



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Ilha Solteira

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS EM BIOMA CERRADO PARA PRODUÇÃO DE AMILASE

Emerson da Silva Cruz Dias

Ilha Solteira – SP
Janeiro, 2025

FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS EM BIOMA CERRADO PARA PRODUÇÃO DE -AMILASE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Faculdade de Engenharia, Câmpus de Ilha Solteira, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Discente: Emerson da Silva Cruz Dias

Orientador: Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves do Prado

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

D541s Dias, Emerson da Silva Cruz.
Seleção de fungos filamentosos isolados em bioma Cerrado para produção de amilase / Emerson da Silva Cruz Dias. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2025
39 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira, 2024

Orientador: Heloiza Ferreira Alves do Prado

Inclui bibliografia

1. Cultivo em estado sólido. 2. Produção de enzimas. 3. Biotecnologia. 4. Farelo de trigo.

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Fungos Filamentosos Isolados em Bioma Cerrado para
Produção de Amilase**

EMERSON DA SILVA CRUZ DIAS

REGULAMENTO SOBRE A AVALIAÇÃO:

ARTIGO 25º - § 2º A apresentação pública do trabalho de TCC deverá ser de no mínimo 20 (vinte) minutos e máximo de 40 (quarenta) minutos. Após um intervalo de 5 (cinco) minutos, haverá a arguição do Trabalho pelos examinadores. O tempo de arguição, será de até 15 (quinze) minutos para cada examinador, e até 15 (quinze) minutos o tempo para a resposta do(a) aluno(a) a cada examinador ou no caso de se optar pelo diálogo, o tempo conjunto entre examinador e acadêmico(a) será de no máximo 30 (trinta) minutos.

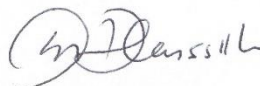
ARTIGO 24º - No julgamento do TCC, a banca examinadora deverá avaliar a apresentação oral, escrita e a defesa do trabalho durante a arguição. O conceito final será APROVADO ou REPROVADO.

COMISSÃO EXAMINADORA

1º EXAMINADOR (Orientador-Presidente)
Profª. Drª. Heloiza Ferreira Alves do Prado

Documento assinado digitalmente
HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO
Data: 09/01/2025 19:55:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

2º EXAMINADOR
Profª. Drª. Ana Maria Rodrigues Cassiolato



3º EXAMINADOR
Drª. Débora Ribeiro Antunes

Documento assinado digitalmente
DEBORA RIBEIRO ANTUNES
Data: 08/01/2025 12:15:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

CONCEITO

☒ APROVADO

☐ REPROVADO

Ilha Solteira-SP, 08 de Janeiro de 2025.

Dedico este trabalho à Professora Heloiza Ferreira Alves do Prado, minha orientadora, por sua incansável dedicação, orientações e incentivo, que foram fundamentais para a realização deste estudo. Seu exemplo de profissionalismo e comprometimento foi inspirado em cada etapa dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao Departamento Fitotecnia Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia (DFTASE), por fornecerem o ambiente e os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho. Reconheço, também, o apoio dos órgãos de fomento FAPESP e CNPq, que possibilitaram a execução deste projeto.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Professora Heloiza Ferreira Alves do Prado, pela dedicação, paciência e pelas valiosas contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho, sempre com orientações precisas e motivação constante.

Não poderia deixar de expressar minha gratidão aos amigos que ficaram ao meu lado, oferecendo apoio, companheirismo e motivação ao longo de todo o percurso acadêmico. Meu sincero agradecimento a Cesar Batista, Jhonatan Rocha, Amanda Dias, Vitória Nascimento, Luisa Aparecida, Kássia, Isabella Carvalho e Emanuele Cesa. Vocês foram fundamentais para a superação de desafios e para a celebração de cada conquista.

A todos, minha eterna gratidão.

RESUMO

Os microrganismos possuem elevado potencial para a manipulação de matéria orgânica e a produção de enzimas, sendo amplamente explorados comercialmente por sua eficiência e diversidade. As enzimas desempenham papel fundamental em processos industriais limpos, contribuindo positivamente para a economia, sociedade e meio ambiente e, no Brasil, têm-se as amilases, amplamente utilizadas no setor alimentício e em processos biotecnológicos. A otimização das condições de cultivo pode maximizar a produção enzimática e confirmar a melhoria industrial dessas amilases, contribuindo para o avanço de biotecnologias aplicadas a processos industriais. Este estudo avaliou a produção de enzimas amilolíticas por quatro fungos isolados em cultivo em estado sólido. Os isolados 5.2 e 22.1 demonstraram maior potencial, com o isolado 5.2 apresentando 380 U g^{-1} de substrato e $19,1 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína após 72 horas de cultivo. Em comparação com estudos anteriores, os resultados obtidos indicam uma atividade enzimática superior, especialmente em relação ao isolado 5.2.

Palavras-chave: Cultivo em estado solido; Produção de enzimas, Biotecnologia; Farelo de trigo.

ABSTRACT

Microorganisms have a high potential for the manipulation of organic matter and the production of enzymes and are widely exploited commercially due to their efficiency and diversity. Enzymes play a fundamental role in clean industrial processes, contributing positively to the economy, society and the environment. In Brazil, amylases are widely used in the food sector and in biotechnological processes. Optimizing cultivation conditions can maximize enzyme production and confirm the industrial improvement of these amylases, contributing to the advancement of biotechnologies applied to industrial processes. This study evaluated the production of amylolytic enzymes by four fungi isolated in solid state cultivation. Isolates 5.2 and 22.1 demonstrated greater potential, with isolate 5.2 presenting 380 U g⁻¹ of substrate and 19.1 U mg⁻¹ of protein after 72 hours of cultivation. Compared to previous studies, the results obtained indicate a higher enzymatic activity, especially in relation to isolate 5.2. In comparison with previous studies, the results obtained indicate a higher enzymatic activity, especially in relation to isolate 5.2.

Keywords: Solid state cultivation; Enzyme production, Biotechnology; Wheat bran.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características das hifas dos fungos.....	17
Figura 2. Hifas aéreas e vegetativas.....	17
Figura 3. Fórmulas estruturais do amido: amilose.....	19
Figura 4. Fórmulas estruturais do amido: amilopectina. (a) Sua estrutura primária próxima de um de seus pontos de ramificação $\alpha(1-6)$ (em vermelho). (b) A sua estrutura em forma de arbusto, com os resíduos de glicose indicados em vermelho.	20
Figura 5. Modificação comercial do amido por processamento enzimático.	22
Figura 6. Aspecto da colônia dos fungos filamentosos reativados. a) P2D19, b) 14.3, c) 22.1, d) 5.1.....	32
Figura 7. Diagrama de calibração para padrão de glicose.	33
Figura 8. Isolados fúngicos, P2D19, 14.3, e 22.1, sob cultivo em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato, após 72 horas de cultivo.	34
Figura 9. Perfil de produção de amilase (U mL^{-1}), produzida pelos isolados 5.2 e 22.1, após cultivo em estado sólido, usando farelo de trigo do substrato.....	35
Figura 10. Perfil de produção de amilase (U g^{-1} substrato) e atividade específica (U mg^{-1} proteína), produzida pelo isolado 5.2, após cultivo em estado sólido, usando farelo de trigo do substrato.	36
Figura 11. Perfil de produção de amilase (U g^{-1} substrato) e atividade específica (U mg^{-1} proteína), produzida pelo isolado 22.1, após cultivo em estado sólido, usando farelo de trigo do substrato.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características do amido encontrado em diferentes fontes vegetais.....	20
Tabela 2. Atividade amilolítica para os isolados reativados, após 72 horas de cultivo em estado sólido, usando farelo de trigo.....	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Fungos Filamentosos.....	16
2.2 Amido	18
2.4 Amilases	21
2.5 Aplicação das amilases	23
2.6 Cultivo microbiano	24
2.6.1 Cultivo Submerso (CS)	25
2.6.2 Cultivo em Estado sólido (CES)	25
2.6.3 Vantagens e Desvantagens do Cultivo em Estado sólido (CES)	26
1.1 Fungos produtores de amilase	27
3. OBJETIVOS.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Microrganismos.....	30
4.2 Meio para reativação e manutenção	30
4.3 Cultivo em Estado Sólido (CES).....	30
4.4 Determinação de atividade enzimática.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Reativação dos isolados.....	32
5.2 Determinação da atividade amilolítica.....	32
5.3 Cultivo em Estado Sólido	33
5.3.1 Perfil da produção de amilase fúngica	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado representa um dos cinco principais biomas do Brasil, abrangendo aproximadamente 25% do território nacional e ocupando uma extensão de 1,8 a 2 milhões de km² nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul, sul do Mato Grosso, oeste de Minas Gerais, Distrito Federal, oeste da Bahia, sul do Maranhão, oeste do Piauí e partes do Estado de São Paulo. A presença de porções de cerrado em outros estados da federação, como o Paraná, ou em áreas desconectadas dentro de outros biomas, como a Floresta Amazônica, também é observada. Classificado como o segundo maior tipo de vegetação do país, logo após a Floresta Amazônica, o Cerrado está predominantemente concentrado no Planalto Central Brasileiro, conforme descrito por Coutinho (1990), Eiten (1994) e Ribeiro; Walter (1998).

Até poucas décadas atrás, o cerrado era frequentemente considerado como terra improdutiva, sendo predominantemente explorado para a extração de lenha e carvão, além da prática da pecuária extensiva. Essas atividades, embora limitadas em termos de impactos diretos, causavam relativamente poucos danos ao ecossistema. Contudo, ao longo do tempo, essa perspectiva evoluiu, revelando-se que o cerrado desempenha um papel crucial na biodiversidade e na prestação de serviços ecossistêmicos (Durigan et al., 2011).

Dentre os microrganismos presentes no solo, os fungos têm despertado um interesse cada vez maior devido à sua capacidade de secretar uma ampla diversidade de enzimas. As enzimas possuem um potencial significativo em diversas aplicações biotecnológicas. A crescente necessidade de enzimas para uso industrial tem impulsionado a busca por novas linhagens de fungos capazes de produzir essas moléculas, destacando a importância da investigação nesse campo (Silva et al., 2018).

Atualmente, a utilização de enzimas industriais compreende aproximadamente 60% do mercado global de enzimas. As principais impulsionadoras dessa demanda são as indústrias de alimentos, rações e detergentes, que contribuíram com cerca de 5 bilhões de dólares para a economia global em 2020 (EMBRAPA, 2017). A utilização de fungos filamentosos como fontes geradoras de enzimas apresenta promissoras oportunidades, pois esses microrganismos representam um dos mais vastos reservatórios de recursos genéticos disponíveis no planeta. Essa abordagem não apenas destaca o potencial significativo desses fungos em aplicações biotecnológicas, mas também contribui para a expansão do conhecimento sobre a diversidade genética e funcional desses microrganismos (Oyeleke; Egwin; Auta, 2010).

Inseridos no reino Fungi, os fungos filamentosos, mais comumente conhecidos como mofo, desempenham funções vitais em diversos ecossistemas. Compostos por estruturas filamentosas denominadas hifas, esses fungos formam intrincadas redes chamadas micélios,

essenciais para a absorção de nutrientes do ambiente circundante. Sua reprodução ocorre tanto de maneira assexuada, através da liberação de esporos em estruturas especializadas, quanto de maneira sexual, envolvendo a formação de esporângios. Presentes em habitats diversos, desde o solo até alimentos em decomposição e ambientes aquáticos, esses organismos desempenham um papel crucial na decomposição de matéria orgânica e na reciclagem de nutrientes (Takahashi et al., 2017).

As amilases constituem um conjunto de hidrolases que catalisam as ligações α -glicosídicas presentes no amido e são categorizadas como α -amilase, β -amilase e amiloglucosidase. A α -amilase atua na quebra das ligações α (1,4) dos polissacarídeos que contêm três ou mais unidades de D-glicose em união por ligações α -1,4. Por sua vez, a β -amilase hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 em polissacarídeos a partir da extremidade não redutora em direção à penúltima ligação óxido, separando duas unidades de glicose na forma de β -maltose por meio de uma inversão. Finalmente, a amiloglucosidase é uma enzima extracelular que quebra as ligações α -1,4 e α -1,6 do amido da extremidade não redutora até a glicose. Essas amilases desempenham um papel crucial na biotecnologia e estão cada vez mais em demanda na indústria, destacando-se especialmente por suas aplicações na indústria de alimentos (Santana et al., 2012; Selvan et al., 2016).

Dada a rica diversidade microbiana nos variados biomas brasileiros, este estudo propõe a produção da enzima amilase. Essa enzima foi obtida a partir de fungos filamentosos isolados do solo do Bioma Cerrado, fazendo parte de uma coleção de fungos mantida na UNESP, no Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Socio Economia (DFTASE), Campus de Ilha Solteira.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos Filamentosos

Os fungos são um grupo grande, diverso e amplamente disseminado de organismos, consistindo de fungos filamentosos, cogumelos e leveduras. Aproximadamente 155.700 espécies de fungos foram descritas (Catalogue of life, 2024), com cerca de 1.200 novas espécies descobertas a cada ano. Estimativas conservadoras sobre o número total de espécies ultrapassam 1,5 milhão, colocando o reino Fungi como segundo maior grupo, somente suplantado pelos insetos (Evert; Eichhorn, 2014). Esses organismos pertencem ao reino Fungi, sendo quimio-heterotróficos e adquirindo alimentos por absorção. Com exceção das leveduras, a maioria dos fungos é multicelular e se reproduz por esporos sexuais e assexuais.

A maior parte dos fungos é microscópica e terrestre. Eles desempenham papéis cruciais nos ecossistemas, ocupando o solo ou detritos vegetais em decomposição e contribuindo para a mineralização do carbono orgânico. Além disso, muitos fungos são parasitas de plantas ou causam enfermidades em animais, incluindo seres humanos. Outros, em contrapartida, estabelecem relações simbióticas com plantas, auxiliando-as na absorção de minerais do solo. Também são amplamente utilizados em processos fermentativos e na produção de antibióticos, destacando sua relevância ecológica e econômica (Deacon, 2013; Evert; Eichhorn, 2014).

Os fungos têm efeitos positivos significativos na cadeia alimentar, principalmente pela decomposição de matéria vegetal resistente e pela reciclagem de nutrientes essenciais. As micorrizas, associações simbióticas entre fungos e raízes de plantas, são exemplos dessa relação benéfica, promovendo a absorção de água e minerais do solo (Evert; Eichhorn, 2014).

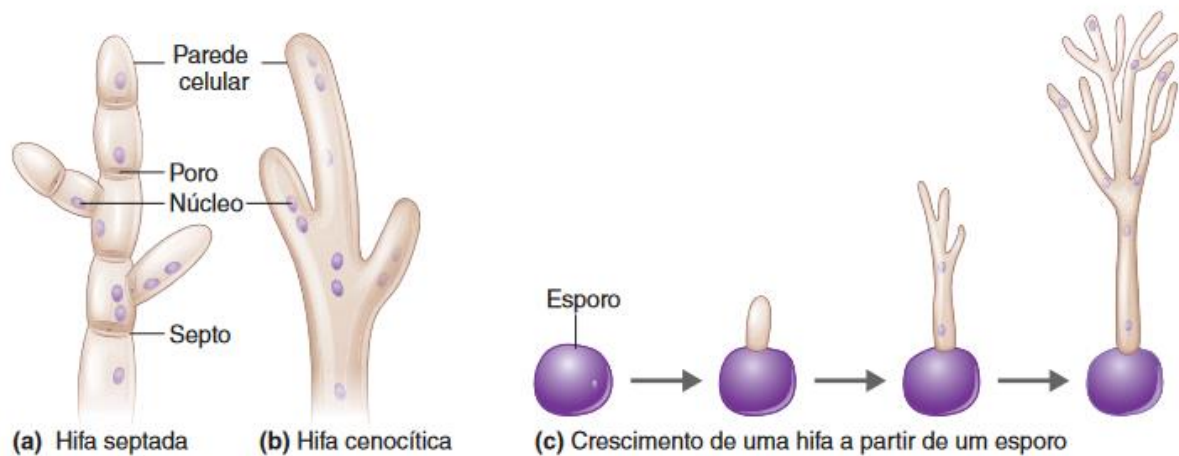
Além disso, os fungos têm aplicações importantes na biotecnologia. São utilizados na produção de enzimas industriais, como amilases e proteases, e em processos fermentativos na indústria alimentícia, como a produção de queijos, cervejas e vinhos. A engenharia genética de fungos tem possibilitado a síntese de proteínas recombinantes para aplicações médicas e científicas, reforçando sua relevância na inovação tecnológica (Esposito; Azevedo, 2010; Pereira et al., 2017).

As colônias de fungos são formadas por estruturas vegetativas compostas por células envolvidas em processos catabólicos e de crescimento. O talo de fungos filamentosos ou carnosos é constituído por hifas, longos filamentos de células interligadas, que podem crescer significativamente. As hifas podem ser septadas, com divisões celulares, ou cenocíticas, onde há continuidade do citoplasma ao longo da estrutura (Deacon, 2013; Evert; Eichhorn, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017).

O crescimento das hifas ocorre pelas extremidades, e cada fragmento delas pode originar novas estruturas. Esse processo é essencial para o desenvolvimento do micélio, uma massa filamentosa visível a olho nu formada por hifas interligadas. As hifas podem ser vegetativas, obtendo nutrientes, ou reprodutivas, projetando-se acima do substrato para sustentar os esporos (Benassi; Almeida, 2019).

As hifas crescem por alongamento das extremidades. Cada parte de uma hifa é capaz de crescer e, quando um fragmento é quebrado, ele pode alongar-se para formar uma nova hifa (Figura 1). Na figura 1a, é representada uma hifa septada, caracterizada pela presença de septos que dividem a hifa em compartimentos semelhantes a células. Cada septo possui poros que permitem a passagem de nutrientes, organelas e citoplasma entre os compartimentos. A figura 1b, ilustra uma hifa cenocítica, que, ao contrário da septada, não possui divisões internas. Assim, toda a hifa forma um único tubo contínuo com vários núcleos compartilhando o mesmo citoplasma, o que facilita a rápida distribuição de nutrientes e organelas ao longo de sua extensão. Já a figura 1c, apresenta um esporo e o processo de crescimento de uma nova hifa a partir dele. Quando as condições são favoráveis, o esporo germina, originando uma hifa inicial que se desenvolve e forma novas estruturas fúngicas (Tortora; Funke; Case, 2017).

Figura 1 - Características das hifas dos fungos.

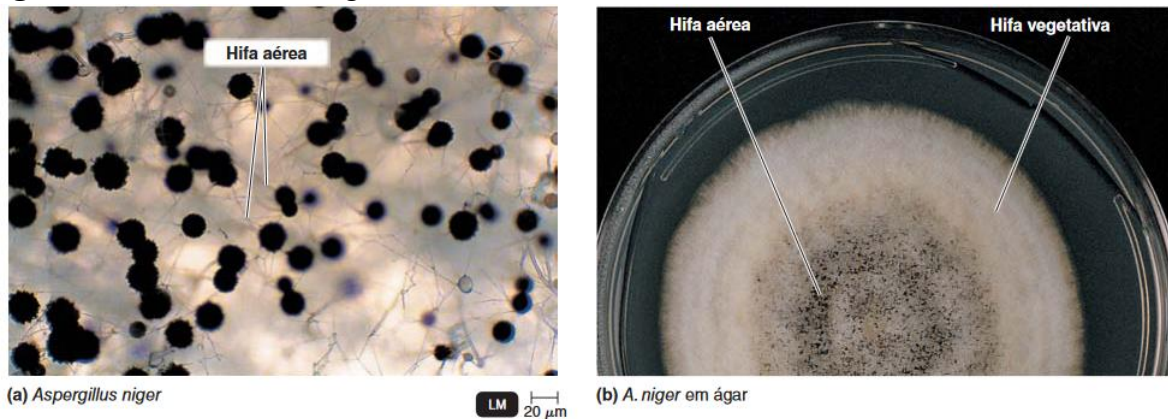


Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

A porção de uma hifa que obtém nutrientes é chamada de hifa vegetativa, enquanto a porção envolvida com a reprodução é denominada hifa reprodutiva ou aérea (Figura 2), assim chamada porque se projeta acima da superfície do meio sobre a qual o fungo está crescendo. Frequentemente, as hifas aéreas sustentam os esporos reprodutivos. Quando as condições

ambientais se tornam favoráveis, as hifas crescem e formam uma massa filamentosa visível a olho nu, chamada de micélio (Tortora; Funke; Case, 2017).

Figura 2 - Hifas aéreas e vegetativas.



Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2017.

2.2 Amido

O amido desempenha um papel fundamental na vida dos organismos, sendo um homopolissacarídeo de reserva composto por monômeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas α -1,4. Este açúcar é armazenado em células de plantas, especialmente em tecidos fotossintetizantes, como folhas, onde forma grânulos no interior dos plastídios, incluindo cloroplastos, além de órgãos heterotróficos, como tubérculos e sementes (Guimarães, 2016; Srinivasan; Parkin, 2019).

O amido existe em duas formas estruturais principais: amilose e amilopectina (Voet; Voet, 2013). A proporção média de amilose para amilopectina nos grânulos de amido é de aproximadamente 25 % e 75 %, respectivamente (Tester et al., 2004; Guimarães, 2016).

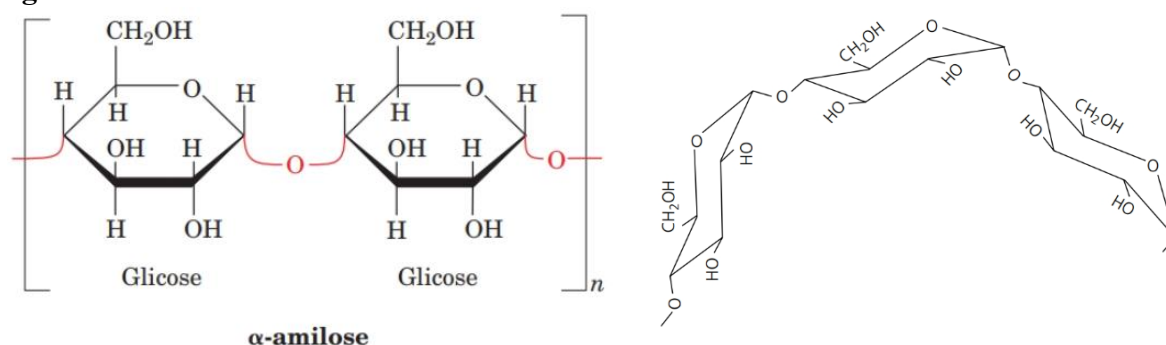
O amido, uma fonte energética amplamente utilizada pelo homem, está presente em diversos produtos derivados de tubérculos, leguminosas e cereais (Aguilera, 2011). Nos processos industriais, a hidrólise desse polímero é comum, resultando nos conhecidos "hidrolisados de amido", independentemente do catalisador utilizado ou do grau de fracionamento. Uma parcela significativa da produção de amido é destinada à indústria de alimentos, contribuindo para aprimorar as propriedades funcionais desses produtos (Silva, 2019).

A maior parte do amido em uso é submetida a modificações químicas, ampliando suas aplicações em diversos setores, como têxtil, farmacêutico, indústrias de adesivos, explosivos, papel, construção civil, metais, cosméticos e mineração (Guimarães, 2016). Do ponto de vista

ecológico, essa utilização é altamente vantajosa para a preservação ambiental, pois o material é degradado mais rapidamente pela ação microbiana (Corradini et al., 2005). Destaca-se também como uma fonte significativa de energia renovável, sendo empregado na produção de bioetanol, uma alternativa crucial diante das limitações das reservas de combustíveis fósseis (Fettke et al., 2009).

A amilose consiste em unidades de D-glicose (α -D-glucopiranosil) conectadas por ligações glicosídicas α -1,4, formando uma estrutura mais simples e não ramificada (Figura 3). As cadeias de amilose assumem uma configuração helicoidal, onde cada volta espiral é composta por seis unidades de glicose (Polizeli; Carvalho; Polizeli, 2016), as imagens ilustradas na Figura 3 representam a ligação glicosídica entre o C1 de unidade de glicose e o C4 da outra unidade de glicose, bem como a sua configuração de helicoidal da cadeia de amilose.

Figura 3. Fórmulas estruturais do amido: amilose.



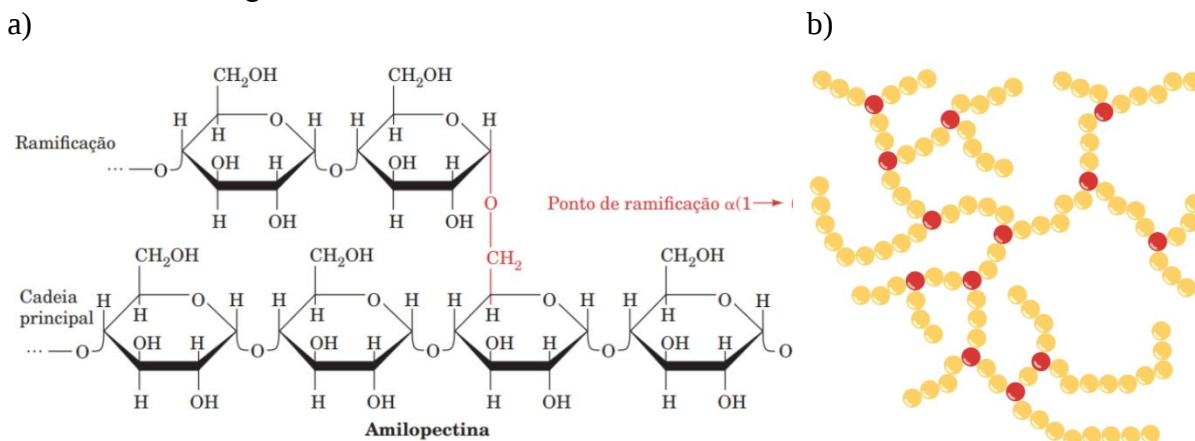
Fonte: Voet; Voet (2013); Srinivasan; Parkin (2019)

A amilopectina é a molécula mais complexa do amido, e é formada por unidades de glicose conectadas por ligações α -1,4, com ramificações nos pontos de ligação α -1,6 (Figura 4). Essas ramificações conferem à amilopectina uma estrutura altamente organizada, essencial para a formação do grânulo de amido, que serve como uma forma eficiente de armazenamento de energia nos vegetais (Polizeli; Carvalho; Polizeli, 2016).

A Figura 4, ilustra aspectos estruturais importantes da amilopectina, incluindo sua fórmula estrutural, destacando um dos pontos de ramificação α -1,6 (Figura 4a, indicados em vermelho), onde ocorre a ligação entre os C1 e C6 das cadeias lineares de glicose. A Figura 4b, exibe a conformação do arranjo entre as cadeias de glicose, lembrando o carboidrato de reserva animal, o glicogênio. Os resíduos de glicose marcados em vermelho, representam os pontos da ligação glicosídica α -1,6 (Srinivasan; Parkin, 2019).

Essa organização estrutural, com ramificações frequentes, torna a amilopectina altamente solúvel em água e acessível para a ação enzimática, facilitando o fornecimento de glicose quando necessário para o metabolismo celular.

Figura 4 - Fórmula estrutural do amido: amilopectina. (a) Sua estrutura primária próxima de um de seus pontos de ramificação α -1,6 (em vermelho). (b) Sua estrutura em forma de arbusto, com os resíduos de glicose indicados em vermelho.



Fonte: Srinivasan; Parkin (2019). A distância efetiva entre os pontos de ramificação varia de 24 a 30 resíduos de glicose.

Conforme mencionado por (Jobling, 2004) a amilopectina desempenha um papel crucial na cristalinidade do grânulo de amido, e as diferenças na estrutura cristalina levam à classificação do amido em três tipos distintos: amidos de cereais (tipo A), amidos de tubérculos (tipo B) e amidos de vagens (tipo C). Essas características são detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características do amido encontrado em diferentes fontes vegetais.

Características	Batata	Mandioca	Milho	Trigo
Morfologia do grânulo	Oval, esférica	Oval, truncada	Circular, poligonal	Circular, bimodal
Dimensão do grânulo	5-100	4-35	2-30	1-45
Fosfato (% m/v)	0,08	0,01	0,02	0,06
Proteína (% m/v)	0,06	0,10	0,35	0,40
Lipídio (% m/v)	0,05	0,10	0,70	0,80

Fonte: Modificada de Jobling (2004).

2.3 Enzimas

Enzimas representam conjuntos de substâncias orgânicas compostas por macromoléculas resultantes da combinação de aminoácidos. Elas desempenham funções cruciais tanto no interior quanto no exterior das células, catalisando reações químicas vitais para o metabolismo. Além disso, as enzimas desempenham um papel fundamental na decomposição

da matéria-prima e na deterioração de alimentos. Muitas delas foram nomeadas com o sufixo "ase" ao final de seus nomes, indicando seus substratos ou atividade enzimática específica. Esse método de nomenclatura diferencia essas enzimas das que foram nomeadas antes mesmo da compreensão completa da reação que catalisam, recebendo então o nome de seus descobridores (Lehninger; Nelson; Cox, 2014).

A estrutura das enzimas é multifacetada, sendo sua configuração primária definida pela sequência específica de aminoácidos que a compõem. A estrutura secundária emerge das interações entre aminoácidos adjacentes, formando arranjos notáveis, como a α -hélice e a folha β . A estrutura terciária, por sua vez, é moldada pelas interações entre aminoácidos próximos, conferindo complexidade tridimensional à enzima. Finalmente, a estrutura quaternária é resultante das interações entre diferentes cadeias polipeptídicas, culminando na configuração tridimensional definitiva da enzima (Voet; Voet, 2013).

2.4 Amilases

As amilases são enzimas com a capacidade de hidrolisar as ligações glicosídicas na molécula de amido, que, por sua vez, é o segundo polímero mais abundante na natureza e o principal carboidrato de reserva sintetizado pelas plantas. Para a hidrólise desses polímeros de grande peso molecular, é essencial a atuação coordenada de um complexo enzimático que trabalhe em conjunto para hidrolisar tanto a amilose quanto a amilopectina. As amilases podem ser categorizadas em duas classes, dependendo do seu modelo de ação: endoamilases e exoamilases (Silva, 2019). Essa diferenciação destaca a diversidade funcional dessas enzimas na degradação eficiente do amido.

As endoamilases, também denominadas enzimas de liquefação ou despolimerização, incluem as α -amilases (EC 3.2.1.1), que focalizam a quebra das ligações internas α -1,4 na molécula de amido.

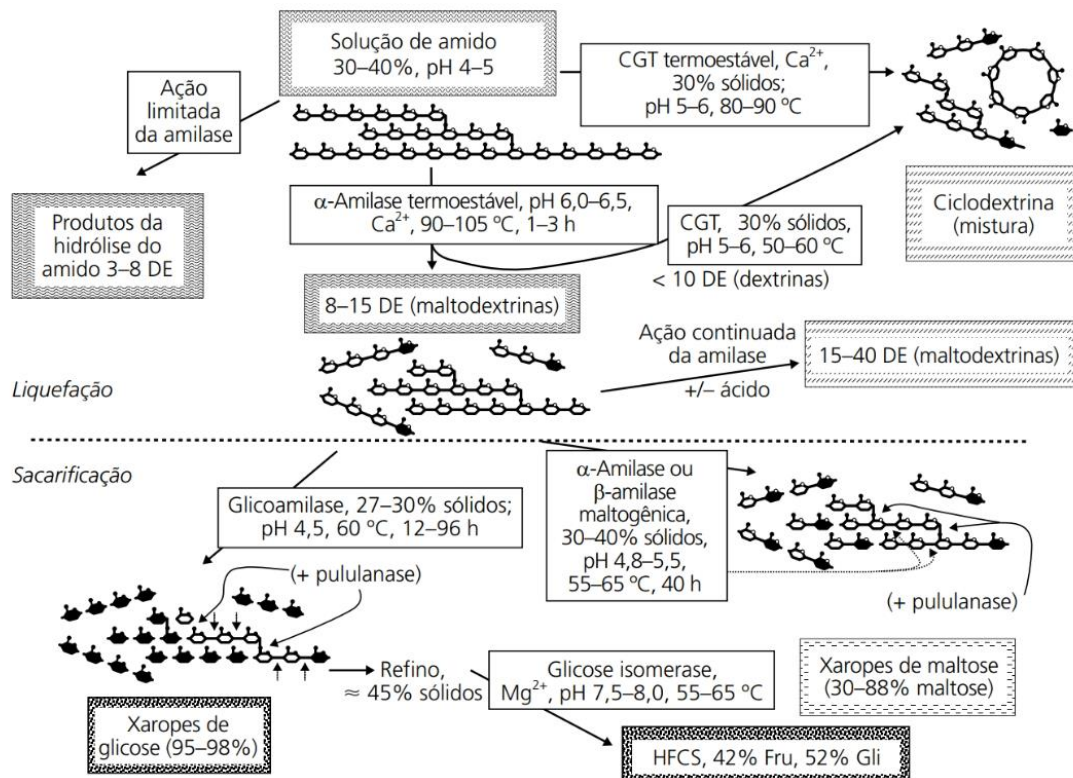
Já as exoamilases, ou enzimas de sacarificação, abrangem glicoamilases (EC 3.2.1.3), sendo a glicose o principal produto resultante da clivagem terminal das ligações α -1,4 no amido. Enzimas desramificadoras, como a pululanase (EC 3.2.1.41), atuam predominantemente nas ligações α -1,6 da molécula de amilopectina (Castro et al., 2010; Castro; Castilho; Freire, 2011). Essa classificação destaca a diversidade funcional dessas enzimas no processo de degradação específica das diferentes ligações presentes na estrutura do amido.

Alguns pesquisadores propuseram critérios para a classificação das amilases devido à sua considerável diversidade. Uma das abordagens classificatórias foi sugerida por (Reddy et al. 2003; Castro; Castilho; Freire, 2011), baseada no modo de ação dessas enzimas. A figura 5

ilustra os grupos de amilases classificadas como endoamilases, exoamilases, desramificadoras e transferases.

- Endoamilases (EnA): Hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 ao longo da molécula de amido, produzindo cadeias de oligossacarídeos com tamanhos variados, essenciais para a liquefação do amido. Este grupo inclui as α -amilases.
- Exoamilases (ExA): Hidrolisam sucessivamente as ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora da molécula, gerando açúcares de menor massa molar, como glicose ou maltose. Exemplos incluem β -amilases, glicoamilases (GA) e α -glicosidases.
- Amilases desramificadoras (DA): Enzimas como a isoamilase e a pululanase atuam especificamente nas ligações glicosídicas α -1,6 do pululano, amido, amilopectina e oligossacarídeos relacionados, resultando na formação de maltotriose. Isoamilases também são consideradas enzimas desramificadoras, distinguindo-se das pululanases por sua incapacidade de hidrolisar o pululano e sua ação restrita sobre a dextrina-limite.
- Transferases: Hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador para um aceptor glicosídico, formando uma nova ligação glicosídica.

Figura 5. Modificação comercial do amido por processamento enzimático.



Fonte: SRINIVASAN; PARKIN (2019). As unidades preenchidas de glicose são extremidades redutoras, e as unidades de glicose pontilhadas são extremidades não redutoras existentes no amido original que evoluíram durante o estágio de liquefação.

Com a contínua expansão das fronteiras da biotecnologia, prevê-se que a aplicação dessa classe de enzimas se estenda para outros campos, como a química clínica, a medicina e a análise, ampliando ainda mais seu impacto e relevância (Soares et al., 2010).

2.5 Aplicação das amilases

As enzimas possuem diversas aplicações em diferentes indústrias, com o mercado distribuído da seguinte maneira: alimentos, bebidas e nutrição animal correspondem a 34 %, detergentes e produtos de higiene pessoal a 27 %, indústrias de celulose e papel a 11 % e indústrias do couro, têxteis e outras a 17 % (Freire; Sant'Anna Jr., 2019). Enzimas desempenham um papel fundamental em diversas indústrias, como na produção de detergentes, produtos de higiene pessoal, alimentos e bebidas. Elas são utilizadas em diferentes categorias, como processamento de alimentos, técnicas e nutrição animal. Os usos técnicos incluem sua aplicação em processos industriais, como na produção de celulose e papel, processamento de couro, biocombustíveis, têxteis, além de detergentes e produtos de higiene pessoal (Freire; Sant'Anna Jr., 2019).

As amilases encontram aplicação em diversas indústrias, incluindo as têxteis, alimentícias, de fermentação de bebidas e panificação, de ração animal, nos processos de liquefação e sacarificação do amido, além da indústria de papel (Soares et al., 2010).

O uso de enzimas é preferido ao uso de compostos químicos, devido ao alto rendimento e pelos inúmeros produtos que podem ser obtidos. Xaropes de frutose, um adoçante de baixa caloria e alto poder adoçante, feitos através da isomerização de xarope de glicose se tornou o principal uso de hidrolisados de amido (Crabb; Shetty, 1999; Srinivasan; Parkin, 2019).

Na panificação, a α -amilase é adicionada à massa para degradar o amido danificado da farinha a pequenas dextrinas. A adição de α -amilase de malte ou fúngica resulta no aumento do volume do pão e uma melhor textura do produto final. Para atrasar o envelhecimento, melhorar a textura, volume e sabor dos produtos tornando-os mais atrativos ao consumidor. Na indústria de bebidas fermentadas a matéria prima na produção das mesmas normalmente é a cevada, mas o objetivo é hidrolisar o amido em glicose através de leveduras para a fermentação alcoólica (Peixoto-Nogueira; Benassi, 2016).

Na indústria de detergentes, a adição de amilases substitui a inserção de componentes tóxicos para o meio ambiente, uma vez que são biodegradáveis. Na indústria papelreira é usada para diminuir a viscosidade da goma de amido empregada durante o processamento do papel. As amilases comercializadas para esse fim são produzidas por *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* (Gupta et al., 2003).

A indústria têxtil tem utilizado as amilases para remoção da pasta de amido aplicada ao fio com a finalidade de aumentar a resistência do mesmo a frisão durante o processamento. Essa pasta, quando não totalmente removida, dificulta o processamento final das roupas como tingimento, clareamento ou outro tipo de acabamento (Peixoto-Nogueira; Benassi, 2016).

As aplicações industriais dessas enzimas são inúmeras, mas talvez a de maior importância seja no processo de liquefação do amido nas indústrias de xaropes, álcool e bebidas fermentadas.

2.6 Cultivo microbiano

As características físico-químicas do meio de cultivo desempenham um papel crucial na eficácia da produção do produto final, influenciando não apenas o desenvolvimento celular. Em processos industriais que envolvem microrganismos, é viável utilizar meios com composição quimicamente definida. Nesse cenário, os elementos constituintes do meio são identificados tanto qualitativa quanto quantitativamente (Bon et al., 2008).

A seleção da matéria-prima para a produção de enzimas é uma etapa fundamental, pois influencia diretamente os custos de produção e a qualidade do produto final. De acordo com Bon et al. (2008), a matéria-prima deve apresentar as seguintes características:

- Composição adequada: a matéria-prima deve conter os nutrientes necessários para o crescimento e a atividade do microrganismo produtor da enzima.
- Custo reduzido: a matéria-prima deve ter um custo de obtenção baixo, a fim de reduzir os custos de produção.
- Disponibilidade elevada: a matéria-prima deve ser abundante, a fim de garantir a continuidade da produção.

Os resíduos provenientes de atividades agroindustriais ou florestais apresentam grande potencial para a produção de enzimas, pois atendem a esses critérios. Esses resíduos são abundantes, de baixo custo e podem ser facilmente obtidos. Além disso, eles geralmente apresentam uma composição rica em nutrientes, o que favorece o crescimento do microrganismo produtor da enzima.

No contexto do processo de produção, existem duas formas comuns de cultivo: o cultivo submerso, no qual os microrganismos se desenvolvem em meio líquido, e o cultivo em estado sólido, no qual o crescimento ocorre em substrato sólido, como grãos, farelos ou resíduos sólidos (Bon et al., 2008; Freire; Sant'Anna Jr., 2019)

Atualmente, a produção de enzimas na indústria é baseada em duas técnicas principais de cultivo: o cultivo submerso (CS) e o cultivo em estado sólido (CES). O CS é a técnica mais

comum para a produção de enzimas, especialmente aquelas de microrganismos modificados geneticamente, cuja demanda tem aumentado consideravelmente. Além disso, o CS é amplamente empregado na produção de enzimas intracelulares. Por outro lado, o CES é frequentemente utilizado para a produção de enzimas extracelulares, que possuem mercados específicos bem estabelecidos (Moraes, et al., 2021). A decisão entre a utilização de CS e CES é influenciada por vários fatores.

2.6.1 Cultivo Submerso (CS)

O cultivo submerso (CS) é um processo amplamente utilizado na produção industrial de microrganismos devido ao seu alto rendimento de biomassa e produto. Realizado em tanques ou reatores, o CS requer um meio de cultivo contendo nutrientes essenciais, com condições controladas de temperatura, pH e oxigênio. O fornecimento de oxigênio é crítico, sendo essencial para os microrganismos respiratórios. Existem dois tipos principais de CS: cultivo batch, onde o meio é adicionado no início e não reabastecido, e cultivo contínuo, onde o meio é adicionado e o produto é removido continuamente. Esse processo complexo envolve etapas como a preparação do meio, inoculação, crescimento, produção do produto e separação do produto. Essa tecnologia é crucial para a fabricação de diversos produtos, como antibióticos, enzimas, vitaminas e biocombustíveis (Bon et al., 2008; Freire; Sant'Anna Jr., 2019).

O CS, realizado em meio líquido, possibilita o controle preciso de variáveis como temperatura, pH, oxigenação e nutrientes, criando um ambiente favorável ao crescimento microbiano e à produção enzimática. Isso resulta em um processo altamente confiável e reproduzível, adequado para produção em larga escala. No entanto, o CS pode ser dispendioso devido à necessidade de equipamentos sofisticados e controle rigoroso, além de gerar grandes quantidades de efluentes que requerem tratamento adequado antes do descarte (Freire; Sant'Anna Jr., 2019). Uma pesquisa realizada pela Associação de Fabricantes e Formuladores de Produtos Enzimáticos (Amfep) em 2014 constatou que a maioria das enzimas comerciais, cerca de 92%, são de origem microbiana. Dentre elas, *Aspergillus* representa 27%, *Bacillus* 17%, *Trichoderma* 12%, *Penicillium* 4,5% e *Rhizopus* 4%.

2.6.2 Cultivo em Estado sólido (CES)

O cultivo em estado sólido (CES) representa um método inovador em que microrganismos são cultivados em substrato sólido, como grãos, farelos ou resíduos sólidos. Em contraposição ao cultivo submerso, que é amplamente adotado na produção industrial de microrganismos, o CES oferece vantagens notáveis, tais como a redução dos custos de

produção, minimização do impacto ambiental e potencial aprimoramento na produtividade de algumas enzimas (Moraes et al., 2021).

Esse método de cultivo apresenta benefícios em comparação com o CS, especialmente ao lidar com fungos filamentosos. Essa abordagem resulta em maior eficiência, produtividade aprimorada e menor consumo de energia (Melnichuk et al., 2020). A simplicidade desse meio de cultivo, dispensando a necessidade de equipamentos avançados, proporciona um baixo teor de umidade, reduzindo problemas de contaminação, e demanda um consumo energético mais baixo. No entanto, os desafios persistem, incluindo dificuldades na ampliação de escala e no controle de variáveis físico-químicas, como pH, temperatura, oxigênio e grau de mistura (Bon et al., 2008).

Destacar que o CES também apresenta desafios, como a obtenção de um menor rendimento de biomassa e produto, além de ser um processo mais complexo quando comparado ao cultivo submerso. Este método é empregado na produção diversificada de produtos, incluindo enzimas, biopesticidas e biofungicidas. Detalhes específicos sobre o CES, como o tipo de substrato, tamanho das partículas, umidade, temperatura e pH, influenciam diretamente o sucesso do cultivo (Moraes et al., 2021).

2.6.3 Vantagens e Desvantagens do Cultivo em Estado sólido (CES)

O processo de cultivo em estado sólido, apresenta várias vantagens operacionais em comparação com o processo submerso. Primeiramente, ele permite o uso de matérias-primas insolúveis, como subprodutos agroindustriais, que muitas vezes só ocorrem comentários de correções de umidade e balanço de nutrientes (Moraes et al., 2021). As condições de assepsia são mais amenas devido à baixa atividade de água, ou que simplificam o pré-tratamento do substrato e a condução do processo. A necessidade de melhoria contínua é rara, sendo usada apenas ocasionalmente para homogeneizar o substrato com os microrganismos. Além disso, a aeração, seja natural ou forçada, é facilmente fornecida ao sistema devido aos interstícios existentes entre o substrato e o microrganismo.

Outra vantagem significativa é a menor área necessária para a estocagem do produto semi processado ou final, que pode dispensar refrigeração. O processo também gera uma quantidade menor de resíduos líquidos a serem tratados ou investidos, o que reduz os custos de capital investido e de operação da planta de tratamento, além de diminuir os impactos ambientais (Moraes et al., 2021). Para a produção com fungos filamentosos, que crescem naturalmente em baixa atividade de água, o processo em estado sólido oferece ainda mais benefícios. O volume do reator é menor devido à baixa quantidade de água, o que reduz os

custos de operação e de capital investido. Dependendo do produto desejado, essa baixa quantidade de água também diminui os custos de capital e de energia consumida na recuperação. Além disso, há maiores rendimentos na obtenção de produtos industriais.

Moraes et al. (2021) também destacam que o processo em estado sólido permite o estudo de casos específicos, como a produção de toxinas por fungos filamentosos em grãos. O produto final tende a ser mais concentrado, facilitando a secagem e embalagem direta ou a utilização imediata, como no caso de bioinseticidas ou rações animais. No entanto, existem competências associadas ao processo em estado sólido. A dissipação de calor e gases pode ser problemática, causando elevações de temperatura em pontos localizados e quedas no rendimento geral. A ampliação de escala é desafiadora devido à heterogeneidade do substrato, à dissipação de calor e gases, à manipulação do meio e do produto final, e ao monitoramento e controle do processo. O acompanhamento e controle de parâmetros operacionais como pH, temperatura, umidade, aeração e crescimento de microrganismos são mais complexos. Além disso, pode ser necessário um controle ambiental mais rigoroso.

1.1 Fungos produtores de amilase

Quanto à produção, as enzimas extracelulares podem ser geradas tanto em meios de cultivo sólidos quanto líquidos. Entretanto, a utilização de meios sólidos possibilita uma rápida seleção de populações de fungos, permitindo a identificação de enzimas específicas, como no caso da amilase. Um método clássico para rastrear linhagens fúngicas em busca de atividade amilolítica em meio sólido envolve a adição de amido solúvel ao meio de cultivo. A produção enzimática se torna evidente pela formação de um halo claro ao redor da zona de crescimento da colônia, revelado por meio da aplicação de uma solução de iodo (Pongsawasdi; Yagisawa, 1987).

Espécies de *Aspergillus* produzem muitas enzimas extracelulares, muitas das quais são aplicadas na biotecnologia. Existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. Dentre as espécies mais conhecidas, encontram-se o *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e *A. versicolor*. *Aspergillus* spp. pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Euromicetos, ordem dos Eurotiales, família Aspergilaceae e gênero *Aspergillus*. (The Catalogue of Life, 2024). Suas colônias podem apresentar coloração branca, rosada, amarela, amarelo-esverdeada, amarronzada ou verde. A taxa de crescimento destes fungos é rápida a moderadamente rápida (SOARES et al., 2010). Além da espécie *Aspergillus* existem diversas outras espécies que produzem amilase.

Frequentemente, enzimas amilolíticas, especialmente do tipo α -amilase, são geradas por fungos filamentosos, sendo que os gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* são amplamente preferidos para esse fim. Além desses, outros gêneros como *Mucor*, *Humicola* e *Thermomyces* também são reconhecidos como potenciais produtores desta enzima (PANDEY et al., 1999).

3. OBJETIVOS

Avaliar o potencial de produção de amilase em fungos filamentosos isolados do solo do Bioma Cerrado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram selecionados alguns isolados da coleção de microrganismos da UNESP, no Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Socio Economia (DFTASE), Campus de Ilha Solteira, sob responsabilidade da Prof^ª. Dr^ª. Heloiza Ferreira Alves do Prado. Essa seleção se deu com base em estudos anteriores realizados com esses isolados.

4.2 Meio para reativação e manutenção

Os isolados foram transferidos para placas de Petri, contendo Ágar Dextrosado de Batata (PDA – Potatoe Dextrose Agar). Parte do disco micelial, mantido em criotubos foi transferido para as placas, de forma asséptica com o auxílio de uma alça de platina. Essas placas foram incubadas na estufa tipo BOD a 30 °C por até 96 horas. Após o crescimento das colônias típicas, essas, foram transferidas para tubos contendo meio PDA inclinado para manutenção da cultura e uso nos ensaios.

4.3 Cultivo em Estado Sólido (CES)

Para obtenção do extrato enzimático bruto, foi adotado o cultivo em estado sólido (CES). Para o CES foi usado farelo de trigo como substrato, o qual foi disponibilizado em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 5,0 g do substrato. Em seguida, esses frascos foram esterilizados na autoclave a 121 °C, a 1 atm por 20 minutos. Após esterilização o substrato foi umedecido com 10 mL de solução salina composta por 0,14% de (NH₄)₂SO₄ (Sulfato de Amônia); 0,20% de K₂HPO₄ (fosfato de potássio); 0,02% de MgSO₄.7H₂O (sulfato de Magnésio hepta-hidratado) e 0,03% de uréia. O inóculo dos isolados foi realizado com 5 discos de 5 mm, os quais foram homogeneizados com o auxílio da alça de platina. Os frascos foram incubados em incubadora tipo BOD a 35 °C por 72 horas. Para obter a solução enzimática bruta, adicionou-se 45 mL de água deionizada em cada frasco, os mesmos foram homogeneizados a fim de liberar os micélios e substrato, em seguida foram submetidos à agitação a 100 ciclos por minuto em temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período, o material foi filtrado, usando tecido sintético (voal) e em seguida centrifugado a 10.000 rcf por 10 minutos a 5 °C, resultando em uma solução límpida, que foi utilizada para fins de determinação enzimática (SILVA, 2019). O cultivo foi realizado em triplicata.

4.4 Determinação de atividade enzimática

Para determinação da atividade amilolítica foi adotado o método de açúcar redutor DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico), seguindo o protocolo estabelecido por Miller (1959) e a ação hidrolítica do amido pelo método Dextrinizante, refletindo a interação amido-iodo.

Para o método dextrinizante, adotou-se nesse estudo as diretrizes propostas por Fuwa (1954) e Pongsawasdi; Yagisawa (1987), com algumas modificações específicas. A mistura de reação foi composta por 0,1 mL da solução enzimática convenientemente diluída, combinada a 0,3 mL de solução de amido solúvel a 0,5%, em tampão acetato 0,1 M, com pH ajustado para 5,5. Após a incubação a 50 °C, durante 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 4,0 mL de solução de HCl 0,2 M. Posteriormente, 0,5 mL de reativo de iodo (contendo 0,30% de KI e 0,03% de I₂) foi introduzido na reação. A mistura resultante foi diluída com 10 mL de água destilada. O grupo controle foi preparado conforme o procedimento descrito, substituindo-se a enzima pelo volume equivalente de enzima inativa. A absorbância foi determinada a 700 nm por meio de espectrofotometria. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% a intensidade da coloração azul do complexo Iodo-Amido por minuto.

Para a determinação da atividade de α -amilase foi avaliada pelo método de açúcar redutor, proposto por Miller (1959), no qual 450 μ l de amido solúvel à 0,5%, preparada em tampão acetato a 0,1 M em pH 5,5 foi incubada junto com 50 μ L do extrato enzimático bruto por 10 minutos em banho a 50 °C. Em seguida, foi adicionado 500 μ L do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) à mistura da reação, para parar a reação. A mistura foi incubada em banho de ebulição durante 10 minutos, em seguida foi resfriada em banho de gelo e adicionado 4 mL de água destilada. Após a homogeneização, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A atividade de exoglucanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose por minuto, nas condições de reação, comparado a um diagrama de calibração para o padrão de glicose (0,5 a 4,4 μ mol), previamente preparada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reativação dos isolados

Foram reativados quatro isolados, após reativação apresentaram bom crescimento em meio PDA. O crescimento em placas de Petri com meio PDA está ilustrado na figura 6, no qual pode-se visualizar o aspecto da colônia e o crescimento micelial.

Figura 6 - Aspecto da colônia dos fungos filamentosos reativados. a) P2D19, b) 14.3, c) 22.1, d) 5.1

a) P2D19



b) 14.3



c) 22.1



d) 5.2



Fonte: Próprio autor

5.2 Determinação da atividade amilolítica

Para a indicação de Unidade Internacional (UI) da determinação enzimática, foi realizado para o método dextrinizante, relativo à interação do complexo iodo-amido, o seguinte cálculo:

$$UI = \left[\frac{Abs. controle - Abs. reação}{Abs. controle} \right] \times \left(\frac{100}{10} \right) \times (vol. Enz. \times t) \times Fd$$

Onde:

UI: Unidade internacionais

Abs. Controle: leitura da absorbância do tubo controle

Abs. reação: leitura da absorbância do tubo de reação

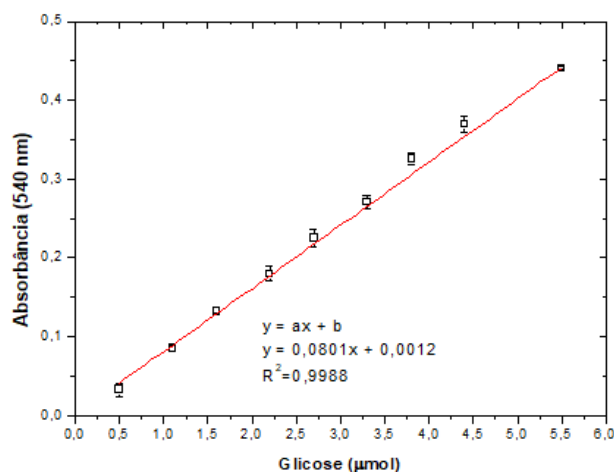
Vol. Enz.: volume de solução enzimática utilizada para reação

T: tempo de reação

Fd: fator de diluição da enzima, quando necessário realizar diluição

Para o método DNS, para o açúcar redutor, foi gerado um diagrama de calibração, usando variações na concentração de glicose a 0,1%, no eixo x e leitura da absorbância no eixo y (Figura 7), gerando assim, uma regressão linear.

Figura 7. Diagrama de calibração para padrão de glicose.



Fonte: Próprio autor

O cálculo das unidades enzimáticas foi realizado usando a seguinte equação:

$$UI = \left[\frac{(Abs. corrigida - 0,0012)}{0,0801} \right] \div (vol. Enz. \times t) \times Fd$$

Onde:

UI: Unidade internacionais

Abs. corrigida: leitura da absorbância do de reação - leitura da absorbância do tubo controle

Vol. Enz.: volume de solução enzimática utilizada para reação

T: tempo de reação

Fd: fator de diluição da enzima, quando necessário realizar diluição

5.3 Cultivo em Estado Sólido

Os isolados fúngicos foram cultivados em estado sólido (CES) utilizando farelo de trigo como substrato. Após 72 horas de cultivo, a massa micelial do fungo tomou todo o substrato, demonstrando que o farelo de trigo foi um bom substrato para o crescimento dos isolados. Na figura 8, estão ilustrados os frascos com o crescimento fúngico no CES, para cada um dos isolados fúngicos em estudo.

Figura 8 - Isolados fúngicos, sob cultivo em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, após 72 horas de cultivo. a) P2D19, b) 14.3, c) 22.1 e d) 5.2

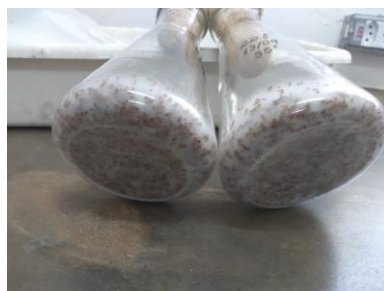
a) P2D19



b) 14.3



c) 22.1



d) 5.2



Fonte: próprio autor

Após o cultivo, foi realizada a extração das enzimas brutas secretadas pelos fungos e, em seguida, avaliou-se a atividade amilolítica, conforme descrito na Tabela 2, evidenciando o potencial biotecnológico dos isolados

Tabela 2 - Atividade amilolítica para os isolados reativados, após 72 horas de cultivo em estado sólido, usando farelo de trigo.

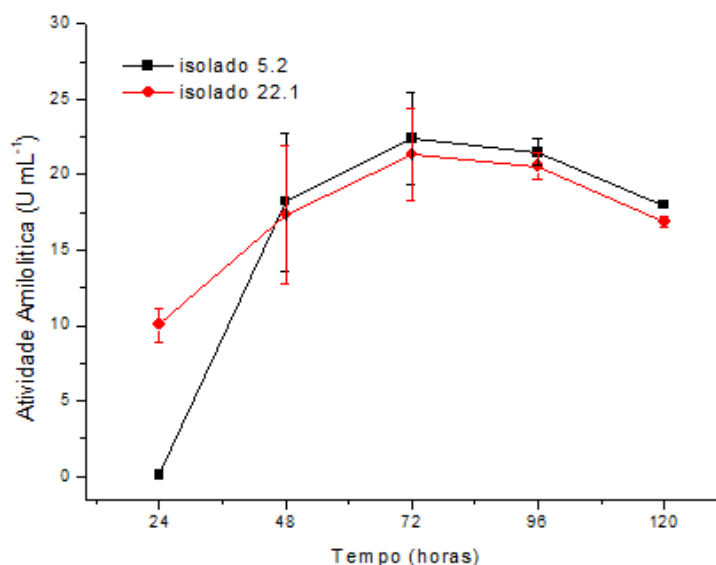
Isolados	Atividade amilolítica	
	(U mL ⁻¹)	(U g ⁻¹ substrato)
P2D19	4,41 ± 0,89	44,1 ± 8,9
14.3	3,45 ± 0,41	34,5 ± 4,1
5.2	7,95 ± 0,81	79,5 ± 8,1
22.1	8,61 ± 0,85	86,1 ± 8,5

Fonte: próprio autor

5.3.1 Perfil da produção de amilase fúngica

Os isolados 5.2 e 22.1 foram selecionados para dar continuidade aos estudos por apresentarem os melhores resultados de atividade amilolítica, em comparação com os demais isolados estudados. O CES foi realizado utilizando farelo de trigo como substrato, e o crescimento dos fungos foi analisado em intervalos regulares de 24 horas, ao longo de 120 horas de cultivo. Após cada intervalo, procedeu-se à extração da solução enzimática bruta, secretadas pelos isolados, conforme ilustrado na Figura 9. Observa-se que a produção de amilase é menor no início do ensaio e vai aumentando ao longo do tempo, sendo dosada as maiores atividades entre 48h e 96h de cultivo, em 120h de cultivo há um decréscimo da atividade amilolítica. Esse decréscimo na atividade pode ser relativa a presença de outras proteases no meio.

Figura 9. Perfil de produção de amilase (U mL⁻¹), produzida pelos isolados 5.2 e 22.1, após cultivo em estado sólido, usando farelo de trigo do substrato.

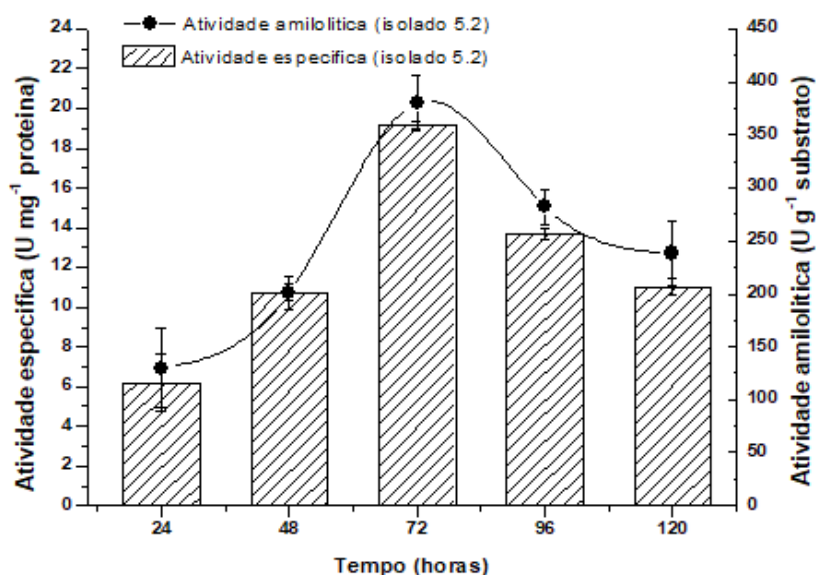


Fonte: próprio autor

Ambos os isolados apresentaram pico de atividade após 72 horas de cultivo. Foi avaliado o perfil de proteína nos extratos enzimáticos, pelo método Hartee-Lowry. Com os dados de proteína total (mg mL^{-1}), foi calculado a atividade específica (U mg^{-1} proteína) para os dados dos extratos enzimáticos, secretados pelos isolados 5.2 (Figura 10) e 22.1 (Figura 11), estudados

O isolado 5.2, apresentou pico para atividade específica de $19,2 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína em 72 h de cultivo, inferior aos demais tempos de cultivo analisados. Essa característica foi acompanhada pela atividade amilolítica (Figura 10).

Figura 10. Perfil de produção de amilase (U g^{-1} substrato) e atividade específica (U mg^{-1} proteína), produzida pelo isolado 5.2, após cultivo em estado sólido, usando farelo de trigo do substrato.

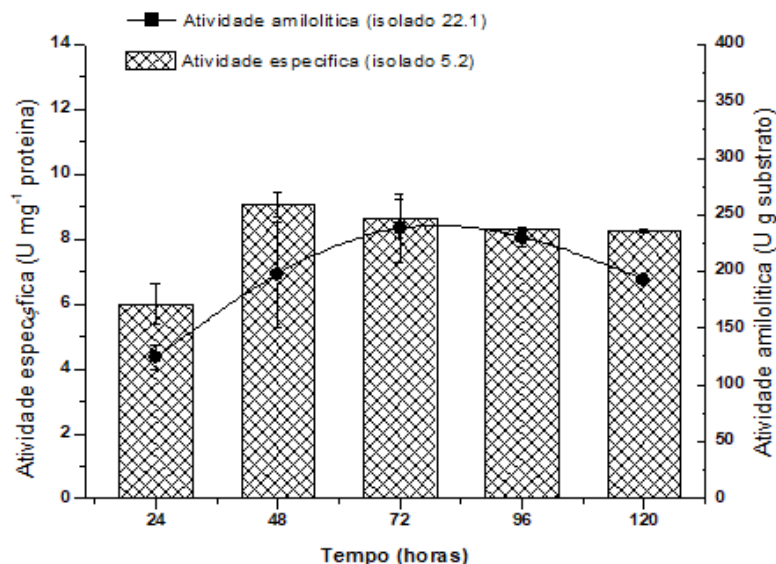


Fonte: próprio autor

Para o isolado 22.1, o tempo de 24 h, representou a menor atividade específica. A maior atividade específica foi determinada em 48 h, no entanto, não diferiu significativamente dos demais tempos de cultivo analisados. A atividade amilolítica foi maior nos tempos de cultivo de 72 h e 96 h com $238,0 \text{ U g}^{-1}$ substrato e $230,2 \text{ U g}^{-1}$ substrato, respectivamente. (Figura 11).

Pandey et al. (1999) relatam que enzimas amilolíticas são produzidas por fungos filamentosos, de diferentes espécies, sendo as mais notificadas as espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus*. Os isolados 5.2 e 22.1 serão submetidos a processos de identificação, em estudos posteriores.

Figura 11. Perfil de produção de amilase (U g^{-1} substrato) e atividade específica (U mg^{-1} proteína), produzida pelo isolado 22.1, após cultivo em estado sólido, usando farelo de trigo do substrato.



Fonte: próprio autor

Peixoto et al., (2003) conduziram uma avaliação da produção de amilases por *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* em cultivo submerso (CS), utilizando diversas fontes de carbono, tais como glicose, maltose, amido solúvel, farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar. Os resultados revelaram uma notável capacidade dessas fontes para induzir a síntese de amilase, sendo que o amido solúvel foi o melhor indutor, apresentando os mais elevados rendimentos, com uma atividade específica de $26,0 \text{ U mg}^{-1}$ proteína. Esse resultado foi um pouco superior $19,2 \text{ U mg}^{-1}$ proteína ao apresentado pelo isolado 5.2, em cultivo em estado sólido, usando farelo de trigo (Figura 10).

Oliveira et al., 2016 estudaram as enzimas amilolíticas produzidas por *Lichtheimia ramosa* e *Thermoascus aurantiacus* obtiveram atividade enzimática significativa de $417,2 \text{ U g}^{-1}$ substrato e $144,5 \text{ U g}^{-1}$ substrato, respectivamente. O cultivo também foi realizado em substrato de farelo de trigo, com destaque de perfil de atividade amilolítica em 96 h no tempo de cultivo, para ambas espécies. Sendo assim, foram obtidos resultados semelhantes de atividade enzimática quando comparado-se isolado 5.2 à *Lichtheimia ramosa* e o isolado 22.3 superior à *Thermoascus aurantiacus*.

O farelo de trigo, utilizado como substrato no cultivo em estado sólido, é um substrato muito rico em proteína, fibras e amido e devido a isso, muito utilizado nos ensaios de produção

enzimática. Muitas vezes a mistura de outros substratos com o farelo de trigo, podem potencializar os processos de produção enzimática.

Os estudos realizados por Pereira (2015), na otimização da produção de amilase por *Aspergillus* sp, foi eficiente alcançando um aumento de 4,62 vezes em relação à atividade enzimática inicial. Nesse estudo, houve a variação da concentração de amido solúvel utilizado no meio de cultivo.

Dessa forma, estudos de busquem a otimização, no meio de cultivo, poderão ampliar o potencial biotecnológico e a eficiência da síntese enzimática para os isolados 5.2 e o 22.1. Isso poderá ser realizado com a variação do tipo de substrato, bem como de sua concentração, além disso, poderão ser ajustados fatores como a umidade e pH do meio de cultivo, bem como a temperatura de cultivo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira resumida, este trabalho aprofunda compreensão da produção de enzimas que degradam amido, por isolados fúngicos, evidenciando a complexidade das interações entre fungos, substratos e fatores ambientais durante o cultivo em estado sólido.

Foram estudados quatro isolados fúngicos e desses, dois isolados, isolado 5.2 e 22.1 demonstraram melhor potencial na produção de amilase, com atividade amilolítica em 72 h de cultivo usando farelo de trigo como substrato. O isolado 5.2 apresentou, em 72h de cultivo, maiores atividades amilolítica e específica, 350 U g^{-1} substrato e $19,2 \text{ U mg}^{-1}$ proteína, respectivamente. Enquanto, o isolado 22.1 apresentou atividade amilolítica 238 U g^{-1} substrato em 72 h de cultivo e atividade específica $9,5 \text{ U mg}^{-1}$ proteína em 48 h de cultivo.

As conclusões deste estudo não apenas contribuem significativamente para o avanço do conhecimento nessa área, mas também apontam para potenciais aplicações práticas na otimização de processos industriais associados à produção de enzimas.

REFERÊNCIAS

- BENASSI, V. M.; ALMEIDA, A. Prospecção de fungos filamentosos termotolerantes e hemofílicos de distintos materiais coletados no estado de Minas Gerais e análise de potenciais produtores de amilases. **Unimontes Científica**, v. 20, n. 1, p. 150-169, 2019.
- BON, E. P. S.; PERREIR JR., N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PERREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para produção de enzimas. In.: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Org.) **Enzimas em biotecnologia, produção, aplicações e mercado**. Cap. 5, p. 100-112. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- CASTRO, A. M.; CARVALHO, D. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. **Economic analysis of the production of amylases and other hydrolases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of babassu cake**. *Enzyme Research*. v. 2010, p.1-9, 2010.
- CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. **An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non-conventional processes**. *Biomass Conversion and Biorefinery*. v. 1, p. 245-255, 2011.
- COUTINHO, L. M. **As queimadas e seu papel ecológico**. Brasil Florestal, Brasília, v. 10, n. 44, p. 723, 1990.
- CRABB, W. D.; SHETTY, J. K. **Commodity scale production of sugars from starches**. *Current Opinion in Microbiology*. v. 2, p. 252-256, 1999.
- DEACON, J. W. **Fungal biology**. Somerset: Wiley, p. 371, 2013.
- DURIGAN, G.; MELO, A. C. G.; MAX, J. C. M.; VILAS BOAS, O.; CONTIERI, W. A.; RAMOS, V. S. **Manual para recuperação da vegetação do Cerrado**. 3ª. ed. São Paulo: SMA, 2011.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Novo microrganismo produz enzima de interesse industrial com mais sustentabilidade**. Brasília (DF), 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/28467220/novo-microrganismo-produz-enzima-de-interesseindustrial-com-mais-sustentabilidade>.
- ESPÓSITO, E. AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª ed. Caxias do Sul: Educs, 2010.
- EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Raven biologia vegetal**. 8ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014, Cap. 14, 856 p.
- FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In.: LIMA, U. A.; ALTERTHUM, F.; SCHMIDELL, W.; MORAES, I. O. (Org.) **Coleção Biotecnologia Industrial**. 2. ed., São Paulo: Blucher, vol. 3, cap. 11. 2019.
- FUWA, H. **A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate**. *Journal of Biochemistry*. v. 41, p. 583-603, 1954

GUIMARÃES, L. H. S. Amido: biossíntese, estrutura e aplicação. In.: POLIZELI, M.L.T.M.; SILVA, T.M. (Org.) **Amilases microbianas**. São Paulo: EDUSP, 2016. Cap. 1, p. 11-19

JOBLING, S. Improving starch for food and industrial applications. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 210–218, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 6ª. Ed. São Paulo: Sarvier, 2014. 839 p.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. 2006. **Biodiversidade brasileira: Síntese do estado atual do conhecimento**. In: Lewinsohn T.M. (org.). Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.

MILLER, G. L. Use of dinitrossalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**. v. 31, p. 426-428, 1959.

MORAES, R. O.; DEL BIANCHI, V. L.; ARRUDA, R. O. M.; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, I. O. Fermentação em Estado Sólido. In.: SCHMIDELL, W.; ALTERTHUM, F.; LIMA, U. A.; MORAES, I. O. (Org.) **Coleção Biotecnologia Industrial**. 2. ed., São Paulo: Blucher, vol. 2, cap. 15. 2021.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de Bioquímica**. Ed. Sarvier, 5ªed., Porto Alegre, Artmed, 2011, 1273 p.

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 and by solid-state fermentation. **The Scientific World Journal**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

OYELEKE, S. B.; EGWIN, E. C.; AUTA, S. H. **Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production**. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, v. 2, n. 7, p. 83-87, 2010.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. **Solid state fermentation for the production of industrial enzymes**. *Current Science*. v. 77, n. 01, p.149-162, 1999.

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

PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BENASSI, V. M. **Aplicação industrial de amilases microbianas**. In.: POLIZELI, M.L.T.M.; SILVA, T.M. (Org.) **Amilases microbianas**. São Paulo: EDUSP, 2016. Cap. 5, p. 92-99.

PEREIRA, J. O., SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; CASTRO FRANÇA S., DE OLIVEIRA L.A. **Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon**. In: de Azevedo J., Quecine M. (eds) Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. Springer, Cham. p. 71-103, 2017

POLIZELI, M. L. T. M.; CARVALHO, C.C.; POLIZELI, A.M. O sistema amilolítico. In.: POLIZELI, M.L.T.M.; SILVA, T.M. (Org.) **Amilases microbianas**. São Paulo: EDUSP, 2016. Cap. 2, p. 23-45.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. **Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria**. *Journal Fermentation Technology*, v.65, n.4, p. 463-467, 1987.

REDDY, N.; NIMMAGADDA, A.; SAMBASIVA RAO, K. R. S. **An Overview of the Microbial α -amylase Family**. *African Journal Biotechnology*. v. 2, n. 12, p. 645-648, 2003.

SANTANA, R. S. M.; GONÇAVES, Z. S.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. **Produção de amiloglucosidase utilizando como substrato a palma forrageira**. *Revista Caatinga*, v. 25, n. 1, p. 188-193, 2012.

SILVA, B. C. R.; GOIS, I. M.; BISPO, D. F.; MARQUE, J. J.; SILVA, C. F. **Isolamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas de interesse comercial**. *Scientia Plena*, v. 14, n. 2, 2018.

SILVA, A. D. **Produção de amilase por fungos filamentosos: cultivo em estado sólido e cultivo submerso**. 2019. Iniciação Científica (curso de Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista (UNESP).

SOARES, I. A. et al. **Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans***. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 30, n. 3, p.700-705, 2010.

SRINIVASAN, D; PARKIN, K. L. **Química de alimentos de Fennema**. 5ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. cap. 6.

TAKAHASHI, J. A., LIMA, G. S., DOS SANTOS, G. F., LYRA, F. H., HUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. **Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados**. *Revista virtual de química*, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

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

The Catalogue of Life, acesso em 08/2024. <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/33ZF>

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, cap. 12.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, Cap. 11