos principais compostos de reserva em plantas é encontrado principalmente em sementes de cereais como milho, cevada, trigo e arroz e em tubérculos ou raízes como batata e mandioca. É composto por unidades de glicose, organizadas em dois homopolissacarídeos, a amilose e a amilopectina (AMARAL et al., 2007; FERNANDES et al., 2007).

A pesquisa por novas linhagens microbianas potencialmente utilizáveis biotecnologicamente, em especial as de fungos, fundamenta-se na capacidade de adaptação que os mesmos possuem nos mais diversos ambientes. Essa capacidade adaptativa foi adquirida ao longo do processo evolutivo o que proporcionou a esses microorganismos ampla diversidade genética e metabólica (BELO, 2013).

Dessa maneira o uso de fungos em bioprocessos tem aumentado bastante, e logicamente sua importância devido à produção de várias enzimas com diferentes características físico-químicas e excelente potencial para aplicação industrial (ONOFRE et al., 2012).

No Brasil, apesar de seu grande potencial biotecnológico, a prospecção de fungos filamentosos produtores de enzimas industriais ainda é pouco explorada haja vista que o país ainda importa a maior parte das enzimas que utiliza em diferentes setores industriais (BON et al., 2008; BARATTO et al., 2011)

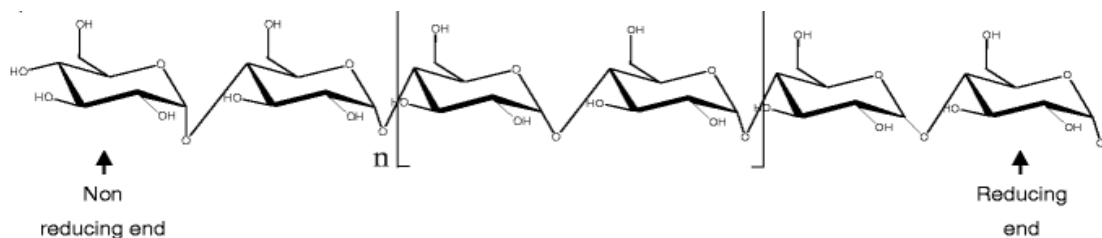
Neste contexto, o presente estudo trata da seleção de linhagens de fungos filamentosos produtores de amilases, os quais foram isolados a partir da mandioca (*Manihot esculenta*) coletada do bioma Amazônico, localizado na região do Médio Solimões, na cidade de Coari, levando em consideração a grande biodiversidade de microorganismos que temos na região, ainda quase inexplorada.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

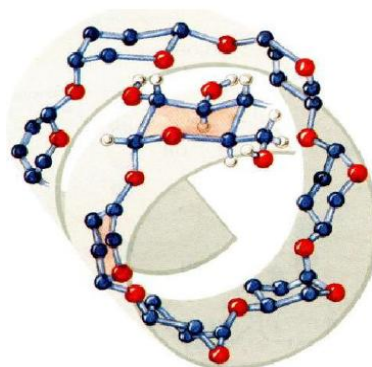
### 2.1 Amido

O amido é um homopolissacarídeo com fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . É formado por unidades de glicose unidas por ligações entre o carbono 1 (C1) e carbono 4 (C4) através do oxigênio, formando uma ligação glicosídica (SUMERLY et al., 2003). É composto por dois polissacarídeos, a amilose cerca (25%) e a amilopectina cerca (75 %).

A amilose é um polímero linear com unidades de glicose conectadas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 constituído de cerca de 6000 resíduos. A amilopectina é altamente ramificada com cadeias laterais de 15 a 45 resíduos de glicose, é ligada por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 em sua cadeia principal e  $\alpha$ -1,6 nas suas ramificações que estão em aproximadamente 5% da molécula que por sinal é uma das maiores biomoléculas conhecidas (AMARAL et al., 2007; FERNANDES et al., 2007). Nas figuras 1, 2 e 3, 4 são apresentadas as estruturas das moléculas de amilose e amilopectina respectivamente, nas formas linear e helicoidal.

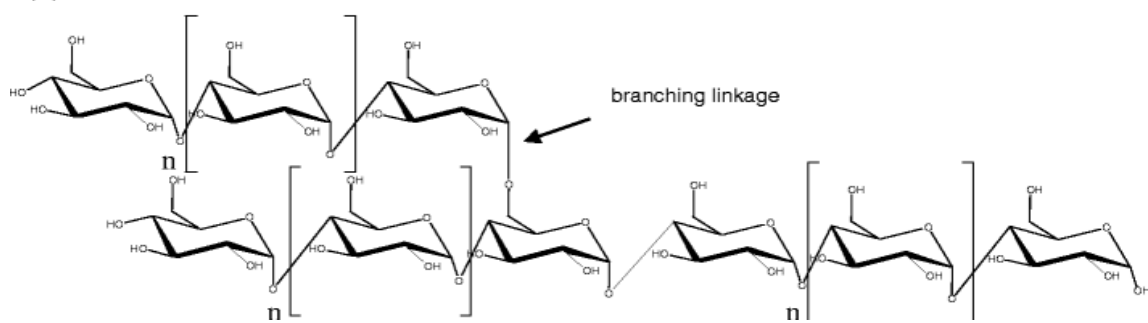


**Figura 1:** Estrutura linear da molécula de amilose composta por D-glicose ligadas poligações  $\alpha$ -1,4. (CASTRO et al., 2011).

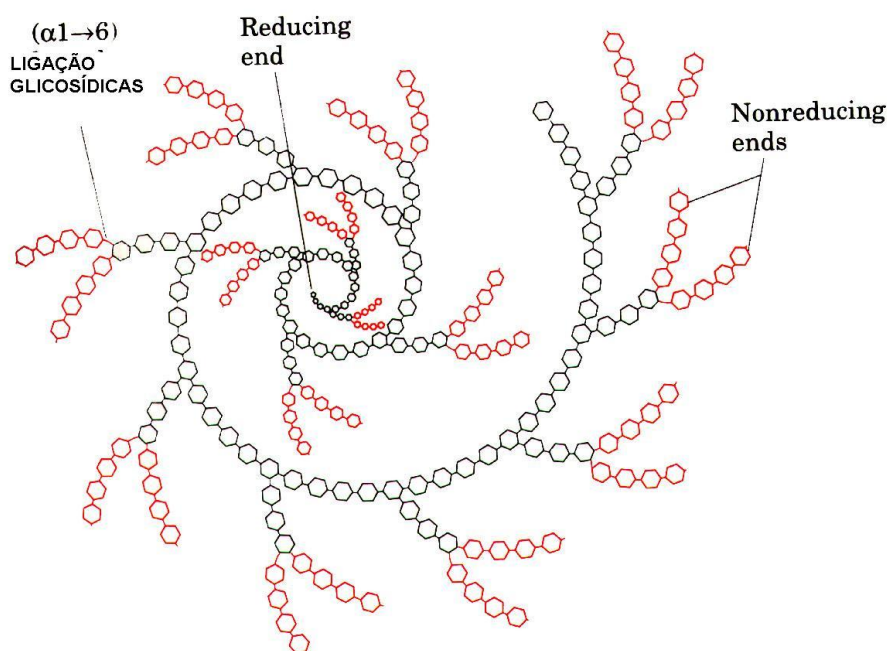


**Figura 2:** Estrutura helicoidal molécula de amilose composta por D-glicose ligadas por ligações  $\alpha$ -1,4. (NELSON & COX, 2011)





**Figura 3:** Estrutura da molécula de amilopectina composta por D-glicose ligadas por ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 nas ramificações (CASTRO et al., 2011).



**Figura 4:** Estrutura da amilopectina. Cada um dos hexágonos representa um resíduo de glicose (LEHNINGER, 1995).

Variações estruturais nas moléculas que compõem o amido bem como a proporção das mesmas nos grânulos pode resultar em propriedades físico-químicas e funcionais distintas podendo afetar suas aplicações industriais. Essas variações ocorrem entre espécies diferentes, entre variedades de uma mesma espécie ou na mesma variedade dependendo de seu grau de maturação (WALTER et al., 2005; MALI et al., 2010).

O amido pode ser encontrado em diversas espécies de vegetais como carboidrato de reserva, porém é nas sementes de cereais (trigo, cevada, milho, arroz) e nos tubérculos ou raízes (batata, mandioca) que ele está presente em maiores quantidades (MORAES, 2004). É o carboidrato mais importante para

nutrição humana representando 80-90% de todos os polissacarídeos da dieta (WALTER et al., 2005).

Quanto sua utilização na indústria de alimentos o amido é usado na produção de adoçantes em refrigerantes e doces, espessantes, estabilizantes, agentes gelificantes, entre outros. Também vem sendo utilizado em outras vertentes industriais como na de papel, tecidos e embalagens que o utilizam como aglutinante de fibras e como adesivo. Contudo, a maior parte do amido que é processado é destinado para produção de glicose que pode ser posteriormente convertido em diversos outros produtos industrialmente mais rentáveis como etanol, frutose, sorbitol entre outros (CARVALHO, 2007).

## **2.2 Enzimas**

Um setor que está em crescimento no campo da biotecnologia e movimentando bilhões de dólares anualmente é o da produção de enzimas (ORLANDELLI et al., 2012). Esse campo vem se expandindo consideravelmente nos últimos anos, contudo ainda pode crescer muito com implementação de novas enzimas em setores industriais ainda não explorados (WANDERLEY et al., 2011). As enzimas podem ser de origem animal, vegetal e microbiana, porém do ponto de vista industrial são as de origem microbiana as que apresentam maior interesse, por serem mais facilmente produzidas em larga escala, via fermentação (SENA et al., 2006; ORLANDELLI et al., 2012).

As enzimas são biocatalizadores, e com exceção de algumas poucas moléculas de RNA e DNA todas são de natureza proteica, essenciais para os sistemas metabólicos de todos os organismos vivos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002; ORLANDELLI et al., 2012). Aceleram a velocidade de uma reação química termodinamicamente possível, reduzindo a barreira energética da reação (HARGER, 1982). Podem ser isoladas de animais, plantas e microorganismos e apresentam um papel essencial na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e deterioração dos alimentos (ORLANDELLI et al., 2012).

As enzimas possuem estrutura molecular complexa. São formadas principalmente por cadeias longas de aminoácidos unidas por ligações peptídicas,

podendo estar integradas a outras moléculas, tais como carboidratos e lipídeos (ORLANDELLI, et al., 2012).

De acordo com NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) as enzimas podem ser divididas em seis grupos, conforme as reações que catalisam (tabela 1). Cada um desses grupos é ainda subdividido em classes e subclasses, sendo que, cada enzima é identificada por *EC* (*Enzyme Commission*) seguido de números, de forma que não haja ambiguidade (COELHO et al., 2008; ORLANDELLI et al., 2012).

**Tabela 1:** Classificação Internacional das Enzimas.

<b>Classe de Enzimas</b>	<b>Nome da Classe</b>	<b>Tipo de Reação Catalisada</b>
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidreto ou átomos de Hidrogênio).
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água).
4	Liases	Adição de grupos a ligações duplas, ou formação de ligações duplas por remoção de grupos.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas.
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas á hidrólise de ATP ou cofatores similares.

**Fonte:** adaptado a partir de Nelson e Cox (2002).

Segundo Laider (1954), as enzimas também são classificadas de acordo com substrato com o qual reagem, adicionando a terminação *ase* ao nome do substrato, dessa maneira a que decompõem a uréia recebe o nome de urease, as que hidrolisam proteínas denominam-se proteases, bem como as que hidrolisam amido são chamadas de amilases. Algumas enzimas como as proteases tripsina e

pepsina, conservaram os nomes utilizados antes que se adotasse esta nomenclatura (PASTORE, 2010).

Em relação à origem as enzimas podem ser divididas em dois grupos, as intracelulares, que são produzidas e mantidas dentro da célula, e as extracelulares que após serem produzidas são secretadas para o meio externo (COELHO et al., 2008). Podem ser classificadas ainda quanto a seu modo de ação podendo ser endoenzimas e exoenzimas. As endoenzimas atuam em regiões internas da molécula ou polímero alvo, clivando aleatoriamente suas ligações químicas, já as exoenzimas, atuam nas extremidades de sua molécula ou polímero alvo clivando suas ligações, formando assim dímeros ou trímeros (COELHO et al., 2008).

Quando comparadas aos catalisadores químicos, um dos aspectos mais relevantes das enzimas é seu alto grau de especificidade pelo substrato e a característica em promover somente uma reação bioquímica com o mesmo, em condições adequadas para reação, também causam menos problemas ambientais e toxicológicos (BON et al., 2008; ROCHA, 2010).

O trabalho conjunto de equipes multidisciplinares da Microbiologia, Bioquímica, Química, Engenharia Bioquímica, entre outras áreas, complementando os conhecimentos que cada área possui sobre as enzimas estão descobrindo novas enzimas e também novos usos para as já conhecidas, isso contribui para os decrescentes custos das enzimas industriais e com isso, a utilização de enzimas tende a aumentar continuamente (ORLANDELLI et al., 2012).

No campo da biotecnologia industrial um de seus principais setores está relacionado à produção de enzimas de origem microbiana, sendo que suas aplicações no mercado mundial estão ligadas a um conjunto de áreas relacionadas à ciência e tecnologia, sendo empregadas ao uso terapêutico, diagnóstico, analítico, química fina e pesquisa (ZIMMER et al., 2009; ORLANDELLI et al., 2012).

Segundo Singh et al. (2016), mercado mundial de enzimas foi estimado em aproximadamente US\$ 4,2 bilhões em 2014 e conforme estudos de mercado, irá desenvolver-se a uma taxa de crescimento anual de aproximadamente 7% no período de 2015 a 2020 para atingir cerca de US\$ 6,2 bilhões de dólares.

Em termos percentuais, as enzimas de uso industriais (enzimas técnicas, enzimas para a indústria de alimentos e enzimas para ração animal) representam mais de 60% do mercado mundial de enzimas o restante e representado pelas

enzimas ditas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico e enzimas para química quiral). Apesar de seu grande potencial para bioprospecção e descoberta de microrganismos produtores de enzimas de interesse, o Brasil tem contribuído com uma pequena fatia desse mercado apenas 3,7 % (BOM et al., 2008).

Cerca de 80% das enzimas utilizadas na indústria correspondem a hidrolases (COELHO et al., 2008). As enzimas proteolíticas lideram a produção mundial em escala industrial, seguidas das enzimas amilolíticas, entre as quais as amilases, que atingem uma média de 25% dessa produção (NGUYEN et al., 2002). Constam atualmente na lista da Comissão Internacional de Enzimas (E.C.) cerca de 3000 enzimas identificadas, contudo apenas 60 dessas enzimas tem aplicação industrial (EMBRAPA, 2015).

### **2.3 Fungos filamentosos produtores de enzimas**

Os fungos são organismos eucarióticos que possuem parede celular (com algumas exceções) e não fazem fotossíntese nem possuem clorofila, podem ser unicelulares ou multicelulares. Com exceção das leveduras, a maioria produz um micélio bem desenvolvido constituído de hifas septadas ou cenocíticas (PELCZAR, 1998).

Quanto a sua distribuição os fungos são encontrados ao redor de todo o globo terrestre, nos mais diversos ambientes que possam lhes fornecer matéria orgânica passível de degradação, dentre eles o solo, plantas, animais vivos ou mortos entre outros (BONONI; GRANDI, 1999).

A utilização de fungos em bioprocessos teve um aumento e ganhou importância nas últimas décadas. Esse crescimento é devido aos mesmos produzirem enzimas com características físico-químicas variadas e com ótimo potencial para serem utilizadas industrialmente. Entre as características desejáveis apresentadas pelos fungos estão a capacidade de síntese enzimática em grande escala, bem como a facilidade com qual os mesmos as excretam para o meio externo (PAPAGIANNI, 2004; SHARMA et al., 2009).

A expressiva parcela do mercado obtida pelos fungos nos últimos anos foi possível devido a muitas de suas espécies utilizadas industrialmente, entre elas

*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Acremonium chrysogenum* e *Penicillium chrysogenum* terem sido classificadas como seguras (GRAS – *Generally Regarded as Safe*) além de poderem crescer em substratos relativamente baratos e também produzirem e secretarem grandes quantidades de proteínas recobinantes (SHARMA et al., 2009).

Muitas enzimas já são produzidas para fins comerciais a partir de linhagens selvagens de fungos (tabela 2).

**Tabela 2:** Fungos produtores de enzimas comerciais.

Fungo produtor	Enzimas comerciais
<i>Aspergillus aculeatus</i>	$\beta$ -glucanase, pectinase
<i>Aspergillus melleus</i>	Protease
<i>Aspergillus niger</i>	aminopeptidase, $\alpha$ -amilase, $\alpha$ -galactosidase, catalase, celulase, fitase, $\beta$ -glucanase, glucoamilase, hemicelulase, inulase, lipase, pectinase, protease, xilanase
<i>Aspergillus oryzae</i>	aminopeptidase, $\alpha$ -amilase, lactase, protease
<i>Aspergillus pulverulentus</i>	Pectinase
<i>Chaetomium erraticum</i>	Dextranase
<i>Chryphonectria parasítica</i>	protease aspártica
<i>Penicillium camembertii</i>	Lípase
<i>Penicillium funiculosum</i>	pectinase, xilanase
<i>Penicillium lilacinum</i>	Dextranase
<i>Penicillium roqueforti</i>	Lípase
<i>Rhizopus delemar</i>	Glucoamilase
<i>Rhizopus niveus</i>	glucoamilase, protease
<i>Rhizopus oryzae</i>	aminopeptidase, glucoamilase, lípase

**Fonte:** European Commission. Adaptado de Orlandelli et al., 2012

Como organismos saprófitos, muitos fungos filamentosos possuem um potente sistema secretor para tornar os nutrientes biodisponíveis. Isso provou ser um importante recurso para o cultivo de fungos, à medida que o produto é lançado no meio circundante, facilitando a recuperação do produto e demais etapas do processamento a jusante (GRIMM et al., 2005).

Segundo Kathiresan e Manivannan (2006), as fontes fúngicas produtoras de amilases têm se limitado a isolados terrestres. Sendo que as mais utilizadas são aquelas produzidas por fungos filamentosos, principalmente os dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* (Pandey et al., 1999; Pandey et al., 2005 ).

**Tabela 3:** Produção de amilases por *Aspergillus* spp.

Linhagem fúngica	Fermentação	Substrato	Produtividade	Referência
<i>A. flavus</i>	FES	Amido	74 U mg <sup>-1</sup>	BHARDWAJ et al. (2012).
<i>A. niger</i>	FES	Gramma preta	86 U mg <sup>-1</sup>	SUGANTHI et al. (2011).
<i>A. niger</i>	FES	Casca de amendoim	726 U g <sup>-1</sup>	PAULCHAMY (2008).
<i>A. niger</i>	FSm	Água de maceração do milho/sacarose	1744 U mL <sup>-1</sup>	CHIMATA et al. (2011).
<i>A. niger</i>	FSm	Farinha de mandioca	10,5 U mL <sup>-1</sup>	STROPARO, et al. (2011)
<i>A. oryzae</i>	FES	Farelo de trigo	1986 U g <sup>-1</sup>	ZAMBARE (2010).
<i>A. gracilis</i>	FSm	Amido	131.02U mg <sup>-1</sup>	ALI et al. (2014).
<i>A. niger</i>	FSm	Casca de mandioca	19,34 mg mL <sup>-1</sup>	LAWAL et al. (2014).
<i>A. awamori</i>	FES	Farelo de trigo	4528 U g <sup>-1</sup>	NEGI e BANERJEE(2010 ).
<i>A. niger</i>	FES	Casca de mandioca	54,08 U g <sup>-1</sup>	CRUZ (2011).
<i>A. oryzae</i>	FES	Bagaço de malte	34 U g <sup>-1</sup>	FRANCIS et al. (2003).
<i>A. niger</i>	FSm	Batata-doce	0,893U mL <sup>-1</sup>	TAMILARASAN et al. (2012)

FES: Fermentação no Estado Sólido; FSm: Fermentação Submersa (líquida)

Fonte: Pereira, 2015.

## 2.4 Enzimas Amilolíticas

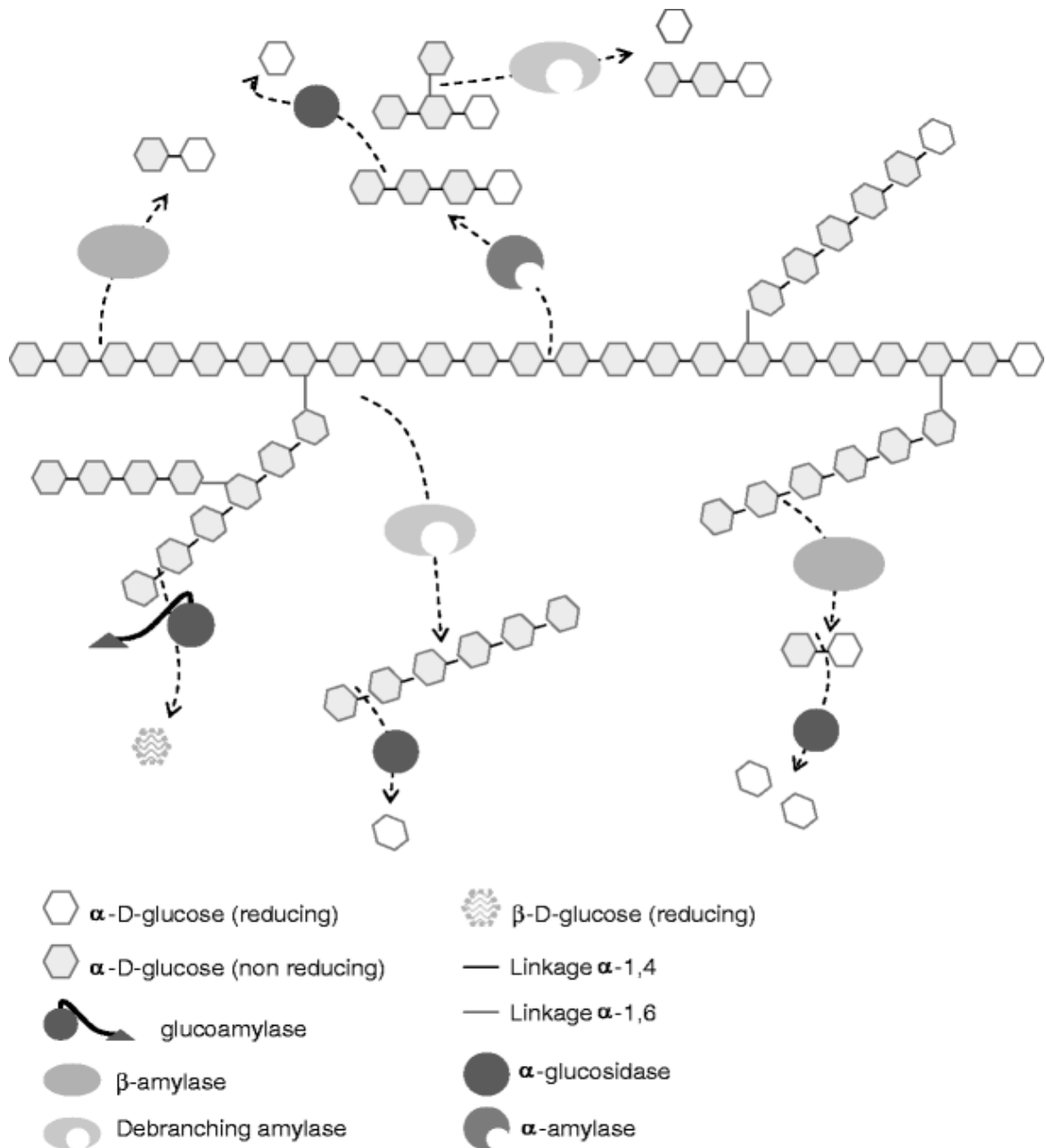
As amilases são enzimas classificadas como hidrolases e tem como alvo a molécula de amido o qual após ser hidrolizado gera diversos produtos tais como dextrinas indo progressivamente até produtos menores formados por unidades de glicose (GUPTA et al., 2003). As enzimas também são nominadas conforme o substrato sobre o qual agem. Logo o termo amilase indica sua atuação sobre o amido (HARGER, 1982; SPIER, 2005).

As amilases podem ser classificadas quanto ao seu mecanismo de ação ou de acordo com as ligações que hidrolisam (GUPTA et al., 2003). Quanto ao seu mecanismo de ação podem ser divididas em dois grupos as endoamilases e as exoamilases. As endoamilases rompem as ligações no interior da molécula de amido de forma randômica e são responsáveis pela formação de oligossacarídeos lineares com variados comprimentos de cadeia. As exoamilases hidrolisam a partir das extremidades não redutoras da molécula de amido, gerando dessa maneira produtos finais de baixo peso molecular (GUPTA et al., 2003; FERNANDES, 2007).

Conforme as ligações que hidrolisam as amilases podem ser classificadas principalmente em:  $\alpha$ -amilases, (endoamilases);  $\beta$ -amilases (exoamilases) e glucoamilases (amiloglicosidade) (CORNELIS, 1987; WISNIEWSKI et al., 2010).

Para que ocorra a hidrólise completa da molécula amido, grandes matrizes de amilases agem em uma ação combinada gerando diferentes produtos. As enzimas amilásicas são bastante utilizadas em vários processos industriais, como, têxteis, de ração animal, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil. Também são usadas no processamento de amido para produção de xaropes de glicose, dextrinas, e outros adoçantes como xaropes maltose (FENNEMA, 2010; SIDKEY et al., 2010; LIMA et al., 2015).





**Figura 5:** Representação esquemática da ação sinérgica de amilases em direção a uma amilopectina estrutura. Acima da figura: sinergias endoamilase / exoamilase e endoamilase / dismantelamento amilase. Abaixo da figura: sinergias dismantelando amilase / exoamilase e exoamilase / exoamilase (CASTRO et al., 2011).

### 2.4.1 $\alpha$ -Amilases

As  $\alpha$ -amilases (EC 3.2.1.1;  $\alpha$ -1,4 glicano 4-glicano-hidroxilase) são enzimas que quebram as ligações  $\alpha(1,4)$  dos polissacarídeos. Essa quebra ocorre simultaneamente em vários pontos da molécula de forma aleatória (tipo

endoenzima), os primeiros produtos formados são sempre oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose. Esse tamanho de oligossacarídeo indica que a hidrólise ocorre preferencialmente sobre cada passo da hélice, da cadeia espiral da amilose ou da amilopectina (PANDEY et al., 2005; ADEWALE et al., 2006; JESUS, 2013).

Logo as  $\alpha$ -amilases são endoenzimas que após sua ação produzem oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares além de glicose e maltose. Sua ação ocorre de forma isolada ou ao mesmo tempo com outras enzimas (SPIER, 2005; ADEWALE et al., 2006; ROCHA, 2010). Apresentam grande importância biotecnológica e são amplamente utilizadas nas indústrias têxteis, alimentícia, farmacêutica, papel e celulose, detergentes, cervejas e bebidas destiladas (PANDEY et al., 2005; FERNANDES et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009; SOUZA et al., 2010; CASTRO et al., 2010).

As  $\alpha$ -amilases estão presentes nos mamíferos, nas plantas, insetos, fungos, bactérias e crustáceos (ABE et al., 2002). Sua estrutura polipeptídica básica consiste de uma única cadeia dobrada formada por três domínios A, B e C, sendo o domínio catalítico A o mais preservado em todas as famílias de  $\alpha$ -amilases (JESUS, 2013).

#### **2.4.2 $\beta$ -Amilases**

A  $\beta$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glucano maltohidrolase, E.C.3.2.1.2) hidrolisa a penúltima ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 dos terminais não reduzidos de polissacarídeos, separando duas unidades de glicose na forma de  $\beta$ -maltose por uma inversão, é encontrada principalmente nos vegetais superiores, sendo essencial para produção de xaropes com altos teores de maltose (HARGER, 1982; SPIER, 2005; PASIN, 2015).

#### **2.4.3 Glucoamilases**

A Glucoamilase, também nominada de glicoamilase, amiloglucosidase e exo-1,4- $\alpha$ -D-glucano glucohidrolase, EC. 3.2.1.3, é uma enzima capaz de hidrolisar ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 a partir da extremidade não redutora do amido até glicose. As ligações  $\alpha$ -1,6 são hidrolisadas de pontos de ramificação da amilopectina, porém em

uma velocidade menor que as ligações do tipo  $\alpha$ -1,4 (PANDEY et al., 2005; SPIER, 2005).

A glucoamilase também hidrolisa outras moléculas além do amido tais como maltose, dextrinas e glicogênios. Chamadas de enzimas de sacarificação pois são capazes de realizar a completa hidrólise do amido em incubações por longos períodos (REGULY, 1991; COSTA, 1996). Estão presentes no trato digestivo de mamíferos e em diversos microorganismos, principalmente em fungos filamentosos, bactérias (CRUZ; CIACCO, 1980; SANTANA, 2012).

A maior parte da amiloglicosidade produzida é de origem fúngica essencialmente de linhagens de *Aspergillus* e *Rhizopus*, sendo que as produzidas a partir de *Aspergillus* são mais termoestáveis (COUTINHO; RELLY, 1997; LEMOS et al., 2003). São encontradas várias formas de glucoamilases fúngicas, que são denominadas de isoenzimas, resultantes da variação de aminoácidos e/ou carboidratos presentes em sua estrutura (MANJUNATH et al., 1983; PAVEZZI, 2006).

Apresenta grande importância industrial, especialmente na indústria de processamento de alimentos, onde é utilizada na produção xaropes com altos teores de glicose e frutose, (obtida pela isomerização da glicose) em torno de 96 a 98%, os quais são utilizados como substratos para fermentações (MACKENZIEA et al., 2000).

A temperatura ótima na qual a glucoamilase tem sua atividade máxima de sacarificação do amido está em torno de 50 a 60°C (MANJUNATH et al., 1983). Em temperaturas superiores a 60°C pode ocorrer mudanças em sua conformação nativa ocasionado sua inativação (MANJUNATH et al., 1983; BRUMM, 1998). Em processos industriais onde a incubação prolongada em altas temperaturas é necessária seu uso fica limitado devido justamente a sua termoestabilidade está dentro de uma faixa relativamente estreita (LEMOS et al., 2003)

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho de pesquisa tem como principal objetivo a produção de enzimas amilolíticas a partir de fungos filamentosos, através de fermentação no estado líquido, visando a potencial utilização em processos biotecnológicos

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Selecionar a partir de uma coleção de fungos filamentosos isolados da mandioca o melhor produtor das amilases;
- Realizar a identificação morfológica e molecular do isolado selecionado para produção;
- Avaliar a influência do pH e da temperatura na atividade enzimática;
- Caracterizar cineticamente as amilases;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados nos Laboratórios do Centro de Apoio multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas.

### 4.1 Seleção dos microrganismos

Foram utilizados um total de 14 fungos filamentosos nos testes preliminares para seleção da linhagem com qual o trabalho foi desenvolvido. Esses 14 fungos foram coletados na cidade de Coari- Am (S 04°06'54.7" W 063°02'50.5"), isolados a partir da mandioca (*Manihot esculenta*) sendo todos endofíticos. Os fungos fazem parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada ISB/UFAM. A preservação das culturas foi feita por manutenção dos isolados em meio Sabouraud inclinado coberto com óleo mineral e água destilada estéreis, em temperatura ambiente.

### 4.2 Testes *Cup-Plate*

Os 14 endofíticos utilizados nos testes preliminares passaram pelo teste do *cup-plate*, etapa essa realizada em um trabalho de conclusão de curso produzido pelo então acadêmico Gleucinei dos Santos Castro, no ano de 2017, o experimentos ocorreram no laboratório de microbiologia do Instituto de Saúde e biotecnologia (ISB/UFAM).

Nos testes, quantidades de 150 µL de extrato enzimático de cada fungo, foram inoculadas em *cup plates* de 5 mm de diâmetro perfurados na superfície de meios de cultura sólidos adequados para a detecção da enzima em placa de Petri. Foi utilizado o meio ágar-amido (ágar, 18 g.L<sup>-1</sup>; amido, 10 g.L<sup>-1</sup>, tampão acetato de sódio pH 5).

Nas placas vertia-se uma pequena quantidade ressublimado de iodo fazendo movimento circulares até a obtenção de uma coloração lilás, e a ação enzimática era observada com um halo translucido formado ao redor de cada *cup-plate*, os quais foram medidos com paquímetro e os resultados expressos em mm (TEIXEIRA et al., 2011). O ensaio foi realizado em triplicata.

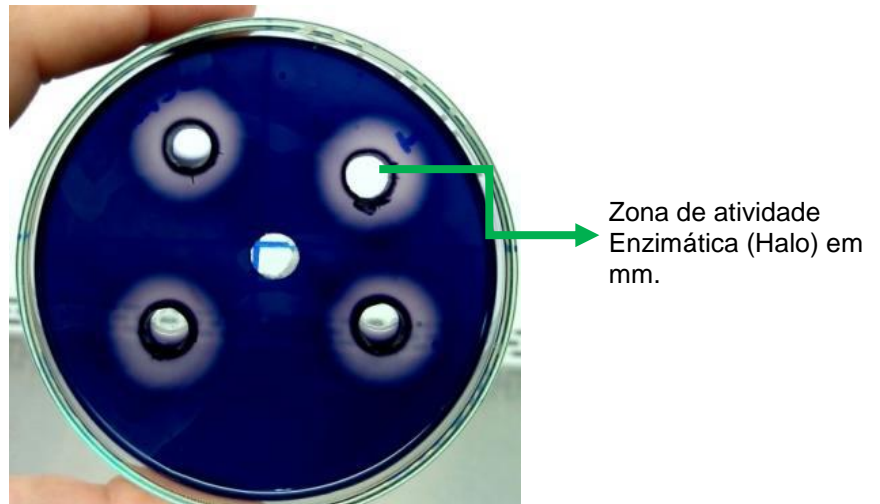


Figura 6: Atividade amiolítica

### 4.3 Seleção da linhagem para produção das amilases

Para obtenção de culturas dos isolados, os fungos foram repicados para placas de petri contendo meio BDA (caldo de 200 g de batata; 20 g.L<sup>-1</sup> de dextrose; 15 g.L<sup>-1</sup> de ágar, completando para 1000 mL com água destilada), e incubados a 28 °C por 7 a 10 dias, quando ocorreu o desenvolvimento do micélio.

Dois discos de 5 mm do micélio de cada isolado foram cultivados em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido *Solução de Manachini* (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g.L<sup>-1</sup>; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 1 g.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g.L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,9 g.L<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 1 g.L<sup>-1</sup>; água destilada, 1000 mL), adicionado de substrato indutor amido (0,5%), e pH 6,0. A incubação foi conduzida a 28 °C, sob agitação a 140 rpm, durante 72 horas (MANACHINI; FORTINA; PARINI, 1987).

Completadas às 72 horas, os fungos foram levados para a câmara de fluxo e filtrados utilizando papel Whatman (47mm Ø circles), e o meio de cultivo livre das células foi utilizado como solução enzimática bruta.

A seleção do melhor isolado teve como base a variação da intensidade da cor do complexo iodo-amido (FUWA, 1954), com o qual extrato enzimático foi tratado. O procedimento ocorreu da seguinte maneira: foi adicionado em tubo de ensaio 50 µL do extrato enzimático, 50 µL de água destilada, 100 µL de ácido acético 1M e 100 µL do reagente FUWA. Etapa essa realizada em triplicata para cada isolado.

#### **4.4 Produção de amilases em meio líquido**

Dois discos de 5 mm de micélio do isolado selecionado foram postos para crescer em Solução *de Manachini*, nos mesmos parâmetros descritos acima com mudanças apenas no tempo de incubação que nessa etapa foi de 120 horas. Após o tempo de crescimento foi feita a filtração da cultura a vácuo, utilizando-se papel Whatman (47mm Ø circles). O meio de cultivo livre das células foi utilizado como solução enzimática bruta. O extrato foi armazenado a 4°C e posteriormente utilizado na dosagem da atividade das enzimas amilolíticas.

#### **4.5 Determinação da atividade amilolítica**

A atividade amilolítica foi determinada pelo método que baseia-se na variação da intensidade da cor do complexo iodo-amido, denominado de atividade dextrinizante (FUWA, 1954).

#### **4.6 Atividade amilolítica dextrinizante**

Neste ensaio foram adicionados em tubos de ensaio de 10 mL, 20 µL de tampão fosfato de potássio (50 mmol. L<sup>-1</sup>, pH 6,0), 30 µL de extrato enzimático e 50 µL de solução de amido (2%). A mistura foi incubada a 50 °C por 10 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 100µl de ácido acético (1,0 mol. L<sup>-1</sup>) e 100 µl do reagente FUWA (solução de iodo/iodeto 1% iodo em etanol absoluto, 10% iodeto de potássio e água destilada na proporção de 1v:1v:3v). O volume foi completado para 5 mL com água destilada, homogeneizado e a absorbância determinada a 660 nm. A quantidade de amido consumido é calculada de acordo com uma curva padrão construída com quantidades crescentes de amido solúvel (0,1 - 30 mg/ml<sup>-1</sup>). Uma unidade (U) de atividade amilolítica dextrinizante foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 0,1mg de amido por minuto de reação (FUWA, 1954). O teste foi realizado em triplicata.

O controle da reação foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se o extrato enzimático por volume equivalente de água destilada (controle do substrato). Um outro controle foi realizado substituindo-se a solução de

amido por volume de tampão fosfato de potássio (controle da enzima), considerando a possibilidade da existência de resíduos de amido no extrato enzimático.

#### **4.7 Determinação do pH ótimo**

A determinação do efeito do pH sobre a atividade enzimática foi realizada incubando-se em tubos de ensaio de 10 mL, 30  $\mu$ L de extrato enzimático e 50  $\mu$ L de solução de amido (2%) em diferentes valores de pH. Foram utilizados tampões a 50 mM com valores de pH de 2 a 10. Os tampões utilizados foram fosfato de potássio com valores de pH de 2 a 8 e Tris-HCl de 9 a 10. As demais condições foram conforme procedimento do item 4.6 com diferença apenas na temperatura de incubação que foi de 60° C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.8 Determinação da temperatura ótima**

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se em tubos de ensaio de 10mL, 30 $\mu$ l de extrato enzimático e 50 $\mu$ l de solução de amido (2%) em temperaturas na faixa de 20, 30, 40, 50, 60, 70,80, 90 e 100°C no pH determinado como ótimo. As demais condições foram conforme procedimento do item 4.6. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.9 Determinação das constantes cinéticas**

Com o objetivo de analisar os parâmetros cinéticos, Km e Vmax do extrato enzimático, foram preparadas soluções de amido comercial solúvel (marca SYNTH) nas seguintes concentrações: 1,0 mg/mL, 5,0 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, 25 mg/mL e 30 mg/mL dissolvidos em água destilada. O ensaio foi realizado no tempo de 10 minutos sob as condições reacionais ótimas estabelecidas em experimentos anteriores (pH 6,0 e temperatura 50 °C). A partir de então foram adicionados em tubos de ensaio de 10 mL, 50  $\mu$ L de cada solução de amido, 30  $\mu$ L do extrato enzimático e 20  $\mu$ L do tampão. Para cada concentração do amido foi feito um branco com 50  $\mu$ L de tampão fosfato sem a presença do extrato enzimático,



também foi feito um branco sem o substrato contendo 30  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e 70  $\mu\text{L}$  tampão.

As demais condições foram conforme procedimento do item 4.6. Os dados coletados foram expressos mediante as constantes de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk, segundo LEHNINGER (2002).

## **4.10 Identificação molecular do microorganismo**

### **4.10.1 Extração do DNA**

O fungo foi crescido em meio líquido BDL (caldo de 200 g de batata; 20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de dextrose; completando para 1000 mL com água destilada), por 24 horas, então foi filtrado. O micélio foi lavado com água destilada por três vezes, aproximadamente 1 grama foi transferido para um almofariz e submetido a maceração com nitrogênio líquido. O macerado foi então transferido para microtubos de 2 mL e preservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração. O objetivo desse processo foi o rompimento da parede celular do fungo para facilitar a extração do material genético. Após, a amostra foi submetida à extração pelo *Kit Wizard Genomic DNA Purification* (PROMEGA). Em seguida, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta para confirmação. Ao final da extração, o pellet foi ressuspensionado em solução tampão (*DNA Rehydration Solution*) e congelado para análises posteriores.

### **4.10.2 Quantificação do DNA**

A concentração das amostras de DNA foi determinada por fluorimetria com 2  $\mu\text{L}$  da solução de DNA total extraído, utilizando o *Kit Qubit® dsDNA HS Assay* (*Molecular Probes – Life Technologies*).

#### 4.10.3 PCR para o sequenciamento

A metodologia para amplificação dos ácidos nucleicos foi adaptada de Montero-Lomelí e Rumjanek (2013). Os reagentes e concentrações utilizados para a reação estão dispostos na Tabela 4.

**Tabela 4:** Protocolo utilizado para amplificação por PCR

Reagente	Concentração das Soluções	Volume para uma reação (25 µL)
Água Mili-Q	-	6,2µL
Tampão para Taq DNA polimerase	10X	2,5µL
Mistura de dNTP	2,5mM	2,5µL
Iniciador senso	5pmol/µL	2,0µL
Iniciador antissenso	5pmol/µL	2,0µL
MgCl <sub>2</sub>	25mM	2,5µL
Taq DNA polimerase	5U/µL	0,3µL
DNA-molde	50ng	7µL

As regiões amplificadas foram a LSU com os primers LR0R e LR5 e ITS (internal transcribed spacer), usando os primers ITS1 e ITS4. A PCR foi realizada de acordo com Pagnocca e Colaboradores (2008) composta por 1 cliço inicial de 95 °C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de: 96°C por 3 minutos, 61°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto.

O produto da PCR foi revelado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídeo 1% e visualizado sob luz ultravioleta usando o marcador molecular como padrão de comparação, seguido de uma nova quantificação por fluorimetria de acordo com o método anteriormente realizado.

Para o sequenciamento, o DNA genômico extraído do fungo foi submetido à purificação com “exosap” o qual permaneceu *overnight* em termociclador com ciclos de 30 min a 37°C; 15 min a 80°C. Após isso, seguiu-se para o sequenciamento.

Para as reações de sequenciamento foi utilizado um total de 10µL de solução, contendo 5,0 µL do produto da reação, 2,0µL de *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific)*, e 10 pmoles de cada iniciador LR0R, LR5 e ITS1, ITS4. Os produtos das reações de sequenciamento foram lidos por sequenciador *3500 Genetic Analyzer (Thermo Scientific)*.

As sequências foram editadas e usadas para montar os *contigs* no programa Bioedit e os *contigs* foram usados para pesquisar sequências homólogas nas bases de dados para identificação taxonômica molecular do *GenBank*, através da ferramenta BLAST.

#### **4.11 Autenticação morfológica da linhagem fúngica**

A confirmação das características macro e micro morfológicas da linhagem foi realizada nos cultivos ágar CYA (Czapek-Dox + extrato de levedura), CZ (Czapek-Dox) e ágar extrato de Malte de acordo com a Raper and Fennell (1977) Klich and Pitt (1988).

Os cultivos foram mantidos a 28 °C, durante sete dias. Na macromorfologia foram analisadas característica, como cor da colônia, micélio, presença ou ausência de exsudato, cor do reverso, diâmetro da colônia, presença ou ausência de pigmentação solúvel e cor do esporos conforme Klich and Pitt (1988).

Na micromorfologia foram analisadas tanto as estruturas reprodutivas como o aspecto das hifas, para a visualização das microestruturas do fungo filamentoso, previamente foi preparado e esterilizado o sistema de microcultivo, após o preparo das lâminas utilizando corante azul de metileno foram observadas características como comprimento, largura e textura dos conidióforos e diâmetro, forma e textura dos conídios Klick and Pitt (1988).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Detecção da produção da enzima pelo teste *cup-plate*

Essa técnica avalia o potencial enzimático dos fungos de forma semiquantitativa, baseia-se na difusão das enzimas extracelulares presente no extrato bruto. Na presença de enzimas o substrato é degradado evidenciando-se um halo translucido ao redor de cada *cup-plate* no meio de cultivo. Para que se haja a determinação da enzima mede-se o diâmetro do halo (mm) pelo diâmetro do poço (TEIXEIRA et al., 2011). Para este teste foi utilizado o meio Agar Amido, tendo o amido como fonte de carbono.

Das 14 cepas selecionadas para o teste amilolítico, 13 mostraram bons resultados, apresentando um bom potencial enzimático. Com exceção da cepa M2C20 que em nenhum dos testes apresentou resultado positivo.

Os isolados M1C1, M1C11 e M1C14 foram às cepas que tiveram os melhores índices enzimáticos com um (IE) 3,5, 3,6 e 3,4 respectivamente. Os fungos M2S16, M2S18 e M1C15 tiveram resultados parecidos com um (IE) entre 3 e 2,5.

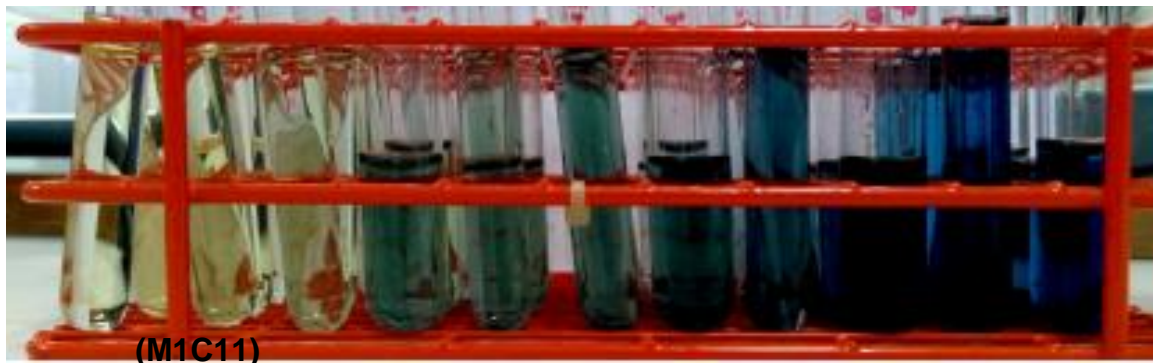
Segundo Stanford (1998) considera-se como um potencial produtor de amilase uma cepa com IE superior a 2,0.

### 5.2 Seleção da linhagem com qual o trabalho foi desenvolvido

Após as 72 horas de crescimento em meio líquido em *Solução de Manachini* e posterior filtração, todos os 13 extratos enzimáticos positivos no *cup-plate* foram testados através do reagente FUWA. Todos apresentaram variação na intensidade da cor do complexo iodo-amido, contudo o que teve maior variação na intensidade foi o isolado M1C11 (figura 7). Após a reação do extrato com o reagente FUWA, o mesmo apresentou coloração amarela, sendo que os demais extratos apresentaram variação de cor entre o azul claro passando pelo roxo até o verde claro.

A coloração amarela indica que o amido presente no meio havia sido degradado completamente, logo a quantidade de amilases produzidas pelo o isolado M1C11 foi maior que nos demais dessa maneira, esse foi o fungo selecionado para dar continuidade ao trabalho. Os testes com o reagente FUWA vieram por confirmar o

que já havia sido demonstrado nos testes com cup-plate, no qual o isolado M1C11 também foi o que apresentou maior (IE).

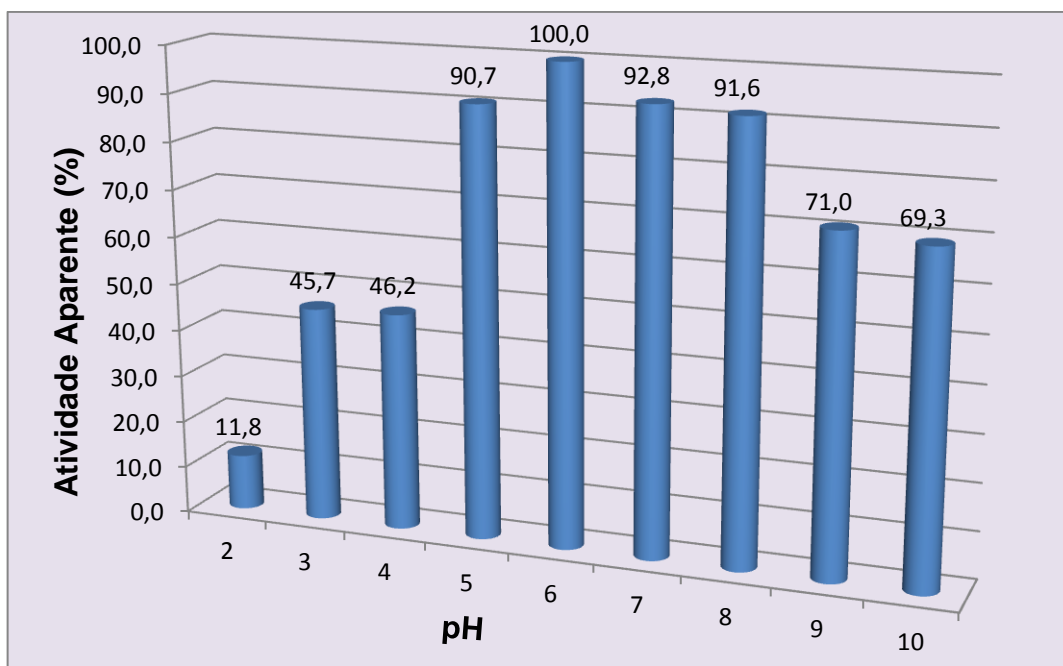


**Figura 7:** Variação da intensidade de cor do complexo iodo amido dos analisados. O isolado M1C11 apresentou coloração amarela indicando que amido presente no meio havia sido consumido em maior quantidade que nos demais extratos.

### 5.3 Determinação do pH ótimo

As enzimas também apresentam um pH ótimo (ou um intervalo de pH) em que sua atividade catalítica é máxima (LEHNINGER et al., 2002). Quando a enzima encontra-se em um pH maior ou menor do que seu pH ótimo sua atividade é afetada (reduzida). Variações na faixa de pH tanto para valores ácidos como alcalinos, podem causar danos a estrutura das enzimas levando a sua desnaturação, com conseqüente perda da sua atividade biológica (LEHNINGER et al., 2002).

Para a determinação do pH ótimo, utilizou-se tampões com pH entre 2,0 a 10,0. A enzima apresentou atividade ótima em presença de solução com amido a 2% no pH 6,0. Pode-se verificar também que a enzima em estudo foi bem estável em uma faixa de pH entre 5,0 a 8,0 (figura 8), sendo que até o pH 10 a mesma ainda teve uma certa estabilidade, na faixa de pH de 2 a 4 a enzima não apresentou atividade satisfatória.



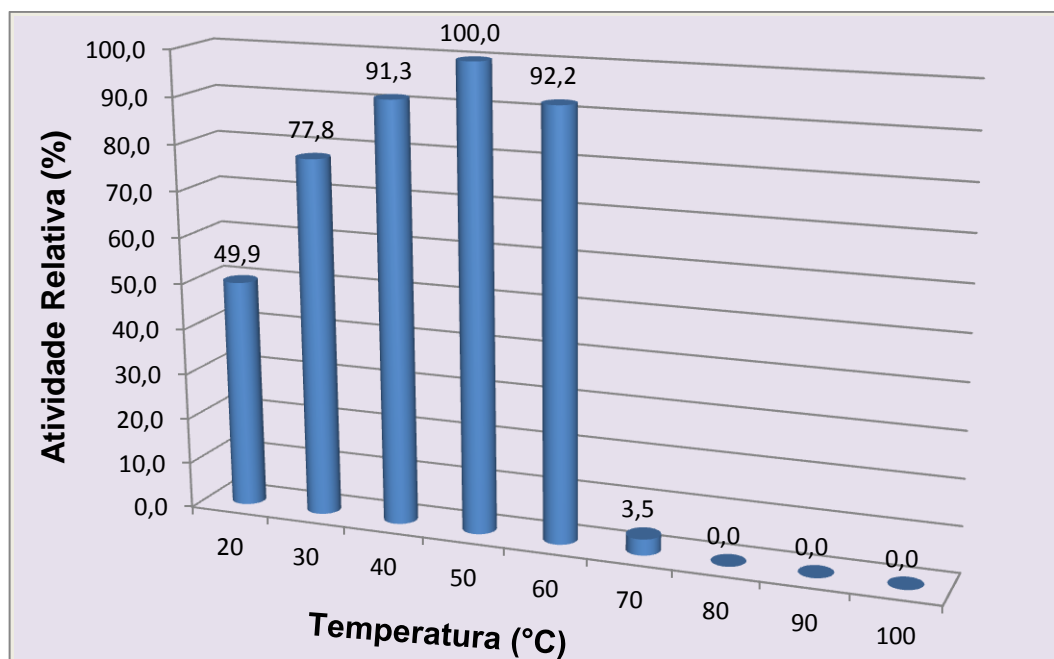
**Figura 8:** Atividade relativa (%) das amilases extracelulares do extrato enzimático bruto de *A. flavus* em relação à variação de pH ( 2 a 10 ). pH ótimo aparente em 6,0.

#### 5.4 Determinação da temperatura ótima

A velocidade de uma reação enzimática é afetada pela temperatura em que ela ocorre, quando a temperatura é aumentada a velocidade das moléculas também aumenta e com isso as colisões entre enzima e substrato ocorrem com mais frequência, dessa maneira gerando mais produto, essa temperatura em que os níveis enzimáticos são máximos e denominada temperatura ótima. Contudo existe uma temperatura limite acima da qual a taxa de desnaturação da enzima aumenta. (DEUNER et al., 1995; LEHNINGER et al., 2002 ).

As enzimas do microrganismo selecionado foram testadas nas temperaturas de 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e 100°C e tampão fosfato de potássio com pH 6, para verificar qual seria a temperatura ideal de reação.

A temperatura ótima na qual a enzima apresentou sua máxima eficiência catalítica foi 50°C, porém a enzima demonstrou ser bastante estável na faixa entre 40°C a 60°C, o que indica que tais enzimas apresentam um perfil termofílico (figura 9), acima de 60°C foi observada uma queda brusca em sua atividade. A 70°C a enzima praticamente não tem atividade sendo totalmente inativada acima desta temperatura devido à desnaturação proteica.



**Figura 9:** Atividade relativa (%) das amilases extracelulares do extrato enzimático bruto de *A. flavus* em relação à variação de temperatura (20°C a 100°C). Temperatura ótima aparente de 50°C.

## 5.5 Produção enzimática

Figueira et al. (2000) verificou que as amilases dos fungos *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus flavus* apresentaram valores de pH ótimos de 6,7 e 5,5 respectivamente, resultado próximos do encontrado para fungo avaliado neste trabalho. Freitas et al.(2014) observou que o pH ótimo das amilases produzidas por linhagens selvagem e mutante do fungo *Syncephalastrum racemosum* foi respectivamente pH 5,0 e 4,5. Nwagu & Okolo (2011) relataram em seu trabalho que a amilase do fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou pH ótimo de 6,0. Essa variação de pH apresentada pelos fungos demonstra uma tendência de produção de amilases levemente ácidas (FREITAS et al., 2014).

Este estudo avaliou a produção de amilases sob fermentação submersa, o extrato bruto utilizado para hidrólise do amido foi obtido após 120 horas de cultivo em Solução de Manachini adicionado de substrato indutor amido (0,5%), o pH utilizado no cultivo foi ajustado para 6,0 e a incubação foi conduzida a 28 °C, sob agitação a 140 rpm, durante as 120 horas (MANACHINI; FORTINA; PARINI, 1987).

Após o cultivo, a cultura foi filtrada e o extrato enzimático livre de células foi então utilizado para a determinação da atividade da amilase usando amido como substrato de reação. Para dosagem foram usados pH 6 e temperatura a 50° C,

parâmetros esses definidos anteriormente com sendo os que as amilases em estudo apresentaram sua máxima atividade.

Conforme Spier (2005) o pH ótimo para a atividade da  $\alpha$ -amilase fungica esta entre 5,0 e 6,0, e a faixa ótima de temperatura e de 55°C a 70°C.

A produção máxima observada no presente trabalho foi de 79,2 U/mL (figura 10). Hernández (2006) trabalhando com uma linhagem de *Aspergillus niger* obteve uma produção correspondente a 70,29 U/mL. Silva et al. (2011) investigando a produção de amilases sacarogênicas produzida a partir de uma linhagem de *P. purpurogenum* sob fermentação submersa obteve uma produção de 68,2 U/mg de substrato indutor. Nos estudos de Gonçalves (2006) com o fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* obteve a produção máxima para atividade dextrinizante de 181,6 U/mL.

Pereira (2015) estudando a produção de amilase por *Aspergillus niger* obteve uma produção máxima após a otimização do processo de produção de 214,28 U/mL, essa produção foi 4,62 vezes maior que observada antes do processo de otimização que era de 46,38 U/mL. Os fatores analisados no processo de otimização com o intuito de estabelecer as condições ótimas para a produção das amilases foram tempo de cultivo, o pH de cultivo e a concentração do substrato. As condições ótimas estabelecidas com a otimização foram concentração do substrato 2.0 %, tempo de cultivo 6,5 dias (156 horas) e pH de cultivo 6,0.

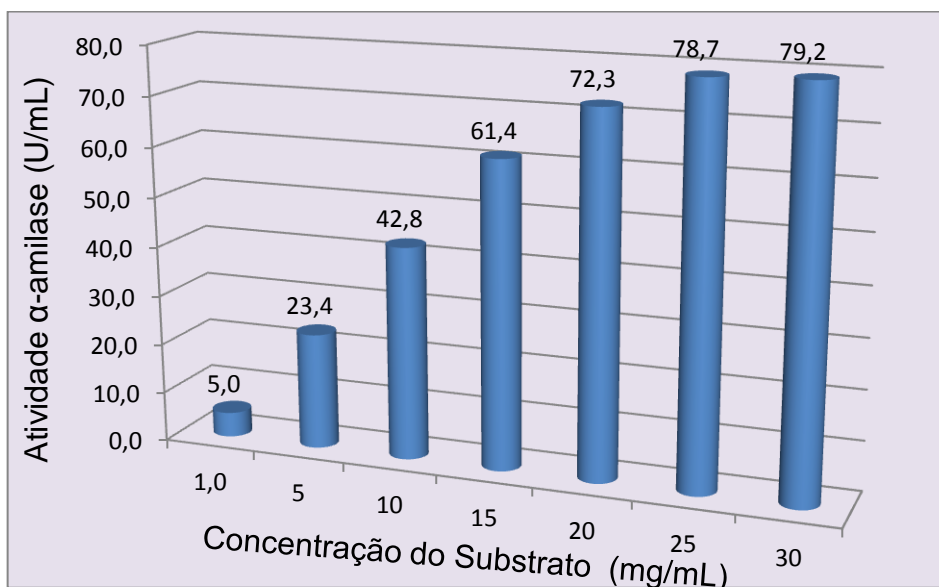
Segundo Amin (2011) a concentração do Substrato exerce grande influência na produção enzimática, o aumento do substrato no meio levará a uma taxa de produção enzimática diretamente proporcional a esse aumento até que o meio fique saturado com substrato, quando isto ocorre a adição extra de mais substrato não fará diferença.

O pH também esta entre os fatores que mais afetam o crescimento e produção durante o processo fermentativo, sendo que o mesmo pode alterar as substâncias químicas do meio de cultivo, ionizar moléculas polares, afetar reações enzimáticas e os processamentos pós-tradução de enzimas (GONÇALVES, 2006).

Tudo isso demonstra que os resultados obtidos no presente estudo são bastantes significativos uma vez que vários parâmetros ainda podem alisados e melhorados dentre eles o tempo de cultivo, a concentração do substrato presente no



meio de cultivo, o pH e a temperatura do meio de cultivo, para ai sim se ter a máxima produção enzimática por parte do fungo em estudo.



**Figura 10:** Produção das amilases extracelulares do extrato enzimático bruto de *A. flavus* sobre o amido solúvel em temperatura de 50°C e pH de 6,0. Atividade amilásica dextrinizante.

## 5.6 Caracterização cinética das amilases

Na determinação dos parâmetros cinéticos foi observado o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação catalisada pelas amilases. A caracterização foi realizada em pH 6 em uma temperatura de 50°C parâmetros esses definidos como ótimos para as enzimas em questão.

Os resultados experimentais obtidos na caracterização cinética são apresentados na tabela 5. A dosagem enzimática foi realizada utilizando soluções de amido comercial solúvel com diferentes concentrações (1,0; 5,0; 10; 15; 20; 25 e 30 mg/mL). A constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e a Velocidade Máxima ( $V_{máx}$ ) foram determinadas de acordo com LEHNINGER (2002) baseando se nos dados apresentados na Tabela 5.

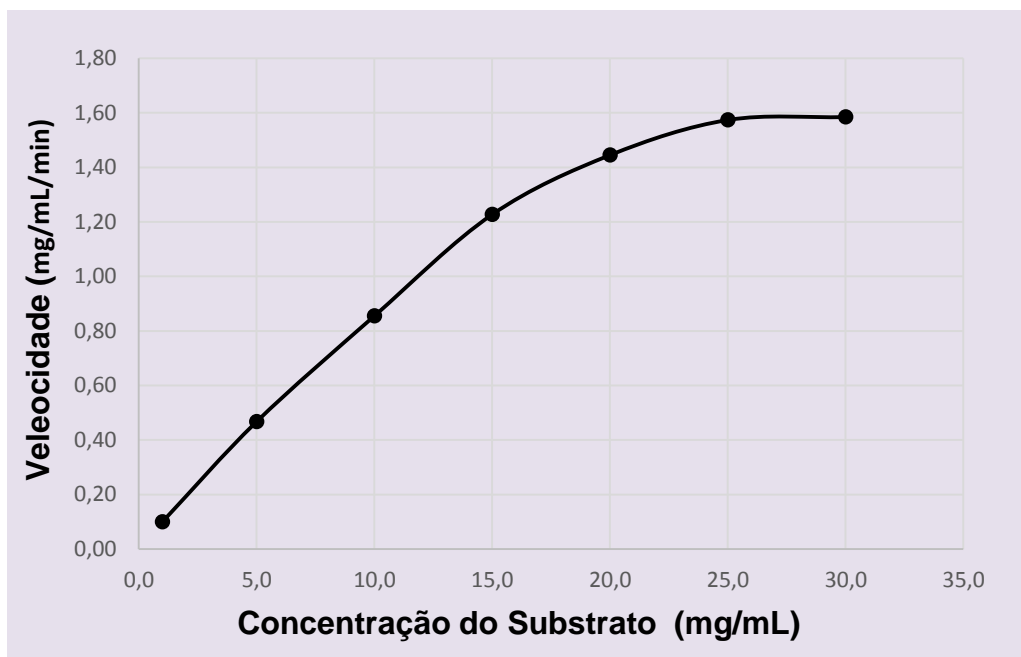
**Tabela 5:** Velocidade e atividade das amilases em reação com diferentes concentrações de substrato

ENSAIO	AMIDO (mg/mL)	VELOCIDADE (mg/mL/min)	AMILASES (U/mL)
1	1,0	0,10	5,0
2	5	0,47	23,4
3	10	0,86	42,8
4	15	1,23	61,4
5	20	1,45	72,3
6	25	1,57	78,7
7	30	1,58	79,2

A partir dos dados expressos na tabela 5 foi construído o gráfico da figura 13, ele mostra o efeito da concentração de amido (mg/mL) sobre a velocidade da reação catalisada pelas amilases (mg/ml/min).

Nesse gráfico, percebe-se que em concentrações baixas de substrato a velocidade inicial da reação ( $V_0$ ) é aproximadamente proporcional à concentração do substrato, sendo dessa maneira considerada uma reação aproximadamente de primeira ordem em relação ao substrato. Nota-se que a curva aproxima-se da curva [Substrato] em função da Velocidade (da reação catalisada pela enzima) apresentada por LEHNINGER (2002).

Conforme ocorre o aumento gradual na concentração do substrato, a velocidade da reação diminui e tende a se tornar independente em relação à concentração do substrato, aproximando-se de uma velocidade constante dita de ordem zero. No presente experimento isso ocorre em concentrações superiores a 25 mg/mL de amido conforme mostra a figura 11. Segundo LEHNINGER (2002) essa velocidade é observada devido à enzima ter ficado saturada pela concentração substrato elevada.



**Figura 11:** Efeito da concentração de amido sobre a velocidade da reação catalisada pelas amilases pH 6,0 e temperatura 50°C.

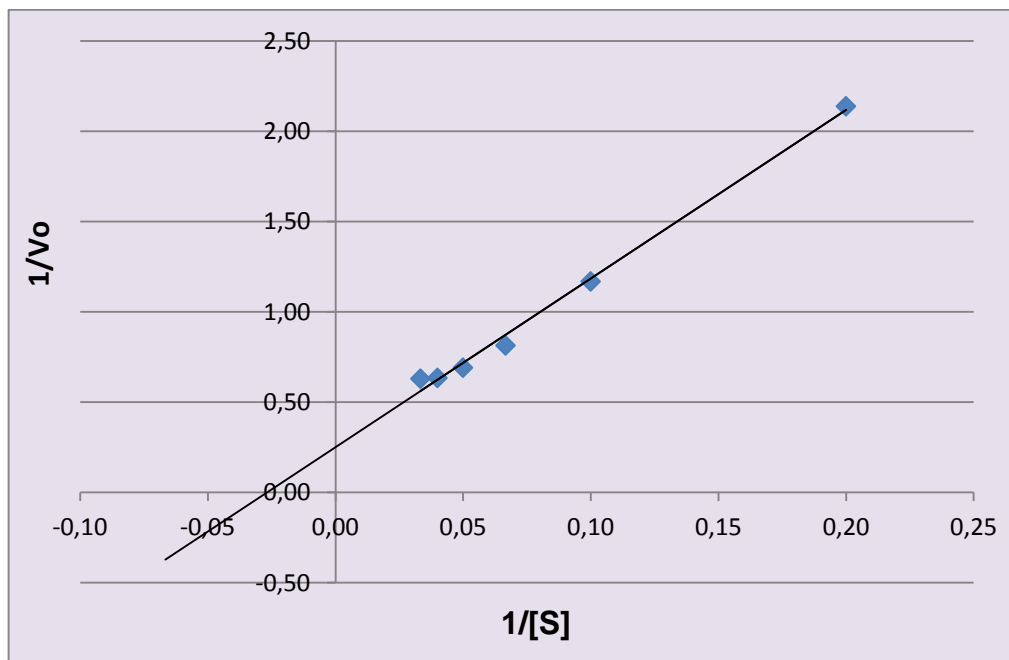
De acordo com Spier (2005) a cinética enzimática apresentada por Michaelis e Menten em 1913 é melhor desenvolvida para reações simples em que existe apenas um substrato como no caso apresentado na figura 12.

A equação de Michaelis e Menten é uma expressão de relação quantitativa entre a velocidade inicial  $V_0$ , a velocidade inicial máxima  $V_{max}$  e a concentração inicial de substrato  $[S]$ , todas relacionadas pela constante de Michaelis  $K_M$ . A constante  $K_M$  é igual à concentração de substrato na qual a velocidade inicial da reação é metade da velocidade máxima (LEHNINGER, 2002).

Uma transformação que constantemente é feita com a equação de Michaelis - Meten é sua dedução a equação de Lineweaver-Burk que é uma equação na qual fica mais simples a determinação prática de  $K_M$  e  $V_{max}$ , ela é obtida simplesmente invertendo-se os dois lados da equação de Michaelis -Meten.

A equação de Lineweaver-Burk gera o gráfico *duplo recíproco* de  $1/V_0$  versus  $1/[S]$  (figura 14), com ele obtém-se uma linha reta que terá uma inclinação de  $K_M/V_{max}$ , a intercepção será  $1/V_{max}$  no eixo de  $1/V_0$ , e uma intercepção de  $-1/K_M$  no eixo de  $1/[S]$ . Após a linearização dos dados cinéticos de acordo com o método de Lineweaver-Burk foi possível determinar a constante Michaelis-Menten  $K_M$  e também o valor de  $V_{máx}$  que foram 37,2 mg/mL para  $K_M$  aparente e 4,0 mg/mL/min. para  $V_{máx}$ . aparente. A figura 14 apresenta o modelo que mais se ajustou aos dados

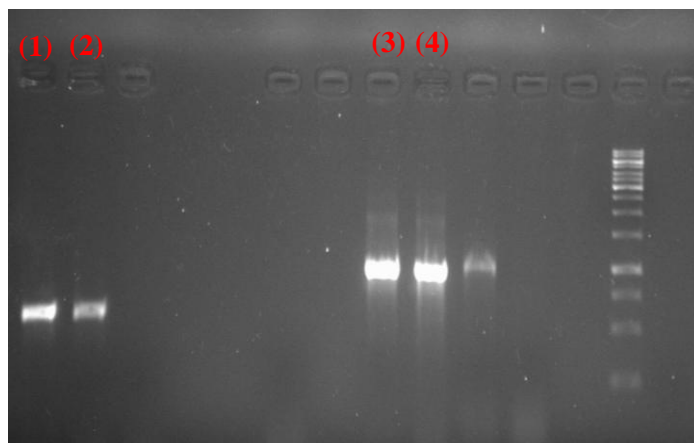
experimentais segundo a metodologia de Lineweaver-Burk, no qual teve um valor de  $R^2$  de 0,9994 indicando um bom ajustamento da reta regressão da amostra em relação aos dados.



**Figura 12:** Gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do amido a pH 6,0°C e temperatura 50°C.

### 5.7 Identificação molecular

A identificação genética foi realizada através da extração do DNA genômico do fungo, que apresentou o melhor potencial para produção de amilase. A amplificação das regiões ITS e RSU foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A eletroforese do material genético amplificado demonstra a qualidade do material obtido Figura (13).



**Figura 13:** Eletroforese dos produtos de PCR das regiões ITS e LSU. Em: 1 e 2 produto da região ITS, 3 e 4 produto da região LSU.

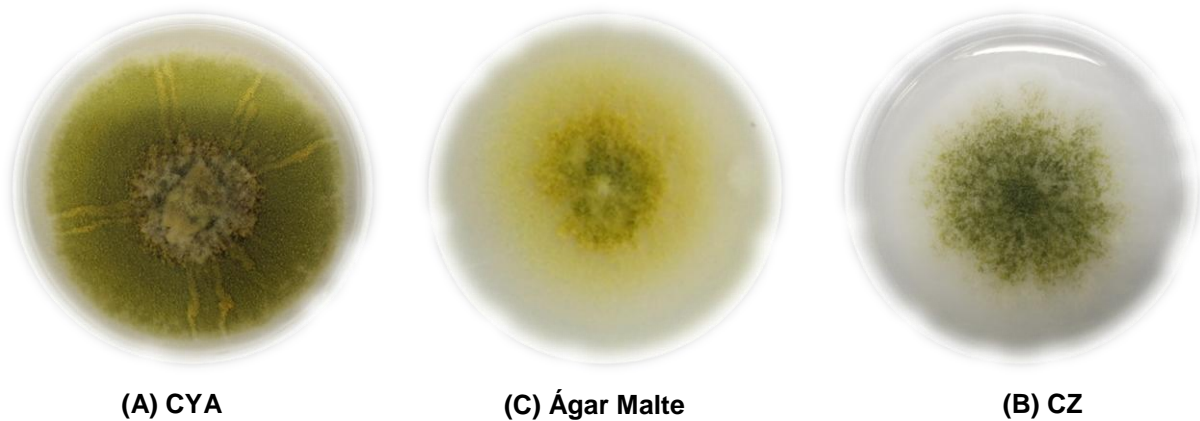
As sequências consenso dos nucleotídeos obtidas após sequenciamento das regiões ITS e LSU possuíam os seguintes tamanhos 568 pb para ITS e 886 pb para LSU. Essas sequências foram então editadas para montar os contigs através do programa Bioedit. A similaridade obtida por comparação de sequências das regiões ITS e LSU da linhagem com as sequências contidas no banco de dados do *GenBank* através da ferramenta *Blastn*, foi de 100% para a espécie de *Aspergillus flavus* nas duas regiões analisadas (número de acesso KY065346.1 para ITS e JN938926.1 para LSU).

### 5.8 Autenticação das características morfológicas

Nos testes de autenticação, as análises morfológicas confirmaram a identificação de *A. flavus*. Com base nesses dados estão apresentadas nas figuras 1 e 2 as características morfológicas de *A. flavus* em meio padrão CYA (Czapek-Dox + extrato de levedura), (Figura 14 A), Cz (Czapek-Dox), (Figura 14 B) e Ágar Malte (Figura 14 C). Colônias em Czapek ágar apresentam de 6-7 cm em diâmetro geralmente a partir de 7 dias de crescimento a temperatura ambiente, colônias comumente planas apresentando estruturas conidiais em abundância. Colônias em ágar malte apresentam rápido crescimento atendendo de 6-7 centímetros, cabeças conidiais apresentam característica entre radiada e colunar variando em proporção de linhagem para linhagem, em meio CYA após 7 dias a colônia apresentou diâmetro 7,5 – 8,5 cm, formato Circular, Centro elevado, verrugosa, pulverulenta,

sem pigmento e sem exudado, ondulações no verso (rugas) e centro do verso com bolinhas escuras (Rapper & Fennel, 1965).

Segundo Klich & Pitt (1988) foi definido que espécies que apresentam esporos de cor amarelo citrino, vesícula na extremidade de conidióforo, esterigmas e conídios em cadeia fazem parte do grupo *flavus*.

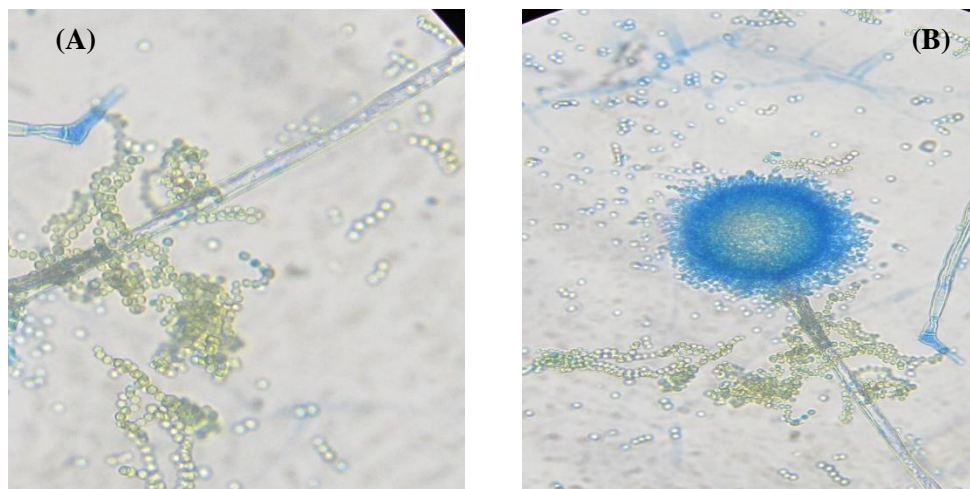


(A) CYA

(C) Ágar Malte

(B) CZ

**Figura 14:** Características macromorfológicas de *A. flavus* nos cultivos obtidos em sete dias em meio sólido (A) CYA; (B) CZ; (C) Malte.



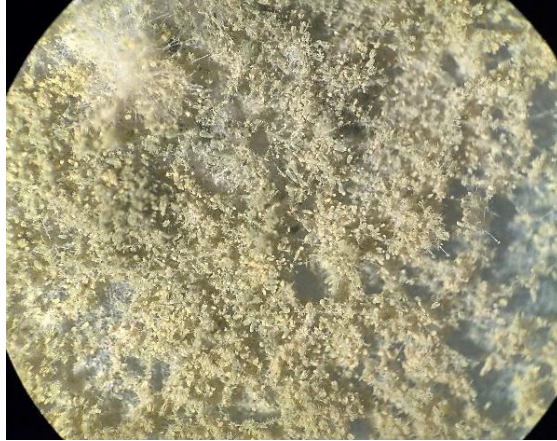
(A)

(B)

**Figura 15:** Microestruturas de *A. flavus*: (A) Conídios e hifa septada; (B) Conidióforo, vesícula, esterigmas e conídios.

Segundo Silva et al. (2015) a taxonomia de espécies de *Aspergillus* precisa ter uma abordagem que integre características fenotípicas, juntamente com sequências de DNA. Sendo assim, a similaridade obtida por comparação de sequências das regiões ITS e LSU da linhagem com as sequências contidas no

banco de dados do *GenBank* através da ferramenta *Blastn*, foi de 100% para a espécie de *A. flavus*.



**Figura 16:** Cabeças conidiais de *A. flavus* radiadas ou levemente colunares quando mais maduras no cultivo em ágar malte.

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi proposto selecionar, identificar e verificar a produção de enzimas amilolíticas por parte do melhor fungo produtor selecionado dentre 13 isolados que já haviam comprovado serem produtores de amilases por intermédio da avaliação semiquantitativa do *cup-plate*.

Pode se concluir através dos resultados obtidos, que a metodologia de avaliação feita com *cup-plate* foi bastante satisfatória uma vez que o isolado que apresentou maior índice enzimático no teste foi também o selecionado como melhor produtor no teste com fuwa. Quanto à identificação do fungo selecionado, tanto a análise morfológica quanto a molecular tiveram como resultado a espécie *Aspergillus flavus* sendo que na identificação molecular foram analisadas duas regiões do DNA as regiões ITS e RSU ambas com 100% para a espécie em questão.

Nos estudos da produção enzimática conduzidos com fungo o *Aspergillus flavus*, foi utilizado meio *Manachini*, tendo como substrato indutor o amido a 0,5%, a produção máxima observada foi de 79,2 U/mL esses resultados demonstraram que o fungo é um bom produtor de amilases com grande potencial para utilização em processos biotecnológicos. As enzimas apresentaram atividades ótimas em pH 6,0 e em temperaturas de 50 °C, indicando um perfil de enzimas termofílicas.

Os bons resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, justifica que estudos posteriores sejam realizados a fim de uma maior produção enzimática, haja vista que alguns parâmetros ainda podem ser otimizados durante a produção, faz se necessário também estudos quanto a termoestabilidade enzimática bem como o estudos da produção de outras classes de amilases entre elas as glucoamilases.



## REFERÊNCIAS

Abe, R.; Chiba, Y.; Nakajima, T. Characterization of the functional module responsible for the low temperature optimum of a rice alpha-amylase (Amy 3E). **BIOLOGIA-BRATISLAVA-**, 57(SUP/2), 197-202, 2002.

ADEWALE, I. O.; AGUMANU, E. N.; OTIHOKORONKWO, F.I. Comparative studies on 3b1;-amylases from malted maize (*Zea mays*), MILLET (*Eleusine coracana*) and Sorghum (*Sorghum bicolor*). **Carboidrate Polymers**, v.22, p. 2-16, 2006.

Agência Embrapa de Informação Tecnológica, Brasília, DF, 2015. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia\\_de\\_alimentos/arvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s473v6o7sud.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s473v6o7sud.html).

ALMEIDA, M.C.O., Análise da produção de amiloglucosidase e alfa-amilase por *Aspergillus awamori* através de fermentação batelada em frascos agitados. **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. 2009.

AMARAL, L. D.; GASPAR, M.; COSTA, P. M. F.; AIDAR, M. P. M.; BUCKERIDGE, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, 34(4), 425-431, 2007.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; REHMAN, S. Optimization of growth parameters for lipase production by *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 28, p. 5514–5523, 2011.

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-Ciência e Biotecnologia**, v. 11, n. 2, p. 15-28, 2012.

BASTOS, N. B. S.; RE CAREY, H.; ESPÍRITO, S. A.; MOREAU, V.; FERRÃO, G. A. Isolamento e caracterização de microrganismos amilolíticos presentes na rizosfera de tuberosas amiláceas. **Diálogos & Ciência**, 153-158, 2012.

BELO, S. C. B. **PRODUÇÃO DE AMILASE E LIPASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE DIFERENTES TIPOS DE SOLO DE FLORESTA E SAVANA DE RORAIMA**. BOA VISTA, 103 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais). Universidade Federal de Roraima, BOA VISTA-RR, 2013.

BELO, S. C. B. **PRODUÇÃO DE AMILASE E LIPASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE DIFERENTES TIPOS DE SOLO DE FLORESTA E SAVANA DE RORAIMA**. BOA VISTA, 103 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais). Universidade Federal de Roraima, BOA VISTA-RR, 2013.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: **Interciência**, p. 506 2008.

BONONI, V. L. R.; GRANDI, R. A. P. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: **Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 181 p., 1999.

BRUMM, P. J. Enzymatic production of dextrose. **Cereal Food World**, v. 40, p. 804-807, 1998.

CARLA, R. P. **Produção de amilases por *aspergillusniger*: potencial de aplicação na hidrólise do amido granular da batata-doce**. GUARAPUAVA, 88 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis). Universidade Estadual do Centro-Oeste, GUARAPUAVA- PR, 2015.

CARVALHO, R. V. **Produção e caracterização de  $\alpha$ -amilase por *Bacillus sp. SMIA-2* termofílico utilizando proteínas do soro de leite, e algumas aplicações da enzima** (dissertação). Campos dos Goytacazes (RJ): Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2007.

CASTRO, A. M.; ANDRÉA, T. V.; REIS, C. L.; FREIRE, D. M. G. Use of mesophilic fungal amylases produced by solid-state fermentation in the cold hydrolysis of raw babassu cake starch. **Applied biochemistry and biotechnology**, 162(6), 1612-1625, 2010.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non-conventional processes. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 1, n. 4, p. 245, 2011.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. *Tecnologia enzimática*. Editora EPUB, 2008.

CORNELIS, P. Microbial amylases. **Microbiological sciences**, v. 4, n. 11, p. 342-343, 1987.

COSTA, J.A.V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus Níger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, p.203, 1996.

COUTINHO, P. M.; REILLY, P. J. Glucoamylase structural, functional and evolutionary relationships. **Protein Engineering**, v. 29, p. 334-347, 1997.

CRUZ, R.; CIACCO, C. F. Fabricação de amido e sua utilização. Série: Tecnologia Agroindustrial – **Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia – FTPT**, p.152, 1980.

DEUNER, S.; FERREIRA, L.; BACARIN, M.; BERVALD, C.; ZANATTA, E. Caracterização parcial da invertase ácida solúvel em tubérculos de batata: energia de ativação e efeito de inibidores. **Current Agricultural Science and Technology**, 11(1), 2005.

FENNEMA, O. R.; KIRK L. P.; SRINIVASAN, D, **Química de alimentos de Fennema**, Traduzido por Adriano Brandelli, Ed. ARTMED, 4ª ed. Porto Alegre, 2010.

FERNANDES, L. P.; ULHOA, C. J.; ASQUIERI, E. R.; MONTEIRO, V. N. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, IV, 43–51, 2007.

FIGUEIRA, E. L. Z.; SÁ, M. C.; IDA, E. I. & HIROOKA, E. Y. Produção e caracterização de amilase de *Fusarium moniliforme* e *Aspergillus flavus*. **Revista CEPPA**, 43: 461-467, 2000.

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. S.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização parcial de  $\alpha$ -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 26, p.266-232, 2014.

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

GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de alfa-amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas**. Rio Claro, 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – SP, 2006.

GRIMM, L. H., KELLY, S., KRULL, R., & HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, 69(4), 375, 2005.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. **Microbial  $\alpha$ -Amylases: a Biotechnological Perspective**. Process Biochemistry. Jan. 2003. p. 1-18. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em 20 de agosto. 2017.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase fúngica. **Bioquímica das fermentações**, p. 56, 1982.

HERNÁNDEZ, M. S.; RODRÍGUEZ, M. R.; GUERRA, N. P.; ROSÉS, R. P. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. **Journal of Food Processing Engineering**, v. 73, p. 93-100, 2006.

Jesus, J. G. R. D. **Seleção e identificação de cepas bacterianas produtoras de amilases isoladas da microbiota associada a resíduos agrícolas de cacau e dendê**. SALVADOR, 86f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) . Universidade Federal da Bahia , Salvador- BA, 2014.

KATHIRESAN, K.; MANIVANNAN. S.  $\alpha$ -Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 829–832, 2006.

KIRK, O.; BORCHET, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n.4, p. 345-351, 2002.

Klich, MA, Pitt JI. A Laboratory guide to common. *Aspergillus* species and their teleomorphs. Australia: **Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization**, 115pp, 1988.

LAILER, K.J. Introduction to the Chemistry of Enzymes. **New York: McGraw-Hill Book Company Inc.**, p. 208, 1954.

LEMOES, C. M. Y.; FUCHS, E.; GOMES, E.; SILVA, R. Glucoamilase: estrutura e termoestabilização. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. Brasília, n.31, p. 86-94, 2003.

LIMA, M. S. Potencial de fungos filamentosos na produção de enzimas utilizando diferentes fontes de amido. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, 5(1), 49-53, 2015.

MACKENZIEA. D. A.; JEENES, D. J.; GOU, X.; ARCHER, D. B. Molecular basis of glucoamilase over production by a mutagenised industrial strain of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.193-200, 2000.

MALI, S; EIRAS, G. M. V; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, 2010.

MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARINI, C. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. **Biotechnology Letters**, v. 9, n. 3, p. 219-224, 1987.

MANJUNATH, P.; SHENOY, B. C.; RACHAVENDRA-RAO, M. R. Fungal glucoamilase Review. **Journal Application Biochemistry**, v. 5, p. 235-260, 1983.

MORAES, L. M. P.; SAID, S.; PIETRO, R. Amilases. SAID, S.; PIETRO, R. Enzimas como agentes Biotecnológicos. Ribeirão Preto: **Legis Summa**, cap, v. 13, p. 222-242, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 1.274, 2011.

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

NWAGU, T. N.; OKOLO, B. N. Extracellular amylase production of a thermotolerant *Fusarium sp.* isolated from eastern nigerian soil. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v. 54, p. 649-658, 2011.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; SOUZA, A. J.; FREITAS C. J. A. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27(1), 2007.

ONOFRE, S. B.; GROFF, S. A.; SARTORI, A.; BERTOLINI, J.; KAGIMURA, F. Y.; ROTTA, D.; STEILMANN, P. Production of  $\alpha$ -Amylase and Amyloglucosidase by the Fungus *Cylindrocladium* sp. in semi-solid state fermentation. **Journal of Microbiology Research**, 2(5), 123-126, 2012.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **Rev. Saúde e Biol.**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

PANDEY, A. ; SELVAKUMAR, P. ; SOCCOL, C.R. ; NIGAM, P. Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes. In: **Current Science**, v. 77. n.1 Jul, p. 149-161, 1999.

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

PAPAGIANNI M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnol Adv** 22:189–259, 2004.

PASIN, T. M. **PROSPECÇÃO E PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE UMA GLUCOAMILASE DE ASPERGILLUS JAPONICUS: APLICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO EM RECICLAGEM DE PAPEL**. RIBEIRÃO PRETO, 156f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade de São Paulo, RIBEIRÃO PRETO-SP, 2015.

PASTORE, M. G. **Uso de Enzimas nas Indústrias de Alimentos**. 2010. UNICAMP. Disponível em: <[http://www.anbio.org.br/palestras/palestra\\_glaucia.ppt](http://www.anbio.org.br/palestras/palestra_glaucia.ppt)>. Acesso em 25 agosto. 2017

PAVEZZI, F. C. **Produção e caracterização de glucoamilases termoestáveis de *Aspergillus awamori* obtidas por PCR mutagênico e expressas em *Saccharomyces cerevisiae***. São José do Rio Preto, 84f. Dissertação (Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas). Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto – SP, 2006.

PELCZAR. **Microbiologia – Conceitos e Aplicações**. Cap. 10. 4. ed. São Paulo: Makron Books, p. 258-271, 1998.

RAPER KB, FENNELL DI. THE GENUS ASPERGILLUS. New York, N.Y: Robert E. Krieger Co; 1977. 686 p.

RAPPER , FENNEL . **The genus *Aspergillus***. Williams & Wilkins, 1965

REGULY, J.C. **Biotecnologia de Processos Fermentativos e suas Matérias Primas**. Pelotas: UFPEL, p. 321. 1996.

ROCHA, C. P. Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido, 2010.

SANTANA, R. S. M. **PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**. ITAPETINGA, 73f. Dissertação (Engenharia de Alimentos, área de Concentração em Ciência dos Alimentos). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, ITAPETINGA- BA, 2012.

SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; NETO, A. G.; UETANABARO, A. P. T. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. Feira de Santana: **SITIENTIBUS**, n.35, p.91-98, 2006.

SHARMA, R. et al. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p.2083-2094, ago. 2009.

SIDKEY, N. M.; ABO-SHADI, M.; AL-MUTRAFY, A. M.; SEFERGY, F.; AL-REHEILY, N. Screening of micro-organisms isolated from some enviro-Agro-Industrial wastes in Saudi Arabia for-amylase production. **Journal of American Science**, 6(10), 926-939, 2010.

SILVA, F. C.; CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R.; SANTOS, C.; LIMA, N. Taxonomia polifásica para identificação de *Aspergillus* seção flavi: uma revisão. **Revista Iles Ciência**, 1(1): 18-40, 2015.

SILVA, T. M.; OLIVEIRA, M.; SOMERA, A. F.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; GUIMARÃES, L. H. S. Thermostable saccharogenic amylase produced under submerged fermentation by filamentous fungus *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1136-1140, 2011.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, 6(2), 174, 2016.

SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MARQUES, M. M.; PATERA, B. R.; BARONI, S. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30(3), 2010.

SOUZA, P. M.; MAGALHAES, P. O. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry - A review. **Braz. J. Microbiolvol**, 41, n.4, p.850-861, 2010.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. Curitiba, 178 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2005.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Enzymatic Activity of micro-organisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban)

(*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 382-385, 1998.

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. Hidrólise do Amido. *In: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas*. p. 377-395, 2003.

TEIXEIRA, M. F. S. et al. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inesplorada (Aplicações Biotecnológicas)**. Universidade Federal do Amazonas, Manaus: Edu, 2011.

WALTER, M; SILVA, L. P; EMANUELLI, T. Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, 2005.

WANDERLEY, M.D.; NEVES, E.; ANDRADE, C.J. Aspecto da produção industrial de enzimas. **Rev. Citino (Hestia)**, v. 1, n. 1, p. 30-36, 2011.

WISNIEWSKI, A. C.; DE ALMEIDA, M. Â. L.; PALMA, M. B.; TAVARES, L. B. B. Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja. *Revista Brasileira de Biociências*, 8(3), 2010.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; WOICICKOSKI JR, C.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 123-137, 2009.