

DAVID SPRESSÃO DE LIMA JUNIOR

Amilases do fungo endofítico *Paecilomyces* sp SF 021: Estudos de produção, caracterização e aplicação na hidrólise do amido

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Alonso Bocchini
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Heloíza Ferreira Alves do Prado

Araraquara
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

L732a Lima Junior, David Spressão de
Amilases do fungo endofítico *Paecilomyces* sp SF 021: estudos de produção, caracterização e aplicação na hidrólise do amido / David Spressão de Lima Junior. – Araraquara - SP : [s.n.], 2020 66 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Daniela Alonso Bocchini
Coorientador: Heloiza Ferreira Alves do Prado

1. Amilases. 2. Fungos endofíticos. 3. Planejamento experimental. 4. Fermentação em estado sólido. 5. Hidrólise. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

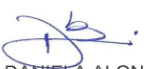
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Amilases do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021: Estudos de produção, caracterização e aplicação na hidrólise do amido"

AUTOR: DAVID SPRESSÃO DE LIMA JÚNIOR

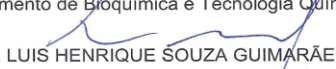
ORIENTADORA: DANIELA ALONSO BOCCHINI

COORDINADORA: HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO

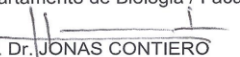
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


Prof.ª, Dr.ª, DANIELA ALONSO BOCCHINI

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto


Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Araraquara, 02 de março de 2020

DADOS CURRICULARES

APRESENTAÇÃO

David Spressão de Lima Junior

Nascimento: 15/08/1992, Marília – SP.

Endereço de acesso ao currículo Lattes: lattes.cnpq.br/2622722366127237

Nome em citações bibliográficas: LIMA JUNIOR, D. S.; LIMA JR, D. S.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Bacharel em Engenharia Biotecnológica (2013-2017)

Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Ciências e Letras de Assis

1. Atividades acadêmicas relevantes Capítulo de livro submetido para publicação:

PEREIRA SCARPA, JOSIANI DE CÁSSIA; BOCCHINI, DANIELA ALONSO; GOMES, ELENÍ; GOMES, JOSÉ ERICK GALINDO; OLIVEIRA, RAISA DÉLI; LIMA JUNIOR, DAVID SPRESSÃO; PEREIRA, WALDIR EDUARDO SIMIONI; OKAMURA, GABRIELA; NASCIMENTO, CARLOS EDUARDO. Microbial plant degrading enzymes: catalysis and application. In. **Natural Materials based Green Composites 2: Biomass**.

2. Participação em eventos científicos:

-IX Simpósio de Microbiologia Aplicada (2019)

Apresentação na forma de painel do trabalho “Studies of amylase production by the endophytic fungi *Paecilomyces* sp. SF 021.”

-XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP (2017)

Apresentação na forma de painel do trabalho “Avaliação da produção de enzimas por *Sporidiobolus pararoseus* Sia 33.1 usando palha de cana e soro de leite.”

- VII Simpósio de Microbiologia Aplicada (2015)

Apresentação na forma de painel do trabalho “Determinação da temperatura ideal de crescimento de leveduras em meio contendo bagaço de cana”.

- VII Simpósio de Microbiologia Aplicada (2015)

ELSNER, V. H. P. ; LIMA JR, D. S. ; ORNELA, P. H. O. ; SHINYA, T. Y. ; OLIVA NETO, P.

Co autoria no trabalho apresentado na forma de painel “Determinação da temperatura ideal de crescimento de leveduras para incremento proteico”.

- XX Simpósio Nacional de Bioprocessos e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (2015)

SHINYA, T. Y. ; ELSNER, V. H. P. ; **LIMA JR, D. S.** ; MORAES, F. T. ; NUNEZ, E. G. F. ; OLIVA NETO, P.

Co autoria no trabalho apresentado na forma de resumo expandido “Produção de enzimas lignocelulolíticas por *Rhodotorula mucilaginosa*: Um novo bioprocesso utilizando bagaço de cana em cultivo submerso”.

- II Workshop de Bioenergia (2014)

SHINYA, T. Y. ; **LIMA JR, D. S.** ; ELSNER, V. H. P. ; ORNELA, P. H. O. ; MORAES, F. T. ; OLIVA NETO, P.

Co autoria no trabalho apresentado na forma de painel “Avaliação da produção de xilanase por levedura utilizando bagaço de cana como substrato”.

3. Outros:

Estágio docência

Estágio realizado junto aos cursos de Química e Química Tecnológica, na Disciplina “Bioquímica Geral e Experimental I”, sob supervisão da Profª Drª Daniela Alonso Bocchini.

Período: Segundo semestre letivo de 2019

Carga horária: 60 horas

Regência de classe – Tema: Lipídeos: Estrutura e função

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Ângela Eliza Busetto, por seu amor e apoio incondicionais e ao meu padrinho, Áureo Busetto, por todo o incentivo, apoio e inspiração ao longo de toda a trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me ter me dado a força, proteção e iluminado meu caminho até aqui.

Aos meus familiares, meu mais sincero e profundo agradecimento a todos vocês, em especial à minha mãe Ângela Eliza, ao meu padrinho Áureo Busetto e à minha madrinha Fátima Aparecida Busetto, e à minha avó querida, Adelina, que ao longo de todos estes anos, não pouparam esforços, em nenhum momento, para que eu continuasse seguindo meu sonho. Obrigado por todo o apoio financeiro e emocional e por, principalmente, acreditarem nos meus sonhos junto comigo e por acreditarem em mim. Sem os inúmeros esforços de cada um de vocês, cada um à sua maneira, nada disso seria possível. Que Deus me permita um dia retribuir devidamente todos vocês, por todo esforço, dedicação e amor.

A Prof^a Dr^a Daniela Alonso Bocchini por ter acreditado em mim e por ter me aceito em seu laboratório e grupo de pesquisa. Obrigado pela sua orientação, pelos seus ensinamentos, pelos inúmeros conselhos, pela sua amizade e pela sua compreensão e paciência nos diversos momentos em que foram necessárias. Obrigado!

A Prof^a Dr^a Heloiza Ferreira Alves do Prado pela co-orientação, ensinamentos e por sua disponibilidade e prontidão ao longo destes dois anos de trabalho.

A pessoa que esteve ao meu lado frente todas às dificuldades e momentos difíceis destes dois anos, Cintia Marcelo de Oliveira. Obrigado por sempre me apoiar, por não ter deixado com que eu desistisse, acreditado em mim quando eu mesmo não fui capaz e por ter sonhado os meus sonhos junto comigo. Obrigado por todo o seu apoio, por ter sido meu porto seguro, minha amiga, confidente e por sempre me ajudar a lembrar de seguir no caminho do meu objetivo maior. Você é incrível. À você, nada menos que o melhor. Obrigado por tudo!

Aos amigos José Aparecido de Oliveira (Cidão), Cleusa Marcelo (Cleclê) e Ricardo Marcelo de Oliveira (Ricardin), por toda a ajuda que me deram, por terem me acolhido e por terem sido minha segunda família. Muito obrigado. Que Deus continue os abençoando.

Aos amigos que a Pós Graduação me presenteou: Fauller Henrique, Jonatas Ângelo e Beatriz Campanhol, por tornarem essa caminhada mais leve e alegre. Pelos momentos de descontração e também pelos de desabafo, muito obrigado.

Aos irmãos que a vida me presenteou, Khalil Nogueira Nicolau e Pedro Henrique Lopes Cardoso (Bigode), por serem minha inspiração, meus exemplos e por todo o apoio e parceria ao longo destes anos.

A Cristina Spressão Doretto pela ajuda financeira durante o início do mestrado.

A Prof^a Dr^a Sandra Regina Pombeiro Sponchiado e ao Prof Dr Rubens Monti por terem aceito o convite para avaliar o trabalho durante o Exame de Qualificação e por suas considerações e sugestões para o trabalho.

Ao Prof Dr Luis Henrique Souza Guimarães e ao Prof Dr Jonas Contiero por terem aceito o convite para avaliar o trabalho final e por suas considerações e sugestões para o trabalho

Ao Prof Dr Gustavo Nakamura Alves Vieira pela indispensável ajuda durante os ensaios de planejamento experimental.

Ao Prof Dr Fernando Massarin por ter cedido, gentilmente, a glucoamilase comercial utilizada neste trabalho.

Ao Instituto de Química de Araraquara, juntamente com todos os seus funcionários, pela estrutura, oportunidade e serviços prestados.

Ao CNPq, pela bolsa de pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

O presente trabalho visou o estudo da produção de amilases pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021, por fermentação submersa (FSbm) e em estado sólido (FES), além da aplicação das enzimas na hidrólise do amido. Os melhores resultados foram obtidos pelo cultivo por FES, destacando-se o farelo de trigo como substrato e, então, ferramentas de planejamento experimental foram empregadas para a otimização das variáveis quantidade e umidade inicial do substrato e quantidade de discos de inóculo, levando a um aumento de 62,53% na atividade amilolítica sacarificante da solução enzimática bruta obtida (de 300 ± 18 para $497,6 \pm 21,92$ U/g). As amilases obtidas sob condições otimizadas foram caracterizadas quanto a pH e temperatura ótimos de atividade, sendo as melhores atividades sacarificantes obtidas em pH 5,1 e 48 °C. As enzimas apresentaram estabilidade frente a uma ampla faixa de pH (3,5-10,-5), mantendo a atividade sacarificante residual acima de 80%. Quanto a termoestabilidade, a atividade sacarificante residual manteve-se acima de 80% em temperaturas entre 35 e 45 °C. A solução enzimática bruta obtida sob as condições de cultivo otimizadas foi aplicada na hidrólise do amido batata e mandioca e os rendimentos obtidos foram 51,4 e 54,1% (25,69 e 27,09 mg glicose/mL de hidrolisado), respectivamente, em 24 horas. Estes rendimentos correspondem a aproximadamente 57 e 67%, respectivamente, dos rendimentos máximos obtidos com o uso de glucoamilase comercial, sob as mesmas condições de hidrólise.

Palavras chave: amilases; fungo endofítico; fermentação submersa; fermentação em estado sólido; otimização; hidrólise enzimática.

ABSTRACT

This work aimed to study the production of amylases by the endophytic fungus *Paecilomyces* sp. SF 021, by submerged fermentation (SmF) and solid-state fermentation (SSF), and the application of amylases in the hydrolysis of starch. Better results were obtained by solid-state cultivation, highlighting the use of wheat bran as substrate. Then, experimental design tools were used for optimize the variables substrate amount, substrate initial moisture and amount of inoculum discs, leading to an increase of 62.53% in the saccharifying amyolytic activity of the crude enzyme solution (from 300 ± 18 up to 497.6 ± 21.92 U/g). The amylases obtained under optimized conditions were characterized regarding optimum pH and temperature of activity, with the best saccharifying activities obtained at pH 5.1 and 48°C. The enzymes also showed stability over a wide pH range (3.5 – 10.5), maintaining residual saccharifying activity above 80%. In terms of thermo stability, residual saccharifying activity remained above 80% at temperatures between 35 and 45°C. The crude enzymatic solution obtained under optimized conditions was applied in the hydrolysis of potato and cassava starch leading to yields of 51.4 and 54.1% (25.69 and 27.09 mg of glucose / mL of hydrolizate), respectively, in 24 hours. These yields correspond to approximately 57 and 67%, respectively, of the maximum yields obtained using commercial glucoamylase, under the same conditions.

Keywords: *amylases; endophytic fungus; submerged fermentation; solid-state fermentation; optimization; enzymatic hydrolysis.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmulas estruturais do amido.	19
Figura 2. Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido.....	20
Figura 3. Curva analítica de glicose utilizada para a determinação das atividades amilolíticas sacarificantes..	31
Figura 4. Atividades amilolíticas sacarificantes obtidas pelos cultivos de <i>Paecilomyces</i> sp. SF 021, por FES (U/g) e FSbm (U/mL), utilizando diferentes subprodutos agroindustriais como fontes de carbono.....	38
Figura 5. Atividades amilolíticas dextrinizantes obtidas pelos cultivos de <i>Paecilomyces</i> sp. SF021, por FES (U/g) e FSbm (U/mL), utilizando diferentes subprodutos agroindustriais como fontes de carbono.....	39
Figura 6. Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na atividade de amilase sacarificante.	44
Figura 7. Superfícies de resposta obtidas para os efeitos do teor de umidade e quantidade de substrato; quantidade de discos de inóculo e quantidade de substrato; quantidade de discos de inóculo e teor de umidade.	46
Figura 8. Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis quantidade e teor de umidade inicial do substrato e quantidade de discos de inóculo para a máxima atividade amilolítica sacarificante.	47
Figura 9. Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na atividade amilolítica sacarificante das amilases.	51
Figura 10. Superfície de resposta obtida para os efeitos do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica sacarificante das amilases.	53
Figura 11. Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e temperatura no planejamento fatorial do tipo face centrada 2 ² , para a máxima atividade amilolítica sacarificante.	54

Figura 12. Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a estabilidade de amilases. ... 56

Figura 13. Hidrólise de amidos de diferentes fontes, a 48 °C, utilizando a solução enzimática bruta obtida através do cultivo do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021 ou glucoamilase comercial de *Aspergillus niger*. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Delineamento de Composto Central Rotacional, valores codificados e reais de cada variável.....	33
Tabela 2. Valores codificados e reais utilizados no planejamento fatorial do tipo face centrada 2^2 para estudo do efeito do pH e temperatura sobre a atividade das amilases.	34
Tabela 3. Ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR), em níveis codificados e reais.....	41
Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para a atividade de amilases.	45
Tabela 5. Planejamento fatorial do tipo face centrada 2^2 , valores codificados e reais das variáveis pH e temperatura e atividade sacarificante relativa das amilases.	49
Tabela 6. : Análise de variância (ANOVA) para a atividade amilolítica sacarificante das amilases.	52

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Objetivos	17
3. Revisão Bibliográfica.....	18
3.1. Amido	18
3.2. Amilases	19
3.3. Aplicações industriais das amilases	22
3.4. Produção de amilases	24
3.5. Fermentação em Estado Sólido (FES), Fermentação Submersa (FSbm) e produção de enzimas	26
4. Materiais e Métodos	28
4.1. Microrganismo	28
4.2. Produção de enzimas	28
4.2.1. Pré inóculo	28
4.2.2. Fermentação em Estado Sólido (FES)	28
4.2.3. Fermentação Submersa (FSbm)	29
4.3. Determinação das atividades enzimáticas	30
4.3.1. Atividade amilolítica sacarificante	30
4.3.2. Atividade amilolítica dextrinizante	31
4.4. Otimização das condições de cultivo para produção de amilases por FES	32
4.4.1. Delineamento de Composto Central Rotacional	32
4.5. Caracterização físico-química das amilases	33
4.5.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da enzima	34
4.5.2. Estabilidade das enzimas frente a variações de pH e temperatura	34
4.6. Ensaio de hidrólise do amido	35
4.7. Quantificação de glicose presente no hidrolisado	35
5. Resultados e Discussão	37
5.1. Produção de amilases por FES e FSbm	37
5.2. Otimização da produção de amilases pelo cultivo por FES	40
5.2.1. Delineamento de Composto Central Rotacional	40
5.3. Caracterização físico química das amilases	49
5.3.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas	49
5.3.2. Estabilidade das enzimas frente a variações de pH e temperatura	55
5.4. Hidrólise enzimática do amido	57
6. Conclusões.....	60
7. Referências Bibliográficas	61

1. Introdução

Fungos são de grande interesse para a Biotecnologia especialmente pela capacidade de crescimento em diferentes substratos, incluindo resíduos naturais como a biomassa vegetal, e consequente produção de enzimas de ampla aplicabilidade industrial, entre as quais amilases (TROIANO, ORSAT e DUMMONT, 2020) . A capacidade de degradação de biomassa e subprodutos agroindustriais via secreção de enzimas é uma característica que tem auxiliado na redução dos impactos gerados a partir do acúmulo e descarte destes materiais no meio ambiente, uma vez que podem ser empregados para o cultivo dos fungos tanto por fermentação submersa (FSbm)(HANSEN *et al.*, 2015) como por fermentação em estado sólido (FES) (GRAMINHA *et al.*, 2008;CARLILE, WATKINSON e GOODAY, 2001).

Os fungos endofíticos, caracterizados por habitarem o interior das plantas conferindo-lhes proteção contra insetos, microrganismos patogênicos e fitófagos, são reconhecidamente importantes produtores de compostos bioativos como anticancerígenos, antimicrobianos e antiinflamatórios (NISA *et al.*, 2015). Tais fungos são também potenciais produtores de enzimas de degradação de material vegetal (BORGES *et al.*, 2009), uma vez que produzem hidrolases extracelulares como parte do seu mecanismo de resistência para superar as defesas do hospedeiro e/ou para obter nutrientes do solo (KUSARI, SING e JAYABASKARAN, 2014).

Vantagens como custo-benefício, menor demanda por tempo e por espaço para produção e facilidade de modificação e otimização dos processos de obtenção justificam a crescente aplicação das enzimas microbianas nos processos industriais (SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2006). As amilases destacam-se neste contexto sendo responsáveis por cerca de 30% do mercado mundial de enzimas, sendo aplicadas em diversos processos industriais (MOBINI-DEHKORDI, M.; JAVAN, 2012), além de ocuparem o segundo lugar em número de patentes, fatores que evidenciam sua relevância e valor comercial (KUMAR *et al.*, 2014).

Dada a diversa aplicabilidade industrial das amilases, sobretudo das α -amilases e glucoamilases, a busca por novos microrganismos produtores tem sido uma constante. Além disso, o crescente interesse pelo desenvolvimento de processos economicamente viáveis para a obtenção destas enzimas torna os subprodutos agroindustriais, de baixo valor agregado e de grande disponibilidade no país, importantes ferramentas para o alcance deste objetivo, uma vez que sua utilização contribui não apenas para a redução dos custos dos processos, mas também, para a minimização de problemas ambientais resultantes de seu acúmulo (MOBINI-DEHKORDI, M.; JAVAN, 2012).

O uso de planejamentos de experimentos tem sido bastante explorado quando se deseja otimizar a produção de enzimas microbianas, uma vez que esta técnica possibilita a triagem de parâmetros que influenciam diretamente no processo em desenvolvimento, oferecendo vantagens como a obtenção de maior precisão estatística na resposta analisada juntamente com a estimativa de níveis ótimos e da existência de interação entre os parâmetros analisados. Desta forma, esta ferramenta contribui para a redução do número de experimentos realizados em escala laboratorial e, conseqüentemente, dos custos experimentais, além de ser importante para ampliação de escala de bioprocessos (TAHARA e ROZENFELD., 2019).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo geral a avaliação da influência das condições de cultivo sobre a produção de amilases pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021, a caracterização físico-química das enzimas e a aplicação na hidrólise do amido. A influência de diferentes subprodutos lignocelulósicos na produção das amilases foi avaliada, tanto por FES quanto por FSbm, tendo sido selecionada a primeira opção de cultivo, empregando-se farelo de trigo não lavado como substrato. Delineamentos experimentais foram então utilizados para verificar a influência da quantidade e umidade inicial do substrato, e da quantidade de discos de inóculo na produção das enzimas. Foi realizada ainda a caracterização físico-química das amilases obtida sob condições otimizadas de cultivo e estas foram empregadas na hidrólise do amido para quantificação da liberação de glicose.

2. Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influências das condições de cultivo sobre a produção de amilases pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021 e aplicação das enzimas na hidrólise do amido.

Os objetivos específicos foram:

- avaliar a influência de diferentes subprodutos lignocelulósicos/amilolíticos na produção de amilases por fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSbm) e selecionar o melhor modo de cultivo para a obtenção de uma solução enzimática com alta atividade amilolítica, com base na atividade sacarificante;
- empregar delineamentos experimentais para a produção das amilases, avaliando-se a influência das variáveis quantidade e umidade inicial do substrato e quantidade de discos de inóculo, visando a otimização das condições de cultivo, tendo como resposta analisada a atividade sacarificante;
- caracterizar as amilases obtidas sob a condição de cultivo otimizada, quanto a pH e temperaturas ótimos de atividade e de estabilidade;
- aplicar a solução enzimática bruta obtida a partir do cultivo do fungo *Paecilomyces* sp. SF 021 na hidrólise de diferentes tipos de amido, quantificando-se a liberação de glicose no hidrolisado obtido;
- realizar a hidrólise dos diferentes tipos de amido empregando-se a glucoamilase comercial de *Aspergillus niger* (A7095 – Sigma Aldrich), sob as mesmas condições utilizadas com o emprego o extrato enzimático fúngico, para fins comparativos.

3. Revisão Bibliográfica

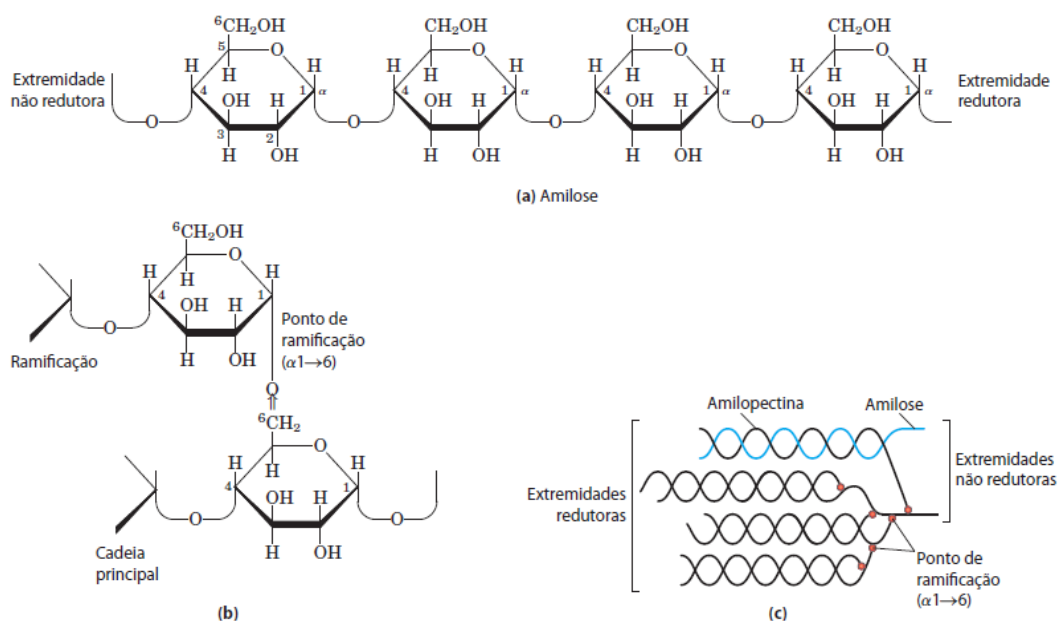
3.1. Amido

O amido é a principal fonte de reserva energética dos vegetais, sendo comumente encontrado nas sementes, tubérculos, frutas, caules e folhas. Por esta razão, desempenha um importante papel na nutrição humana, como a principal fonte de carboidratos de grãos, cereais, leguminosas, tubérculos e raízes, e mais recentemente, considerado também uma interessante fonte de fibra alimentar (BERTOFT, 2017).

Trata-se de um homopolissacarídeo composto por unidades monoméricas de glicose organizadas sob a forma de dois polímeros: amilose e amilopectina (AI e JANE, 2018). A amilose (Figura 1a), constituinte da região amorfa de um grão de amido, é um polímero majoritariamente linear e, em que os monômeros de glicose encontram-se unidos por ligações glicosídicas α -1,4 e as poucas ramificações existentes ocorrem mediante ligações glicosídicas α -1,6. Por outro lado, a amilopectina (Figura 1b), responsável pela região de lamela cristalina do grão de amido, é um polímero altamente ramificado, com ramificações a cada 25-30 resíduos de glicose ao longo de sua porção linear. A presença de uma região amorfa e de uma região cristalina nos grãos de amido é o que permite a classificação como biopolímeros semicristalinos (AI e JANE, 2018; BELLO PEREZ e AGAMA-ACEVEDO, 2017; BERTOFT, 2017).

A composição de um grão de amido tende a variar de acordo com a sua origem, porém, de modo geral, é constituído por 25-30% de amilose e 70-75% de amilopectina (NELSON e COX, 2014). No entanto, alguns grãos (amido ceroso) apresentam um elevado teor de amilopectina (98-99%) enquanto outros podem apresentar um alto conteúdo de amilose (50-70%). Em dispersões aquosas, a amilose apresenta maior tendência de sofrer retrogradação, além de formar géis e filmes fortes, desenvolvendo uma cor azul escuro ao se complexar com o iodo enquanto que a amilopectina é caracterizada por sofrer retrogradação mais lentamente e por formar géis fracos e películas quebradiças. Quando na presença de iodo, a amilopectina apresenta coloração roxa avermelhada (COPELAND *et al.*, 2009; SCHMIELE, SAMPAIO e PEDROSA SILVA CLERICI, 2019).

Figura 1. Fórmulas estruturais do amido. a) amilose b) ponto de ramificação na amilopectina c) agrupamento entre amilose e amilopectina nos grânulos de amido



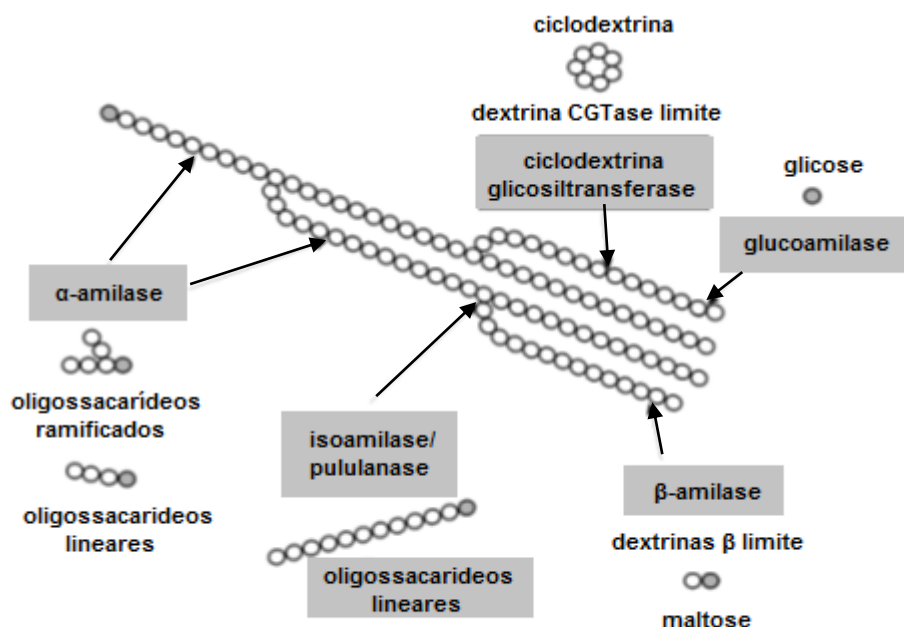
Fonte: NELSON e COX, 2014.

3.2. Amilases

O processamento enzimático do amido proporciona uma variedade de produtos de importância e interesse industrial, tais como xarope de glicose, frutose, derivados de malto e ciclodextrina, a depender do tipo de amilase empregada (SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2006).

As amilases são enzimas que realizam a catálise da clivagem das ligações glicosídicas presentes entre as unidades monoméricas de glicose que constituem a molécula do amido. O amido, sendo uma macromolécula complexa, possui diferentes pontos de clivagem ao longo de sua estrutura, o que possibilita a obtenção de diferentes produtos através da ação destas biomoléculas. Desta forma, as amilases podem ser classificadas, de acordo com o local em que exercem sua ação, em: endoamilases, exoamilases, amilases desramificantes e transferases (Figura 2) (MOLLER e SVENSSON, 2016).

Figura 2. Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (●) extremidade redutora; (o) extremidade não redutora (→) indicam o ponto de clivagem preferido na molécula de amido.



Fonte: Veen, 2000(adaptado).

As α -amilases (EC 3.2.1.1) são endoamilases que atuam aleatoriamente no interior da molécula de amido, hidrolisando as ligações glicosídicas α -1,4. No entanto, a especificidade das α -amilases para estas ligações não é absoluta e algumas podem hidrolisar ligações α -1,6, em menor grau. É a mais importante das amilases, pois desempenha um papel fundamental na conversão do amido em produtos de baixo peso molecular, que podem então ser utilizados por outras enzimas do mesmo grupo (PEIXOTO *et al.*, 2003). Os principais produtos de hidrólise do amido pela ação das α -amilases são maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e oligossacarídeos ramificados podendo ainda haver a liberação de maltose e glicose (EZEJI, T. C.; BAHL, 2006; NAJAFI, DEOBAGKAR e DEOBAGKAR, 2005).

As glucoamilases (1,4- α -D-glucanoglucohidrolase. EC 3.2.1.3), também conhecidas como amiloglicosidases, são produzidas principalmente por fungos. São exoamilases que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 a partir de uma extremidade não redutora da molécula de amido, liberando glicose. Em uma velocidade menor, também atuam hidrolisando as ligações α -1,6. Sugere-se, portanto, que a ação das glucoamilases ocorra por meio de um mecanismo multiseriado pelo qual as enzimas atuam aleatoriamente em toda a molécula do substrato (KNIGHT e MAZZIEIRO, 2000).

As β -amilases (EC 3.2.1.2) são exoamilases que atuam na penúltima ligação glicosídica α -1,4, a partir de uma extremidade não redutora do amido, liberando maltose. Neste caso há ainda a inversão da configuração anomérica da maltose, que é liberada na configuração β . Esta enzima é incapaz de hidrolisar ligações α -1,6 de substratos ramificados (HORVÁTHOVÁ, JANECEK e ŠTURDIK, 2000).

O grupo das amilases desramificantes é constituído pelas isoamilases (EC 3.2.1.68), pululanase I (EC 3.2.1.41) e pululanase II (EC 3.2.1.1/41). As isoamilases hidrolisam as ligações α -1,6 da amilopectina e de dextrinas ramificadas produzindo maltotriose e maltooligossacarídeos. A pululanase I atua nas ligações α -1,6 da pululana, um polissacarídeo linear que consiste de maltotrioses unidas por ligações glicosídicas α -1,6 e que não pode ser degradado por α - ou β -amilase. Os produtos da ação da pululanase I são maltose e oligossacarídeos lineares. As pululanases II, além de atuarem nas ligações glicosídicas α -1,6 da pululana, também atuam nas ligações α -1,4 do amido, liberando glicose, maltose, maltotriose e outros oligossacarídeos lineares (MOHANAN e SATYANARAYANA, 2018).

Por fim, no grupo das transferases encontram-se as ciclodextrinas glicosiltransferases (EC 2.4.1.19). São caracterizadas pela liberação de oligossacarídeos cíclicos e por serem as únicas capazes de converter o amido e uma mistura de açúcares não redutores (ciclodextrinas). Estas enzimas, porém, também são capazes de produzir açúcares e dextrinas lineares (HORVÁTHOVÁ, JANECEK e ŠTURDIK, 2000; VIHINEN e MANTSALA, 1989).

3.3. Aplicações industriais das amilases

Por apresentarem elevada afinidade pelos seus substratos e também não contribuírem para a formação de produtos indesejáveis, o emprego de enzimas em processos industriais de hidrólise é mais vantajoso quando comparado aos métodos que utilizam ácidos para a mesma finalidade (BALLESTEROS *et al.*, 2002). Nesse sentido, as amilases representam excelente alternativa ao método clássico de hidrólise do amido, substituindo a utilização de elevadas temperaturas e meios ácidos para esta finalidade (WANG, LIANG e LIANG, 2011) e foram as primeiras enzimas de origem microbiana a serem aplicadas, em larga escala, na indústria alimentícia (SINGHANIA *et al.*, 2015). As amilases são, portanto, enzimas de grande importância industrial, dada a capacidade de realizarem a conversão do amido em diferentes produtos, estando presentes em diversos processos e setores industriais além do alimentício, tais como indústrias de detergentes, papéis, têxteis, panificação, indústria química, produtos farmacêuticos, hidrólise do amido e fabricação de etanol (CASTRO *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2003).

No setor de alimentos, as amilases são amplamente empregadas na panificação, produção de bebidas, sucos de frutas, bolos e xaropes. Na panificação a ação das α -amilases auxiliam na degradação do amido em dextrinas menores que serão posteriormente fermentadas pela ação de leveduras. Dessa maneira, além de contribuir para uma quantidade adicional de açúcar à massa, a adição de amilases resulta em uma massa mais volumosa, de melhor textura e menos viscosa, contribuindo também para o aumento da taxa de fermentação (ASTRAY *et al.*, 2009; SINGH e KUMAR, 2018; SYNOWIECKI, 2007).

De maneira semelhante, as amilases estão presentes também na produção de bebidas alcoólicas, como a cerveja, auxiliando na degradação do amido presente nos grãos a fim de aumentar liberação de glicose e consequente taxa de fermentação pelas leveduras (GUERRA *et al.*, 2009; SAMMARTINO, 2015). Ainda no setor de bebidas, as amilases podem ser utilizadas em conjunto com outras enzimas, como as pectinases, durante o processamento de sucos de frutas, auxiliando nas etapas de maceração,

liquefação e clarificação, a fim de se melhorar os rendimentos e a rentabilidade (SILVA, DA, 2013; SINGH e KUMAR, 2018).

Na indústria do papel são aplicadas em etapas de modificação do amido, empregado como cobertura do papel a fim de se criar uma barreira de proteção contra danos mecânicos durante o processamento e contribuir para um produto final de melhor qualidade em termos de apagabilidade e resistência (GUPTA *et al.*, 2003).

Durante a fabricação de tecidos costuma-se aplicar uma camada removível de proteção, constituída a partir de gomas de amido ou derivados, a fim de se proporcionar maior resistência aos fios durante o processo de tecelagem. Nesse sentido, as amilases são aplicadas na indústria têxtil com o objetivo de remover as gomas, em substituição à utilização de oxidantes, ácidos ou bases, capazes de danificar a celulose presente no tecido. As amilases atuam degradando o amido em dextrinas menores, solúveis em água, facilmente removíveis através da lavagem (BASTIAN e ROCCO, 2009; CEGARRA, 2000).

As amilases são empregadas, juntamente outras enzimas como proteases, celulasas e lipases, na formulação de detergentes visando aumentar a eficiência na remoção de manchas e no cuidados com tecidos. O uso de detergentes enzimáticos contribui para a redução dos impactos e danos ambientais, uma vez que não apresentam riscos à vida marinha, serem biodegradáveis e as enzimas serem obtidas a partir de fontes renováveis. Além disso, os detergentes enzimáticos proporcionam maior eficiência, dada a sua alta especificidade, contribuindo para a redução no consumo de energia e água. A presença das amilases nestes produtos contribui para a remoção de manchas de chocolate, massas, arroz, entre outras (BON *et al.*, 2008; GUPTA *et al.*, 2003; ITO *et al.*, 1998; OLSEN e FALHOLT, 1998).

Nas últimas décadas, a necessidade de alternativas ao uso de combustíveis fósseis para o atendimento da demanda energética crescente tem impulsionado as pesquisas envolvendo as amilases para a obtenção de glicose a partir de subprodutos amiláceos, a qual pode ser convertida a etanol de segunda geração por microrganismos fermentadores, em um processo menos prejudicial ao meio ambiente (MOHANAN e SATYANARAYANA, 2018).

3.4. Produção de amilases

As amilases podem ser obtidas a partir de fontes vegetais, animais e microbianas (HORVÁTHOVÁ, JANECEK e ŠTURDIK, 2000). Porém, as obtidas através do cultivo de microrganismos, como fungos e bactérias, são as mais empregadas industrialmente. Isso se deve à facilidade de cultivo destes organismos em larga escala. Diversos microrganismos são capazes de produzir enzimas de interesse em quantidades elevadas. Além disso, fungos e bactérias podem ser manipulados geneticamente visando a obtenção de linhagens mutantes superprodutoras das enzimas. Desta forma, é crescente o interesse na prospecção de enzimas extracelulares, incluindo as amilases, a partir de novas linhagens microbianas (SANCHEZ e DEMAINE, 2017; SALEEM e EBRAHIM, 2013; GUPTA *et al.*, 2003).

O fungos, sobretudo os filamentosos, destacam-se como excelentes produtores de amilases industriais, por serem organismos versáteis quanto à utilização de diferentes substratos, incluindo subprodutos agroindustriais, e metabolização de diferentes fontes de carbono (BHARATHIRAJA *et al.*, 2017; SANCHEZ e DEMAINE, 2017; SINGH, SINGH e PANDEY, 2019; TROIANO, ORSAT e DUMMONT, 2020). Porém, apesar da grande diversidade de fungos existentes na natureza, apenas algumas dezenas de espécies foram e são exploradas para a produção comercial de amilases e outras enzimas, de tal maneira que os fungos do gênero *Aspergillus*, mais especificamente *A. oryzae* e *A. niger* representam os maiores produtores de enzimas industriais, atualmente (TROIANO, ORSAT e DUMMONT, 2020).

Os fungos endofíticos representam um grupo de organismos muito diversificado, presentes na maioria das plantas ecossistemas naturais sem provocar sintomas externos (KOGEL, FRANKEN e HÜCKELHOVEN, 2006). O termo endófito, segundo Stone, Bacon e White (2000) e Schulz e Boyle (2005), é utilizado para designar organismos que, durante algum período de seu ciclo vital, colonizam os tecidos vivos de seus hospedeiros, sendo esta uma definição suficientemente ampla para incluir qualquer organismo que resida no interior de uma planta hospedeira, inclusive aquela aparentemente saudável. Fungos endofíticos são considerados uma excelente fonte de novos

compostos naturais bioativos e têm despertado interesse por serem potenciais produtores de enzimas de degradação de material vegetal, incluindo as amilases (CORREA *et al.*, 2014).

A maioria dos estudos sobre a prospecção de enzimas de degradação de material vegetal entre fungos endofíticos envolve a análise qualitativa, pelo cultivo em meios solidificados em placas e avaliação dos halos de hidrólise dos substratos (RAVIRAJA, MARIA e SRIDHAR, 2006) ou análise quantitativa pelo cultivo em fermentação submersa (FSbm) (OKUNOWO *et al.*, 2010). Estudos envolvendo prospecção pelo cultivo dos fungos por fermentação em estado sólido (FES) são menos frequentes e abordam a produção por alguns gêneros endofíticos mais estudados (KAPOOR *et al.*, 2010). Especificamente em relação às amilases, embora as possibilidades de aplicação industrial sejam amplas, o uso comercial destas enzimas restringe-se àquelas produzidas por fungos e bactérias muito bem descritas na literatura. O exposto ressalta a importância de estudos envolvendo novas linhagens microbianas, especialmente de fungos endofíticos, incluindo análises quantitativas, emprego de diferentes modos de produção como a FES e, ainda, uso de diferentes substratos como, por exemplo, os subprodutos agroindustriais, baratos e amplamente disponíveis, no intuito de se obter enzimas com características que atendam à demanda atual do mercado, ou seja, ativas e estáveis em ampla faixa de pH e temperatura.

O Brasil destaca-se em biodiversidade, sendo uma fonte riquíssima para a exploração de linhagens microbianas produtoras de enzimas, incluindo as amilases. Além disso, o crescente interesse pelo desenvolvimento de processos economicamente viáveis para a obtenção destas enzimas tornam os subprodutos agroindustriais, de baixo valor agregado e de grande disponibilidade no país, importantes ferramentas para o alcance deste objetivo, contribuindo também para resolução de problemas ambientais resultantes da acumulação destes (BHARATHIRAJA *et al.*, 2017).

3.5. Fermentação em Estado Sólido (FES), Fermentação Submersa (FSbm) e produção de enzimas

Define-se a fermentação em estado sólido (FES) como o bioprocesso realizado na ausência ou quase ausência de água livre para o crescimento microbiano. Porém, a matriz sólida a ser utilizada deve possuir umidade mínima necessária para que o microrganismo seja capaz de desenvolver suas atividades metabólicas e manter seu crescimento. A matriz sólida pode servir como fonte de carbono e demais nutrientes ou ainda, caso seja constituída por um material inerte, atuar apenas como suporte para o crescimento do microrganismo havendo, neste caso, a necessidade de suplementação com nutrientes, incluindo carbono (SOCCOL, C. R. *et al.*, 2017; THOMAS, LARROCHE e PANDEY, 2013).

A FES apresenta algumas importantes vantagens biotecnológicas, tais como menor demanda de energia para esterilização, menor suscetibilidade à contaminações. Do ponto de vista dos produtos obtidos, este método de cultivo proporciona uma maior produtividade, maior concentração final dos produtos, maior estabilidade do produto e menor repressão catabólica. Além disso, a FES possibilita a utilização de substratos insolúveis em água (como os subprodutos agroindustriais, de baixo custo e amplamente disponíveis), apresentando uma importante vantagem do ponto de vista ambiental (SINGHANIA *et al.*, 2009; SOCCOL *et al.*, 2017).

Há no entanto, uma preferência, por parte das indústrias, pela utilização da fermentação submersa (FSbm) para a produção de enzimas microbianas. Trata-se de um processo no qual os microrganismos são cultivados em meios líquidos, com uma grande quantidade de água livre. Esta preferência é atribuída à maior facilidade de desenvolvimento de reatores destinados a este processo. Além disso, esta tecnologia apresenta diversas vantagens, principalmente em relação à maior facilidade de monitoramento dos parâmetros do processo como temperatura, agitação, aeração, pH, entre outros, os quais podem ser extensivamente controlados, dependendo do tipo de reator empregado. A FSbm também possibilita aos microrganismos uma melhor

absorção de nutrientes e facilita a recuperação dos seus metabólitos (CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

Neste sentido, a utilização de FES para a produção de enzimas industriais, sobretudo das amilases, representa uma interessante alternativa ao método tradicionalmente empregado, pois além de mimetizar o habitat natural da maioria dos microrganismos, possibilita a reutilização de subprodutos agroindustriais, de baixo valor agregado, contribuindo não só para a redução dos custos associados ao processo de produção de enzimas mas também para a minimização dos danos ambientais associados ao acúmulo e descarte destes materiais (SOCCOL, C. R. *et al.*, 2017; THOMAS, LARROCHE e PANDEY, 2013).

Ambos os métodos de cultivo são utilizados para produção de enzimas microbianas de interesse industrial e amplamente descritos na literatura, como é o caso da produção de amilases por *Aspergillus awamori*, por FES (KARAM *et al.*, 2017) e por *Bacillus amyloliquefaciens*, por FSbm (ABD-ELHALEM *et al.*, 2015) assim como a produção de celulases por *Trichoderma harzanium* por ambos os métodos de cultivo (RAMAMOORTHY, SAMBAVI e RENGANATHAN, 2019) entre outros estudos.

4. Materiais e Métodos

4.1. Microrganismo

Foi utilizado o fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021 pertencente à coleção de culturas do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do IQ/UNESP. As culturas foram preservadas em frascos de vidro contendo água deionizada estéril, segundo metodologia descrita por Castellani (1939). Culturas estoque são também preservadas por congelamento a - 80°C, em solução de glicerol a 20%. Para o estabelecimento das culturas de trabalho, a fim de se evitar repiques sucessivos, o fungo foi repicado em meio Agar Sabouraud Dextrose (Himedia) em placas de Petri mantidas a 28 °C, por 7 dias, e então repicado, sob as mesmas condições, em tubos de ensaio contendo o Agar inclinado, fechados com tampa de rosca e mantidos a 28 °C.

4.2. Produção de enzimas

4.2.1. Pré inóculo

O fungo foi pré cultivado em Ágar Batata Dextrose (BDA) (Kasvi), em placas de Petri, por 7 dias, a 28 °C. Posteriormente, discos miceliais de 8,0 mm de diâmetro foram tomados e utilizados como inóculo para os cultivos em estados sólido e submerso.

4.2.2. Fermentação em Estado Sólido (FES)

Diferentes subprodutos lignocelulósicos/amilolíticos e/ou em suas misturas (1:1 p/p) foram utilizados como substratos para o crescimento do fungo, a saber: bagaço de cana-de-açúcar, aveia, resíduo de malte obtido após moagem em cervejaria, farelo de trigo, farelo de soja e quirera de arroz. O bagaço de cana - de- açúcar foi previamente lavado, seco a 45 °C em estufa de circulação de ar, processado em triturador e peneirado em peneira de 0,59 mm de malha. O farelo de trigo foi utilizado sem e com lavagem prévia seguida apenas de secagem, como descrito para o bagaço. Os demais materiais não foram lavados nem processados. Os cultivos por fermentação em estado sólido

foram realizados utilizando-se frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5g da fonte de carbono com umidade inicial em 70 %, proporcionada pela adição de solução nutriente composta por (g/L): KH_2PO_4 (3,0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), CaCl_2 (0,5) e solução de sais (0,1% v/v), cuja composição se dá por (mg/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,0), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,6), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,4), CoCl_2 (2,0). Cada frasco, contendo o substrato já umedecido, foi autoclavado a 121 °C, sob 1 atm, por 20 minutos, resfriado a temperatura ambiente e, então, inoculado com 5 discos miceliais obtidos a partir do pré cultivo em BDA. As FES foram mantidas a 28 °C, por 7 dias e, após este período, 50 mL de água destilada foram adicionados a cada frasco para a extração das enzimas. A mistura foi homogeneizada manualmente com auxílio de bastão de vidro e, então, mantida sob agitação de 150 rpm, por 1 hora, sob temperatura ambiente. O material foi filtrado em tecido de nylon, a fase líquida foi centrifugada a 10.000 xg, a 5 °C, por 20 minutos e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta para a determinação das atividades amilolíticas. Todos os cultivos foram realizados em duplicata e nesta etapa definiu-se, com base na atividade sacarificante qual o substrato mais adequado para a produção das amilases por FES.

4.2.3. Fermentação Submersa (FSbm)

Os cultivos por fermentação submersa foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de meio de cultivo composto por solução nutriente (item 4.2.2), subproduto lignocelulósico/amilolítico e/ou suas misturas (item 4.2.2) a 30,0 g/L como substrato para crescimento, além de peptona e extrato de levedura (Himedia), a 2,0 g/L cada. Os frascos foram inoculados com 5 discos miceliais obtidos a partir do pré cultivo em BDA e mantidos a 28 °C, por 7 dias, sob agitação de 150 rpm. Após este período, os conteúdos dos frascos foram filtrados em tecido de nylon e as fases líquidas centrifugadas a 10.000 xg, por 20 min, a 5 °C. Os sobrenadantes foram usados como soluções enzimáticas para a determinação das atividades amilolíticas. Todos os cultivos foram realizados em duplicata e nesta etapa definiu-se, com base na atividade sacarificante, qual o substrato mais adequado para a produção das amilases por FSbm.

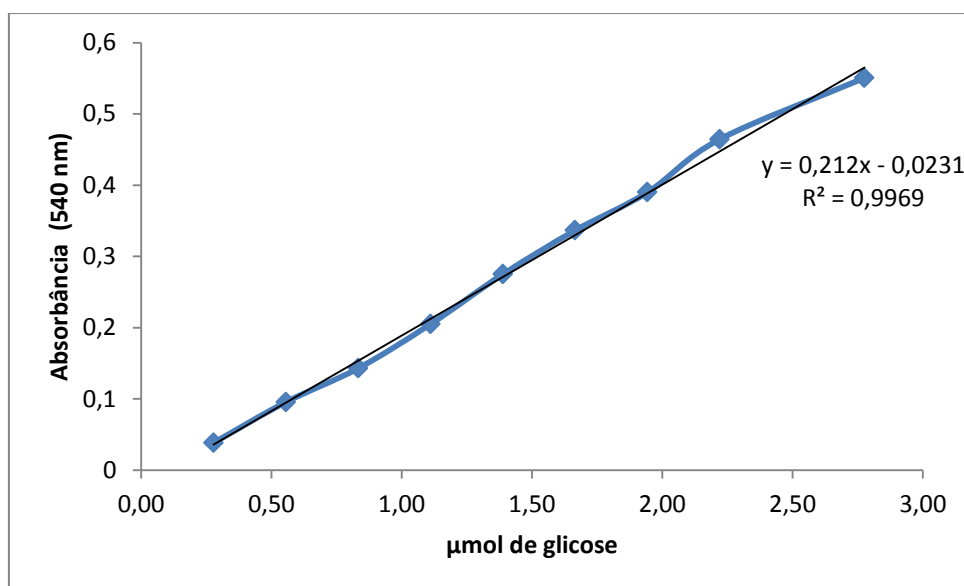
4.3. Determinação das atividades enzimáticas

Para o desenvolvimento dos protocolos a seguir, o amido foi previamente gelatinizado em microondas, garantindo assim a total homogeneização do substrato. Foram determinadas as atividades amilolíticas sacarificante e dextrinizante das soluções enzimáticas obtidas. Em todo o texto, U/g refere-se a Unidade de atividade enzimática por grama da fonte de carbono utilizada na FES.

4.3.1. Atividade amilolítica sacarificante

A mistura de reação utilizada para se determinar a atividade sacarificante constituiu-se por 450 μ L de solução de substrato (amido solúvel - Sigma) a 5,0 g/L em solução tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 5,0) e 50 μ L de solução enzimática bruta convenientemente diluída em água destilada. A reação foi mantida a 50 °C por 10 minutos e, então, interrompida pela adição de 500 μ L do reagente DNS para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por Miller (1959), a partir da curva analítica de glicose (Figura 3). O controle da reação foi obtido através da adição prévia do reagente de DNS em relação à adição da solução enzimática bruta, a fim de se garantir a não ocorrência da reação. Ambas as misturas (reação e controle) foram levadas ao banho de ebulição a 100 °C, por 5 minutos, resfriadas em banho de gelo, adicionadas de 4,0 mL de água destilada e homogeneizadas. Os valores de absorbância foram lidos em espectrofotômetro a 540 nm. Como branco utilizado para zerar o aparelho, foi utilizado a mistura de 500 μ L de água destilada e 500 μ L de DNS, também submetida à fervura e posterior adição de água destilada como descrito acima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio acima citadas.

Figura 3. Curva analítica de glicose utilizada para a determinação das atividades amilolíticas sacarificantes.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.2. Atividade amilolítica dextrinizante

A atividade dextrinizante foi determinada com base na diminuição da capacidade de complexação entre o amido e o iodo, como descrito por Pongsawasdi e Yagisawa (1987) e Fuwa (1954), com algumas modificações. Ao tubo de reação foram adicionados 300 μL de solução de substrato (amido solúvel a 5,0 g/L em solução tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 5,0) e 100 μL de solução enzimática bruta convenientemente diluída. A mistura foi incubada a 50 °C por 10 minutos e, então, a reação foi interrompida pela adição de 4,0 mL de solução de HCl 0,2 mol/L. Em seguida, 500 μL da solução de iodo composta por KI (3 g/L) e I₂ (0,3 g/L) foram adicionados. A mistura foi homogeneizada e 10,0 mL de água destilada foram adicionados. Após homogeneização, a leitura da absorbância foi realizada a 700 nm. O controle constituía-se dos mesmos constituintes da mistura de reação, porém a solução enzimática bruta foi o último componente adicionado. O branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro, foi feito substituindo-se as soluções de substrato, de HCl e enzimática pelos volumes equivalentes de água destilada. Definiu-se uma unidade enzimática como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% a intensidade de cor azul do complexo iodo-amido por minuto, calculada através da fórmula abaixo:

$$\frac{U}{mL} = \left[\frac{Abs\ controle - Abs\ reação}{Abs\ controle} \right] * \left(\frac{100}{10} \right) * \left(\frac{Volume\ de\ enzima}{Volume\ de\ reação} \right) * Tempo\ de\ reação * diluição$$

4.4. Otimização das condições de cultivo para produção de amilases por FES

Delineamentos experimentais foram empregados para a avaliação da influência das variáveis quantidade do substrato para crescimento do fungo, quantidade de inóculo e umidade inicial do substrato, buscando-se a otimização das condições de cultivo. A escolha do tipo de delineamento foi feita com base em dados de literatura, levando-se em conta o número de variáveis a serem estudadas. A resposta analisada foi a atividade amilolítica sacarificante, enquanto que as atividades dextrinizante e de glucoamilase serão também determinadas na solução enzimática bruta obtida sob a condição otimizada. Análise de variância (ANOVA) foi realizada para estimar os efeitos das variáveis e de suas interações sobre a resposta. As análises de regressão e gráficas foram realizadas utilizando-se o *software* Statistica 10 (StatSoft Inc, Tulsa, Oklahoma, USA).

4.4.1. Delineamento de Composto Central Rotacional

Para a análise da influência das variáveis quantidade e umidade inicial do substrato utilizado para o cultivo por FES e quantidade de discos de inóculo, foi realizado um planejamento do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), onde o efeito das variáveis foi estudado em cinco níveis (Tabela 1).

Os valores mínimos e máximos das variáveis estudadas foram definidos durante a realização de experimentos prévios.

Tabela 1. Delineamento de Composto Central Rotacional, valores codificados e reais de cada variável.

Variáveis	Níveis					Unidades
	-1,68	-1	0	1	1,68	
X₁–Quantidade de substrato	2,96	5	8	11	13,04	g
X₂- Umidade inicial	61,59	65	70	75	78,4	%
X₃- Discos de Inóculo	2,96	5	8	11	13,04	discos

Fonte: Elaborado pelo autor

A resposta avaliada foi a atividade amilolítica sacarificante, modelada por uma equação polinomial de segunda ordem, apresentada abaixo (Equação 1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_2 X_2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_3 X_3 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon \quad (1)$$

Onde, Y é a resposta predita; β_0 é o termo de intercepto; β_1 , β_2 , β_3 são os efeitos lineares; β_{11} , β_{22} , β_{33} são os efeitos quadráticos; β_{12} , β_{13} e β_{23} são os efeitos de interação; e x_1 , x_2 e x_3 são as variáveis independentes, e 'ε' é o erro experimental. A análise dos dados dos delineamentos experimentais foi realizada utilizando-se o *software* estatístico Statistica 10 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para estimar os parâmetros estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5%.

4.5. Caracterização físico-química das amilases

As amilases produzidas sob a condição de cultivo otimizada foram caracterizadas quanto ao efeito do pH e da temperatura sobre a atividade e a estabilidade enzimática.

4.5.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da enzima

O estudo do efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das amilases foi realizado através de um delineamento fatorial do tipo face centrada 2^2 , em dois níveis, com 12 ensaios, incluindo 4 pontos axiais e 4 pontos centrais, sendo a atividade sacarificante a resposta analisada. A Tabela 2 apresenta os valores codificados e reais das variáveis estudadas. As soluções tampão utilizadas foram acetato de sódio (pH 3,5 e pH 5,5) e Tris-HCl (pH 7,5), ambas a 0,1 mol/L.

Tabela 2. Valores codificados e reais utilizados no planejamento fatorial do tipo face centrada 2^2 para estudo do efeito do pH e temperatura sobre a atividade das amilases.

Variável	Níveis			Unidade
	-1	0	+1	
X_1 (pH)	3,5	5,5	7,5	-
X_2 (temperatura)	40	50	60	°C

Fonte: Elaborado pelo autor

4.5.2. Estabilidade das enzimas frente a variações de pH e temperatura

A fim de se avaliar o efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas, as mesmas foram incubadas, convenientemente diluídas, por 24h, a 25°C, em soluções tampão (0,05 mol/L) de diferentes valores de pH: tampão acetato de sódio (3,5 – 5,5), Tris – NaOH (5,5 – 7,0), Tris-HCl (7,2 – 9,0), Glicina-NaOH (9,0 – 10,5). A termoestabilidade das amilases foi avaliada incubando-se a solução enzimática bruta, adequadamente diluída em tampão acetato de sódio (0,05 mol/L), pH 5,0, sob temperaturas de 30 a 70 °C, por uma hora. A atividade residual foi determinada sob as condições ótimas de reação. Foi considerado como 100% a atividade sacarificante previamente quantificada, sob as condições ótimas de pH e temperatura.

4.6. Ensaios de hidrólise do amido

As reações de hidrólise do amido foram conduzidas empregando-se os valores de pH e temperatura ótimos de atividade, previamente determinados. Como substratos foram utilizados amido de batata comercial (Sigma) e amido extraído do subproduto obtido a partir do processamento da mandioca, ambos gelatinizados em tampão acetato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,1, em concentração final de 5% (m/v). Os substratos foram incubados juntamente com a solução enzimática bruta (1,5 U/mL de solução de substrato), a 48°C e 100 rpm. Amostras foram retiradas após 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600, 720 e 1440 minutos de reação para análise dos produtos quanto ao teor de glicose. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Os rendimentos dos processos de hidrólise foram calculados com base na concentração de glicose obtida em função da quantidade de substrato ofertado, expressos em porcentagem.

$$\text{Rendimento (\%)} = \left[\frac{\text{massa de glicose obtida}}{\text{massa de substrato ofertado}} \right] * 100$$

4.7. Quantificação de glicose presente no hidrolisado

A glicose liberada durante os ensaios de hidrólise do amido foi quantificada pelo método enzimático peroxidase/glicose-oxidase utilizando Kit comercial (Glicose – Método Enzimático-Colorimétrico/Analisa). A mistura de reação foi constituída de 10 µL do hidrolisado e 1000 µL do reagente de cor. A 1000 µL do reagente de cor foram adicionados 10 µL de uma solução padrão de glicose (100 mg/mL), compondo a mistura padrão do ensaio. Como branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro, utilizou-se 1000 µL do reagente de cor. A mistura de reação e o controle foram incubados a 37 °C, por 10 minutos e então as absorbâncias foram lidas em 505 nm. Os cálculos para determinação da concentração de glicose presente no hidrolisado estão apresentados a seguir:

$$Fator\ de\ calibração = \frac{Concentração\ do\ padrão}{Absorbância\ do\ padrão}$$

$$Concentração\ de\ glicose\ \left(\frac{mg}{dL}\right) = Fator\ de\ calibração * Absorbância\ do\ hidrolisado$$

5. Resultados e Discussão

5.1. Produção de amilases por FES e FSbm

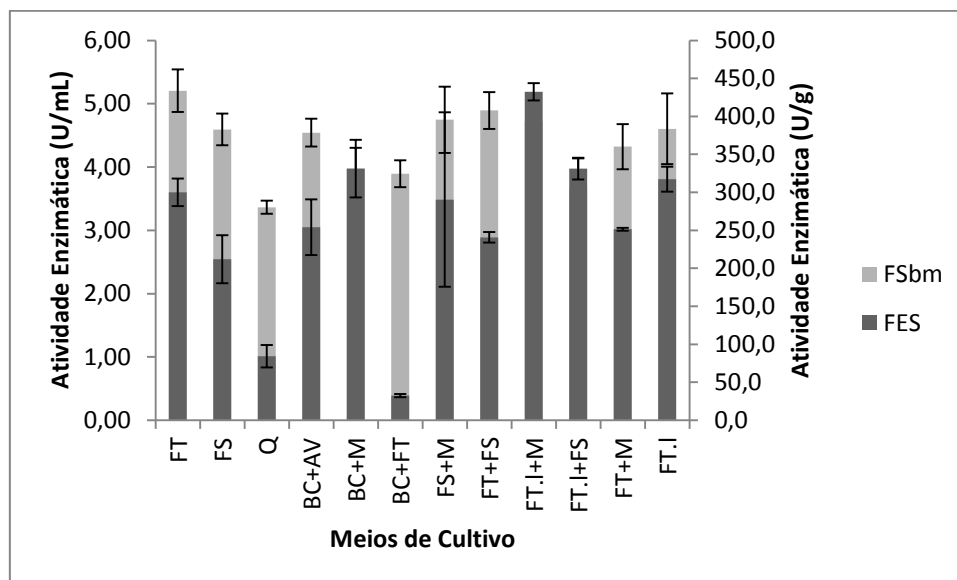
O emprego de FES para a produção de amilases pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021 proporcionou os maiores valores de atividades enzimáticas amilolíticas, tanto sacarificante quanto dextrinizante (Figuras 4 e 5).

Além disso, os cultivos por FES em substratos lignocelulósicos/amilolíticos destacaram a capacidade deste fungo de utilizar tais substratos como única fonte de carbono para seu crescimento e produção das enzimas.

De acordo com a Figura 4, a maior atividade sacarificante foi obtida pelo cultivo do fungo, por FES, na mistura de farelo de trigo lavado e malte (FT.I + M) (432,5 U/g).

As misturas contendo farelo de trigo lavado e farelo de soja (FT.I + FS) (331,4 U/g), bagaço de cana e malte (BC + M) (331,1 U/g) e o uso isolado de farelo de trigo lavado (FT.I) (317,2 U/g) e farelo de trigo sem lavar (FT) (300 U/g) proporcionaram atividades sacarificantes semelhantes. O mesmo pode ser observado nas seguintes misturas: farelo de trigo sem lavar e malte (FT + M) (251,4 U/g) farelo de trigo sem lavar e farelo de soja (FT + FS) (240,8 U/g) e bagaço de cana e aveia (BC + AV) (254,2 U/g). Além disso, nota-se que o uso de FSbm proporcionou atividades praticamente constantes para os diferentes substratos empregados e que estas não ultrapassaram 5,21 U/mL (valor correspondente ao cultivo utilizando Farelo de Trigo). Os resultados referentes aos valores de atividade enzimática obtidos por meio do cultivo do fungo nos meios contendo bagaço de cana e malte (BC+M), farelo de trigo lavado e malte (FT.I + M) e farelo de trigo lavado e farelo de soja (FT.I + FS), apresentados na Figura 4, tiveram suas barras sobrepostas, em relação aos resultados obtidos pelos dois métodos de cultivo devido ao fato de que os valores de atividade enzimática obtidos por FSbm e FES coincidem, uns com os outros, em cada um dos eixos verticais. Sendo assim, os valores de atividade amilolítica sacarificante obtidas por meio do cultivo do fungo em cada um destes meios, por FSbm e FES, respectivamente, são: BC+M: 3,98 U/mL e 331,1 U/g; FT.I + M: 4,72 U/mL e 432,5 U/g; FT.I + FS: 3,67 U/mL e 331,4 U/g.

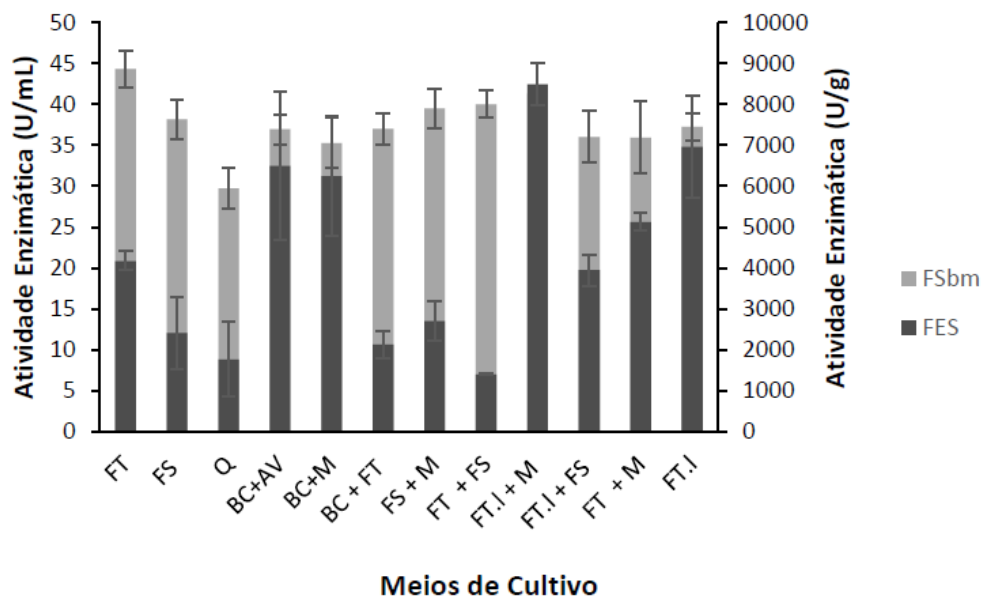
Figura 4. Atividades amilolíticas sacarificantes obtidas pelos cultivos de *Paecilomyces* sp. SF 021, por FES (U/g) e FSbm (U/mL), utilizando diferentes subprodutos agroindustriais como fontes de carbono. Os cultivos foram mantidos a 28°C, por 7 dias. **FT:** Farelo de trigo; **FS:** Farelo de soja; **Q:** Quirera de arroz; **BC+AV:** Bagaço de cana + Aveia; **BC+M:** Bagaço de cana + Malte; **BC+ FT:** Bagaço de cana + Farelo de Trigo; **FS + M:** Farelo de soja + Malte; **FT+ FS:** Farelo de trigo + Farelo de soja; **FT.I + M:** Farelo de trigo lavado + Malte; **FT.I + FS:** Farelo de trigo lavado + Farelo de soja; **FT + M:** Farelo de trigo + Malte; **FT.I:** Farelo de trigo lavado.



Fonte: Elaborado pelo autor

Em relação à atividade amilolítica dextrinizante, pelos dados apresentados na Figura 5 observa-se que os maiores valores foram obtidos pelo cultivo por FES nos meios contendo Farelo de trigo sem lavar (FT) (416,99 U/mL; 4169,9 U/g), Bagaço de cana e aveia (BC + AV) (649,53 U/mL; 6495,3 U/g), Bagaço de cana e Malte (BC + M) (624,55 U/mL; 6245,5 U/g), Farelo de trigo lavado e Malte (FT.I + M) (848,40 U/mL; 8484 U/g), Farelo de trigo sem lavar e Malte (FT + M) (512,77 U/mL; 5127,7 U/g). As atividades dextrinizantes obtidas pelo cultivo do fungo por FSbm também não foram expressivas, mantendo-se praticamente constantes nos diferentes substratos analisados (em torno de 37,62 U/mL).

Figura 5. Atividades amilolíticas dextrinizantes obtidas pelos cultivos de *Paecilomyces* sp. SF021, por FES (U/g) e FSbm (U/mL), utilizando diferentes subprodutos agroindustriais como fontes de carbono. Os cultivos foram mantidos a 28°C, por 7 dias. **FT:** Farelo de trigo; **FS:** Farelo de soja; **Q:** Quirera de arroz; **BC+AV:** Bagaço de cana + Aveia; **BC+M:** Bagaço de cana + Malte; **BC+ FT:** Bagaço de cana + Farelo de Trigo; **FS + M:** Farelo de soja + Malte; **FT+ FS:** Farelo de trigo + Farelo de soja; **FT.I + M:** Farelo de trigo lavado + Malte; **FT.I + FS:** Farelo de trigo lavado + Farelo de soja; **FT + M:** Farelo de trigo + Malte; **FT.I:** Farelo de trigo lavado.



Fonte: Elaborado pelo autor

Dado o exposto, o método escolhido para obtenção das amilases pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021 foi a FES, utilizando-se farelo de trigo não lavado (FT) como substrato. Embora a combinação de farelo de trigo lavado e malte (FT.I + M), tenham proporcionado maiores valores de atividades sacarificante e dextrinizante maior, a utilização de farelo de trigo lavado implicaria na adição de mais uma etapa ao processo, tornando-o mais oneroso.

Há na literatura diversos trabalhos comparando os níveis de produção de enzimas e metabólitos secundários entre FES e FSbm e, no caso das enzimas microbianas, as maiores atividades são geralmente obtidas pelos cultivos por FES. As enzimas produzidas por um mesmo microrganismo, por FES e FSbm, podem apresentar diferentes características físico químicas como temperatura e pH ótimos, estabilidade, além de parâmetros cinéticos. (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012).

As diferenças de produção proporcionadas pelos dois métodos de cultivo em questão podem ser explicadas pelo fato da FES proporcionar ao microrganismo um ambiente mimetizado das condições encontradas em seu habitat natural, caracterizadas principalmente pela baixa atividade de água e pelo contato direto do fungo com o substrato (HÖLKER e LENZ, 2005), favorecendo assim o desenvolvimento e o prolongamento de suas hifas de tal forma a auxiliar na colonização e penetração do material para acessar e degradar, por meio de enzimas extracelulares, os nutrientes necessários para seu crescimento (SOCCOL, C. R. . *et al.*, 2017).

Além disso, alguns trabalhos desenvolvidos na área da genética mostram que os genes envolvidos na produção e secreção enzimática são expressos diferentemente dependendo das condições de cultivo empregadas. Em seu trabalho, Hata *et al* (1997) relatam a existência de dois genes envolvidos na produção de glucoamilase (*glaA* e *glaB*) por *Aspergillus oryzae* como as condições de cultivo influenciam em suas expressões, de tal forma que o gene *glaB* é altamente expresso em FES enquanto o gene *glaA* se expressa mais ativamente quando em FSbm. Já Ishida *et al* (1998) destacam que ambos os genes podem e são induzidos pela presença de amido e malto-oligossacarídeos, e que somente o gene *glaB* é induzido por outros fatores, como a baixa atividade de água, as altas temperaturas e as barreiras físicas para o crescimento e extensão de hifas, fatores estes característicos do cultivo por FES.

5.2. Otimização da produção de amilases pelo cultivo por FES

5.2.1. Delineamento de Composto Central Rotacional

A influência das variáveis quantidade, umidade inicial do substrato utilizado para o crescimento do fungo e quantidade de discos de inóculo sobre a produção de amilases foi avaliada empregando-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³ incluindo 6 ensaios com as condições axiais e 4 repetições no ponto central, tendo como resposta a atividade sacarificante (Tabela 3).

Tabela 3. Ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR), em níveis codificados e reais, empregado para o cultivo do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF021, obtendo-se como resposta a atividade de amilolítica sacarificante.

Ensaios	X ₁	X ₂	X ₃	Atividade Enzimática (U/g)
1	(-1) 5	(-1) 65	(-1) 5	474,06
2	(+1) 11	(-1) 65	(-1) 5	450,00
3	(-1) 5	(+1) 75	(-1) 5	250,47
4	(+1) 11	(+1) 75	(-1) 5	223,58
5	(-1) 5	(-1) 65	(+1) 11	309,91
6	(+1) 11	(-1) 65	(+1) 11	397,64
7	(-1) 5	(+1) 75	(+1) 11	237,74
8	(+1) 11	(+1) 75	(+1) 11	222,17
9	(-1,68) 2,96	(0) 70	(0) 8	308,49
10	(+1,68) 13,04	(0) 70	(0) 8	280,19
11	(0) 8	(-1,68) 61,59	(0) 8	493,87
12	(0) 8	(+1,68) 78,4	(0) 8	141,51
13	(0) 8	(0) 70	(-1,68) 3	290,09
14	(0) 8	(0) 70	(+1,68) 13	200,94
15	(0) 8	(0) 70	(0) 8	410,38
16	(0) 8	(0) 70	(0) 8	527,83
17	(0) 8	(0) 70	(0) 8	457,08
18	(0) 8	(0) 70	(0) 8	474,06

*X₁: quantidade de substrato (g); X₂: Umidade inicial (%); X₃: Quantidade de discos de inóculo

Fonte: Elaborado pelo autor

Observou-se que a atividade enzimática variou de 200,94 a 527,83 U/g, sendo a máxima aproximadamente 76% superior à máxima inicialmente obtida pelo cultivo por FES em farelo de trigo, sem o uso de planejamento experimental (300 U/g) (Figura 4).

Pode-se observar a influência que cada uma das variáveis exerce sobre a produção das amilases analisando-se os ensaios 9 a 14. Nos ensaios 9 e 10 as variáveis umidade inicial da fonte de carbono e quantidade de discos de inóculos foram mantidas em seus níveis centrais, enquanto que a quantidade de substrato variou do menor para o maior nível empregado (níveis axiais), o que resultou na diminuição de 9,17% (28,3 U/g) na atividade sacarificante, indicando que menores níveis desta variável favorecem a resposta analisada. O teor de umidade inicial exerceu uma influência muito mais expressiva sobre a resposta analisada, dado que, ao manter as outras variáveis em seus níveis centrais variando-se apenas umidade do menor para o maior nível empregado (níveis axiais) (ensaios 11 e 12), houve uma redução de cerca de 71,3% na resposta avaliada (352,37 U/g), indicando também que o aumento do nível desta variável desfavorece a resposta analisada. Por fim, pela análise dos ensaios 13 e 14, evidencia-se uma influência da quantidade de discos de inóculo na produção das amilases. Quando a quantidade de inóculo variou do menor para o maior nível empregado (níveis axiais), mantendo-se as demais variáveis em seus níveis centrais, observou-se uma redução de cerca de 30,7% na atividade sacarificante (89,15 U/g). Os resultados apontam para a importância da otimização das condições de cultivo, visto que a utilização das variáveis em seus níveis inferiores favorece a obtenção de maiores atividades da enzima de interesse pelo fungo utilizado, o que representa uma economia no processo.

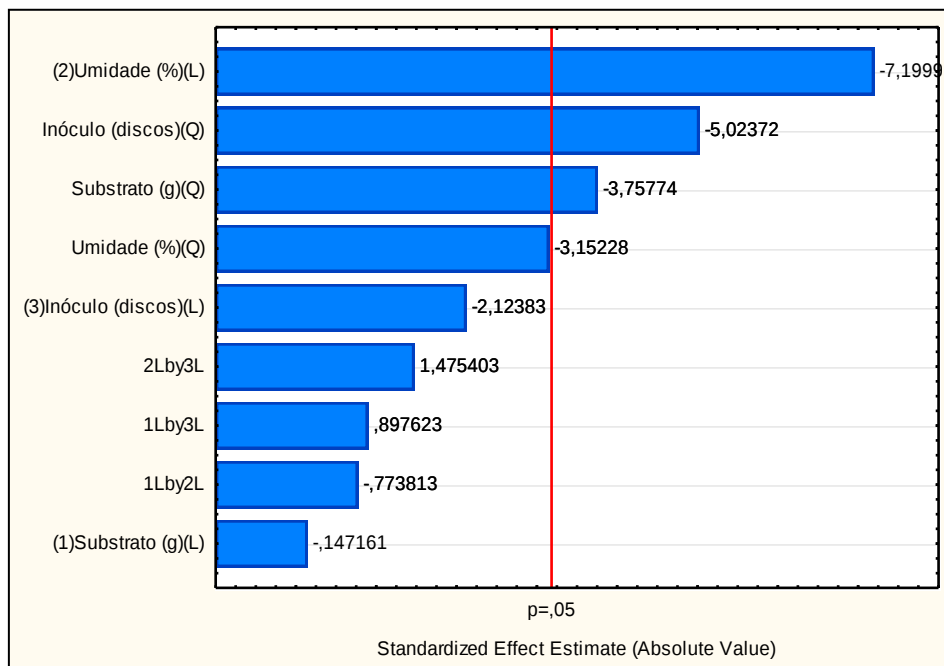
A quantidade e o tipo de substrato utilizado representam importantes parâmetros a serem considerados nos processos de FES, uma vez que o substrato é responsável não apenas por fornecer nutrientes aos microrganismos e possibilitar a indução da produção de enzimas que auxiliarão na obtenção de nutrientes mais prontamente assimiláveis, mas também por atuar como suporte físico para o crescimento fúngico (PANDEY, 2003).

O teor de umidade inicial do substrato é também um parâmetro que deve ser considerado nos processos de FES. Ainda que se caracterize por ser

um método de cultivo em que há pouca quantidade de água disponível, durante as FES a presença de água é essencial para que o microrganismo seja capaz de desenvolver seu metabolismo (GERVAIS e MOLIN, 2003). Um teor de umidade elevado pode acarretar na diminuição da porosidade do substrato, contribuindo para uma baixa transferência de oxigênio, enquanto que um teor de umidade abaixo do necessário dificulta a solubilidade dos nutrientes presentes no substrato, afetando diretamente o crescimento microbiano (MARTINS *et al.*, 2011).

Os efeitos que cada variável e suas interações exerceram sobre a atividade enzimática de amilase sacarificante são apresentados pelo Diagrama de Pareto (Figura 6). A análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 6 mostra os valores calculados para a regressão e resíduos do modelo, bem como o cálculo da falta de ajuste (*lack of fit*), baseado no valor de erro puro, ambos calculados pelo *software* STATISTICA 10. Como pode ser observado pelo diagrama de Pareto e confirmado pela tabela de efeitos estimados, para a enzima em questão a umidade exerceu efeito linear significativo enquanto que as quantidades de substrato e de discos de inóculo foram significativas apenas em seus efeitos quadráticos.

Figura 6. Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na atividade de amilase sacarificante obtida pelo cultivo do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021.



Fonte: Elaborado pelo autor, *Software Statistica*.

O coeficiente de determinação do modelo (R^2) foi 0,93, o que, juntamente com a análise da variância do modelo obtido (Tabela 4), permite concluir que este se ajusta bem aos dados experimentais, confirmado pela insignificância estatística da falta de ajuste juntamente com o valor de $p < 0,05$ para o modelo de regressão.

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para a atividade de amilases obtidas pelo cultivo do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF021.

Fator	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F crítico	p-value
Regressão	499387,6	9	55487,5	26,95	3,39	0,0000477
Resíduos	16469,8	8	2058,7			
Falta de ajuste	9415,5	5	1883,1	0,80	9,01	0,6147407
Erro Puro	7054,3	3	2351,4			
Total		17				

*valores em negrito são estatisticamente significantes ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

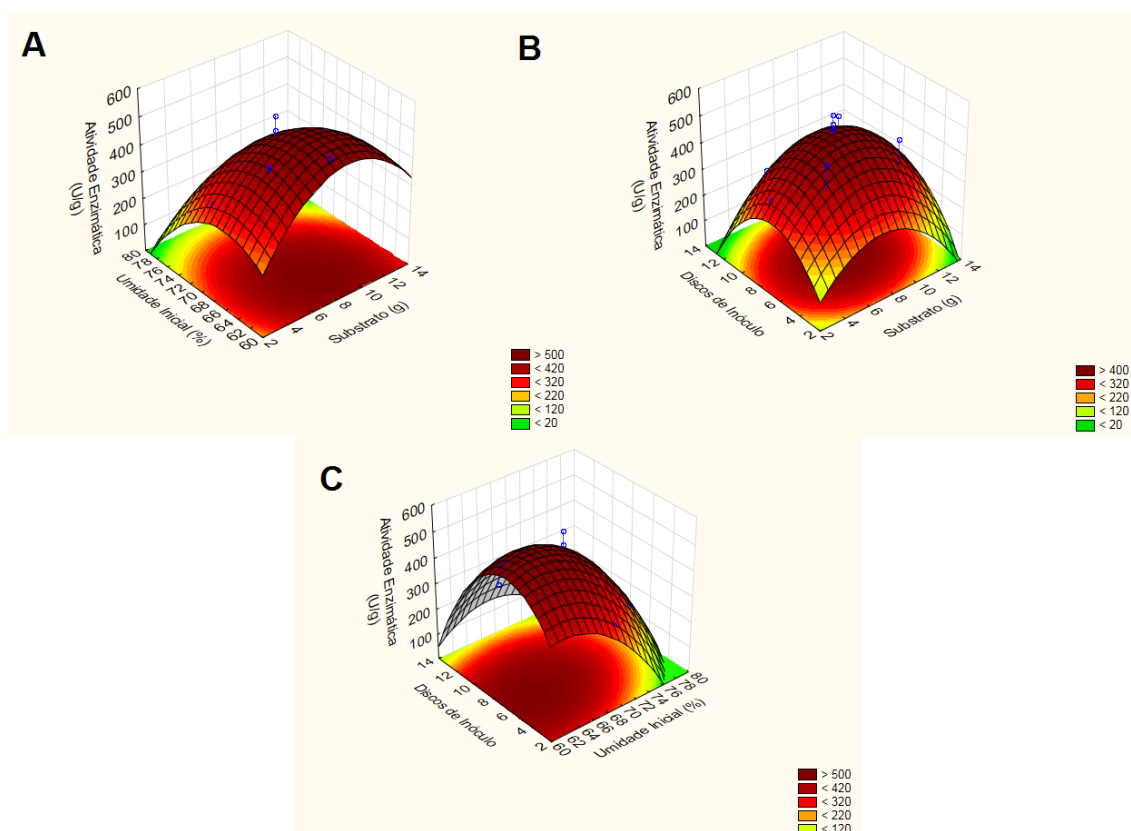
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados foram analisados por análise de regressão múltipla da qual originou-se a equação polinomial de segunda ordem para representar a atividade prevista de amilase (Eq. 2) em função das variáveis independentes avaliadas. A equação está apresentada abaixo, em seus níveis codificados:

$$Y = 465,0216 - 1,93 x_1 - 51,2337 x_1^2 - 94,5133 x_2 - 42,9606 x_2^2 - 27,8804 x_3 - 68,5328 x_3^2 - 13,2662 x_1 x_2 + 15,3887 x_1 x_3 + 25,2962 x_2 x_3.$$

As superfícies de respostas geradas pelo modelo, considerando-se os efeitos das variáveis estudadas, são apresentadas na Figura 7 a fim de se demonstrar os efeitos de interação das variáveis e identificar os níveis ideais de cada uma, buscando-se a otimização das condições para a obtenção de atividades máximas da enzima.

Figura 7. Superfícies de resposta obtidas para os efeitos do teor de umidade e quantidade de substrato (A); quantidade de discos de inóculo e quantidade de substrato (B); quantidade de discos de inóculo e teor de umidade (C).

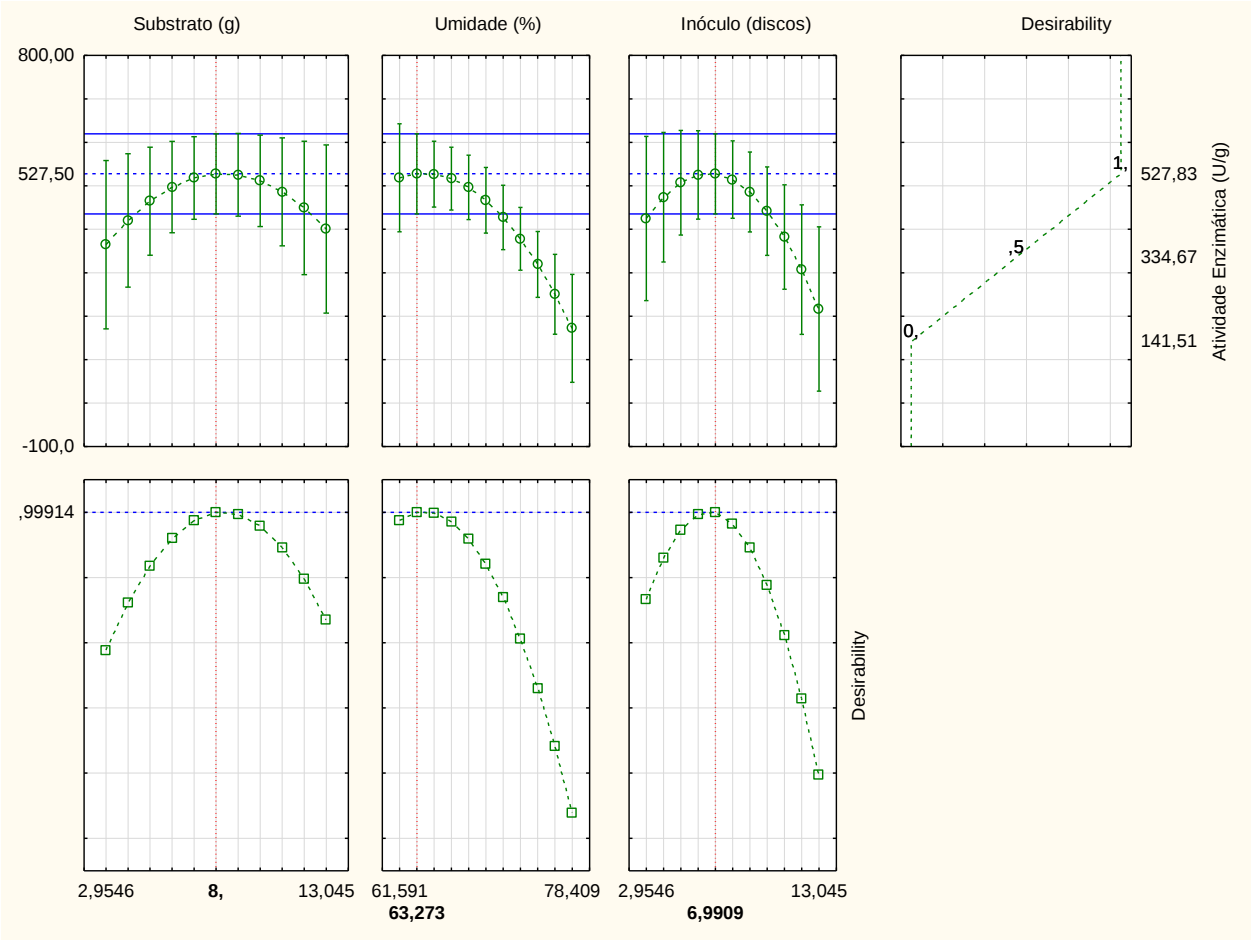


Fonte: Elaborado pelo autor, *Software Statistica*.

Analisando-se as superfícies, pode-se verificar a existência de uma região ótima para a atividade da enzima em questão, a qual corresponde à combinação das faixas de teor inicial de umidade do farelo de trigo entre 62 e 64%, quantidade de farelo de trigo próximo aos 8g e quantidade de discos de inóculo entre 6 e 8 discos

Utilizando-se a função de desejabilidade do *software* Statistica, foi possível prever o valor ótimo da atividade de amilase sacarificante. Pela função de desejabilidade, empregando-se 8g de farelo de trigo com 63,27% de teor de umidade inicial e 6,99 discos de inóculo, a máxima atividade sacarificante (52,75 U/mL; 527,50 U/g) seria obtida (Figura 8).

Figura 8. Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis quantidade e teor de umidade inicial do substrato e quantidade de discos de inóculo para a máxima atividade amilolítica sacarificante obtida pelo cultivo do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021.



Fonte: Elaborado pelo autor, Software Statistica

Para a validação experimental dos resultados, foram utilizados 7 discos de inóculo, ao invés de 6,99, dada impossibilidade de se obter tal quantidade. A validação foi realizada com ensaios em triplicata, sob as condições otimizadas previstas. O resultado obtido foi $497,6 \text{ U/g} \pm 21,92$ para a atividade amilolítica sacarificante, indicando a reprodutibilidade dos dados e confirmando a validação do modelo. Este valor corresponde a um aumento de 62,53% quando comparado com a atividade da solução enzimática bruta obtida inicialmente.

Diversos trabalhos relatam a produção de amilases por fungos filamentosos cultivados por FES utilizando-se farelo de trigo como substrato. Moreira *et al.* (2001) reportam a produção de amilases com atividade amilolítica sacarificante durante o cultivo de três diferentes espécies de *Aspergillus* por FES (30°C, 75% de umidade inicial), usando farelo de trigo como substrato, alcançando 350, 240 e 210 U/g de substrato seco para as espécies *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. tamari*, respectivamente. Kunamneni *et al.* (2005) cultivaram *Thermomyces lanuginosus* por FES, durante 5 dias, em farelo de trigo (90% de umidade inicial, 50°C), suplementado com 1% de solução de amido e 1% de peptona e reportaram a atividade amilolítica sacarificante de 534 U/g de substrato. Oliveira *et al.* (2016), após otimização das condições de cultivo de *Lichtheimia ramosa* por FES (60% de umidade inicial, 4 dias de cultivo), utilizando farelo de trigo como substrato, relatam aumento na produção de amilases de 320,4 para 417,2 U/g de substrato.

Os mesmos autores cultivaram *Thermoascus aurantiacus* por FES (65% de umidade inicial, 4 dias de cultivo), empregando o mesmo substrato, e citam aumento de 200% (44,2 para 144,5 U/g de substrato) na atividade amilolítica sacarificante. As atividades amilolíticas sacarificantes obtidas no presente trabalho são promissoras, uma vez que valores próximos a 500 U/g de substrato foram obtidos sem necessidade de suplementação com amido solúvel, em 7 dias de cultivo.

5.3. Caracterização físico química das amilases

5.3.1. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas

Para avaliação do pH e temperatura ótimos das enzimas foi utilizado um planejamento fatorial do tipo face centrada 2², incluindo 4 pontos e axiais e 4 pontos centrais, totalizando 12 ensaios. Os valores codificados e reais bem como a resposta obtida encontram-se apresentados na Tabela 5. Considerou-se como 100% a maior atividade enzimática encontrada.

Tabela 5. Planejamento fatorial do tipo face centrada 2², valores codificados e reais das variáveis pH e temperatura e atividade sacarificante relativa das amilases presentes na solução enzimática bruta obtida pelo cultivo de *Paecilomyces* sp. SF 021 sob condições otimizadas

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade relativa (%)
			Y
1	(-1) 3,5	(-1) 40	70,28
2	(+1) 7,5	(-1) 40	5,94
3	(-1) 3,5	(+1) 60	35,24
4	(+1) 7,5	(+1) 60	5,73
5	(-1) 3,5	(0) 50	70,91
6	(+1) 7,5	(0) 50	4,88
7	(0) 5,5	(-1) 40	72,82
8	(0) 5,5	(+1) 60	69,21
9	(0) 5,5	(0) 50	94,27
10	(0) 5,5	(0) 50	95,97
11	(0) 5,5	(0) 50	100
12	(0) 5,5	(0) 50	94,9

Y: Atividade amilolítica sacarificante *100%: 444,3 U/g

Fonte: Elaborado pelo autor

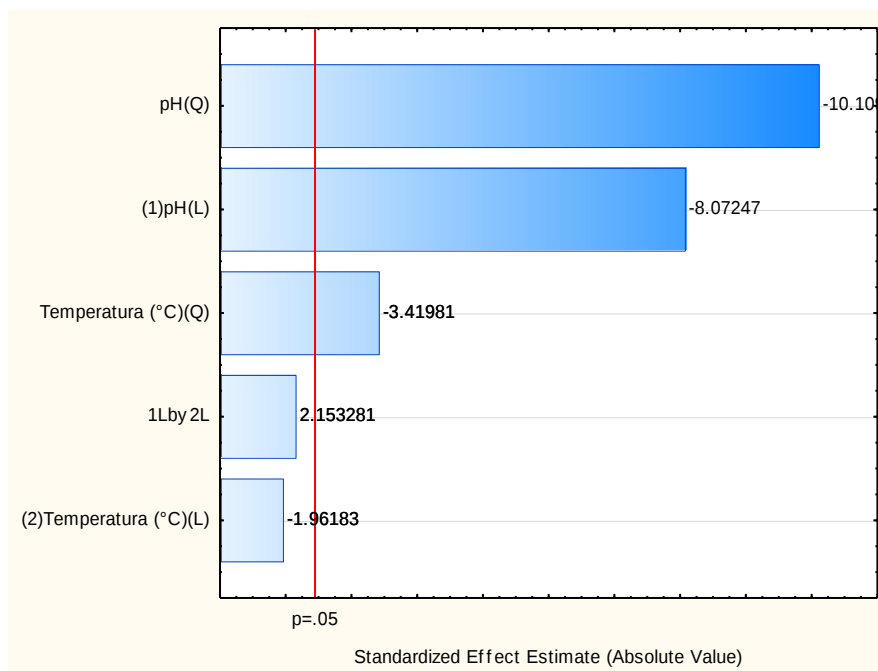
Os ensaios 5 a 8 destacam a importância e a influência do pH e da temperatura para a atividade sacarificante das amilases produzidas. As atividades relativas variaram de 4,88% a 100%, porém, analisando-se apenas

os ensaios 5 e 6, onde variou-se apenas os valores de pH (do menor para o maior nível empregado), nota-se uma queda expressiva (93,12%) na atividade relativa quando a reação é conduzida sob o pH 7,5. Os ensaios 7 e 8 mostram que, mantendo-se o pH no nível central e variando-se a temperatura do menor para o maior nível, a atividade relativa não é muito afetada, havendo uma queda de cerca de 4,96%. Pelos resultados obtidos pode-se inferir que a variável temperatura, quando nos níveis empregados neste planejamento, teve menos influência sobre a resposta analisada, podendo ser constatada pelos ensaios 3, 5, 7 e 8.

A atividade de enzimas é influenciada pelo pH e pela temperatura do meio em que se encontram, sendo os valores ótimos destes dois parâmetros aqueles que proporcionam a máxima atividade catalítica (NELSON e COX, 2014). Desta forma, variações além das faixas ótimas de pH e temperatura resultam na diminuição da atividade catalítica ou ainda na perda desta atividade. A variação da atividade em função do pH do meio é explicada pela relação existente entre esta variável e os diferentes graus de ionização dos aminoácidos, os quais por sua vez determinam as interações eletrostáticas que tais aminoácidos podem estabelecer na enzima, responsáveis pela estabilidade conformacional de sua estrutura tridimensional (ANFINSEN, 1973). Já em relação à temperatura, esta variável influencia as interações fracas responsáveis por manter a estabilidade da estrutura tridimensional de uma proteína. Desta forma, a maioria das proteínas pode sofrer desnaturação pelo calor, devido ao rompimento destas interações e consequente alteração da conformação nativa da proteína, com perda de estrutura e função (NELSON e COX, 2014).

Os efeitos que cada uma das variáveis e suas interações exerceram sobre a atividade enzimática são apresentados pelo Diagrama de Pareto (Figura 9) e podem ser confirmados pela análise de variância (ANOVA) apresentada na tabela 6.

Figura 9. Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na atividade amilolítica sacarificante das amilases presentes na solução enzimática bruta obtida pelo cultivo do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021 sob condições otimizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor, *Software* Statistica 10.

O coeficiente de determinação do modelo (R^2) foi 0,97, indicando bom ajuste aos dados experimentais. Através da análise da ANOVA (Tabela 5) verifica-se que os efeitos quadráticos de ambas as variáveis foram significativos juntamente com o efeito linear do pH. Os efeitos lineares da temperatura e da interação entre pH e temperatura não foram significativos para a atividade da enzima estudada.

Tabela 6. Análise de variância (ANOVA) para a atividade amilolítica sacarificante das amilases presentes na solução enzimática bruta obtida pelo cultivo do fungo *Paecilomyces* sp. SF 021 sob condições otimizadas.

Fator	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	p
(1)pH (L)	4259,88	1	4259,875	65,1647	0,000194
pH (Q)	6680,83	1	6680,828	102,1988	0,000054
(2)Temperatura (°C)(L)	251,60	1	251,599	3,8488	0,097447
Temperatura (°C) (Q)	764,52	1	764,519	11,6951	0,014145
1L*2L	303,10	1	303,100	4,6366	0,074767
Erro	392,23	6	65,371		
Total SQ	15277,82	11			

*Valores em negrito são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p<0,05).

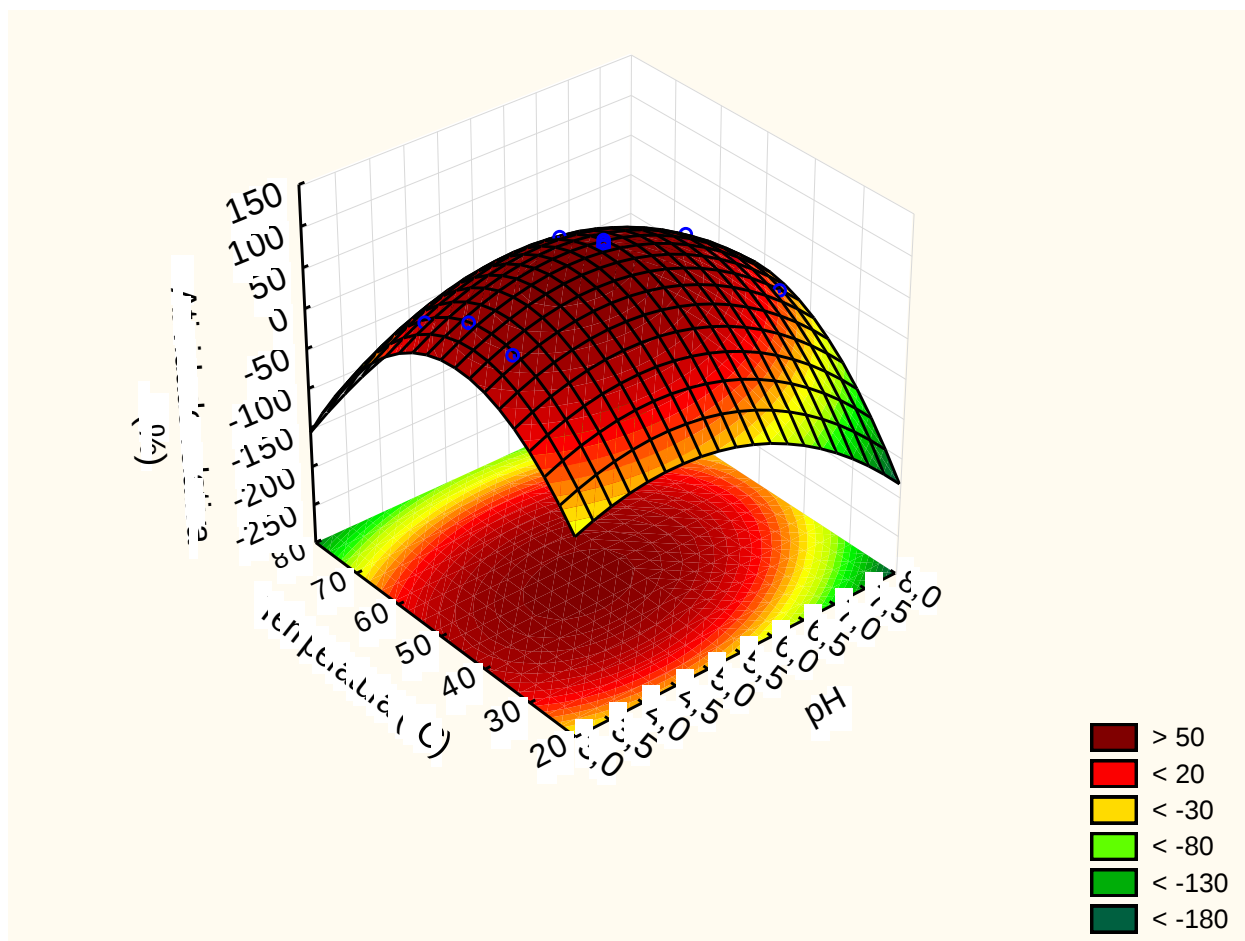
Fonte: Elaborado pelo autor, *Software* Statistica 10.

Os resultados experimentais foram analisados por análise de regressão múltipla e uma equação polinomial de segunda ordem foi derivada para representar a atividade amilolítica sacarificante em função das variáveis independentes analisadas. A equação do modelo utilizado para a análise das duas variáveis está representada abaixo:

$$Y = 93,5067 - 26,6454 \cdot x_1 - 50,0531 \cdot x_1^2 - 6,4756 \cdot x_2 - 16,9321 \cdot x_2^2 - 8,7049 \cdot x_1 \cdot x_2$$

A superfície de resposta gerada pelo modelo para a atividade amilolítica sacarificante está apresentada na Figura 10. É possível observar que as maiores atividades enzimáticas são obtidas quando as duas variáveis encontram-se próximas de seus pontos centrais (na faixa de combinação de pH e temperatura de 4,0 a 6,0 e 42°C a 50°C, respectivamente).

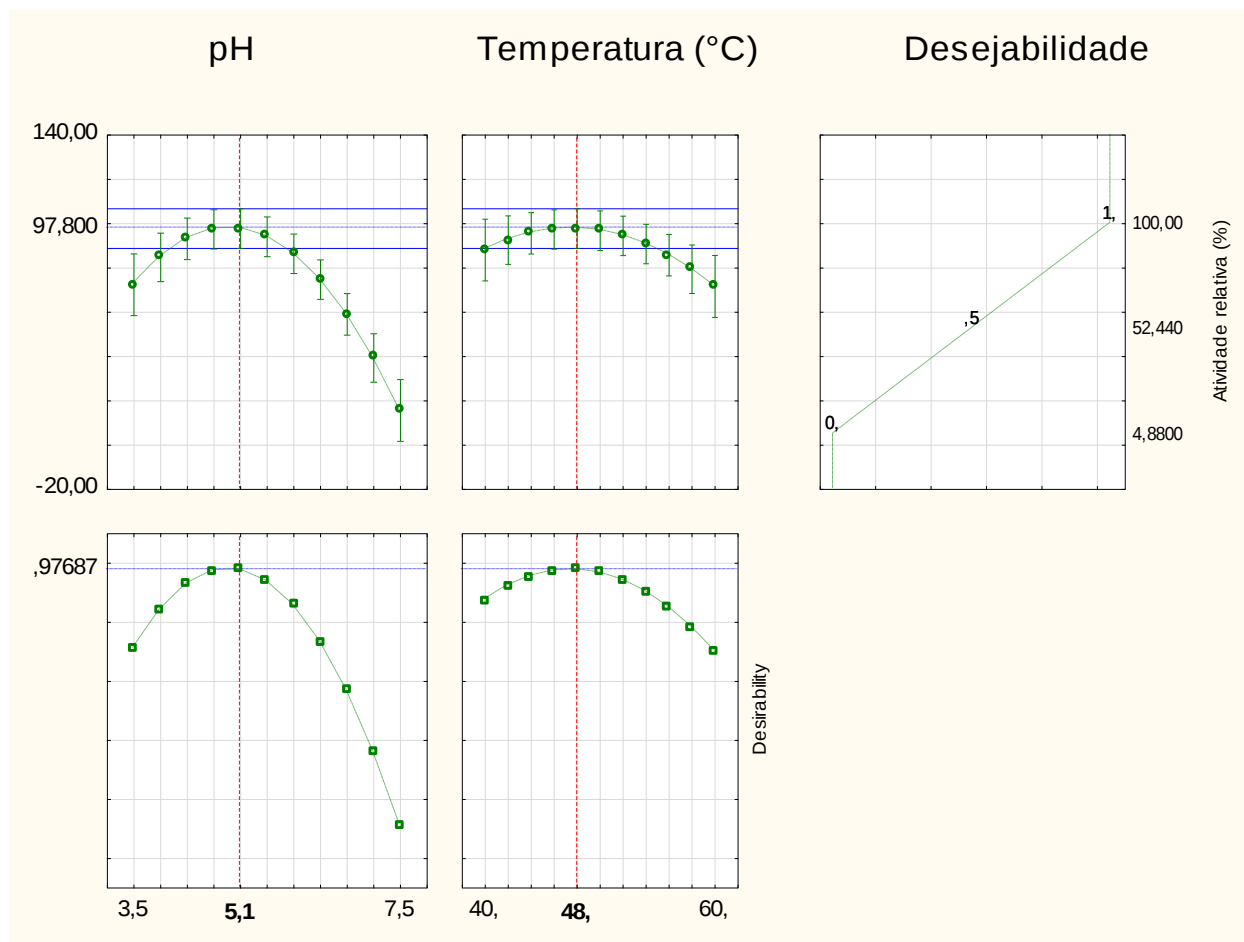
Figura 10. Superfície de resposta obtida para os efeitos do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica sacarificante das amilases presentes na solução enzimática bruta obtida pelo cultivo do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021 sob condições otimizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor, *Software Statistica*.

A função de desejabilidade do *software* Statistica 10 foi utilizada para prever os valores ótimos das condições de pH e temperatura. A Figura 11 apresenta os perfis dos valores otimizados, a função de desejabilidade e a atividade enzimática relativa prevista (97,8%) sob as condições ótimas.

Figura 11. Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e temperatura no planejamento fatorial do tipo face centrada 2^2 , para a máxima atividade amilolítica sacarificante presente no extrato enzimático obtido pelo cultivo do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021 sob condições otimizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor, Software Statistica.

De acordo com a Figura 11, o pH 5,1 e a temperatura de 48°C foram apontados como os valores ótimos que levariam a uma máxima atividade amilolítica sacarificante. A validação experimental dos resultados foi realizada com ensaios de reação enzimática em triplicata, sob tais condições. Obteve-se como resultado $95,4 \pm 0,35$ % para a atividade amilolítica sacarificante residual, indicando reprodutibilidade dos dados e confirmando a validação do modelo.

As amilases obtidas pelos cultivos isolados de *Lichtheimia ramosa* e *Thermoascus auranticus* em farelo de trigo apresentaram atividade amilolítica sacarificante ótima sob pH 6 e temperatura de 60°C (OLIVEIRA *et al.*, 2016). As amilases produzidas a partir do cultivo de *Aspergillus flavus* TF-8 em “Sal (*Shorea robusta*) deoiled cake” apresentaram máxima atividade sacarificante

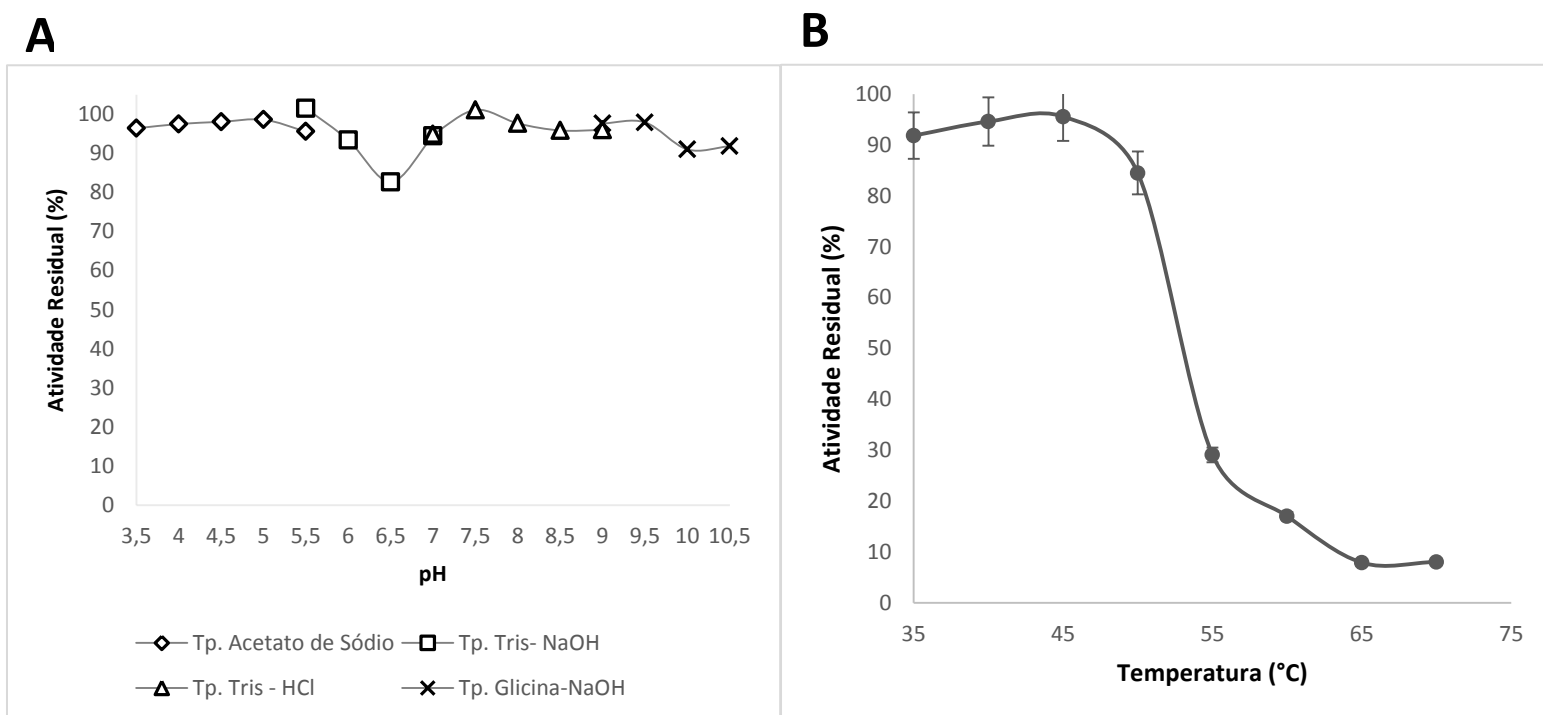
em pH 5,5 e temperatura entre 50 e 60°C (SINGH e GUPTA, 2014). O cultivo de *Aspergillus* sp.GP-21 em farelo de trigo proporcionou a produção de amilases com máxima atividade sacarificante em pH entre 5,0 e 5,5, sob temperatura de 65°C (MAMO e GESSESSE, 1999). As amilases produzidas por *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* usando farelo de trigo e espiga de milho apresentaram máxima atividade sob temperatura 65°C, e pH entre 4 e 5. (PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2008).

Dessa maneira, verifica-se que as amilases obtidas pelo cultivo de *Paecilomyces* sp SF 021 possuem características semelhantes às amilases já descritas na literatura, em relação às condições ótimas de atividade, com destaque para a capacidade de manter sua atividade residual próxima de 70% quando incubada em temperaturas na faixa de 40°C - 60°, possibilitando a aplicação da solução enzimática bruta em processos que utilizem tais temperaturas.

5.3.2. Estabilidade das enzimas frente a variações de pH e temperatura

A fim de se avaliar o efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das amilases produzidas sob as condições otimizadas de cultivo, estas foram incubadas, durante 24h, à temperatura de 25°C, em soluções tampão na faixa de pH de 3,5-10,5 e, após este período, a atividade sacarificante residual foi determinada, sob as condições ótimas de reação.

Figura 12. Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a estabilidade de amilases produzidas pelo cultivo de *Paecilomyces* sp. SF 021.



*100%: 510,8 U/g ou 51,08 U/mL.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As amilases mantiveram-se estáveis em uma ampla faixa de pH (Figura 12a), mantendo acima de 80% de atividade sacarificante quando incubadas entre os valores de pH 3,5 e 10.

Para a avaliação da estabilidade das enzimas frente à variações de temperatura, a solução enzimática bruta foi incubada por 1 hora, em solução tampão acetato de sódio 0,05 mol/L, em pH 5, sob temperaturas de 35 a 70 °C. As atividades sacarificantes residuais, determinadas sob as condições ótimas, são apresentadas na Figura 11b. As amilases mantiveram-se estáveis quando incubadas por 1 hora entre 35 e 45°C, mantendo acima de 80% de atividade residual. Quando incubadas a 50°C e 55°C, a atividade residual esteve entre 80 e 30%. A incubação em temperaturas superiores levou à perda expressiva da estabilidade enzimática (atividades residuais abaixo de 20%).

SINGH e GUPTA (2014) relatam a produção de amilases estáveis na faixa de pH 5,0 – 9,0 por *A. flavus* TF-8. Relatam ainda a estabilidade destas

por 3 horas em temperatura de 45°C e por 1 hora em 50°C, com atividade residual superior a 80%. As amilases produzidas por *L. ramosa* e *T. aurantiascus* apresentaram estabilidade nas faixas de 3,5 - 10,5 e 4,5 - 9,5, respectivamente (OLIVEIRA *et al.*, 2016), apresentando um padrão de estabilidade ao pH muito semelhante ao apresentado no presente trabalho. Com relação a estabilidade à temperatura, as amilases produzidas por *L. ramosa* mantiveram-se estáveis por 1 hora sob a temperatura de 55°C e, sob 60°C, apresentaram 75% de sua atividade amilolítica sacarificante inicial. Já as amilases produzidas por *T. aurantiascus* mantiveram-se estáveis por 1 hora sob 50°C e, sob 60°C, apresentaram 25% de sua atividade inicial, apresentando um padrão de estabilidade a temperatura semelhante ao apresentado no presente trabalho.

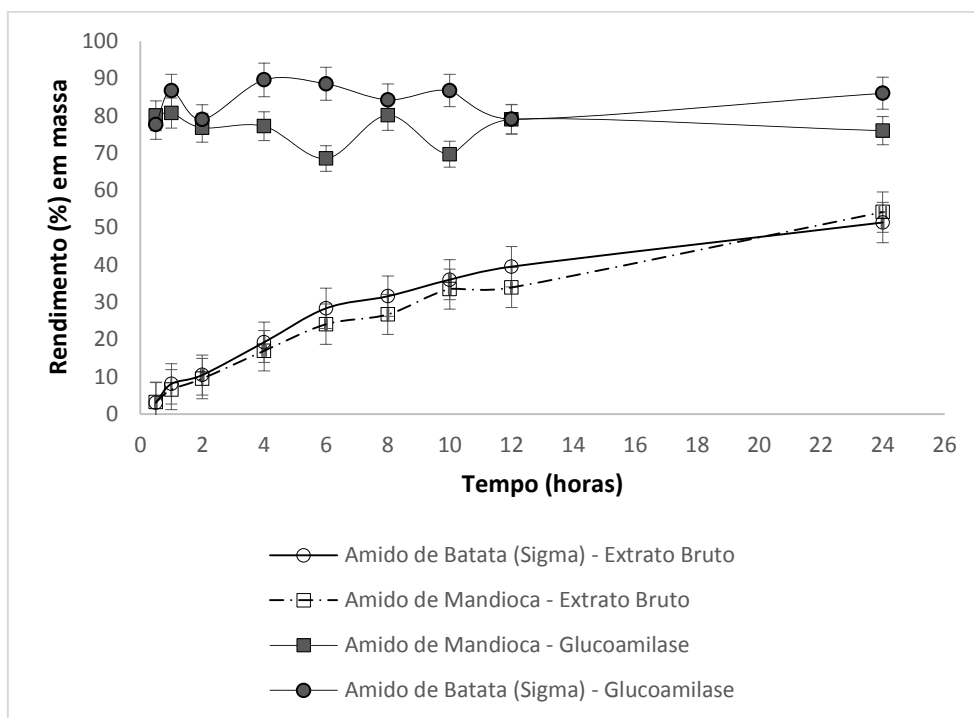
As amilases obtidas a partir do cultivo de *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* apresentaram total estabilidade, por 1 hora, à temperatura dentro da faixa de 25-75°C e ao pH na faixa de 2,5 – 6,5 (PEIXOTO-NOGUEIRA *et al.*, 2008).

A busca por fungos produtores de amilases capazes de manter suas atividades frente a amplas variações de pH é importante do ponto de vista da aplicação industrial destas enzimas, uma vez que a necessidade de ajustes do pH do meio durante os tratamentos para liquefação e sacarificação do amido se torna mínima (MICHELIN *et al.*, 2008). Enzimas com tal característica podem ser aplicadas em processos ácidos para produção de xarope de glicose e em processos alcalinos na indústria de detergentes (EL-FALLAL *et al.*, 2012).

5.4. Hidrólise enzimática do amido

A solução enzimática bruta obtida a partir do cultivo do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021 sob condições otimizadas foi utilizado nas reações de hidrólise do amido de batata (Sigma Aldrich®) e amido de mandioca. Para efeitos comparativos foram realizados ensaios de hidrólise utilizando-se uma glucoamilase comercial de origem fúngica (Sigma Aldrich – A7095). A Figura 13 apresenta os rendimentos obtidos, com base na liberação de glicose, ao longo de 24 horas de hidrólise.

Figura 13. Hidrólise de amidos de diferentes fontes, a 48 °C, utilizando a solução enzimática bruta (símbolos abertos) obtida através do cultivo do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021 ou glucoamilase comercial de *Aspergillus niger* (símbolos fechados).



Fonte: Elaborado pelo autor

Os perfis de hidrólise dos amidos de batata e mandioca foram semelhantes quando se empregou a solução enzimática bruta de *Paecilomyces* sp. SF 021. Em 12 horas de hidrólise os rendimentos alcançados foram de 40 e 33,97% (19,78 e 16,99 mg de glicose/mL de hidrolisado), respectivamente. Prolongando-se a hidrólise até 24 horas, houve um aumento de 11,4 e 20,13 % nos rendimentos, obtendo-se, respectivamente 51,4 e 54,1 % (25,69 e 27,09 mg glicose/mL de hidrolisado).

Os ensaios de hidrólise empregando-se a glucoamilase comercial proporcionaram valores elevados de rendimento logo nos primeiros 30 minutos (77,58% utilizando amido de batata e 80% utilizando amido de mandioca). Com relação a massa de glicose liberada, os valores máximos obtidos foram 44,8 mg de glicose/mL de hidrolisado quando utilizado amido de batata como substrato, em 4 horas de hidrólise, e 40,3 mg de glicose/mL de hidrolisado quando utilizado amido de mandioca como substrato, em 1 hora de hidrólise.

A quantidade máxima de glicose liberada pela ação da solução enzimática bruta durante a hidrólise do amido de batata (25,69 mg/mL), corresponde a 57,3% da quantidade máxima liberada pela ação da glucoamilase comercial sobre o mesmo amido (44,8 mg/mL). Já em relação ao amido de mandioca, a quantidade máxima de glicose liberada pela ação da solução enzimática bruta (27,09 mg/mL) corresponde a cerca de 67,7% da quantidade máxima de glicose liberada pela ação da glucoamilase comercial.

Escaramboniet *al* (2018) relatam a utilização da solução enzimática produzida por *Rhizopus oligosporus* (CCT 3762) para a hidrólise de amido solúvel (Sigma), em duas temperaturas diferentes (55°C e 60°C). Os perfis de hidrólise para as duas temperaturas testadas foram semelhantes, atingindo-se rendimentos máximos, após 11 horas de reação, de 81,1 e 78,8% para os ensaios conduzidos sob 55 e 60 °C, respectivamente. Barros (2015) relata a utilização da solução enzimática de *Rhizopus oligosporus* na hidrólise de quirera de arroz e pó de brunição, alcançando rendimentos máximos de 56,5 e 23,1%, respectivamente, em 24 horas.

Os resultados da hidrólise de diferentes tipos de amido obtidos no presente trabalho apontam o potencial de aplicação da solução enzimática bruta de *Paecilomyces* sp. SF 021 para a obtenção de glicose e estimulam estudos futuros envolvendo otimização do processo, visando, além do aumento da eficiência hidrolítica, uma competitividade com as amilases disponíveis comercialmente.

6. Conclusões

O fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021 mostrou-se versátil quanto a utilização de diferentes subprodutos lignocelulósicos/amilolíticos como substrato para seu crescimento, sendo uma interessante fonte de amilases especialmente quando cultivado por fermentação em estado sólido. Como um gênero de fungo endofítico pouco explorado no contexto da produção/aplicação de amilases, os resultados obtidos no presente trabalho contribuem com a prospecção de novas fontes microbianas destas enzimas.

Os planejamentos experimentais foram ferramentas importantes para a obtenção das amilases pelo cultivo do microrganismo por fermentação em estado sólido, contribuindo para um aumento de aproximadamente 62,5% na atividade amilolítica sacarificante da solução enzimática bruta obtida inicialmente.

A caracterização físico-química das amilases produzidas por *Paecilomyces* sp. SF021 indicou a estabilidade sob ampla faixa de pH e ainda sob temperaturas entre 35 e 45°C o que indica um bom potencial para aplicação industrial.

Por fim, o resultados obtidos pelos experimentos de sacarificação do amido reportados no presente trabalho apontam para o potencial de aplicação das amilases de *Paecilomyces* sp. SF021 na obtenção de glicose e estimulam estudos futuros envolvendo a otimização das condições do processo, visando uma competitividade com as amilases comerciais atualmente empregadas.

7. Referências Bibliográficas

- ABD-ELHALEM, B. T. *et al.* Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. **Annals of Agricultural Sciences**, p. 193–202, 2015.
- AI, Y.; JANE, J. L. **Understanding Starch Structure and Functionality**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2018.
- ANFINSEN, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. **Science**, v. 181, n. 4096, p. 223–229, 1973.
- ASTRAY, G. *et al.* A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1631–1640, out. 2009.
- BALLESTEROS, I. *et al.* Enzymatic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particle sizes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 187–192, 2002.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 175–185, 2012.
- BARROS, F. F. C. **Desenvolvimento de um bioprocesso utilizando-se redíduos para produção de amilases por *Rhizopus oligosporus* e etanol por *Saccharomyces cerevisiae***. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociência, 2015.
- BASTIAN, E. Y. O.; ROCCO, J. L. S. **Guia Técnico Ambiental da Indústria Têxtil**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.sinditextilsp.org.br/guia_p%2Bl.pdf.pdf>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- BELLO PEREZ, L. A.; AGAMA-ACEVEDO, E. **Starch**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.
- BERTOFT, E. Understanding starch structure: Recent progress. **Agronomy**, v. 7, n. 3, 2017.
- BHARATHIRAJA, S. *et al.* **Production of Enzymes From Agricultural Wastes and Their Potential Industrial Applications**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 80
- BON, E. P. S. *et al.* Bioprocessos para produção de enzimas. *In*: **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. [s.l.: s.n.]. p. 95–123.
- BORGES, W. S. . *et al.* Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137–1163, 2009.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. Fungi and Biotechnology. *In*: **The Fungi**. [s.l.: s.n.]. p. 461–542.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 3, p. 225–622, 1939.

- CASTRO, A. M. *et al.* Economic analysis of the production of amylases and other hydrolases by *Aspergillus awamori* in solidstate fermentation of babassu cake. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1–9, 2010.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181–188, 2010.
- CEGARRA, J. Biotecnologia aplicada aos processos de química têxtil. **Química Têxtil**, v. 58, p. 5–14, 2000.
- COPELAND, L. *et al.* Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1527–1534, 2009.
- CORREA, R. C. G. *et al.* Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467–1478, 2014.
- EL-FALLAL, A. *et al.* Starch and Microbial α -Amylases: From concepts to Biotechnological Applications. *In*: CHANG, C.-F. (Ed.). . **Carbohydrates: Comprehensive Studios on Glycobiology and Glycotechnology**. [s.l.] Intech, 2012. .
- ESCARAMBONI, B. *et al.* Ethanol biosynthesis by fast hydrolysis of cassava bagasse using fungal amylases produced in optimized conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 368–377, 1 fev. 2018.
- EZEJI, T. C.; BAHL, H. Purification, characterization, and synergistic action of phytate – resistant α - amylase and α - glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 1, p. 27–38, 2006.
- FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amilose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583–603, 1954.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2/3, p. 85–101, 2003.
- GRAMINHA, E. B. N. *et al.* **Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition****Animal Feed Science and Technology**, 2008.
- GUERRA, N. P. *et al.* Use of Amylolytic Enzymes in Brewing. **Beer in Health and Disease Prevention**, p. 113–126, 1 jan. 2009.
- GUPTA, R. *et al.* Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599–1616, 2003.
- HANSEN, G. H. *et al.* Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327–1341, 2015.

- HATA, Y. *et al.* Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (koji) and in submerged culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 6, p. 532–537, 1997.
- HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation: are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301–306, 2005.
- HORVÁTHOVÁ, V.; JANECEK, Š.; ŠTURDIK, E. Amylolytic enzymes : their specificities , origins and properties. *Biologia*, Bratislava, v. 55, n. 6, p. 605–615, 2000. **Biologia**, v. 55, n. 6, p. 605–615, 2000.
- ISHIDA, H. *et al.* Regulation of the glucoamylase-encoding gene (glaB), expressed in solid-state culture (koji) of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 301–307, 1998.
- ITO, S. *et al.* Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: Enzymatic properties, genetics, and structures. **Extremophiles**, v. 2, n. 3, p. 185–190, 1998.
- KAPOOR, N. *et al.* Production of cellulase enzyme by *Chaetomium* sp. using wheat straw in solid state fermentation. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, p. 1199–1206, 2010.
- KARAM, E. A. *et al.* Production, immobilization and thermodynamic studies of free and immobilized *Aspergillus awamori* amylase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 694–703, 2017.
- KNIGHT, I. M.; MAZZIEIRO, G. Aplicação das enzimas amilolíticas em panificação. **Higiene alimentar**, v. 14, n. 72, p. 35–46, 2000.
- KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 358–363, 2006.
- KUMAR, V. *et al.* Global scenario of industrial enzyme market. In: BENIWA, V.; SHARMA, A. K. (Eds.). . **Industrial Enzymes**. [s.l.] Nova Science Publishers, 2014. p. 91–111.
- KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 2, p. 168–171, 2005.
- KUSARI, S. .; SING, S. .; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 297 –303, 2014.
- MAMO, G.; GESSESSE, A. Production of raw-starch digesting amyloglucosidase by *Aspergillus* sp GP-21 in solid-state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 622–626, 1999.
- MARTINS, S. *et al.* Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365–373, 2011.

- MICHELIN, M. *et al.* Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus *Paecilomyces variotii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 17–25, 2008.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MOBINI-DEHKORDI, M.; JAVAN, F. A. Application of alpha-amylase in biotechnology. **Journal of Biology and Today's World**, v. 1, n. 1, p. 15–20, 2012.
- MOHANAN, N.; SATYANARAYANA, T. Amylases ☆. **Reference Module in Life Sciences**, p. 1–20, 2018.
- MOLLER, M. S.; SVENSSON, B. Structural biology of starch-degrading enzymes and their regulation. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 40, p. 33–42, 2016.
- MOREIRA, F. . *et al.* The use of α -methyl-d-glucoside, a synthetic analogue of maltose, as inducer of amylase by *Aspergillus* sp in solid- state and submerged fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 15–19, 2001.
- NAJAFI, M. F.; DEOBAGKAR, D.; DEOBAGKAR, D. Purification and characterization of an extracellular α - amylase from *Bacillus subtilis* AX20. **Protein Expression and Purification**, v. 41, p. 349–354, 2005.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 6. ed. [s.l.] Artmed, 2014.
- NISA, H. . *et al.* Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50–59, 2015.
- OKUNOWO, W. O. *et al.* Media studies on *Myrothecium roridum* Tode: a potential biocontrol agent for water hyacinth. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 1, n. 4, p. 55–56, 2010.
- OLIVEIRA, A. P. A. *et al.* Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by Solid-State Fer. **The Scientific World Journal**, v. 2016, p. 1–10, 2016.
- OLSEN, H. S.; FALHOLT, P. The role of enzymes in modern detergency. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 1, n. 4, p. 555–567, out. 1998.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2/3, p. 81–84, 2003.
- PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C. *et al.* Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microspores* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 4, p. 329–334, 2008.

- PEIXOTO, S. C. *et al.* Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology**, v. 6, p. 269–273, 2003.
- PONGSAWASDI, P. .; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal Fermentation Technology**, v. 65, n. 4, p. 463–467, 1987.
- RAMAMOORTHY, N. K.; SAMBAVI, T. R.; RENGANATHAN, S. A study on cellulase production from a mixture of lignocellulosic wastes. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 148–158, 2019.
- RAVIRAJA, N. S.; MARIA, G. L.; SRIDHAR, K. R. Antimicrobial evaluation of endophytic fungi inhabiting medicinal plants of the western ghats of India. **Engineering in Life Sciences**, v. 6, p. 515–520, 2006.
- SALEEM, A.; EBRAHIM, M. K. H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. **Journal of Taibah University for Science**, 2013.
- SAMMARTINO, M. Enzymes in Brewing. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 156–164, 2015.
- SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. **Useful Microbial Enzymes-An Introduction**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 2017
- SCHMIELE, M.; SAMPAIO, U. M.; PEDROSA SILVA CLERICI, M. T. **Basic Principles: Composition and Properties of Starch**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661–686, 2005.
- SILVA, T. DA. Fungal Amylases: Applications and Functional Properties. *In: Fungal Enzymes*. [s.l.] CRC Press, 2013. .
- SINGH, P.; KUMAR, S. Microbial Enzyme in Food Biotechnology. **Enzymes in Food Biotechnology**, p. 19–28, 2018.
- SINGH, R. S.; SINGH, T.; PANDEY, A. **Chapter 1 - Microbial Enzymes-An Overview**. [s.l.] Elsevier B.V., 2019.
- SINGH, S.; GUPTA, A. Comparative fermentation studies on amylase production by Aspergillus flavus TF-8 using Sal (Shorea robusta) deoiled cake as natural substrate: Characterization for potential application in detergency. **Industrial Crops and Products**, v. 57, p. 158–165, 2014.
- SINGHANIA, R. R. *et al.* **Recent advances in solid-state fermentation** **Biochemical Engineering Journal**, 15 abr. 2009.
- SINGHANIA, R. R. *et al.* Industrial Enzymes. *In: Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 473–497.

SIVARAMAKRISHNAN, D. . *et al.* α -Amylases from microbial sources: an overview on recent developments. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 173–184, 2006.

SOCCOL, C. R. *et al.* Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52–71, jan. 2017.

SOCCOL, C. R. . *et al.* SOCCOL, C.R.; COSTA, E.S.F.; LETTI, L.A.J.; KARP, S.G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDERBERGHE, L. P.S. Recent developments and innovations in solid-state fermentation. **Biotechnology Research & Innovation**, v. 1, p. 52–71, 2017.

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. *In*: BACON, C. W.; WHITE, J. . (Eds.). . **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 3–29.

SYNOWIECKI, J. The use of starch processing enzymes in the food industry. **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications**, p. 19–34, 2007.

TAHARA, S. .; ROZENFELD., H. **Planejamento de experimentos - DOE**. Disponível em: <<http://www.portaldeconhecimentos.org.br/index.php/por/Conteudo/Planejamento-de-Experimentos-DOE>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. **Current developments in solid-state fermentation** **Biochemical Engineering Journal**, 15 dez. 2013.

TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMMONT, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, n. October 2019, p. 109472, 2020.

VEEN, B. A. VAN DER. Engineering reaction and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. p. 1–75, 2000.

VIHINEN, M.; MANTSALA, P. VIHINEN M.; MANTSALA, P. Microbial amylolytic enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, p. 329–418, 1989.

WANG, S.; LIANG, Y.; LIANG, T. Purification and characterization of a novel alkali-stable α -amylase from *Chryseobacterium taeanense* TKU001, and application in antioxidant and prebiotic. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 745–750, 2011.