

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

LARISSA APARECIDA GONÇALVES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMILASE SECRETADA POR
Rhizoctonia solani AG-1 IA**

Ilha Solteira
2019

LARISSA APARECIDA GONÇALVES

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMILASE SECRETADA POR
***Rhizoctonia solani* AG-1 IA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia, Campus de Ilha Solteira – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Especialidade: Sistemas de Produção.

Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini
Orientador

Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado
Co-orientadora

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

G635p Gonçalves, Larissa Aparecida.
Produção e caracterização de amilase secretada por *Rhizoctonia solani*
AG-1 IA / Larissa Aparecida Gonçalves. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2019
51 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Engenharia. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2019

Orientador: Paulo Cezar Ceresini

Co-orientador: Heloiza Ferreira Alves do Prado

Inclui bibliografia

1. Amilases. 2. *Rhizoctonia solani*. 3. Cultivo em estado sólido.
4. Resíduos agroindustriais. 5. Composição bromatológica.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título:

Produção e caracterização de amilase secretada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA

AUTORA: LARISSA APARECIDA GONÇALVES

ORIENTADOR: PAULO CEZAR CERESINI

COORIENTADORA: HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA,
área: Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:



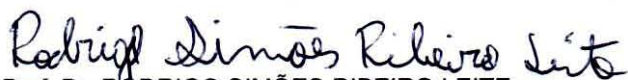
Profa. Dra. HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO

Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Prof. Dr. RENATO GRILLO

Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Prof. Dr. RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais / Universidade Federal da Grande Dourados

Ilha Solteira, 25 de janeiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os dias me envolver em sua presença, renovar as minhas forças e tornar possíveis os sonhos que são inatingíveis por mim.

Aos meus pais, Maria Aldeniz e José Antônio, que me criaram com todo amor, se empenharam em cada uma das minhas conquistas e intercederam por mim em orações para que tudo desse certo. Vocês são os meus melhores amigos! Sem a ajuda de vocês, certamente eu não teria chegado até aqui.

Aos meus queridos irmãos Josmar (*in memoriam*) e Dimas, minha cunhada Tatiana, minha sobrinha Yasmin e minha tia Maria José, que sempre demonstraram preocupação e amor por mim, me incentivaram e vibraram com cada conquista.

A Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado, com quem tive o privilégio de conviver. Obrigada pela contribuição em todos os momentos, pela amizade e confiança, e principalmente, pela sua paciência e disposição em ajudar-me.

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini, por colocar-se à disposição para auxiliar-me no que fosse necessário, pelo esclarecimento de dúvidas e apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UNESP, Campus de Ilha Solteira, pela amizade, dedicação e contribuição à minha formação acadêmica.

Aos funcionários da UNESP, Campus de Ilha Solteira, pela dedicação, paciência, e suporte dado nas diferentes etapas do desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos da faculdade, colegas do laboratório e da vida, pelos agradáveis momentos de convivência, incentivos, conselhos, e por toda ajuda e solidariedade.

Aos professores membro das bancas de Qualificação, Prof. Dr. Marco Eustáquio de Sá e Prof^a. Dr^a. Ana Maria Rodrigues Cassiolato, e de Defesa do mestrado, que disponibilizaram parte do seu tempo para fazer sugestões e críticas, contribuindo para melhoria deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, a qual agradeço.

Muito obrigada!

“Aqueles que saíram chorando, levando a semente
para semear, voltarão cantando, cheios de alegria,
trazendo nos braços os feixes da colheita.”

Salmo 126,6

RESUMO

Rhizoctonia solani AG-1 IA é um patógeno habitante do solo que causa doenças em pastagens e plantas cultivadas, em vários estados brasileiros. Para penetrar e colonizar os tecidos do hospedeiro, o microrganismo utiliza enzimas que podem ser de interesse biotecnológico e industrial. O objetivo do presente trabalho foi produzir e caracterizar a α -amilase secretada por *R. solani* AG-1 IA utilizando produtos e resíduos agroindustriais como substratos para fermentação. Para todos os ensaios foi adotado o processo de cultivo em estado sólido (CES) à temperatura de 25 °C e umidade inicial de 60%. Inicialmente, nove isolados de *R. solani* provenientes de diferentes hospedeiros (arroz, braquiária e soja) foram comparados quanto à produção amilolítica. As maiores atividades enzimáticas foram proporcionadas pelos isolados TO_022 e MT_SO85, procedentes da cultura da soja. Na etapa seguinte, foi avaliado o efeito do substrato sobre a produção enzimática. Farelo de trigo (12,98 U mL⁻¹; TO_022), farelo de soja (3,97 U mL⁻¹; MT_SO85) e braquiária lavada (4,95 U mL⁻¹; TO_022) induziram eficientemente a produção amilolítica. O perfil de produção enzimática no farelo de trigo, melhor substrato avaliado no cultivo, indicou o tempo de 216 h como o mais apropriado para a obtenção de α -amilases pelo isolado TO_022 (22,14 U mL⁻¹), e 240 h para o isolado MT_SO85 (22,84 U mL⁻¹). Para caracterização físico-química da enzima foi utilizado o extrato enzimático bruto do isolado TO_022. A α -amilase de *R. solani* TO_022 exibiu máxima atividade a 55 °C e pH 5,5, e manteve atividade (em torno de 80%) quando incubada à 25 °C, pelo período de 24 h, em pH 4,5 a 7,0. A enzima também é estável quando incubada pelo período de 1 h, em temperaturas de até 45 °C.

Palavras-chave: Amilases. *Rhizoctonia solani*. Cultivo em estado sólido. Resíduos agroindustriais. Composição bromatológica.

ABSTRACT

Rhizoctonia solani AG-1 IA is a soil-borne pathogen that causes diseases in pastures and cultivated plants in several Brazilian states. To penetrate and colonize host tissues, the microorganism uses enzymes that may be of biotechnological and industrial interest. The aim of the present work was to produce and characterize the α -amylase secreted by *R. solani* AG-1 IA using agroindustrial products and residues as substrates for fermentation. For all the tests, the solid state cultivation process (SSC) at 25 °C and initial humidity of 60% was adopted. Initially, nine isolates of *R. solani* from different hosts (rice, Brachiaria grass and soybean) were compared for amylolytic production. The major enzymatic activities were provided by the isolates TO_022 and MT_SO85, from the soybean crop. In the next step, the effect of the substrate on the enzymatic production was evaluated. Wheat bran (12.98 U mL⁻¹; TO_022), soybean meal (3.97 U mL⁻¹, MT_SO85) and washed ruzigrass (4.95 U mL⁻¹; TO_022) efficiently induced amylolytic production. The enzymatic production profile in wheat bran, the best substrate evaluated in the culture, indicated the time of 216 h as the most appropriate to obtain α -amylases by the TO_022 isolate (22.14 U mL⁻¹), and 240 h for the isolated MT_SO85 (22.84 U mL⁻¹). For the physicochemical characterization of the enzyme, the crude enzymatic extract of the TO_022 isolate was used. The α -amylase of *R. solani* TO_022 exhibited maximum activity at 55 °C and pH 5.5, and maintained activity (around 80%) when incubated at 25 °C for 24 h at pH 4.5 to 7.0. The enzyme is also stable when incubated for 1 h at temperatures up to 45 °C.

Keywords: Amylases. *Rhizoctonia solani*. Solid state cultivation. Agroindustrial waste. Bromatological composition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Desenho estrutural das (a) unidades de glicose, (b) amilose e (c) amilopectina	14
Figura 2 -	Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (●) molécula glicose com extremidade redutora; (○) molécula de glicose sem extremidade redutora; (→) indicam o ponto de clivagem preferido na molécula de amido	17
Figura 3 -	Aspecto dos substratos utilizados na fermentação.....	25
Figura 4 -	Perfil de produção enzimática dos isolados RRA37, RRA30 e RRA33 de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, provenientes da cultura do arroz, e cultivados em farelo de trigo lavado, a 25 °C. (a) atividade amilolítica, (b) atividade específica, (c) açúcar redutor e (d) proteína total	30
Figura 5 -	Perfil de produção enzimática dos isolados PAB1B6, ROB2E1 e ROD2D5 de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, provenientes da cultura da braquiária, e cultivados em farelo de trigo lavado, a 25 °C. (a) atividade amilolítica, (b) atividade específica, (c) açúcar redutor e (d) proteína total	31
Figura 6 -	Perfil de produção enzimática dos isolados TO_022, TO_064 e MT_SO85 de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, provenientes da cultura da soja, e cultivados em farelo de trigo lavado, a 25 °C. (a) atividade amilolítica, (b) atividade específica, (c) açúcar redutor e (d) proteína total	32
Figura 7 -	Colonização dos substratos pelo isolado TO_022, após 96 h de cultivo em estado sólido	34
Figura 8 -	Colonização dos substratos pelo isolado MT_SO85, após 96 h de cultivo em estado sólido	35
Figura 9 -	Atividade amilolítica e açúcar redutor total para <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA TO_022 e MT_SO85, após 96 h de cultivo em estado sólido, a 25 °C, em diferentes substratos	38
Figura 10 -	Perfil de produção enzimática, atividade específica, açúcar redutor e proteína total dos isolados TO_022 e MT_SO85 de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, cultivados em farelo de trigo e braquiária lavada, a 25 °C	40
Figura 11 -	(a) pH ótimo e (b) temperatura ótima da α -amilase de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, isolado TO_022.....	41

Figura 12 - Efeito do pH sobre a estabilidade da α -amilase de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA TO_022. Tampão McIlvaine pH 3,0 a 8,0 e tampão glicina-NaOH pH 8,5 a 10,0	42
Figura 13 - Efeito da temperatura sobre a estabilidade da α -amilase de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA TO_022	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados de georreferenciamento dos isolados de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA	24
Tabela 2 -	Proteína, atividade específica e atividade de α -amilase dos isolados TO_022 e MT_SO85 de <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA, provenientes do hospedeiro soja, e cultivados sob fermentação sólida por 96 h a 25 °C	33
Tabela 3 -	Caracterização bromatológica dos substratos.....	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	AMIDO: ESTRUTURA E APLICAÇÃO.....	14
2.2	ENZIMAS DEGRADADORAS DO AMIDO.....	16
2.3	APLICAÇÃO DAS ENZIMAS AMIOLÍTICAS.....	17
2.4	PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA OBTENÇÃO DE AMILASES MICROBIANAS	19
2.5	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	20
2.6	<i>RHIZOCTONIA SOLANI</i> AG-1 IA	21
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	MICROORGANISMOS E PREPARO DO INÓCULO.....	24
4.2	PREPARO DOS SUBSTRATOS	25
4.3	ANÁLISE BROMATOLÓGICA DOS SUBSTRATOS	26
4.4	CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES)	26
4.5	EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA.....	26
4.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMIOLÍTICA E ESPECÍFICA ...	26
4.7	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS.....	27
4.8	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	27
4.9	PERFIL DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E EFEITO DO SUBSTRATO	28
4.10	CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA	28
4.10.1	Temperatura ótima e de estabilidade.....	28
4.10.2	pH ótimo e de estabilidade.....	29
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1	PERFIL DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA NO FARELO DE TRIGO LAVADO	30
5.2	EFEITO DO SUBSTRATO SOBRE A PRODUÇÃO DE AMILASE	32
5.2.1	Composição bromatológica do substrato x atividade amilolítica	36

5.2.2	Inibidores do crescimento microbiano e repressão catabólica do carbono	37
5.3	PERFIL DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA NO FARELO DE TRIGO E BRAQUIÁRIA LAVADA.....	39
5.4	CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA	41
5.4.1	Temperatura e pH ótimos.....	41
5.4.2	Estabilidade ao pH.....	42
5.4.3	Estabilidade térmica	42
6	CONCLUSÕES.....	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

O amido, principal carboidrato de reserva das plantas, é constituído por uma mistura de polímeros de α -glicose unidos por ligações glicosídicas, a amilose e a amilopectina. Milho, trigo, arroz, batata e mandioca são exemplos de matérias-primas amiláceas, plantas que encerram o amido como principal componente, e servem de alimento para seres humanos e outros animais, além de serem utilizadas para a extração econômica desse carboidrato (DAMODARAN *et al.*, 2010; LIMA, 2010)

A obtenção de hidrolisados do amido por conversão enzimática amplia seu leque de aplicações na indústria. Enzimas capazes de quebrar as ligações α -1,4 e α -1,6 da amilose e amilopectina, permitem a formação de compostos de baixa massa molecular, como glicose, maltose e dextrinas, utilizados em indústrias de alimentos (bebidas, panificação, confeitaria, sorvetes, etc) e de álcool combustível (DAMODARAN *et al.*, 2010; POLIZELI; SILVA, 2016).

As amilases também têm ampla aplicação em setores não relacionados a indústria alimentícia, como no acabamento de papéis e tecidos, atuando no processo de desengomagem que sucede a aplicação de pastas de amido, e na fabricação de detergentes (POLIZELI; SILVA, 2016). As enzimas amilolíticas estão entre as mais importantes comercialmente produzidas e perfazem 25 a 33% do mercado internacional de enzimas (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

As enzimas utilizadas na indústria, não só para a despolimerização do amido, como também de outros carboidratos complexos como a celulose e xilana, usualmente são obtidas a partir de microrganismos como fungos e bactérias (BON *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2015). Para produção dessas enzimas, em geral, emprega-se os métodos de cultivo submerso (CSm) e cultivo em estado sólido (CES), este último, mais utilizado para o cultivo de fungos filamentosos graças às semelhanças com seu ambiente natural (ONOFRE *et al.*, 2016).

A produção industrial de enzimas é frequentemente limitada pelos custos dos meios para cultivo, cerca de 40% do investimento requerido corresponde a fonte de carbono (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Assim, a utilização de produtos, subprodutos e resíduos agrícolas, de baixo custo e fácil obtenção, tem sido sugerida como uma alternativa para reduzir os custos da produção enzimática (MAHMOOD *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2017). Farelo de trigo, resíduos da mandioca e da banana, são alguns

exemplos de substratos empregados para a produção de α -amilases (MAHMOOD *et al.*, 2018; RAVINDRAN *et al.*, 2018).

As características do material vegetal empregado no cultivo microbiano, como o teor de amido, celulose, lignina, lipídeos e proteínas, influenciam tanto o tipo de enzima secretada quanto a quantidade (ALMALKI, 2018; COLOGNA *et al.*, 2018; SCHIMIDELL *et al.*, 2001). Também vão influenciar a produção enzimática a cepa do microrganismo utilizado, e até mesmo, o local (fonte ou hospedeiro) de isolamento (GOPINATH *et al.*, 2017).

Fungos filamentosos, saprofíticos ou fitopatogênicos, secretam enzimas e outras proteínas com potencial de aplicação biotecnológica, e apesar da grande diversidade desses microrganismos, os trabalhos com enzimas amilolíticas, em geral, se concentram nos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (RAMOS *et al.*, 2016; SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar a α -amilase do fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, um grupo economicamente importante e geneticamente diverso de patógenos do solo que afetam o cultivo de braquiária, arroz e soja, entre outras culturas, em vários estados brasileiros (CAMPOS; CERESINI, 2006; POLONI *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2007).

A seleção de isolados de *R. solani* AG-1 IA com potencial amilolítico provenientes dos hospedeiros arroz, braquiária e soja, iniciada por Bistratini (2016), foi continuada e ampliada. Novos produtos e resíduos agroindustriais foram empregados na produção da enzima como braquiária lavada, farelo de soja, palha de café, casca de banana e de mandioca. A α -amilase foi caracterizada usando parâmetros bioquímicos, e os substratos utilizados na sua produção, avaliados quanto a constituição bromatológica. A caracterização bromatológica dos substratos permitiu elucidar os parâmetros (teor de açúcares, proteínas, fibras, etc) inerentes aos produtos e resíduos agroindustriais, que favoreceram ou não, sua utilização para obtenção econômica de α -amilases por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

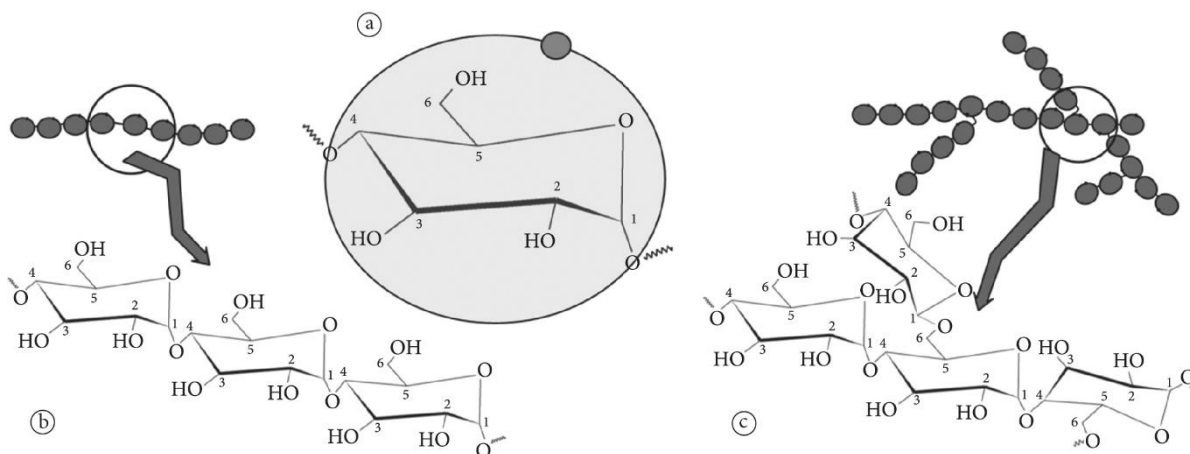
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AMIDO: ESTRUTURA E APLICAÇÃO

O amido e seus produtos constituem a maior parte dos carboidratos digestíveis da dieta humana, fornecendo 70 a 80% das calorias consumidas em todo o mundo (DAMODARAN *et al.*, 2010). Principal carboidrato de reserva das plantas, sua síntese ocorre nos cloroplastos durante o dia, processo em que as unidades de D-glicose se associam em cadeias lineares longas por meio de ligações glicosídicas α -1,4, enquanto as ligações α -1,6 formam pontos de ramificação (POLIZELI; SILVA, 2016). À noite, a clivagem dessas ligações libera maltose e glicose para a produção de sacarose, que passa a ser transportada para as partes não fotossintetizantes da planta. Caules, raízes e folhas jovens utilizam os açúcares exportados como fonte de energia para o crescimento ou estocam-no novamente sob a forma de grânulos de amido, principalmente em raízes tuberosas e tubérculos, como a mandioca e a batata, e em grãos, como o milho, trigo e arroz (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Estruturalmente, o amido é constituído por amilose e amilopectina (Figura 1). A amilose é um polímero linear composto de até 6 mil resíduos de D-glicose unidos por ligações α -1,4-o-glicosídicas. A amilopectina, mais complexa, é formada por unidades de D-glicose unidas por ligações α -1,4 e ramificações α -1,6 a cada 24-30 resíduos de glicose da cadeia linear (GOPINATH *et al.*, 2017; ONOFRE *et al.*, 2016).

Figura 1- Desenho estrutural das (a) unidades de glicose, (b) amilose e (c) amilopectina.



Fonte: Alcázar-Alay e Meireles (2015).

Os grânulos de amido são insolúveis em água fria, mas em água aquecida a uma temperatura próxima a 60 °C absorvem até 25 vezes sua massa, sem perder a forma. Em temperaturas de 65 a 75 °C, o rearranjo da estrutura molecular do amido úmido transforma-o em gel de aparência opalescente, translúcida ou transparente, processo conhecido como gelatinização ou gomificação (LIMA, 2010). Quando a goma resfria ou desidrata, as cadeias de amilose, mais rapidamente que as de amilopectina, tendem a agregar-se formando duplas hélices cristalinas, dando à goma um aspecto de gel firme, viscoelástico (DAMODARAN *et al.*, 2010).

O fenômeno descrito acima é a retrogradação, desejável quando se pretende produzir amido termoplástico, utilizado na fabricação de copos, pratos e talheres descartáveis, indesejável, porém, nas indústrias de alimentos e panificação (CORRADINI *et al.*, 2005; POLIZELI; SILVA, 2016). É que a retrogradação insolubiliza massas de amido e moléculas em solução, sendo responsável, ao menos em parte, pelos defeitos na qualidade de alimentos, como o envelhecimento do pão (observado, por exemplo, pelo aumento da firmeza do miolo e perda da percepção de frescor), perda de viscosidade e formação de precipitados em sopas e molhos (DAMODARAN *et al.*, 2010; PAN *et al.*, 2017).

O tratamento do amido gomificado com ácidos ou enzimas produz uma mistura de D-glicose, maltose e outros malto-oligossacarídeos, formando xaropes estáveis, que não se cristalizam com facilidade, utilizados na fabricação de alimentos e bebidas (DAMODARAN *et al.*, 2010).

As propriedades do amido e seus produtos – viscosidade, claridade, opacidade, textura de gel, higroscopicidade, formação de filmes e adoçantes – permitem que sejam utilizados em vários setores da indústria alimentícia como fabricação de balas e bolos, molhos, refrigerantes, geleias, sorvetes, ligantes em embutidos de carne, espessantes e estabilizantes em alimentos instantâneos, enlatados e congelados (POLIZELI; SILVA, 2016). Em outros setores são empregados para acabamento de pastas de celulose e papel, engomagem de fios e tecidos, compor tintas de impressão e pintura, além da microencapsulação de fármacos e cosméticos (LIMA, 2010).

2.2 ENZIMAS DEGRADADORAS DO AMIDO

As enzimas capazes de hidrolisar o amido estão entre as mais importantes produzidas em escala industrial. Estas enzimas são amplamente empregadas para a produção comercial de diversos tipos de xaropes de açúcar e álcool combustível, a partir do amido, na fabricação de pães e bebidas, além de entrarem na formulação de detergentes, entre outras aplicações (BON *et al.*, 2008; CURVELO-SANTANA *et al.*, 2010).

Amplamente distribuídas na natureza, as enzimas amilolíticas são responsáveis pela reciclagem do carbono contido nos produtos amiláceos em geral e podem ser obtidas de animais, plantas superiores, fungos, leveduras e bactérias (GUPTA *et al.*, 2003).

A degradação do amido pelas enzimas do sistema amilolítico depende, basicamente, da quebra das ligações α -D-1,4-glicosídicas encontradas na amilose e amilopectina, e ligações α -D-1,6-glicosídicas encontradas na amilopectina (POLIZELI; SILVA, 2016).

As enzimas amilolíticas podem ser classificadas em endoamilases, exoamilases, enzimas desramificadoras e transferases, dependendo do ponto de atuação na estrutura do amido (Figura 2) (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002).

As endoamilases agem nas ligações glicosídicas α -1,4 presentes na região interna das cadeias de amilose e amilopectina. A mais conhecida deste grupo é a α -amilase (EC 3.2.1.1) que hidrolisa aleatoriamente o amido, liberando oligossacarídeos de tamanho variados (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002).

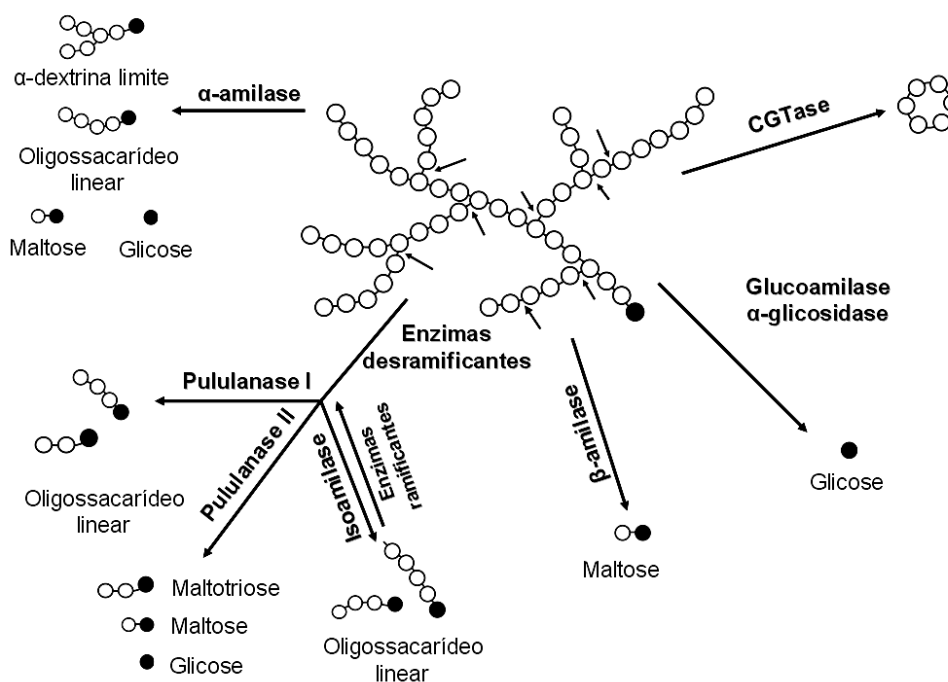
β -amilase (EC 3.2.1.2), glucoamilase (EC 3.2.1.3) e α -glucosidase (EC 3.2.1.20) são exemplos de exoamilases. Essas enzimas atuam nos resíduos externos da amilose e amilopectina, na extremidade não redutora, produzindo oligossacarídeos de baixa massa molecular como a maltose, liberada pela β -amilase, e β -glicose, liberado pela glucoamilase. O produto de hidrólise da α -glucosidase é a α -glicose (BERTOLDO; ANTRANIKIAN, 2002).

As enzimas desramificadoras, isoamilase (EC 3.2.1.68) e pululanase I (EC 3.2.1.41), clivam especificamente as ligações glicosídicas α -1,6 liberando oligossacarídeos lineares de cadeia longa. As pululanases hidrolisam as ligações α -1,6 do pululano (polissacarído formado por unidades de maltotriose unidas por

ligações α -1,6) e amilopectina. Já as isoamilases quebram ligações α -1,6 da amilopectina e dextrinas ramificadas (VAN DER VEEN *et al.*, 2000).

Transferases são enzimas que quebram ligações α -1,4 da molécula doadora para formação de nova ligação glicosídica com uma molécula receptora. Estão incluídas nesse grupo as amilomaltases (EC 2.4.1.25), ciclodextrina glicosiltransferases (CGTase, EC 2.4.1.19) e enzimas ramificadoras (EC 2.4.1.18). As amilomaltases e CGTases formam uma nova ligação α -1,4 enquanto as enzimas ramificadoras formam uma nova ligação α -1,6. A diferença entre as duas primeiras está no produto da reação de transglicosilação, a amilomaltase gera um produto linear e a CGTase forma produtos cíclicos, as ciclodextrinas (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002).

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



Fonte: Bertoldo e Antranikian (2002) modificada por Alves-Prado (2005).

2.3 APLICAÇÃO DAS ENZIMAS AMIOLÍTICAS

A α -amilase foi a primeira enzima utilizada em indústrias de alimentos, fabricação de bebidas e panificação, possibilitando que outras enzimas fossem

testadas e comercializadas como pululanases, proteases, pectinases e celulases (GUPTA *et al.*, 2003; POLIZELI; SILVA, 2016). A produção de xaropes de glicose e frutose, por exemplo, em geral obtidos pelo processamento do amido de milho, emprega três a quatro enzimas: α -amilase, glucoamilase e glicose-isomerase. Inicialmente, o amido de milho é tratado com α -amilase para clivar internamente as moléculas de amilose e amilopectina e produzir oligossacarídeos. Em seguida, a glucoamilase age sobre esses fragmentos liberando unidades de D-glicose. Por fim, a enzima glicose-isomerase converte a glicose em uma mistura equilibrada de D-glicose e D-frutose, na proporção aproximada de 58 e 42%, respectivamente (DAMODARAN *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2009).

Na panificação, a adição de α -amilases fúngicas e maltogênicas na formulação do pão propicia a obtenção de uma massa de boa consistência, maior volume e maciez do miolo, e com maior tempo de prateleira (BLASZCZAK *et al.*, 2004; SAHNI; GOEL, 2015).

Na indústria têxtil, a goma de amido aplicada nos fios para protegê-los contra rompimento e perda de elasticidade durante a tecelagem, é removida por α -amilases precedendo a etapa de lavagem e tingimento dos tecidos (SAINI *et al.*, 2017). De modo semelhante, na indústria papelreira, a cobertura de amido empregada para melhorar as propriedades do papel (suavidade e resistência) e protegê-lo de danos mecânicos durante o processamento, é parcialmente removida por α -amilases para obtenção de papel com densidade e tamanho desejados (GUPTA *et al.*, 2003).

As amilases encontradas em detergentes auxiliam a remoção de manchas provocadas por alimentos que contém amido como molhos, frutas e chocolates. As indústrias de detergentes são as principais consumidoras de enzimas, e as amilases correspondem, em termos quantitativos, ao segundo tipo de enzima mais utilizado estando presente em 90% dos detergentes líquidos (SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

A utilização das amilases nos diferentes setores industriais vai depender de suas características físico-químicas, como respostas às mudanças de temperatura e pH, tolerância à salinidade e estabilidade térmica (AVWIROKO *et al.*, 2015). Amilases termoestáveis, por exemplo, são utilizadas na produção de xaropes de glicose e frutose e na panificação, ao passo que, amilases alcalinas e ativas em baixas temperaturas são preferidas como ingredientes de detergentes (NIYONZIMA; MORE, 2014; SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

Amizyme® (PMP Fermentation Products, Peoria, EUA), Termamyl®, Fungamyl, BAN® (Novozymes, Dinamarca) e α -amylase G9995® (Enzyme Biosystems, EUA) são alguns exemplos de amilases que vem sendo comercializadas para utilização na indústria, todas obtidas a partir de microrganismos (SAHNI; GOEL, 2015).

2.4 PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA OBTENÇÃO DE AMILASES MICROBIANAS

As amilases podem ser obtidas de várias fontes, porém as amilases microbianas são de especial interesse para a indústria graças a sua estabilidade, especificidade e alta produtividade, além de requerer pouco tempo e espaço para a produção (CASTRO; SATO, 2013; DEY *et al.*, 2016).

Existem dois processos para a produção de enzimas microbianas, o cultivo submerso (CSm) e o cultivo em estado sólido (SUNDARRAM; MURTHY, 2014). O CSm caracteriza-se pelo cultivo de microrganismos em uma solução ou suspensão contendo os nutrientes necessários para seu crescimento e produção enzimática. A solução deve conter uma ou mais fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes como vitaminas e sais, além de uma via de entrada para fornecimento de oxigênio, se o processo for aeróbio (POLIZELI; SILVA, 2016).

O CSm é tradicionalmente utilizado para a produção industrial de enzimas, pois proporciona um melhor controle de parâmetros importantes no processo como temperatura e pH (ONOFRE *et al.*, 2016; SARANRAJ; STELLA, 2013). Uma alternativa interessante ao CSm é o cultivo em estado sólido (CES), que se processa com técnicas e equipamentos mais simples, requer pouca energia, gera metabólitos mais concentrados e com menor risco de contaminação por bactérias (ESCARAMBONI *et al.*, 2018; MAHMOOD *et al.*, 2018).

No CES os microrganismos se desenvolvem sobre ou dentro de partículas em uma matriz sólida, e o conteúdo líquido (substrato ou meio umidificante) a ela ligado assegura o metabolismo e crescimento das células, mas não excede à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (SCHIMIDELL *et al.*, 2001). Os fungos filamentosos toleram bem a baixa atividade de água e condições de alta pressão osmótica, assim são preferidos às leveduras e bactérias no CES (ONOFRE *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2014).

No cultivo em estado sólido, a matriz sólida sobre a qual os microrganismos se desenvolvem pode ser utilizada como suporte para absorção de um meio de cultura líquido ou atuar ela mesma como fonte de nutrientes (SCHIMIDELL *et al.*, 2001). A fonte de carbono é o principal fator que afeta os custos da produção enzimática, assim, para a produção econômica de α -amilases, os pesquisadores tem dado atenção significativa a utilização de alimentos e resíduos agroindustriais facilmente disponíveis e baratos (MAHMOOD *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2017).

As fontes de carbono e nitrogênio são, também, os principais aspectos que afetam a produção de enzimas no CES, sendo necessário rastrear uma variedade de substratos para encontrar o mais adequado a produção de uma enzima específica (ALMALKI, 2018; HANSEN *et al.*, 2015). Resíduos lignocelulósicos complexos são geralmente considerados os melhores substratos para o CES (SINGH *et al.*, 2014). Farelo de trigo, casca de batata, palha de trigo, palha de arroz, casca de arroz, resíduos da banana e do café são alguns exemplos de substratos utilizados para a produção de α -amilases (MAHMOOD *et al.*, 2018).

Além da constituição do substrato, outros parâmetros interferem na produção enzimática via CES como tamanho das partículas da matriz sólida, percentual de umidade, concentração de inóculo, nutrientes inorgânicos, temperatura, período de incubação, e principalmente, a cepa microbiana utilizada (ALMALKI, 2018; ASRAT; GIRMA, 2018; SAHNI; GOEL, 2015).

2.5 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

Fungos fitopatogênicos secretam enzimas e outras proteínas que facilitam a colonização dos tecidos do hospedeiro (RAMOS *et al.*, 2016; COLOGNA *et al.*, 2018). Celulases, hemicelulases, pectinases e ligninases, despolimerizam componentes da parede celular das plantas (materiais celulósicos, hemicelulose, resíduos de ácido galacturônico e lignina, respectivamente), proteases quebram proteínas em peptídeos e aminoácidos, lipases hidrolisam lipídeos liberando ácidos orgânicos e glicerol, e amilases atuam sobre a reserva energética na forma de amido produzindo glicose, maltose e dextrinas (BON *et al.*, 2008).

Existe uma correlação alta e positiva entre a virulência de alguns fitopatógenos e a produção dessas enzimas (celulases, pectinases, proteases, lipases e amilases),

como foi demonstrado por Gawade *et al.* (2017) para isolados do fungo *Rhizoctonia bataticola*, principal causador da podridão radicular em soja.

As enzimas secretadas na interação patógeno-hospedeiro, entretanto, podem ser de interesse biotecnológico e industrial (COLOGNA *et al.*, 2018). A aril-álcool oxidase secretada pelo agente causal do carvão-comum do milho, o fungo *Ustilago maydis*, por exemplo, tem aplicação na produção do bioetanol (COUTURIER *et al.*, 2016), e a β -1,3-glucanase de *Rhizoctonia solani* compõe a Kitarase-M, mistura comercial de enzimas produzida em Tóquio, no Japão (VIJAYENDRA; KASHIWAGI, 2009).

2.6 RHIZOCTONIA SOLANI AG-1 IA

Rhizoctonia solani (teleomorfo *Thanatephorus cucumeris*) é um basidiomiceto associado com doenças severas em muitas espécies de plantas cultivadas (WOODHALL *et al.*, 2007). Sua penetração no hospedeiro se dá pela liberação de enzimas que degradam as paredes celulares da epiderme radicular ou hipocótilo, seguida da invasão dos tecidos da planta pelas hifas (CASTRO, 2007). Nos tecidos doentes da planta forma escleródios, massa compacta de micélio que funciona como estrutura de resistência e propagação, e podem permanecer viáveis nos hospedeiros, palhada ou solo, servindo de inóculo para culturas subsequentes (AGRIOS, 2004; CASTRO, 2007).

A espécie *R. solani* é complexa, cosmopolita, possui uma ampla gama de hospedeiros e é subdividida em espécies filogenéticas, segundo a ocorrência da fusão de hifas (anastomose). São 14 grupos de anastomose (AGs) identificados como AG-1 a 13 e AG-IB, e avaliados, além da ocorrência de fusão de hifas, pela similaridade no DNA, temperatura ótima de crescimento, tipo de escleródio formado e perfil isoenzimático, entre outras características (SOUZA *et al.*, 2007).

Na América do Sul, o grupo de anastomose 1 IA (AG-1 IA) do fungo *R. solani* surgiu como importante patógeno de pastagens do gênero *Urochloa* sp. A doença foi detectada inicialmente na Colômbia, em áreas onde o cultivo de arroz foi substituído pelo cultivo de capim braquiária (*Urochloa* sp.). A troca de hospedeiro devido à sobreposição ou proximidade com áreas de cultivo de arroz, também foi observada nas culturas do milho e da soja (POLONI *et al.*, 2016).

Queima foliar, podridão do coleto e morte da planta são alguns dos sintomas da rizoctoniose em braquiária que, no Brasil, ataca pastagens nos estados do Acre, Maranhão, norte do Mato Grosso, Rondônia, sul do Pará e Tocantins (POLONI *et al.*, 2016). Manchas ovais, elípticas e bordas marrons na bainha e colmos caracterizam a rizoctoniose em cultivares de arroz, presente, principalmente, em lavouras de arroz irrigado no Tocantins (SOUZA *et al.*, 2007). Na soja, além de necrose foliar, o fungo causa lesões nas hastes e pecíolos e, sob condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento, provoca perdas de até 60% na produção dos estados do Maranhão, Mato Grosso, Piauí, Tocantins, Pará e Roraima (CAMPOS; CERESINI, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo a produção e caracterização da α -amilase secretada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, obtida sob cultivo em estado sólido, utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Selecionar, entre os isolados provenientes de diferentes hospedeiros (arroz, braquiária e soja), aqueles que apresentam maior atividade amilolítica;

b) Cultivar as linhagens selecionadas em produtos e resíduos agroindustriais, visando alternativas mais baratas e sustentáveis de substratos para a obtenção de enzimas;

c) Comparar ensaios de fermentação utilizando substratos de composição bromatológica variada a fim de verificar que parâmetros – teor de açúcar, proteínas e fibras, entre outros – exercem maior influência sobre a produção amilolítica do microrganismo estudado;

d) Estabelecer, por meio do perfil de produção enzimática, o melhor tempo de cultivo para obtenção da enzima de interesse e,

e) Caracterizar a atividade enzimática quanto à temperatura e pH, para o isolado, tempo de fermentação e meio de cultivo, que apresentou maior produção de amilase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS E PREPARO DO INÓCULO

Para o estudo foram empregados nove isolados do fungo filamentoso *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, provenientes das culturas do arroz, braquiária e soja, cultivadas na região Norte e Centro-Oeste do Brasil (Tabela 1).

Os isolados avaliados pertencem à coleção de fungos fitopatogênicos do Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos da UNESP, Campus de Ilha Solteira, sob responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini, e foram selecionados como isolados com potencial amilolítico, com base nos dados de produção enzimática publicados por Bistratini (2016).

Tabela 1- Dados de georreferenciamento dos isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

Hospedeiro	Estado	Código do isolado	Latitude	Longitude
Arroz	Roraima	RR_A37	+03 06 00	-60 49 00
Arroz	Roraima	RR_A30	+03 06 00	-60 49 00
Arroz	Roraima	RR_A33	+03 06 00	-60 49 00
Braquiária	Rondônia	ROB2D5	-09 50 29.2	-63 39 39.7
Braquiária	Rondônia	ROB2E1	-09 50 29.2	-63 39 39.7
Braquiária	Pará	PA_B1B6	-02 53 45.5	-47 33 27.9
Soja	Tocantins	TO_022	-8.97 S	-48.17 W
Soja	Tocantins	TO_064	-8.97 S	-48.17 W
Soja	Mato Grosso	MT_S085	-16.33 S	-55.93 W

Fonte: Modificada de Bistratini (2016).

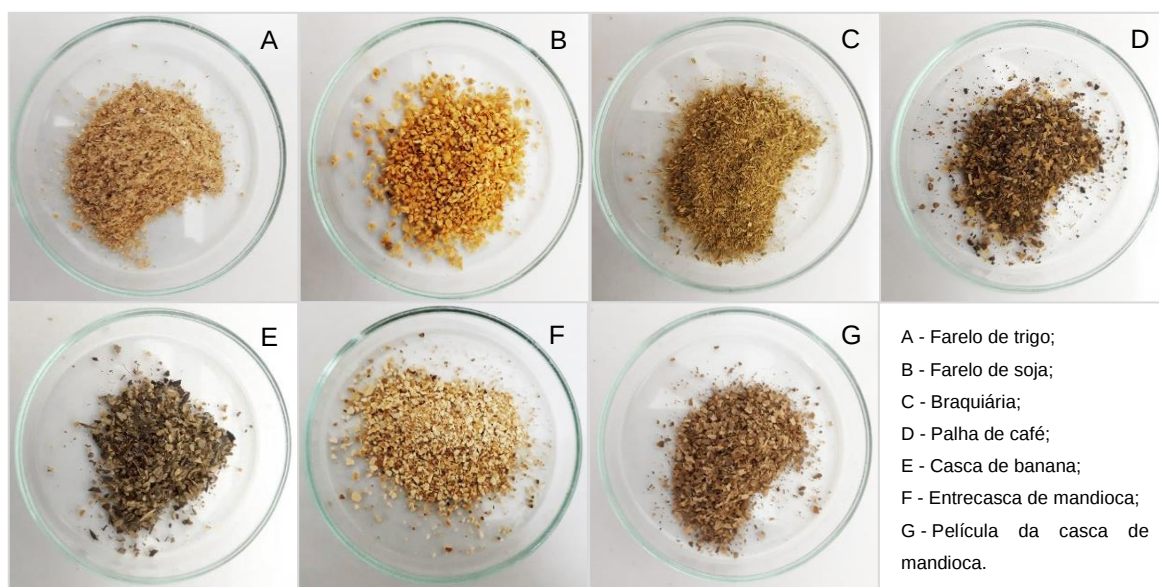
Os isolados foram preservados pelo armazenamento de escleródios em sílica gel a - 21 °C, e para crescimento ou reativação do fungo, foi utilizado meio BDA (Batata Dextrose Ágar).

Repiques obtidos a partir do crescimento de escleródios em placas de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar), a 25 °C, foram transferidos para outras placas nas mesmas condições de cultivo, e destas últimas, discos de 9 mm de micélio, com cerca de 72 h de desenvolvimento, foram utilizados para inocular frascos erlenmeyer contendo os substratos em análise.

4.2 PREPARO DOS SUBSTRATOS

Diferentes produtos e resíduos agroindustriais foram avaliados como substrato para o cultivo em estado sólido (CES): farelo de trigo; farelo de soja; braquiária (*Urochloa ruziziensis*); palha de café; casca de banana; entrecasca e película da casca de mandioca (Figura 3). Os materiais foram secos em estufa a 50 ± 5 °C, triturados em moinho de faca e peneirados para a obtenção de fragmentos com granulometria média de 2 ± 1 mm.

Figura 3- Aspecto dos substratos utilizados na fermentação.



Fonte: Próprio autor.

O farelo de trigo utilizado foi fabricado pela empresa Bungue Alimentos S.A (Tatuí-SP); o farelo de soja, fornecido pela empresa Cargill (Três Lagoas-MS); braquiária e banana foram colhidas na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNESP, Campus de Ilha Solteira (FEPE, Selvíria-MS); a palha de café, obtida em máquina de beneficiamento de café (Santa Fé do Sul-SP) e a mandioca, comprada no comércio local (Ilha Solteira-SP).

A mandioca teve os constituintes da casca – entrecasca e película externa – analisados separadamente. Os demais substratos, a exceção do farelo de soja, foram lavados até a remoção dos açúcares redutores totais. O açúcar redutor total foi quantificado na água de lavagem, de acordo com o método do reagente DNS proposto por Miller (1959). Os substratos foram avaliados com e sem o processo de lavagem.

4.3 ANÁLISE BROMATOLÓGICA DOS SUBSTRATOS

A análise da composição bromatológica dos substratos foi realizada no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Biologia e Zootecnia da UNESP, Campus de Ilha Solteira.

O teor de carboidratos solúveis foi determinado conforme Johnson et al. (1966) e os teores de matéria seca (MS), nitrogênio total (N), proteína bruta (PB), fibra de detergente neutro (FDN), fibra de detergente ácido (FDA), hemicelulose, celulose e lignina, segundo metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002).

4.4 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES)

O cultivo foi realizado em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de substrato e 6 mL de solução salina ($1,4 \text{ g L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $2 \text{ g L}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4$, $0,2 \text{ g L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $0,3 \text{ g L}^{-1} (\text{NH}_2)_2\text{CO}$). Os frascos foram autoclavados durante 20 min a 121°C , inoculados assepticamente com 5 discos de 9 mm de meio com micélio em desenvolvimento, e mantidos em BOD à 25°C , por 96 h. A umidade inicial dos diferentes substratos com a adição da solução de sais foi estimada em 60%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

O extrato enzimático bruto foi obtido pela adição de 50 mL de água destilada em cada frasco erlenmeyer, seguida de agitação a 200 rpm pelo período de 1 h. As amostras foram filtradas em gaze e centrifugadas a $10.000 \times g$ por 15 min a 5°C . O sobrenadante foi empregado nas análises enzimáticas.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMILOLÍTICA E ESPECÍFICA

A atividade amilolítica foi determinada com 0,45 mL de solução amido solúvel a 0,5% em tampão acetato (0,1M pH 5,5) e adição de 0,05 mL da solução enzimática bruta. A mistura de reação foi incubada por 10 minutos a 50°C , paralisada com 0,50 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e, em seguida, transferida ao banho de ebulição por 10 min. Após resfriar em banho de gelo foi adicionado 4 mL de água à

mistura reacional. Os açúcares redutores liberados foram quantificados medindo-se a absorbância a 540 nm, segundo o método descrito por Miller (1959). Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μmol de açúcares redutores por minuto de reação. A solução de glicose a 0,1% (10 mg mL^{-1}) foi usada como padrão.

A atividade específica (U mg^{-1} proteína) foi calculada dividindo-se a concentração de atividade enzimática (U mL^{-1}) pela concentração de proteína total (mg mL^{-1}).

4.7 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS

A quantificação de açúcares redutores totais presentes na amostra foi realizada misturando 0,25 mL do reagente DNS em 0,25 mL da solução enzimática bruta (ou 0,25 mL da água de lavagem, na quantificação de açúcares do substrato) e transferindo a mistura de reação ao banho de ebulição onde permaneceu por 10 minutos. A mistura de reação foi resfriada em banho de gelo e após adição de 2,5 mL de água foi determinada a absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, conforme método proposto por Miller (1959).

4.8 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Na quantificação de proteínas totais a mistura de reação foi composta de 0,50 mL da solução enzimática bruta, 0,45 mL do reagente A (2,0 g L^{-1} $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, 100,0 g L^{-1} Na_2CO_3 , 0,5 mL L^{-1} solução NaOH a 1N) e incubada em banho maria a 50 °C por 10 min. Após, à mistura de reação foi adicionado 0,05 mL do reagente B (2% $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$, 1% CuSO_4 , 10% solução NaOH , a 1N) e incubada à temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, foi adicionado 1,5 mL do reagente C (Folin Ciocalteu e água destilada na proporção 1:15) à mistura, e incubada em banho maria a 50 °C por 10 min. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 650 nm conforme o método Hartree-Lowry (HARTREE, 1972) e a concentração de proteína nas amostras foi determinada utilizando a curva de calibração soro albumina bovina (0 - 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

4.9 PERFIL DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E EFEITO DO SUBSTRATO

Os nove isolados de *R. solani* tiveram a atividade amilolítica, específica, proteína e açúcar redutor quantificados a cada 24 h, pelo período de 10 dias (240 h), sob cultivo em estado sólido, a 25 °C, em farelo de trigo lavado. A partir do perfil de produção enzimática no farelo de trigo lavado, ficou estabelecido os dois isolados com maior atividade amilolítica, e o tempo mínimo de cultivo para boa produção de amilase.

No teste subsequente, as atividades amilolíticas dos dois isolados foram comparadas em diferentes substratos (farelo de trigo; farelo de trigo lavado; braquiária; braquiária lavada; farelo de soja; palha de café; palha de café lavada; casca de banana; casca de banana lavada; entrecasca de mandioca e película da casca de mandioca) às 96 h no CES, e os materiais que, em média, proporcionaram maior atividade enzimática, tiveram o perfil de produção amilolítica neles avaliado.

4.10 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

As propriedades físicas e químicas da amilase foram determinadas pelo método de Miller (1959) descrito no item 4.6, utilizando o extrato enzimático bruto obtido no substrato e tempo de cultivo que apresentou maior atividade amilolítica.

4.10.1 Temperatura ótima e de estabilidade

A determinação da temperatura ótima da amilase foi realizada incubando-se a mistura reacional (0,45 mL de solução amido solúvel a 0,5% em tampão acetato (0,1M pH 5,5) e 0,05 mL da solução enzimática bruta) em diferentes temperaturas, de 30 a 65 °C, em intervalos de 5 °C, e na temperatura de geladeira, a 10 °C.

A estabilidade da amilase à temperatura foi avaliada incubando-se a solução enzimática bruta, por 1 h, em cada uma das temperaturas supracitadas, e a atividade amilolítica residual, determinada na temperatura e pH ótimos.

4.10.2 pH ótimo e de estabilidade

Para determinação do pH ótimo da atividade enzimática foi utilizado o tampão McIlvaine 100 mM L⁻¹, pH 3,0 a 8,0 e tampão glicina-NaOH 100 mM L⁻¹, pH 8,5 a 11,0, ambos, com intervalos de 0,5 unidades de pH (VILLELA *et al.*, 1973).

A estabilidade da amilase foi avaliada incubando-se a solução enzimática bruta, por 24 h, à 25 °C, em cada um dos tampões supracitados, e a atividade amilolítica residual, determinada na temperatura e pH ótimos.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Sisvar, da Universidade Federal de Lavras/ Brasil. O teste de Scott Knott a 5% de significância foi empregado para detectar diferenças significativas entre os grupos analisados.

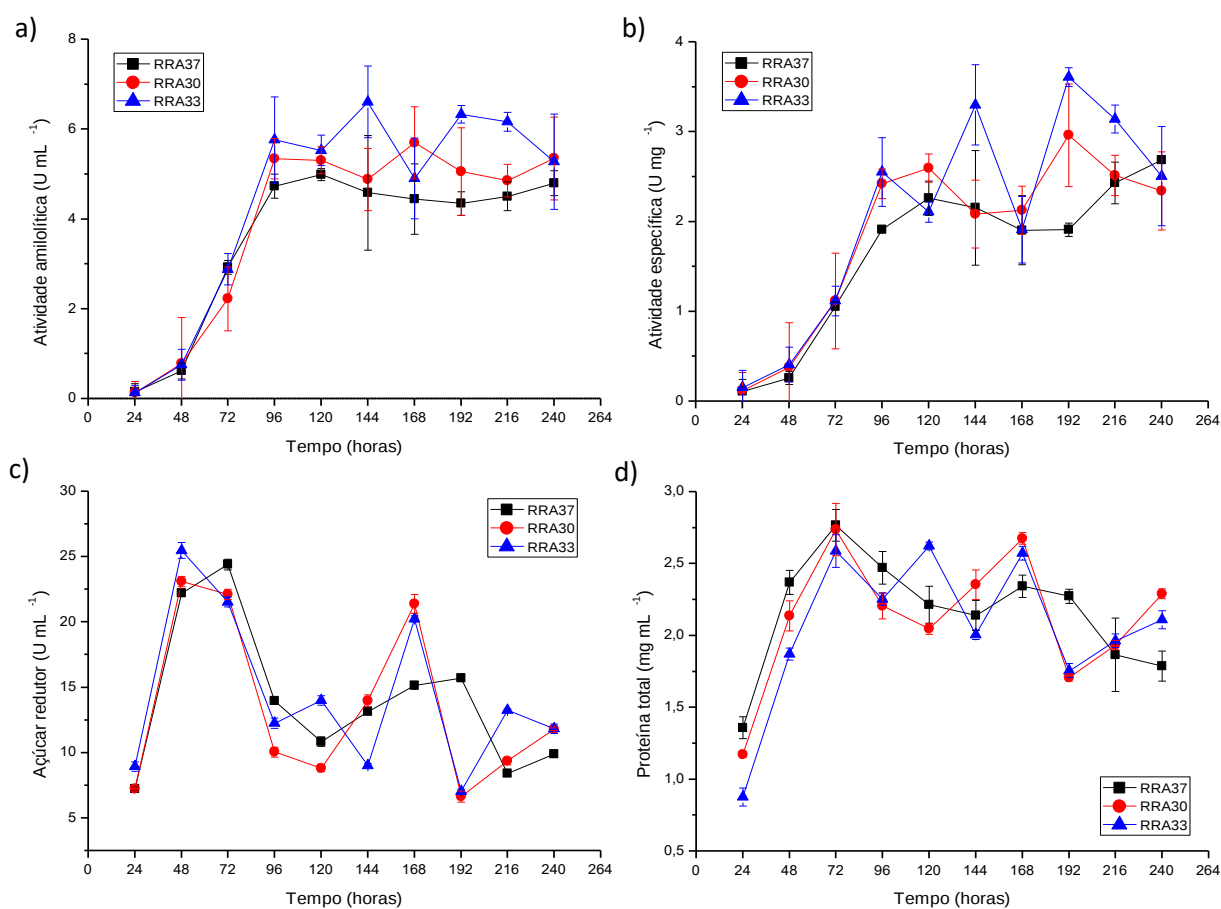
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA NO FARELO DE TRIGO LAVADO

O perfil de produção enzimática dos isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA foi avaliado em farelo de trigo lavado, sob cultivo em estado sólido, pelo período de 240 h, a 25 °C (Figuras 4, 5 e 6).

O total de proteínas detectado nos extratos enzimáticos às 48 h de cultivo foi praticamente o dobro em comparação àqueles detectados às 24 h (Figuras 4d, 5d e 6d). A liberação de açúcares redutores (Figuras 4c, 5c e 6c) concomitante a elevação no teor de proteínas nas primeiras 72 h, deu indícios de que o primeiro foi resultante das atividades metabólicas do microrganismo nesse período.

Figura 4 - Perfil de produção enzimática dos isolados RRA37, RRA30 e RRA33 de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, provenientes da cultura do arroz, e cultivados em farelo de trigo lavado, a 25 °C. (a) atividade amilolítica, (b) atividade específica, (c) açúcar redutor total e (d) proteína total.



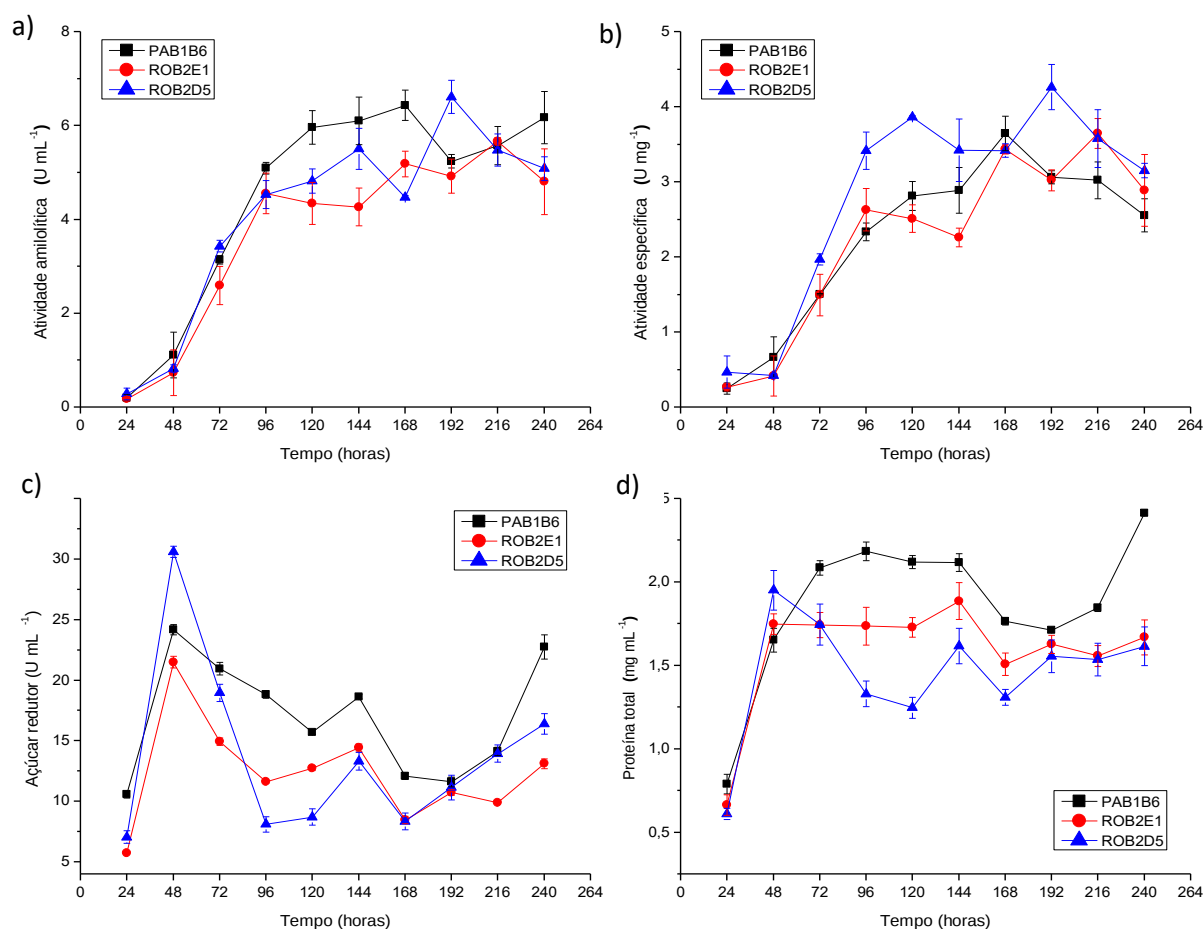
Fonte: Próprio autor.

A produção de α -amilases (Figuras 4a, 5a e 6a) também cresceu no início da fermentação, mas diferente do açúcar redutor, o pico de atividade amilolítica não coincidiu com o de produção de proteína.

Os isolados provenientes do arroz, braquiária e soja, em geral, apresentaram boa atividade amilolítica (Figuras 4a, 5a e 6a) a partir das 96 h de cultivo, e específica (Figuras 4b, 5b e 6b), a partir das 120 h, para o cultivo realizado em farelo de trigo lavado.

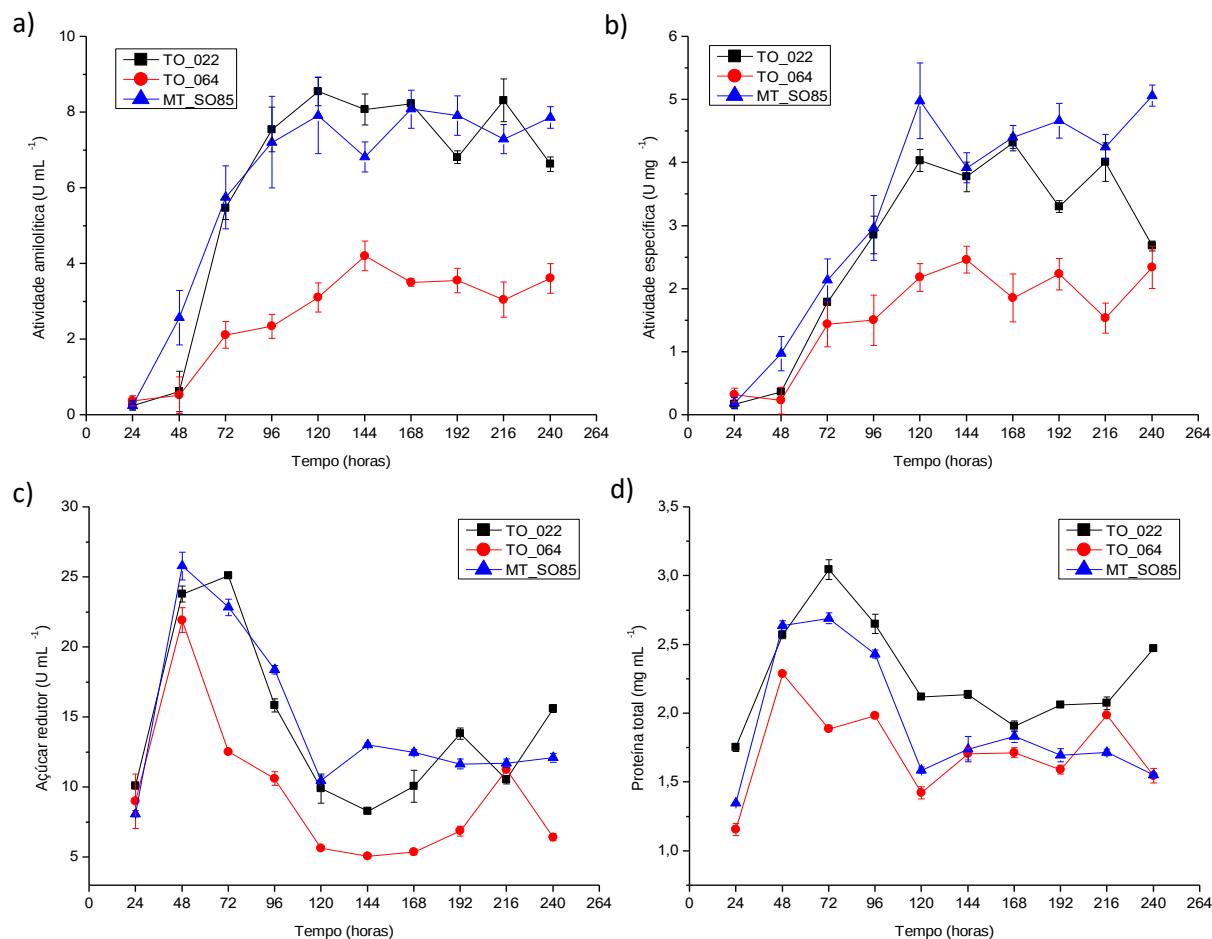
A máxima atividade amilolítica $85,5 \text{ U g}^{-1}$ substrato ($8,55 \text{ U mL}^{-1}$), às 120 h de cultivo (Figura 6a) e máxima atividade específica $5,06 \text{ U mg}^{-1}$ proteína, às 240 h (Figura 6b), foram proporcionadas por isolados provenientes da soja, TO_022 e MT_SO85 respectivamente, que foram, por isso, selecionados para a etapa seguinte, onde investigou-se a atividade amilolítica variando-se os substratos.

Figura 5- Perfil de produção enzimática dos isolados PAB1B6, ROB2E1 e ROD2D5 de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, provenientes da cultura da braquiária, e cultivados em farelo de trigo lavado, a 25°C . (a) atividade amilolítica, (b) atividade específica, (c) açúcar redutor e (d) proteína total.



Fonte: Próprio autor.

Figura 6- Perfil de produção enzimática dos isolados TO_022, TO_064 e MT_SO85 de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, provenientes da cultura da soja, e cultivados em farelo de trigo lavado, a 25 °C. (a) atividade amilolítica, (b) atividade específica, (c) açúcar redutor e (d) proteína total.



Fonte: Próprio autor.

5.2 EFEITO DO SUBSTRATO SOBRE A PRODUÇÃO DE AMILASE

O efeito do substrato sobre a produção de α -amilase pelos isolados TO_022 e MT_SO85 do fungo *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, foi avaliado sob cultivo em estado sólido (CES), após 96 h de incubação a 25 °C (Tabela 2).

Dentre os materiais testados, farelo de trigo foi o que apresentou maior atividade amilolítica (TO_022, 12,98 U mL⁻¹ ou 129,8 U g⁻¹ substrato; MT_SO85, 6,58 U mL⁻¹ ou 65,8 U g⁻¹ substrato) e específica (TO_022, 6,49 U mg⁻¹ de proteína), sendo melhor utilizar farelo de trigo a farelo de trigo lavado, exceto para a atividade específica do MT_SO85, que foi maior no farelo de trigo lavado (3,32 U mg⁻¹ de proteína) (Tabela 2).

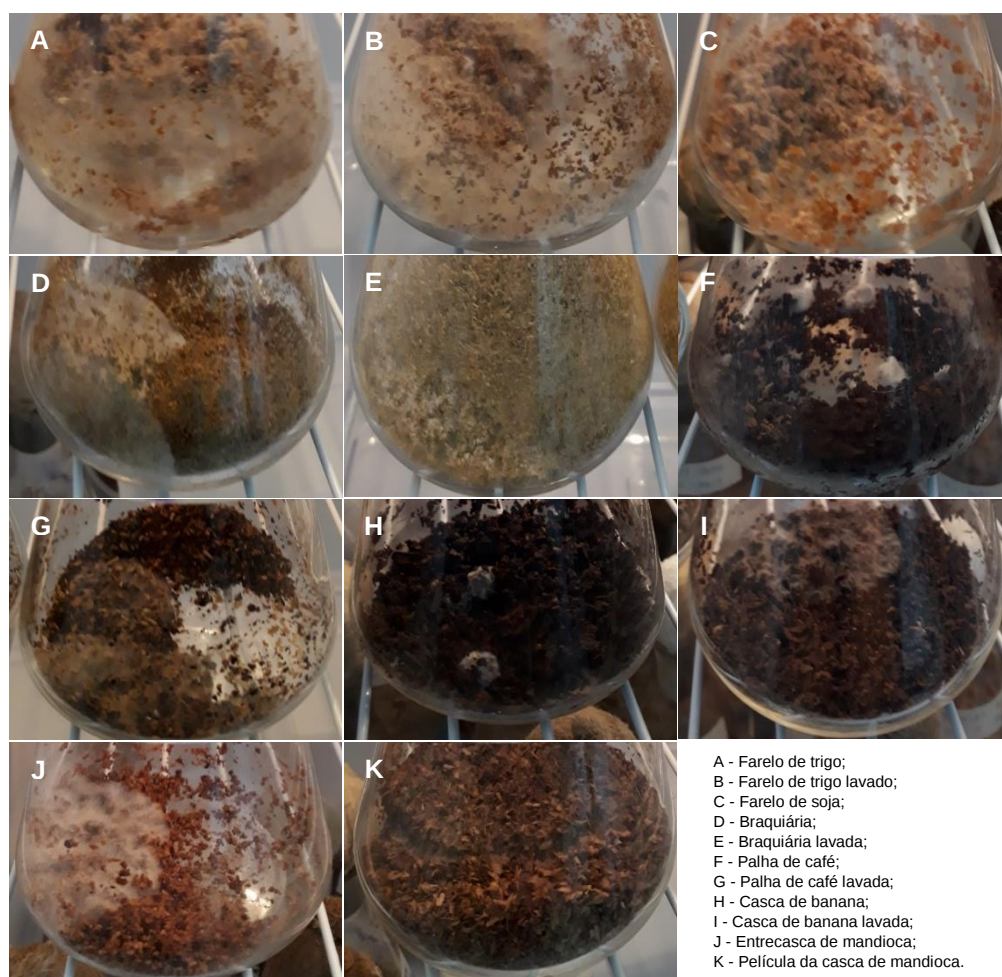
Tabela 2- Proteína, atividade específica e atividade de α -amilase dos isolados TO_022 e MT_SO85 de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, provenientes do hospedeiro soja, e cultivados sob fermentação sólida por 96 h a 25 °C.

Substrato	TO_022			MT_SO85		
	Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. Específica (U mg ⁻¹)	Ativ. Amilolítica (U mL ⁻¹)	Proteína (mg mL ⁻¹)	Ativ. Específica (U mg ⁻¹)	Ativ. Amilolítica (U mL ⁻¹)
Farelo Trigo	2,01 ± 0,17 d	6,49 ± 1,43 a	12,98 ± 2,41 a	1,99 ± 0,09 e	3,32 ± 0,16 b	6,58 ± 0,14 a
Farelo Trigo Lavado	1,29 ± 0,16 e	5,33 ± 0,95 a	6,78 ± 0,57 b	1,17 ± 0,40 f	4,40 ± 0,94 a	4,92 ± 0,54 b
Farelo Soja	5,40 ± 0,44 a	0,47 ± 0,13 b	2,53 ± 0,64 d	5,01 ± 0,53 a	0,80 ± 0,05 c	3,97 ± 0,20 c
Braquiária	4,36 ± 0,25 b	0,51 ± 0,05 b	2,24 ± 0,30 d	4,21 ± 0,08 b	0,29 ± 0,07 d	1,24 ± 0,31 e
Braquiária Lavada	2,77 ± 0,30 c	1,80 ± 0,19 b	4,95 ± 0,16 c	2,71 ± 0,12 d	1,19 ± 0,17 c	3,24 ± 0,61 d
Palha Café	5,10 ± 0,23 a	0,37 ± 0,05 b	1,93 ± 0,34 d	4,88 ± 0,28 a	0,03 ± 0,01 d	0,16 ± 0,03 f
Palha Café Lavada	0,62 ± 0,06 f	0,45 ± 0,07 b	0,28 ± 0,08 e	0,60 ± 0,08 g	0,20 ± 0,29 d	0,13 ± 0,18 f
Casca Banana	2,71 ± 0,32 c	0,67 ± 0,13 b	1,80 ± 0,12 d	3,49 ± 0,43 c	0,30 ± 0,08 d	0,99 ± 0,10 e
Casca Banana Lavada	0,56 ± 0,05 f	0,13 ± 0,18 b	0,30 ± 0,11 e	0,89 ± 0,47 f	0,21 ± 0,04 d	0,11 ± 0,02 f
Entrecasca Mandioca	1,09 ± 0,03 e	0,76 ± 0,41 b	0,83 ± 0,47 e	0,82 ± 0,07 f	1,21 ± 0,11 c	1,00 ± 0,17 e
Película Casca Mandioca	0,29 ± 0,04 f	1,07 ± 0,54 b	0,30 ± 0,11 e	0,29 ± 0,04 g	0,88 ± 0,25 c	0,26 ± 0,10 f

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, em 5% de probabilidade, pelo teste de Scott Knott; e ± indica o desvio padrão.
Fonte: Próprio autor.

Posteriormente ao farelo de trigo, braquiária lavada ($4,95 \text{ U mL}^{-1}$ ou $49,5 \text{ U g}^{-1}$ substrato) e farelo de soja ($3,97 \text{ U mL}^{-1}$ ou $39,7 \text{ U g}^{-1}$ substrato) foram mais eficientes em promover a produção de α -amilase pelos isolados TO_022 e MT_SO85 respectivamente, comparado aos demais substratos (Tabela 2). Já a palha de café e casca de banana não se mostraram apropriados ao cultivo do TO_022 e MT_SO85, pois não houve adequada colonização dos substratos, ficando o crescimento das hifas de *R. solani* aparentemente limitado aos discos de meio BDA utilizados como inóculo (Figuras 7 e 8).

Figura 7- Colonização dos substratos pelo isolado TO_022, após 96 h de cultivo em estado sólido.

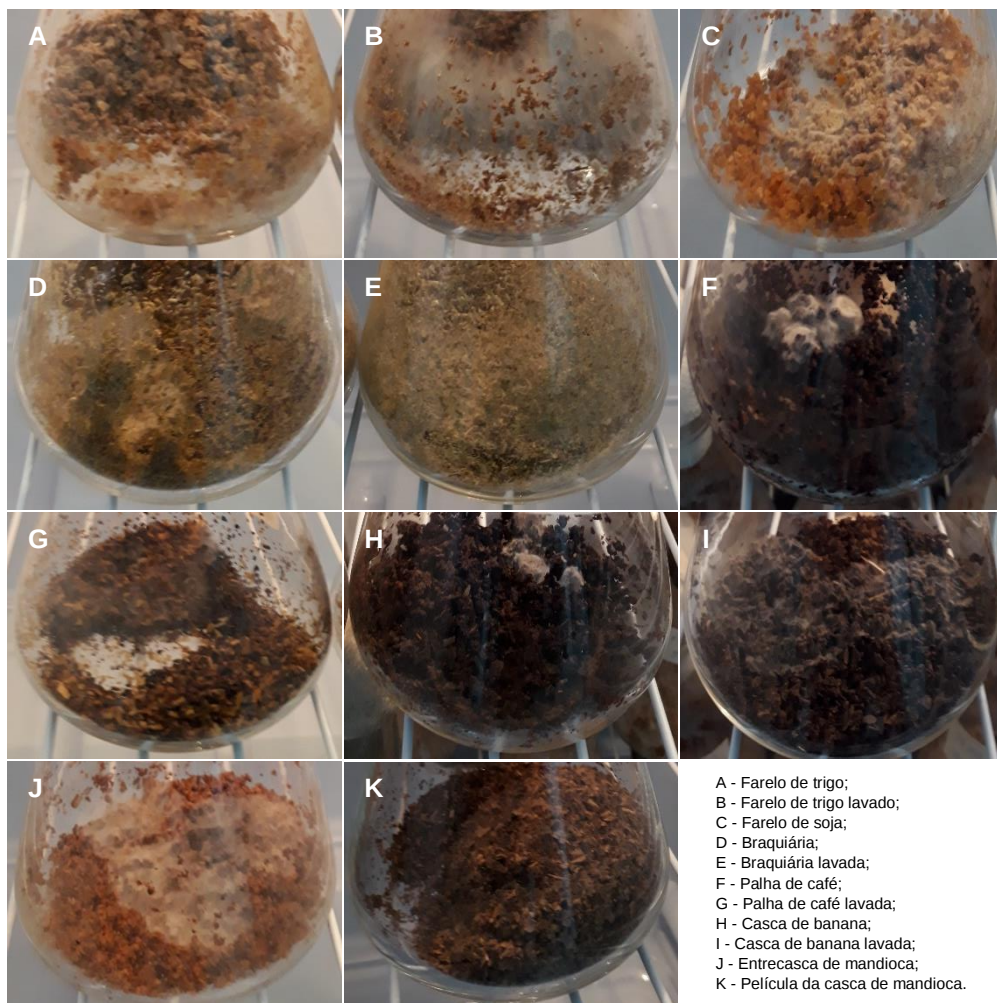


Nota: Fotos tiradas da base dos frascos (Erlenmeyer) de fermentação.

Fonte: Próprio autor.

Rhizoctonia solani AG-1 IA TO_022 e MT_SO85, quando cultivados em farelo de trigo, farelo de soja ou braquiária lavada, demonstraram serem bons produtores de amilase em relação aos dados encontrados na literatura.

Figura 8- Colonização dos substratos pelo isolado MT_SO85, após 96 h de cultivo em estado sólido.



Nota: Fotos tiradas da base dos frascos (Erlenmeyer) de fermentação.

Fonte: Próprio autor.

Oliveira *et al.* (2015) selecionando cepas de leveduras para produção de enzimas com potencial amilolítico, detectou $14,68 \text{ U mL}^{-1}$ para *Candida parapsilosis* após 120 h de cultivo (CES), a 28°C , no farelo de trigo. Freitas *et al.* (2014) avaliando a produção de α -amilase por *Syncephalastrum racemosum*, sob 72 h cultivo (CES) em farelo de trigo, relatou a produção enzimática de 24 U g^{-1} substrato.

Kaur *et al.* (2015) estudando a condição ótima para obtenção de α -amilases de *Rhizopus oryzae* no farelo de arroz, observou a produção de $2,08 \text{ U mL}^{-1}$ após 5 dias de fermentação sólida, a 30°C . Tallapragada *et al.* (2017) testando diferentes resíduos (casca de laranja, casca de cebola, casca de beterraba, torta de amendoim e torta de coco) como fonte de nutrientes para fermentação sólida de *Monascus sanguineus*, verificou a atividade amilolítica máxima de $0,029 \text{ U mL}^{-1}$, em casca de beterraba.

5.2.1 Composição bromatológica do substrato x atividade amilolítica

As fontes de carbono utilizadas pelos fungos filamentosos no processo de fermentação afetam grandemente a composição de proteínas extracelulares produzidas (CARRILLO-SANCEN *et al.*, 2016). Assim, os resíduos agroindustriais empregados na produção de α -amilase pelos isolados de *R. solani* foram quantificados quanto ao teor de nitrogênio, proteínas, fibras de detergente neutro (FDN), fibras de detergente ácido (FDA), carboidratos solúveis, celulose, hemicelulose e lignina, em percentual de matéria seca (%MS) (Tabela 3), e comparados quanto à atividade amilolítica (Tabela 2).

Os substratos que propiciaram melhor desenvolvimento de hifas e produção de α -amilase – farelo de trigo, farelo de soja e braquiária lavada – diferiram quanto à composição bromatológica. O nitrogênio, elemento tido como um dos mais importantes requerido pelo microrganismo no processo de fermentação, estava presente em grande quantidade no farelo de soja, 8,0% da matéria seca, mais que o triplo observado para o farelo de trigo (2,46%), melhor substrato avaliado no cultivo. O farelo de trigo, entretanto, possui substancialmente mais amido (49,14% da matéria seca), polissacarídeo passível de ataque pelas α -amilases, do que o farelo de soja (5,50%), cujo peso seco é representado principalmente por proteínas (49,99%) (ZEOULA *et al.*, 1999).

Tabela 3- Caracterização bromatológica dos substratos.

AMOSTRA	PB	N	FDN	FDA	HEM	LIG	CEL	CHOs
	%MS							
Farelo de Trigo	15,39	2,46	42,37	13,66	28,70	4,30	8,04	11,24
Farelo de Soja	49,99	8,00	16,04	6,06	9,97	0,32	5,33	14,80
Braquiária (<i>U. ruziziensis</i>)	10,01	1,60	69,39	35,60	33,78	4,57	29,51	7,54
Palha de Café	10,69	1,71	38,40	27,02	11,38	8,22	17,28	28,00
Casca de Banana	3,75	0,60	27,37	16,39	10,97	5,03	10,07	35,84
Entrecasca Mandioca	5,05	0,81	25,55	12,05	13,50	2,88	8,21	12,29
Película Casca Mandioca	4,29	0,69	86,47	73,53	12,95	44,61	26,90	1,45

PB- Proteína Bruta; N- Nitrogênio; FDN- Fibra de detergente neutro; FDA- Fibra de detergente ácido; HEM- Hemicelulose; LIG- Lignina; CEL- Celulose; CHOs- Carboidratos solúveis. Valores em percentual de matéria seca (%MS).

Fonte: Próprio autor.

A braquiária tem alto teor de fibras (69,39%, FDN; 35,60%, FDA) e pelo processo de lavagem, provavelmente, reduziu o teor de carboidratos solúveis e outros nutrientes facilmente lixiviáveis, mas não o teor de celulose (29,51%), hemicelulose (33,78%) e lignina (4,57%). Assim podemos supor, com base na composição bromatológica (Tabela 3) e atividades amilolítica e específica (Tabela 2), que do *pool* de enzimas liberadas pelo fungo na braquiária lavada, em comparação ao farelo de trigo, maior energia foi gasta na produção de enzimas que degradam a parede celular vegetal, como as celulasas e hemicelulasas, do que na produção de amilases.

Uma ampla variedade de resíduos agroindustriais vem sendo testados por pesquisadores quanto à adequação como fonte de carbono para a produção de amilases microbianas, mas o farelo de trigo continua sendo o substrato mais utilizado no cultivo em estado sólido para a obtenção dessa enzima (SOUZA; PERALTA, 2001).

Oliveira *et al.* (2016) comparando os resíduos agroindustriais farelo de soja, farelo de trigo, bagaço de cana e palha de milho quanto à produção de amilases pelos fungos *Lichtheimia ramosa* e *Thermoascus aurantiacus*, detectou maior produção no farelo de trigo, após 120 h de cultivo (CES). Zambare (2010), testando farelo de trigo, palha de arroz, farinha de arroz, farinha de semente de algodão, sabugo de milho, torta de coco e torta de amendoim para produção de glucoamilase por *Aspergillus oryzae*, também alcançou melhor resultado com o substrato farelo de trigo, após 120 h de cultivo (CES).

5.2.2 Inibidores do crescimento microbiano e repressão catabólica do carbono

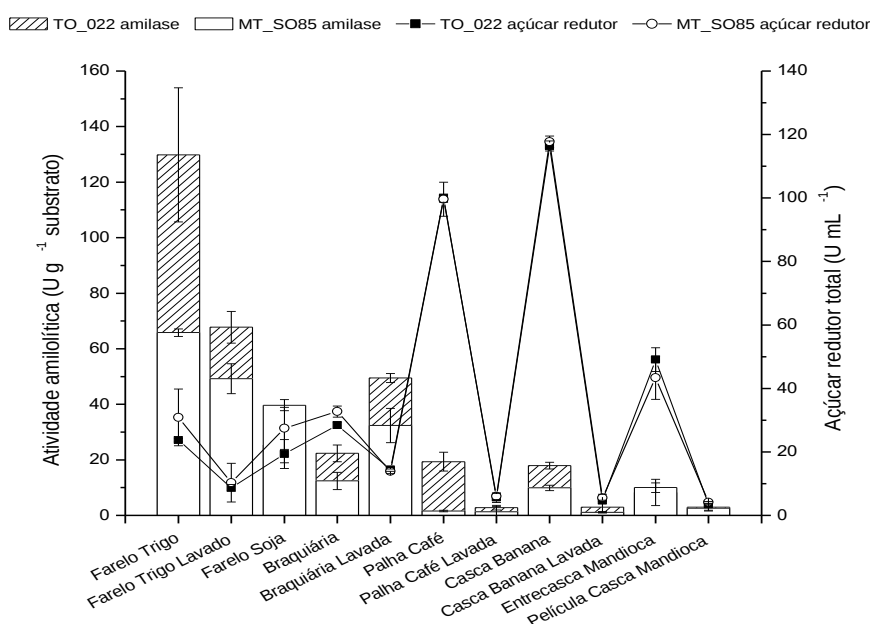
Os microrganismos heterotróficos, em geral, coordenam eficientemente as vias metabólicas que visam o fornecimento de energia e a construção de biomoléculas, utilizando o substrato como suprimento de carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio (SCHMIDELL *et al.*, 2001). O excesso de açúcares facilmente metabolizáveis como a glicose e frutose entretanto, pode reprimir a expressão de genes necessários ao metabolismo de carboidratos complexos como a celulose e o amido, bem como, a presença de substâncias com atividade antimicrobiana, cafeína e taninos por exemplo, podem restringir ou inibir o crescimento de microrganismos (ANTONIÊTO *et al.*, 2014; FAN *et al.*, 2006).

Os dois substratos que não favoreceram o crescimento de *R. solani*, possuem em comum o alto teor de carboidratos solúveis, 28,0% na palha de café e 35,84% na casca de banana, e a presença de cafeína e taninos (Tabela 3).

Fan *et al.* (2006) estudando o efeito da cafeína sobre o crescimento e frutificação do fungo *Pleurotus* sp. em palha de café, verificou que com o aumento da concentração de cafeína, o crescimento micelial e a produção de biomassa diminui, não sendo observado nenhum crescimento a partir de 2500 mg L⁻¹. Os taninos, presente tanto na palha de café como na casca de banana, tiveram a atividade antimicrobiana comprovada para os fungos *Formitopsis annosa* e *Verticillium dahliae* (CHEO, 1892). A ação dos taninos, de acordo com Mohammed *et al.* (2008), está associada a inibição da via de fosforilação oxidativa de enzimas necessárias a hidrólise do substrato para obtenção de nutrientes pelos microrganismos, como as carboidrases, proteolíticas e lipolíticas.

A lavagem de alguns substratos, precedendo o cultivo, visando a redução no teor inicial de açúcares redutores e de substâncias antimicrobianas, diminuiu o efeito inibitório sobre o crescimento das hifas de *R. solani* na palha de café e casca de banana (Figuras 7 e 8), mas não melhorou a atividade amilolítica, exceto para o substrato braquiária (Figura 9).

Figura 9- Atividade amilolítica e açúcar redutor total para *Rhizoctonia solani* AG-1 IA TO_022 e MT_SO85, após 96 h de cultivo em estado sólido, a 25 °C, em diferentes substratos.



Fonte: Próprio autor

A produção de α -amilases pelos isolados TO_022 e MT_SO85 na braquiária lavada, foi duas vezes maior àquela obtida para o substrato que não passou pelo processo de lavagem, e esse incremento na atividade amilolítica pode estar relacionado à redução da repressão catabólica da enzima.

As amilases representam um dos grupos de enzimas afetadas pela repressão catabólica na presença de glicose (CARRILLO-SANCEN *et al.*, 2016). Samanta *et al.* (2017) avaliando a expressão do gene *amyL* em *Bacillus licheniformis* observou que a síntese de α -amilase foi completamente inibida após adição de 0,5% de glicose em meio contendo amido.

Em *R. solani* o excesso de glicose pode ser associado também a diminuição da virulência e a inabilidade de formar escleródios. Weinhol e Bowman (1974) relatou que a repressão catabólica da pectinase ocasionada pela adição de uma fonte exógena de glicose, diminuiu as lesões provocadas por *R. solani* sobre o hipocótilo de plântulas de algodão. Shimma *et al.* (1988) verificou que a suplementação do meio de cultivo com doses igual ou superior a 30 mM de glicose suprimiu a formação de escleródios e este evento está relacionado, de acordo com Wang *et al.* (2018), ao efeito inibitório provocado pela glicose sobre o crescimento micelial em *Rhizoctonia solani* AG-1 IA.

Os substratos que, em média, apresentaram maior atividade amilolítica para os isolados TO_022 e MT_SO85 de *R. solani* foram farelo de trigo e braquiária lavada, e foram avaliados quanto ao perfil de atividade enzimática na próxima etapa do trabalho.

5.3 PERFIL DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA NO FARELO DE TRIGO E BRAQUIÁRIA LAVADA

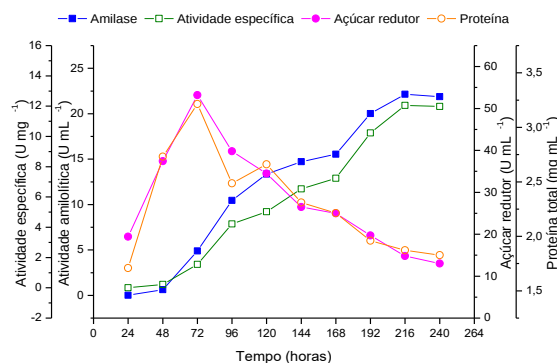
O perfil de produção enzimática dos isolados TO_022 e MT_SO85 de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA foi avaliado em farelo de trigo e braquiária lavada, sob cultivo em estado sólido, pelo período de 240 h, a 25 °C (Figura 10).

No cultivo realizado em farelo de trigo, a máxima produção de proteína e açúcar redutor dos isolados ocorreu no início da fermentação, entre 72 h (TO_022) e 120 h (MT_SO85), enquanto a máxima atividade amilolítica (22,14 U mL⁻¹, TO_022; 22,84 U mL⁻¹, MT_SO85) e específica (12,05 U mg⁻¹ proteína, TO_022; 12,80 U mg⁻¹ proteína, MT_SO85) ocorreu no final da fermentação, entre 216 h (TO_022) e 240 h (MT_SO85).

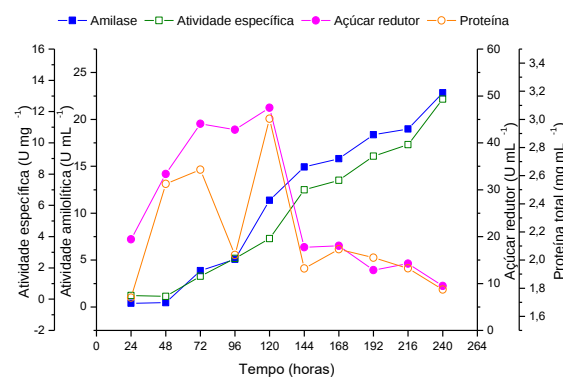
A máxima atividade amilolítica ($7,45 \text{ U mL}^{-1}$, TO_022; $6,12 \text{ mL}^{-1}$, MT_SO85) e específica ($1,98 \text{ U mg}^{-1}$ proteína, TO_022; $1,63 \text{ U mg}^{-1}$ proteína, MT_SO85) observada para o cultivo em braquiária lavada foi, respectivamente, três e seis vezes menor que a relatada para o farelo de trigo. Assim, o menor tempo de fermentação com máxima atividade amilolítica corresponde ao extrato enzimático do isolado TO_022, às 216 h do cultivo em farelo de trigo, escolhido para caracterização físico-química da enzima α -amilase.

Figura 10- Perfil de produção enzimática, atividade específica, açúcar redutor e proteína total dos isolados TO_022 e MT_SO85 de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, cultivados em farelo de trigo e braquiária lavada, a 25°C .

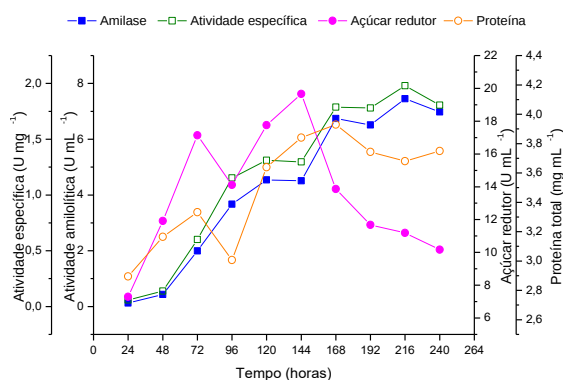
a) TO_022; farelo de trigo



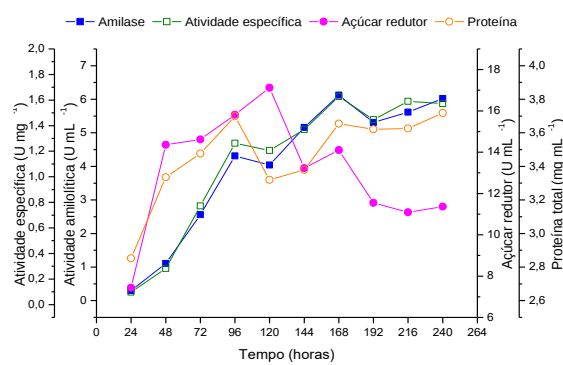
b) MT_SO85; farelo de trigo



c) TO_022; braquiária lavada



d) MT_SO85; braquiária lavada



Fonte: Próprio autor.

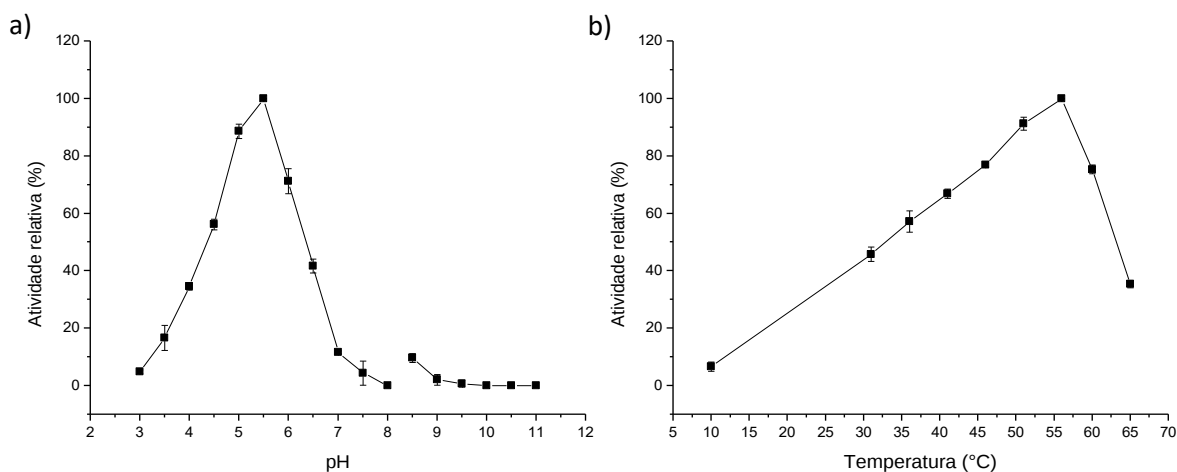
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

A atividade de α -amilase em extratos brutos obtidos do cultivo de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, isolado TO_022, foi caracterizada quanto ao pH e temperatura ótimos e de estabilidade.

5.4.1 Temperatura e pH ótimos

A α -amilase de *R. solani* AG-1 IA TO_022 exibiu máxima atividade a 55 °C e pH 5,5 (Figura 11). Usualmente, amilases fúngicas tem valores de pH ótimo variando do ácido ao neutro (pH 4,0 a 7,0) e temperatura ótima entre 40 e 60 °C (GUPTA *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2015). Os fungos *Syncephalastrum racemosum*, *Trichoderma* sp. J113 e *Candida parapsilosis* exibiram ótima atividade em pH 4,5, 5,0 e 7,0, e temperatura 70, 40 e 60 °C, respectivamente (FREITAS *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015). Para a α -amilase de *Aspergillus flavus*, Singh e Gupta (2014) reportou os mesmos valores de pH e temperatura ótimos relatados neste trabalho para *R. solani*.

Figura 11- (a) pH ótimo e (b) temperatura ótima da α -amilase de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, isolado TO_022.



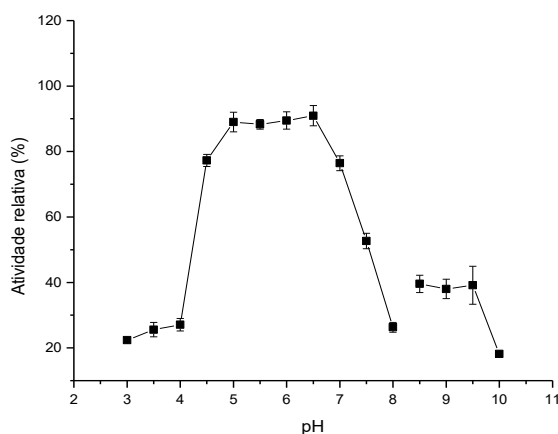
Nota: determinação do pH ótimo em Tampão Mcllvaine (faixa de pH 3,0 a 8,0) e tampão glicina-NaOH (faixa de pH 8,5 a 10,0).

Fonte: Próprio autor.

5.4.2 Estabilidade ao pH

A enzima foi estável, em torno de 80%, entre pH 4,5 a 7,0, atingindo 90% de atividade no intervalo entre pH 5,5 e 6,5 (Figura 12). Dey e Banerjee (2015) observou estabilidade na faixa de pH 4,5 a 7,2 para a α -amilase de *Aspergillus oryzae*. Resultados similares (pH 4,0 a 7,0) foram encontrados por Uzun *et al.* (2017) para a α -amilase purificada de *Rhizoctonia solani* AG-4, isolado ZB-34.

Figura 12- Efeito do pH sobre a estabilidade da α -amilase de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA TO_022. Tampão Mcllvaine pH 3,0 a 8,0 e tampão glicina-NaOH pH 8,5 a 10,0.

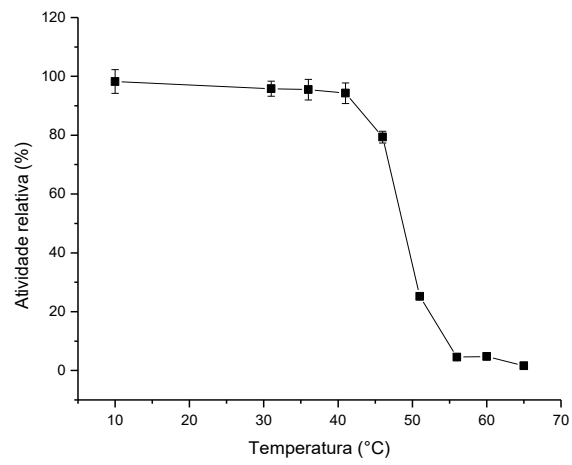


Fonte: Próprio autor.

5.4.3 Estabilidade térmica

O efeito da temperatura sobre a estabilidade da enzima é mostrado na Figura 13. Observa-se que a enzima é estável, manteve aproximadamente 100% da atividade, quando incubada pelo período de 1 h na temperatura de 10 até 40 °C. A 45 °C, ainda manteve 80% da atividade original. A estabilidade térmica da α -amilase de *R. solani* AG-1 IA TO_022 foi menor que a dos fungos *Trichoderma pseudokoningii* (30 a 80 °C; 1 h) e *Aspergillus niger* (até 60 °C; 90 minutos), porém maior que a observada para *Rhizoctonia solani* AG-4 ZB-34, que manteve estabilidade inferior a 80% após 1 h de incubação a 40 °C (ABDULAAL, 2018; PEREIRA *et al.*, 2017; UZUN *et al.*, 2017).

Figura 13- Efeito da temperatura sobre a estabilidade da α -amilase de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA TO_022.



Fonte: Próprio autor.

6 CONCLUSÕES

Dentre os isolados de *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, avaliados sob cultivo em estado sólido (CES), TO_022 e MT_SO85, provenientes do hospedeiro soja, são os que mais produzem enzimas amilolíticas.

Farelo de trigo, farelo de soja e braquiária lavada induzem eficientemente a produção de α -amilases pelo fungo *R. solani* AG-1 TO_022 e MT_SO85. Farelo de trigo é o substrato que proporciona os melhores resultados para produção de amilase, comparado a todos os substratos testados.

Parâmetros como alto teor de amido e nitrogênio favorecem a produção de α -amilases por *R. solani*. Em contrapartida, alto teor de carboidratos solúveis, presença de substâncias com atividade antimicrobiana (taninos e cafeína) e constituição predominantemente lignocelulósica, influenciam negativamente a produção da enzima.

O tempo necessário para máxima obtenção de α -amilases pelo isolado TO_022 sob cultivo (CES) em farelo de trigo a 25 °C, é de 216 h. A máxima atividade amilolítica para o isolado MT_SO85, nas mesmas condições de cultivo, só é atingida 24 h depois (às 240 h).

A α -amilase secretada pelo isolado TO_022 tem máxima atividade em pH ácido (pH 5,5) e temperatura de 55 °C, mantém atividade em pH ácido a neutro (pH 4,5 a 7,0) e não desnatura quando incubada pelo período de 1 h em temperaturas de até 45 °C.

REFERÊNCIAS

- ABDULAAL, W. H. Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. **BMC Biochemistry**, London, v. 19, n. 1, p. 4, 2018.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. Burlington: Elsevier Academic, 2005. 952 p.
- ALCÁZAR-ALAY, S. C.; MEIRELES, M. A. A. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 35, n. 2, p. 215-236, 2015.
- ALMALKI, M. A. Solid state fermentation of agro-residues for the production of amylase from *Bacillus subtilis* for industrial applications. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Kancheepuram, v. 7, n. 3, p. 1341-1348, 2018.
- ALVES-PRADO, H. F. **Purificação e caracterização de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 e *Bacillus clausii* E16**: caracterização das ciclodextrinas, clonagem e sequenciamento do gene da CGTase de *Bacillus clausii* E16. 2005. 166 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)– Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Rio Claro, 2005.
- ANTONIÊTO, A. C. C.; CASTRO, L. S.; SILVA-ROCHA, R.; PERSINOTI, G. F.; SILVA, R. N. Defining the genome-wide role of CRE1 during carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* using RNA-Seq analysis. **Fungal Genetics and Biology**, Maryland Heights, v. 73, p. 93-103, 2014.
- ASRAT, B.; GIRMA, A. Isolation, production and characterization of amylase enzyme using the isolate *Aspergillus niger* FAB-211. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, Lagos, v. 9, n. 2, p. 7-14, 2018.
- AVWIOROKO, O. J.; TONUARI, N. J.; ASAGBA, S. O. Biochemical characterization of crude α -amylase of *Aspergillus* spp. associated with the spoilage of cassava (*Manihot esculenta*) tubers and processed products in Nigeria. **Advances in Biochemistry**, New York, v. 3, n. 1, p. 15-23, 2015.
- BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 151-160, 2002.
- BISTRATINI, E. **Enzimas degradadoras de parede celular de plantas produzida por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA**: estudo da produção extracelular, purificação e caracterização. 2016. 213 f. Tese (Doutorado em Microbiologia)– Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, São José do Rio Preto, 2016.

BŁASZCZAK, W.; SADOWSKA, J.; ROSELL, C. M.; FORNAL, J. Structural changes in the wheat dough and bread with the addition of alpha-amylases. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 219, n. 4, p. 348-354, 2004.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506 p.

CAMPOS A. P. S.; CERESINI P. C. Somatic incompatibility in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA of soybean. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 3, p. 247-254, 2006.

CARRILLO-SANCEN, G.; CARRASCO-NAVARRO, U.; TOMASINI-CAMPOCOSIO, A.; CORZO, G.; PEDRAZA-ESCALONA, M. M.; FAVELA-TORRES, E. Effect of glucose as a carbon repressor on the extracellular proteome of *Aspergillus niger* during the production of amylases by solid state cultivation. **Process Biochemistry**, London, v. 51, n. 12, p. 2001-2010, 2016.

CASTRO, C. V. B. **Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Rhizoctonia solani* Kuhn**. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)– Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 49, p. 813-821, 2013.

CHEO, P. C. Effects of tannic acid on rhizomorph production by *Armillaria mellea*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 6, p. 676-679, 1982.

COLOGNA, N. M.; GÓMEZ-MENDONZA, D. P.; ZANOELO, F. F.; GIANNESI, G. C.; GUIMARÃES, C. A.; MOREIRA, L. R. S.; FERREIRA FILHO, E. X. F.; RICART, C. A. O. Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. **Enzyme and Microbial Technology**, Philadelphia, v. 109, p. 1-10, 2018.

CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E. S.; CARVALHO, A. J. F.; CURVELO, A. A. S.; MATTOSO, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 15, n. 4, p. 268-273, 2005.

COUTURIER, M.; MATHIEU, Y.; NAVARRO, D.; DRULA, E.; HAON, M.; GRISEL, S.; LUDWIG, R.; BERRIN, J. Characterization of a new aryl-alcohol oxidase secreted by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 100, n. 2, p. 697-706, 2016.

CURVELO-SANTANA, J. C.; EHRHARDT, D. D.; TAMBOURGI, E. B. Otimização da produção de álcool de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 613-617, 2010.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DEY, T. B.; BANERJEE, R. Purification, biochemical characterization and application of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Heidelberg, v. 4, n. 1, p. 83-90, 2015.

DEY, T. B.; KUMAR, A.; BANERJEE, R.; CHANDNA, P.; KUHAD, R. C. Improvement of microbial α -amylase stability: strategic approaches. **Process Biochemistry**, London, v. 51, n. 10, p. 1380-1390, 2016.

ESCARAMBONI, B.; NÚÑEZ, E. G. F.; CARVALHO, A. F. A.; OLIVA NETO, P. Ethanol biosynthesis by fast hydrolysis of cassava bagasse using fungal amylases produced in optimized conditions. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 112, p. 368-377, 2018.

FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 4, p. 420-424, 2006.

FREITAS, L. S.; MARTINS, E. S.; FERREIRA, O. E. Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 12, n. 4, p. 226-232, 2014.

GAWADE, D. B.; PERANE, R. R.; SURYAWANSHI, A. P.; DEOKAR, C. D. Extracellular enzymes activity determining the virulence of *Rhizoctonia bataticola*, causing root rot in soybean. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 100, p. 49-56, 2017.

GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; MD ARSHAD, M. K.; LAKSHMIPRIYA, T.; VOON, C. H.; HASHIM, U.; CHINNI, S. V. Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed Research International**, New York, v. 2017, 2017.

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

HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C.; LÜBECK, P. S.; ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 50, n. 9, p. 1327-1341, 2015.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

JOHNSON, R. R.; BALWANI, T. L.; JOHNSON, L. J. Corn plant maturity. II. Effect on in vitro cellulose digestibility and soluble carbohydrate content. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 25, n. 3, p. 617-623, 1966.

KAUR, H.; ARORA, M.; BHATIA, S.; ALAM, M. S. Optimization of α -amylase and glucoamylase production in solid state fermentation of deoiled rice bran (DRB) by *Rhizopus oryzae*. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 3, n. 6, p. 249-256, 2015.

KAUR, S.; DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; CHAUHAN, V. B. Carbohydrate degrading enzyme production by plant pathogenic mycelia and microsclerotia isolates of *Macrophomina phaseolina* through koji fermentation. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 140-148, 2012.

LEE, Y.; OH, C.; HEO, S.; KANG, D.; SHIM, W. Highly potent saccharification of *Arthrospira maxima* glycogen by fungal amylolytic enzyme from *Trichoderma* species J113. **BioEnergy Research**, New York, v. 8, n. 4, p. 1868-1876, 2015.

LIMA, U. A. **Matérias-primas dos alimentos**. São Paulo: Blucher, 2010. 402 p.

MAHMOOD, S.; SHAHID, M. G.; IRFAN, M.; NADEEM, M.; SYED, Q. Partial characterization of α -amylase produced from *Aspergillus niger* using potato peel as substrate. **Punjab University Journal of Zoology**, Lahore, v. 33, n. 1, p. 22-27, 2018.

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

MOHAMMED, H. S.; AL-ZUBAIDY, M. M. I.; AL-ASWAD, M. B. Inhibitory effect of tannic acid extracted from grape seeds and pomegranate peels on some microorganisms. **Mesopotamia Journal of Agriculture**, v. 36, n. 1, p. 12-18, 2008.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Detergent-compatible bacterial amylases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 174, n. 4, p. 1215-1232, 2014.

OLIVEIRA, A. P. A.; SILVESTRE, M. A.; ALVES-PRADO, H. F.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 14, n. 14, p. 1215-1223, 2015.

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

ONOFRE, S. B.; ABATTI, D.; REFOSCO, D.; TESSARO, A. A.; ONOFRE, J. A. B.; TESSARO, A. B. Characterization of α -amylase produced by the endophytic strain of *Penicillium digitatum* in solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SMF). **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 15, n. 28, p. 1511-1519, 2016.

PAN, S.; DING, N.; REN, J.; GU, Z.; LI, C.; HONG, Y.; CHENG, L.; HOLLER, T. P.; LI, Z. Maltooligosaccharide-forming amylase: characteristics, preparation, and application. **Biotechnology Advances**, New York, v. 35, n. 5, p. 619-632, 2017.

PEREIRA, C. R.; RESENDE, J. T. V.; GUERRA, E. P.; LIMA, V. A.; MARTINS, M. D.; KNOB, A. Enzymatic conversion of sweet potato granular starch into fermentable sugars: feasibility of sweet potato peel as alternative substrate for α -amylase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Amsterdam, v. 11, p. 231-238, 2017.

POLIZELI, M. L. T. M.; SILVA, T. M. **Amilases microbianas**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2016. 268 p.

POLONI, N. M.; MOLINA, L. M. R.; MESA, E. C.; GARCIA, I. L.; CERESINI, P. C. Evidence that the fungus *Rhizoctonia solani* AG-1 IA adapted to *Urochloa* in Colombia keeps a broad host range including maize. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 3, p. 228-232, 2016.

RAMOS, A. M.; GALLY, M.; SZAPIRO, G.; ITZCOVICH, T.; CARABAJAL, M.; LEVIN, L. In vitro growth and cell wall degrading enzyme production by Argentinean isolates of *Macrophomina phaseolina*, the causative agent of charcoal rot in corn. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, n. 4, p. 267-273, 2016.

RAVINDRAN, R.; HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, Basel, v. 5, n. 4, p. 93, 2018.

SAHNI, T. K.; GOEL, A. Microbial enzymes with special reference to α -amylase. **BioEvolution**, v. 2, n. 1, p. 19-25, 2015.

SAINI, R.; SAINI, H. S.; DAHIYA, A. Amylases: characteristics and industrial applications. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, Lugar de Publicação, v. 6, n. 4, p. 1865-1871, 2017

SAMANTA, S.; JANA, S.; KAR, S.; MOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Induction and catabolite repression of alpha-amylase synthesis in *Bacillus licheniformis* SKB4. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, New Delhi, v. 7, n. 6, p. 8-16, 2017.

SARANRAJ, P.; STELLA, D. Fungal amylase - a review. **International Journal of Microbiological Research**, Dubai, v. 4, n. 2, p. 203-211, 2013.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Blucher, 2001. v. 2, 541 p.

SHIMMA, Y.; UNO, I.; HASHIBA, T.; ISHIKAWA, T. Characterization of a *Rhizoctonia solani* strain carrying plasmids. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 34, n. 2, p. 111-117, 1988.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 235 p.

SILVA, R. N.; QUINTINO, F. P.; MONTEIRO, V. N.; ASQUIERI, E. R. Production of glucose and fructose syrups from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starch using enzymes produced by microorganisms isolated from Brazilian Cerrado soil. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 213-217, 2010.

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**, Amsterdam, v. 57, p. 158-165, 2014.

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

SOUZA, D. F.; PERALTA, R. M. Production of amylases by *Aspergillus tamaraii* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 599-602, 2001.

SOUZA, E. C.; KURAMAE, E. E.; NAKATANI, A. K.; BASSETO, M. A.; PRABHU, A. S.; CERESINI, P. C. Caracterização citomorfológica, cultural, molecular e patogênica de *Rhizoctonia solani* Kühn associado ao arroz em Tocantins, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 2, p. 129-136, 2007.

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

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TALLAPRAGADA, P.; DIKSHIT, R.; JADHAV, A.; SARAH, U. Partial purification and characterization of amylase enzyme under solid state fermentation from *Monascus sanguineus*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 95-101, 2017.

UZUN, U.; DEMIRCI, E.; AKATIN, M. Y. Purification and characterization of *Rhizoctonia solani* AG-4 strain ZB-34 α -amylase produced by solid-state fermentation using corn bran. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 43, n. 3, p. 257-267, 2017.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002.

VAN DER VEEN, B. A.; UITDEHAAG, J. C. M.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1543, n. 2, p. 336-360, 2000.

VIJAYENDRA, S. V. N.; KASHIWAGI, Y. Characterization of a new acid stable exo- β -1,3-glucanase of *Rhizoctonia solani* and its action on microbial polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 92-97, 2009.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1972. 269 p.

WANG, C.; PI, L.; JIANG, S.; YANG, M.; SHU, C.; ZHOU, E. ROS and trehalose regulate sclerotial development in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. **Fungal Biology**, London, v. 122, n. 5, p. 322-332, 2018.

WEINHOLD, A. R.; BOWMAN, T. Repression of virulence in *Rhizoctonia solani* by glucose and 3-O-methyl glucose. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, p. 985-990, 1974.

WOODHALL, J. W.; LEES, A. K.; EDWARDS, S. G.; JENKINSON, P. Characterization of *Rhizoctonia solani* from potato in Great Britain. **Plant Pathology**, Chichester, v. 56, n. 2, p. 286-295, 2007.

ZAMBARE, V. Solid state fermentation of *Aspergillus oryzae* for glucoamylase production on agro residues. **International Journal of Life Sciences**, Kathmandu, v. 4, p. 16-25, 2010.

ZEOULA, L. M.; MARTINS, A. S.; PRADO, I. N.; ALCADE, C. R.; BRANCO, A. F.; SANTOS, G. T. Solubilidade e degradabilidade ruminal do amido de diferentes alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 898-905, 1999.