

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

FÁTIMA TERMOS

**FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA BIODIVERSIDADE DO
CENTRO-OESTE BRASILEIRO COM INTERESSE PARA A PRODUÇÃO DE
ENZIMAS AMIOLÍTICAS**

DOURADOS - MS
SETEMBRO DE 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

FÁTIMA TERMOS

**FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA BIODIVERSIDADE DO
CENTRO-OESTE BRASILEIRO COM INTERESSE PARA A PRODUÇÃO DE
ENZIMAS AMIOLÍTICAS**

Dissertação de mestrado apresentado
ao Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia Ambiental como
parte dos requisitos para obtenção do
título de mestre em Ciência e
Tecnologia Ambiental.

Orientador: Rodrigo Simões Ribeiro
Leite

DOURADOS - MS
SETEMBRO DE 2022

RESUMO

As amilases são enzimas que hidrolisam moléculas de amido gerando açúcares menores e se dividem em endoamilases, exoamilases e amilases desramificadoras. Estas enzimas possuem diversas aplicações industriais, entre elas a produção de xaropes, detergentes, álcool, na alimentação animal e na indústria têxtil. O Cultivo em Estado Sólido (CES) é uma técnica de baixo custo de cultivo de micro-organismos utilizando resíduos agroindustriais para a produção de enzimas industriais. O objetivo deste estudo foi comparar a produção e propriedades catalíticas de amilases produzidas por espécies fúngicas distintas cultivadas em CES, isoladas em diferentes ambientes do Estado do Mato Grosso do Sul – MS. O substrato agroindustrial com maior produção amilolítica para todos os fungos testados foi o farelo de trigo, devido às suas características que favorecem o crescimento microbiano. As umidades iniciais ótimas do meio de cultivo variaram entre 55–65% dentre as espécies. O fungo *R. microsporus* apresentou melhor tempo de cultivo de 24h, *C. echinulata* 72h e *G. butleri*, *L. ramosa* e *T. aurantiacus* 96h. O pH ótimo se encontrou entre 4,5–6,0 e a temperatura ótima entre 55–65 °C. Os resultados demonstram que as espécies fúngicas isoladas do estado do Mato Grosso do Sul possuem potencial para produção de amilase em meios de custo reduzido e com características desejáveis.

Palavras chave: Produção de amilase; Cultivo em estado sólido; Resíduos agroindustriais; Biodiversidade.

ABSTRACT

Amylases are enzymes that hydrolyze starch signals generating smaller sugars and are divided into endoamylases, exoamylases and debranching amylases. These enzymes have several industrial applications, including the production of syrups, detergents, alcohol, animal feed and the textile industry. Solid State Cultivation (CES) is a low-cost technique for cultivating microorganisms using agro-industrial residues for the production of industrial enzymes. The aim of this study was to compare the production and catalytic properties of amylases produced by different fungal species cultivated in ESC, obtained in different environments in the State of Mato Grosso do Sul - MS. The agroindustrial substrate with the highest amyolytic production for all fungi tested was wheat bran, due to its characteristics that favor microbial growth. Optimum initial moisture content of the culture medium varied between 55–65% among species. The fungus *R. microsporus* showed the best cultivation time of 24h, *C. echinulata* 72h and *G. butleri*, *L. ramosa* and *T. aurantiacus* 96h. The optimum pH was found between 4.5–6.0 and an optimum temperature between 55–65 °C. The results showed that fungal species from the state of Mato Grosso do Sul have potential for amylase production in low-cost media with desirable characteristics.

Keywords: Amylase production; Solid state cultivation; Agro-industrial waste; Biodiversity.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela saúde, capacitação e persistência em atingir meus objetivos, e por todos os surpreendentes caminhos que me trouxeram à finalização deste trabalho.

Aos meus pais, Maria e Abbas, por todas as vezes em que se sacrificaram para colocar as necessidades das filhas em primeiro lugar.

Às minhas irmãs, Zeinab e Mariam, por terem trazido leveza e boas risadas em todas as vezes em que o cansaço se fazia dominante.

Ao João Vitor, por ter enfrentado e vencido ao meu lado todas as adversidades que os últimos anos nos trouxeram, sem desistir de buscar os sonhos que criamos juntos.

Ao meu orientador Rodrigo Leite, por toda a compreensão e ajuda em todas as vezes que senti dificuldades, e por ter torcido pelo meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço às minhas amigas Andressa, Thais, Milena e Sarah, por terem estado presentes nesta caminhada, apesar da distância.

À Gabriela Finoto, por ter se disposto a passar os conhecimentos e experiência de laboratório no tempo em que trabalhamos juntas.

À UFGD e ao CTA, pela oportunidade de adquirir e produzir conhecimento.

À CAPES, pelo fornecimento da bolsa de estudos que permitiu que eu pudesse me dedicar a este trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a construção deste trabalho direta ou indiretamente, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 2 |
| 3. OBJETIVO | 5 |
| 4. METODOLOGIA | 6 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 8 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 11 |
| 7. REFERÊNCIAS | 13 |

1. INTRODUÇÃO

O cultivo em estado sólido (CES) é uma técnica de cultivo de micro-organismos utilizada para a produção de enzimas industriais, transformando resíduos agroindustriais em produtos com valor agregado. O CES apresenta elevada aplicabilidade em países com abundância de biomassa e resíduos agroindustriais, que podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (LIMA *et al.*, 2021). A técnica CES pode ser considerada uma ótima solução para o cultivo de fungos filamentosos, pois além da atratividade econômica, a quantidade de água requerida é muito inferior à do cultivo submerso, e a produção enzimática pode ser ainda maior, devido ao substrato sólido ser mais semelhante ao habitat natural de fungos filamentosos (CAROCA *et al.*, 2021).

Dentre as enzimas de interesse industrial produzidas por cultivo em estado sólido destaca-se a amilase, utilizada nos mais diversos setores com especificações e características desejadas diferentes para cada um deles. As amilases utilizadas na sacarificação do amido por exemplo, devem ser termoestáveis devido à elevada temperatura em que estes processos ocorrem; uma temperatura ótima de atividade entre 50–55 °C também é desejável na panificação, onde é responsável por melhorar a maciez e qualidade da massa.

As α -amilases são utilizadas na clarificação de sucos de fruta de acordo com preferências do consumidor final, com temperatura ótima de 60 °C e pH de trabalho entre 5,0–5,5. Por outro lado, na indústria de detergentes é interessante que as α -amilases utilizadas tenham uma temperatura ótima de trabalho de cerca de 25 °C, seja estável em ambientes alcalinos e sejam tolerantes aos componentes dos detergentes, como agentes oxidantes e surfactantes (LIM; OSLAN, 2021).

Na indústria têxtil, assim como na maioria dos casos, enzimas amilolíticas com estabilidade em temperaturas mais altas (60 °C) são desejáveis para a desengomagem (remoção do amido) biotecnológica para permitir a absorção de água e agentes de acabamento de forma mais eficiente do que a desengomagem química, onde há danificação das fibras do tecido.

A equipe do Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos – LEPPER/UFMG (Universidade Federal da Grande Dourados) realiza desde 2010, trabalhos de isolamento e seleção de linhagens fúngicas isoladas em ambientes industriais e nativos do estado do Mato Grosso do Sul (cerrado, pantanal e resquício de mata atlântica), em busca de micro-organismos produtores de enzimas com características interessantes economicamente, com alta eficiência, elevada produção e baixo custo. Nesse contexto, o presente trabalho reúne

informações sobre a produção e caracterização das enzimas amilolíticas de 5 espécies fúngicas isoladas no estado do Mato Grosso do Sul e estudadas pela equipe do LEPPER.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Amido

O amido é o principal carboidrato de reserva vegetal, presente em grande escala na alimentação humana. É produzido pelas plantas verdes e encontrado em grande quantidade em alimentos como batata, milho, arroz e trigo. É um carboidrato que pode ser hidrolisado pela ação de micro-organismos produtores de enzimas amilolíticas e convertido em dióxido de carbono, água, minerais e açúcares menores sem impacto ambiental (SOYKEABKAEW; THANOMSILP; SUWANTONG, 2015; FU *et al.*, 2014).

Este carboidrato é composto essencialmente por numerosas unidades de glicose interligadas, formando dois tipos de moléculas: a amilose e a amilopectina. A primeira delas forma uma cadeia de glicose relativamente linear, e a segunda possui uma estrutura com muitas ramificações (Fu *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2020). A amilose é formada por unidades de glicose ligadas entre si por ligações α -1,4 e possui uma excelente habilidade de formação de filmes, enquanto a amilopectina é formada por cadeias curtas α -1,4 ligadas por ligações glicosídicas α -1,6 que ocorrem a cada 25 a 30 unidades de glicose (JIMENEZ *et al.*, 2012).

Os grânulos de amido podem ser classificados em três categorias, sendo elas o amido de digestão rápida, amido de digestão lenta e amido resistente, e podem assumir variados formatos como esferas, elipsoides, polígonos, plaquetas ou túbulos irregulares. O formato e tamanho variam de acordo com a fonte vegetal (LI *et al.*, 2020; SOYKEABKAEW; THANOMSILP; SUWANTONG 2015).

Jimenez *et al.* (2012) afirma que filmes e revestimentos comestíveis feitos de amido são usados na proteção de alimentos para aumentar a sua vida útil. Ainda segundo o mesmo autor, amidos nativos e modificados desempenham um importante papel na indústria alimentícia devido à possibilidade da sua utilização para alterar as propriedades físicas de produtos como sopas, molhos e produtos cárneos, principalmente na modificação da textura, viscosidade, adesão, formação de gel e filme, e retenção de umidade.

2.2. Amilase

Considerando a importância do amido e sua abundância na natureza, inclusive na alimentação humana, as enzimas que hidrolisam este carboidrato conseqüentemente também apresentam grande relevância. Chamadas de amilases, estas enzimas hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6. As α -amilases também chamadas endoamilases, por hidrolisarem apenas as ligações glicosídicas internas, geram oligossacarídeos de cadeia curta (como as amilopectinas), e as β -amilases, também chamadas exoamilases por clivarem as ligações glicosídicas das extremidades, liberam carboidratos fermentescíveis de cadeias menores (maltose, glicose e maltotriose) (YANG *et al.*, 2019). A glucoamilase é uma enzima que também integra o grupo das exoamilases, é encontrada em fungos, leveduras e bactérias e possui a glicose como produto final (LAGO *et al.*, 2021). As isoamilases são enzimas desramificadoras que clivam as ligações glicosídicas α -1,6 da amilopectina e dextrinas ramificadas para produzir dextrinas lineares (GOUS; FOX, 2017; GUI *et al.*, 2021).

O principal produto gerado pela ação das enzimas amilolíticas é a glicose, mas também ocorre a formação de maltose, maltotriose e dextrinas (LAGE, 2018). 30% do mercado mundial de enzimas é ocupado pelas aplicações biotecnológicas das amilases em diversos segmentos industriais, substituindo quase por completo a utilização de hidrólise química do amido (ERTAN; BARKAN; YARKIN, 2014).

Alguns dos setores que mais utilizam amilases são os setores alimentício, farmacêutico, têxtil, de detergentes, de papel, de alimentação animal e da indústria de açúcar, entre outros. Além disso, as preocupações ambientais levaram ao aumento de pesquisas e desenvolvimento de produtos relacionados ao uso de amilases nas últimas décadas, fazendo com que novos produtos e aplicações estejam em forte emergência (AKASSOU; GROLEAU, 2018; SOYKEABKAEW; THANOMSILP; SUWANTONG, 2015).

De acordo com Akassou e Groleau (2018), as enzimas utilizadas industrialmente devem idealmente manter a atividade e estabilidade em altas temperaturas, uma vez que o amido passa a ser solúvel a partir dos 100 °C, e em condições ácidas (com pH variando entre 4,5–5,5), que são as condições utilizadas na indústria que possibilitam, entre outras coisas, evitar a contaminação do meio por micro-organismos.

As enzimas amilolíticas são encontradas na maior parte dos seres vivos, sendo produzidas por bactérias, fungos, plantas e animais, devido à sua importância na hidrólise do amido para a utilização na própria nutrição. No entanto, as características das amilases encontradas nas variadas fontes diferem muito entre si, gerando uma grande diversidade e

abrindo espaço para a sua exploração na pesquisa e desenvolvimento de novos processos, de acordo com as suas vantagens para a indústria e o ambiente (LAGE, 2018).

Entre as fontes de amilases utilizadas industrialmente, prevalecem os fungos e as bactérias devido à maior facilidade da extração da enzima. Contudo, destacam-se os fungos filamentosos, cuja capacidade de secretar amilases e outras enzimas produzidas por eles naturalmente e em quantidade suficientemente atrativa, recentemente os tornou importantes para a produção enzimática industrial. As espécies mais comumente utilizadas são *Penicillium* sp, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus* e *Trichoderma* sp (ABDULLAH *et al.*, 2017).

2.3 Cultivo em estado sólido – CES

De acordo com Manan e Webb (2018), o cultivo em estado sólido (CES) tem sido definido de diversas formas, mas que resumidamente refere-se à fermentação microbiana, na ausência ou próximo da ausência de água livre entre as partículas do substrato, estando assim próximo do ambiente natural ao qual os micro-organismos selecionados, especialmente fungos filamentosos são naturalmente adaptados. Outra definição pertinente é a de Rahardjo *et al.* (2005), que estabelece o CES como o crescimento de micro-organismos em substrato sólido e úmido, no qual uma quantidade suficiente de água está presente para manter o crescimento e metabolismo do micro-organismo, permitindo a circulação de ar entre as partículas.

O processo de cultivo em estado sólido possui diversas diferenças em comparação com o método tradicional de cultivo submerso, uma vez que simula de forma mais próxima o ambiente natural do micro-organismo, o que permite maior produção enzimática, maior estabilidade das enzimas em relação às variações de pH e temperatura, e menor susceptibilidade à inibição. Possui também vantagens ambientais, pois requer um consumo energético menor e propõe uma nova finalidade para os resíduos agroindustriais, que normalmente seriam descartados. Além disso, é uma técnica mais simples, o que gera economia financeira e de tempo (WANG *et al.*, 2019; MANAN; WEBB, 2018; SANTOS *et al.*, 2018).

No entanto, não se deve negligenciar o controle de alguns fatores como o tempo de cultivo, temperatura, pH, atividade de água, substratos e atendimento das necessidades nutricionais do micro-organismo, que afetam diretamente a produção enzimática e a qualidade geral dos resultados obtidos com o processo (SANTOS *et al.*, 2018).

Os substratos utilizados no cultivo em estado sólido são de modo geral, resíduos agroindustriais lignocelulósicos, que funcionam como uma excelente fonte de carbono e nitrogênio, além dos outros elementos minerais necessários ao metabolismo do micro-organismo, principalmente das espécies fúngicas, desde o seu crescimento até a sua produção enzimática e de metabólitos (WANG *et al.*, 2019).

De acordo com pesquisas de Ertan, Balkan e Yarkin (2014), o cultivo submerso enfrenta problemas com a inibição enzimática por concentração de metabólitos, especialmente glicose. Na literatura, encontram-se relatos que demonstram que o cultivo em estado sólido tem a capacidade de minimizar este efeito inibitório, podendo manter uma alta produção mesmo em meio contendo 15% de glicose, em contraste com uma inibição enzimática completa em meio de cultivo submerso contendo apenas 1% de concentração de glicose.

A indústria de alimentos e bebidas lidera os setores industriais que mais produzem resíduos agroindustriais, sendo esses, uma excelente fonte de biomassa nutritiva, que podem ser aplicados em cultivos microbiológicos. O cultivo em estado sólido é um processo biotecnológico que emergiu para agregar valor a estes materiais, evitando o seu descarte na natureza e substituindo o cultivo submerso por um método simples e econômico (MURTHY; NAIDU; SRINIVAS, 2009; FRANCIS *et al.*, 2002).

3. OBJETIVO

Comparar a produção e as propriedades catalíticas de amilases produzidas por espécies fúngicas distintas, isoladas em diferentes locais do estado do Mato Grosso do Sul - MS.

4. METODOLOGIA

4.1 Micro-organismos

No presente trabalho foram avaliados 5 espécies de fungos filamentosos, sendo: *Gongronella butleri* (mesófilo) isolado de amostras de solo do cerrado, *Lichtheimia ramosa* (mesófilo) isolado de bagaço de cana processado em uma indústria de etanol de cana-de-açúcar e *Cunninghamella echinulata* (mesófilo) isolado de amostras de solo da Mata Atlântica coletado na Serra da Bodoquena (Bodoquena – MS), *Thermoascus aurantiacus* (termófilo) isolado de serapilheira da Mata Atlântica na cidade de Dourados- MS (Mata do

Azulão) e *Rhizopus microsporus* (termófilo) isolado de frutos em decomposição no Cerrado (tabela 1).

Tabela 1: Micro-organismos isolados e selecionados e seus respectivos identificadores

| Espécie | Local de isolamento | Temperatura de cultivo | Identificação Taxonômica |
|-----------------------|--|-------------------------------|--|
| <i>G. butleri</i> | Amostra de solo do Cerrado (Dourados-MS) | 30 °C | Coleção Brasileira de Microrganismos de Indústria e Meio Ambiente - CBMAI/ UNICAMP - Campinas - SP |
| <i>L. ramosa</i> | Bagaço de cana processado em indústria de etanol (Dourados-MS) | 30 °C | Laboratório de Ecologia e Sistemática de fungos, IB/UNESP Rio Claro - SP |
| <i>C. echinulata</i> | Amostra de solo da Serra da Bodoquena (Bodoquena/MS) | 30 °C | Micoteca URM -Universidade Federal do Pernambuco, Recife - PE |
| <i>T. aurantiacus</i> | Serrapilheira de mata atlântica (Dourados/MS) | 45 °C | Laboratório de Ecologia e Sistemática de fungos, IB/UNESP Rio Claro - SP |
| <i>R. microsporus</i> | Frutas do Cerrado (Dourados/MS) | 45 °C | Micoteca URM -Universidade Federal do Pernambuco, Recife - PE |

4.2 Inóculo

Os fungos foram cultivados em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 40 mL de ágar Sabouraud Dextrose e incubados por 48h a 30 °C (mesófilos) e 45 °C (termófilos). As suspensões fúngicas foram obtidas pela adição de 25 mL de solução nutriente e raspagem suave da superfície. A solução nutriente foi composta de 0,1% de sulfato de amônio, 0,1% de sulfato de magnésio heptahidratado e 0,1% de nitrato de amônio. Os fungos foram inoculados nos resíduos agroindustriais pela transferência de 5 mL da suspensão microbiana.

4.3 Cultivo em estado sólido (CES)

Os fungos foram cultivados em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 5 g de diferentes resíduos agroindustriais (farelo de trigo, palha de milho, sabugo de milho, casca de arroz, farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar), que foram lavados com água destilada e secos em estufa a 50 °C por 48h. O substrato que apresentou maior produção amilolítica foi utilizado para avaliar outros parâmetros de cultivo, como: umidade, e tempo de cultivo. As condições ótimas de cada experimento foram utilizadas nos ensaios subsequentes. Foram

feitas repetições em todos os experimentos, e os resultados apresentados são suas respectivas médias. Todo o material utilizado foi autoclavado a 121 °C por 20 min.

4.4 Extração das enzimas

A extração das enzimas foi feita por meio de adição de 50 mL de água destilada nos substratos miceliados e agitação a 100 rpm por 1 h. As amostras foram filtradas em tecido de *nylon* e centrifugadas (3.000 x g por 10 min). O sobrenadante foi considerado extrato enzimático e utilizado nos ensaios subsequentes.

4.5 Determinação da atividade amilolítica

A atividade amilolítica foi determinada pela adição de 0,1 mL de extrato enzimático em 0,9 mL de solução tampão acetato de sódio (0,1M) contendo 1% de amido de milho. Após 10 minutos de reação, o açúcar redutor resultante foi quantificado pelo método DNS (ácido dinitrosalicílico) descrito por Miller (1959). A unidade de atividade enzimática foi considerada como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de produto por minuto de reação.

4.6 Caracterização bioquímica das amilases produzidas por CES

O pH ótimo foi determinado por quantificação de atividade enzimática a 50 °C em diferentes valores de pH, utilizando o tampão McIlvaine (3,0–8,0). A temperatura ótima foi determinada pela dosagem da atividade enzimática em diferentes temperaturas nos respectivos valores de pH ótimos. A estabilidade de pH foi avaliada pela incubação da enzima em diferentes valores de pH por 24h a 25 °C. Os tampões usados foram McIlvaine (3,0–8,0), Tris HCl 0,1M (8,0–8,5) e glicina NaOH 0,1M (8,5–10,0). A termoestabilidade enzimática foi determinada pela incubação das enzimas em diferentes temperaturas durante 1h. A atividade residual foi determinada sob condições ótimas de pH e temperatura.

4.7 Potencial catalítico para amidos de diferentes fontes

O potencial de hidrólise de amidos de diferentes fontes foi avaliado por meio de ensaios contendo como substrato: amido de batata, milho, mandioca e trigo em tampão McIlvaine e acetato de sódio nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura. Os produtos liberados foram quantificados pelo método DNS.

4.8 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram feitos em repetições, e os resultados relatados são a média destas repetições. Os testes estatísticos incluem um teste ANOVA seguido por um teste de Tuckey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de amilase em CES

Os micro-organismos foram cultivados em diferentes substratos agroindustriais x e tiveram suas respectivas produções de amilase avaliadas. Em todas as avaliações, os cultivos em farelo de trigo foram os que apresentaram a maior produção de enzimas amilolíticas, com valores muito acima da produção obtida com os demais substratos (Tabela 2).

Há relatos da boa atuação do farelo de trigo como substrato para crescimento de fungos filamentosos na literatura, inclusive na produção de outras enzimas de sacarificação, podendo ser explicado pelas características do farelo de trigo que favorecem o crescimento microbiano, devido sua reduzida compactação, nutrientes acessíveis no meio e penetração eficiente dos micélios (EL-SHISHTAWY *et al.*, 2014). Além disso, é um dos resíduos agroindustriais utilizados para produção de enzimas, com melhor custo e benefício, quando comparado com outros bioprodutos, como: soja, arroz e milho (GONÇALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2016). Almanaa *et al.* (2020) realizaram estudos avaliando a produção de amilases em diferentes resíduos agroindustriais como substrato por meio do CES, e o que apresentou maior produção enzimática foi o farelo de trigo, se destacando com significativa diferença da produção dos demais substratos.

Tabela 2: Produção de amilase (U/g) por fungos filamentosos cultivados em estado sólido em diferentes resíduos agroindustriais

| Substrato | Farelo de trigo | Palha de milho | Sabugo de milho | Casca de arroz | Farelo de soja | Bagaço de cana de açúcar |
|-----------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|--------------------------|
| <i>C. echinulata</i> | 157,66 | 7,78 | 5,62 | 5,84 | 15,88 | 2,14 |
| <i>R. microsporus</i> | 144,8 | 8,55 | 5,36 | 6,10 | 3,46 | 3,31 |
| <i>L. ramosa</i> | 320,4 | 8,8 | 9,2 | 3,9 | 10,5 | - |
| <i>T. aurantiacus</i> | 44,2 | 6,2 | 5,2 | 4,7 | 7,6 | 3,7 |
| <i>G. butleri</i> | 35,57 | 6,03 | 2,29 | 2,71 | 9,56 | - |

Quanto à umidade inicial de cultivo, *C. echinulata* e *G. bluteri* apresentaram maior produção de amilases em cultivos contendo 55% de umidade, com alta produção enzimática entre 50–55% e 50–60%, respectivamente. As maiores produções de amilase pelos fungos *R.*

microsporus e *T. aurantiacus* foram obtidas com 65% de umidade inicial. O fungo *L. ramosa* apresentou maior produção com umidade inicial de cultivo de 60%, com produção elevada também aos 55 e 65% de umidade inicial (Tabela 3).

Tanto o aumento quanto a diminuição da umidade inicial do meio de cultivo influenciam diretamente na produção de enzimas. Como descrito por Abdullah *et al.* (2017), a provável razão para que essa variação na produção enzimática ocorra é a redução da solubilidade dos nutrientes ao diminuir a umidade. Por outro lado, umidade em excesso prejudica o crescimento do micro-organismo, principalmente pela interferência na difusão de oxigênio.

Tabela 3: Atividade enzimática (U/g) de amilases produzidas por fungos filamentosos em farelo de trigo em diferentes umidades iniciais

| Micro-organismo | Umidade inicial | | | | | |
|-----------------------|-----------------|---------------|--------------|---------------|-------|-------|
| | 50% | 55% | 60% | 65% | 70% | 75% |
| <i>G. butleri</i> | 45,1 | 51,26 | 46,2 | 28,9 | 26,7 | 9,8 |
| <i>L. ramosa</i> | 300,0 | 349,0 | 369,8 | 328,5 | 273,4 | 245,5 |
| <i>T. aurantiacus</i> | - | 50,8 | 56,2 | 65,1 | 51,2 | 45,9 |
| <i>C. echinulata</i> | 160,2 | 179,61 | 132,1 | 118,2 | 88,4 | 73,1 |
| <i>R. microsporus</i> | - | 104,3 | 148,9 | 175,28 | 80,1 | 74,6 |

Um dos parâmetros mais importantes a ser avaliado em uma enzima com potencial aplicação industrial é o tempo de cultivo. Dentre os micro-organismos estudados, *R. microsporus* apresentou maior produção enzimática em apenas 24h de cultivo, seguido por *C. echinulata* que atingiu sua maior produção em 48h. Os demais micro-organismos avaliados apresentaram maior produção de amilase com 96h de cultivo. De forma geral, após atingir o pico de produção enzimática foi evidenciado uma tendência de queda na atividade amilolítica dos extratos enzimáticos (Tabela 4). A provável causa dessa queda é o alcance do final da fase log do micro-organismo e início da fase estacionária, onde não há disponibilidade de açúcares e outros nutrientes em abundância, resultando na redução da atividade metabólica do micro-organismo. Outro fator que pode diminuir a atividade catalítica dos extratos enzimáticos é o acúmulo de inibidores provenientes do crescimento fúngico e produtos resultantes da própria atividade enzimática, como glicose por exemplo (ABDULLAH *et al.*, 2017).

Os tempos de cultivos obtidos no presente trabalho são consideravelmente menores que os descritos na literatura, para produção de amilases por cultivo em estado sólido.

Melnichuk *et al.* (2020) realizou o cultivo em estado sólido de *Aspergillus oryzae* e obteve melhor tempo de cultivo para extração de alfa-amilase em 14h. Em estudo feito por Balakrishnan *et al.* (2021), a produção de amilase pelo micro-organismo *Apergillus oryzae* alcançou seu máximo de produção com 108h de cultivo.

Conhecer o melhor tempo de cultivo dos micro-organismos possibilita planejar os processos fermentativos de forma eficaz, extraindo deles o melhor custo-benefício. Quanto menor o tempo de cultivo, mais ciclos de fermentação podem ser realizados.

Tabela 4: Produção de amilases (U/g) de acordo com o tempo de cultivo em estado sólido de fungos filamentosos

| Micro-organism | 24h | 48h | 72h | 96h | 120h |
|-----------------------|--------------|-------|--------------|--------------|-------|
| <i>G. butleri</i> | 12,7 | 42,2 | 52,0 | 63,25 | 42,1 |
| <i>L. ramosa</i> | 150,0 | 269,1 | 312,8 | 417,2 | 321,3 |
| <i>T. aurantiacus</i> | 38,9 | 31,6 | 82,4 | 144,5 | 39,7 |
| <i>C. echinulata</i> | 102,0 | 229,5 | 234,9 | 210,1 | - |
| <i>R. microsporus</i> | 224,8 | 208,2 | 159,9 | 171,3 | - |

5.2 Caracterização bioquímica das amilases

Em relação à temperatura ótima e à termoestabilidade, todas as enzimas amilolíticas apresentaram perfis semelhantes, com temperatura ótima entre 55–65 °C e termoestabilidade em valores próximos a 60 °C. As enzimas produzidas pelos fungos mesófilos *G. butleri* e *C. echinulata* apresentaram estabilidade térmica após 1 hora a 40 e 45 °C, respectivamente. No entanto, surpreendentemente a amilase produzida pelo fungo mesófilo *L. ramosa* manteve-se estável até 55 °C, apresentando maior termoestabilidade, mesmo quando comparada com as enzimas produzidos pelos fungos termófilos *T. aurantiacus* e *R. microsporus*, que foram estáveis até 50 °C (Tabela 5).

Temperaturas ótimas elevadas e termoestabilidade são características desejáveis industrialmente. Processos realizados em altas temperaturas evitam contaminação microbiológica e conseqüentemente dispensam a manutenção constante das condições assépticas, mas principalmente porque a maioria dos processos industriais que necessitam da ação de amilases ocorrem em altas temperaturas (RASPOPOVA; KRASNOSHTANOVA, 2016).

O pH ótimo encontrado para as enzimas variaram entre 4,5–6,0. As enzimas apresentaram estabilidade em ampla faixa de pH, com destaque para as amilases produzidas por *L. ramosa*, que se mantiveram estáveis em pH 3,5–11,0 após 24h (Tabela 5).

A estabilidade estrutural destas enzimas é essencial para manter sua atividade durante as variações dos parâmetros dos processos industriais. Como relatado por Oliveira *et al.* (2016), pequenas alterações moleculares como o número de ligações de hidrogênio, grau de hidrofobicidade da molécula e a quantidade de ligações iônicas podem produzir grandes modificações na estabilidade de uma proteína.

Tabela 5: Temperatura ótima, pH ótimo, estabilidade ao pH e termoestabilidade de amilases produzidas por fungos filamentosos cultivados em estado sólido em farelo de trigo

| Micro-organismos | pH ótimo | Temperatura ótima (°C) | pH de estabilidade | Temperatura de estabilidade (°C) |
|-------------------------|-----------------|-----------------------------------|-------------------------------|---|
| <i>G. butleri</i> | 5,0 | 55 | 3,5 - 9,5 | 30 - 40 |
| <i>L. ramosa</i> | 6,0 | 60 | 3,5 - 11 | 30 - 55 |
| <i>T. aurantiacus</i> | 6,0 | 60 | 4,5 - 9,5 | 30 - 50 |
| <i>C. echinulata</i> | 5,0 | 60 | 4,0 - 8,0 | 30 - 45 |
| <i>R. microsporus</i> | 4,5 | 65 | 3,5 - 9,5 | 30 - 50 |

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem inferir que a biodiversidade fúngica presente nos diferentes biomas do Centro–oeste brasileiro apresenta potencial para produção de amilases em meios de reduzido valor agregado.

As características bioquímicas das enzimas amilolíticas relatadas justificam a continuidade de trabalhos com o presente escopo, de forma que contribuem com a construção de conhecimento científico sobre a biodiversidade desses biomas atualmente ameaçados e ainda pouco explorados cientificamente.

7. REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, R., NADEEM, S., IQTEDAR, M., KALEEM, A., IFTIKHAR, T., NAZ, S. Influence of grow conditions on enhanced production of alpha amylase from *Penicillium* species in solid state fermentation. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 16, p. 426-432. 2017.
- AKASSOU, M., GROLEAU, D. Optimization of the production of an extracellular and thermostable amylolytic enzyme by *Thermus thermophilus* HB8 and basic characterization. *Extremophiles*, v. 22, p. 189-202. 2018.
- ALMANAA, T.N., VIJAYARAGHAVAN, P., ALHARBY, N.S., KADAIKUNNAN, S., KHALED, J.M., ALYAHYA, S.A. Solid state fermentation of amylase production from *Bacillus subtilis* D19 using agro-residues. *Journal of King Saud University – Science*, v. 32, p. 1555-1561. 2020.
- BALAKRISHNAN, M., JEEVARATHINAM, G., KUMAR, S.K.S., MUNIRAJ, I., UTHANDI, S. Optimization and scale-up of α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes. *BMC Biotechnology*, v. 21, p. 33. 2021.
- CAROCA, E., ELORRIETA, M., PALMA, C., NAVIA, D., LEBRERO, R., CARVAJAL, A. Lignocellulosic residue valorization in a sequential process of solid-state fermentation and solid substrate anaerobic digestion. *J Chem Technol Biotechnol*, v. 97, p. 1575-1584. 2021.
- EL-SHISHTAWY, R.M., MOHAMED, S.A., ASIRI, A.M., GOMAA, A.M., IBRAHIM, I.H., AL-TALHI, H.A. Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megatherium*. *BMC Biotechnology*, v. 14, p. 29. 2014.
- ERTAN, F., BALKAN, B., YARKIN, Z. Determination of the effects of initial glucose on the production of α -amylase from *Penicillium* sp. under solid-state and submerged fermentation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 28, p. 96-101. 2014.
- FRANCIS, F., SABU, A., NAMPOOTHIRI, K.M., SZAKACS G., PANDEY, A. Synthesis of α -amylase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *Journal of Basic Microbiology*, v. 42, p. 320-326. 2002.
- FU, Z., CHEN, J., LUO, S.J., LIU, C.M., LIU, W. Effect of food additives on starch retrogradation: A review. *Starch/Stärke*, v. 67, 6-78. 2014.
- GONÇALVES, H.B., JORGE, J.A., GUIMARÃES, L.H.S. Production and characterization of an extracellular β -D-fructofuranosidase from *Fusarium graminearum* during solid-state fermentation using wheat bran as a carbon source. *Journal of Food Biochemistry*, v. 40, p. 655-663. 2016.

GOUS, P.W., FOX, G.P. Review: Amylopectin synthesis and hydrolysis e Understanding isoamylase and limit dextrinase and their impact on starch structure on barley (*Hordeum vulgare*) quality. *Trends in Food Science & Technology*, v.62, p. 23-32. 2017.

GUI, Y., ZOU, F., LI, J., TANG, J., GUO, L., CUI, B. Corn starch modification during endogenous malt amylases: The impact of synergistic hydrolysis time of α -amylase and β -amylase and limit dextrinase. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 190, p. 819-826. 2021.

JIMENEZ, A., FABRA, M.J., TALENS, P., CHIRALT, A. Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. *Food Bioprocess Technol*, v. 5, p. 2058-2076. 2012.

LAGE, J.L.D. The amylases of insects. *International Journal of Insect Science*, v.10, p. 1-14. 2018.

LAGO, M.C., SANTOS, F.C., BUENO, P.S.A., OLIVEIRA, M.A.S., BARBOSA-TESSMAN, I.P. Theglucoamylase from *Aspergillus wentii*: Purification and characterization. *Journal of Basic Microbiology*, v. 61, p. 443-458. 2021.

LI, X.Q., XU, K., LIU, X.M., Z,P. A Systematic Review on Secondary Metabolites of *Paecilomyces* Species: Chemical Diversity and Biological Activity. *Planta med*, v. 86, p. 805-821. 2020.

LIM, S.J., OSLAN, S,N. Native to designed: microbial-amylases for industrial applications. *PeerJ*, v. 9, p. 22. 2021.

LIMA, A.C., SILVA, D., SILVA, V., GODOY, M., CAMMAROTA, M., GUTARRA,M. α -Mannanase production by *Penicillium citrinum* through solid-state fermentation using açai residual biomass (*Euterpe oleracea*). *J Chem Technol Biotechnol*, v. 96, p. 2744-2754. 2021.

MANAN, M.A., WEBB, C. Estimation of growth in solid state fermentation: A review. *Malaysian Journal of Microbiology*, v.14, p. 61-69. 2018.

MELNICHUK, N., BRAIA, M.J., ANSELMINI, P.A., MEINI, M., ROMANINI, D. Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. *Waste management*, v. 106, p. 155-161. 2020.

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

MURTHY, P.S., NAIDU, M.M., SRINIVAS, P. Production of α -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, v. 84, p. 1246-1249. 2009.

- OLIVEIRA, H.M., PINHEIRO, A.Q., FONSECA, A.J.M., CABRITA, A.R.J., MAIA, M.R.G. Flexible and expeditious assay for quantitative monitoring of alpha-amylase and amyloglucosidase activities. *MethodsX*, v. 6, p. 246-258. 2019.
- RAHARDJO, Y.S.P., WEBER, F.J., HAEMERS, S., TRAMPER, J., RINZEMA, A. Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate α -amylase production in a model solid-state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 900-902. 2005.
- RASPOPOVA, E.A., KRASNOSHTANOVA, A.A. Characterizing the Properties and Evaluating the Efficiency of Biocatalysts Based on Immobilized Fungal Amylase. *Catalysis in Industry*, v. 8, p. 75-80. 2016.
- SANTOS, P.S., SOLIDADE, L.S., SOUZA, J.G.B., LIMA, G.S., BRAGA Jr, A.C.R., ASSIS, F.G.V. de, LEAL, P.L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v. 4, p. 2. 2018.
- SOYKEABKAEW, N., THANOMSILP, C., SUWANTONG, O. A review: Starch-based composite foams. *Composites: Part A*. v. 78, p. 246-263. 2015.
- WANG, F., XU, L., ZHAO, L., DING, Z., MA, H., TERRY, N. Fungal Laccase Production from Lignocellulosic Agricultural Wastes by Solid-State Fermentation: A Review. *Microorganisms*, v. 7, p. 665. 2019.
- YANG, C.Y., YEN, Y.Y., HUNG, K.C., HSU, S.W., LAN, S.J., LIN, H.C. Inhibitory effects of pu-erh tea on alpha glucosidase and alpha amylase: a systemic review. *Nutrition and Diabetes*, v. 9, p.23. 2019.