

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA CRISTINA PALUDO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS POR
MACROMICETOS PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

CURITIBA

2018

LUANA CRISTINA PALUDO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS POR
MACROMICETOS PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, no Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos – PPGEAL Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos – Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Rigon Spier

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Tirzhá Lins Porto Dantas

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

P184o Paludo, Luana Cristina
Otimização da produção de enzimas amilolíticas por macromicetos para aplicação na indústria de alimentos / Luana Cristina Paludo. – Curitiba, 2018.
85 p. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2018.

Orientadora: Michele Rigon Spier.
Coorientadora: Tirzhá Lins Porto Dantas.

1. α -amilase. 2. Basidiomicetos. 3. Glucoamilase. 4. Bioprocessos. 5. Parâmetros cinéticos.
I. Universidade Federal do Paraná. II. Spier, Michele Rigon. III. Dantas, Tirzhá Lins Porto. IV. Título.

CDD: 664.02

Bibliotecária: Romilda Santos - CRB-9/1214



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LUANA CRISTINA PALUDO** intitulada: **Otimização da Produção de Enzimas Amilolíticas por Macromicetos para Aplicação na Indústria de Alimentos**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 04 de Abril de 2018.

MICHELE RIGON SPIER

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

AGNES DE PAULA SCHEER

Avaliador Interno (UFPR)

GISELLE MARIA MACIEL

Avaliador Externo (UFPR)

*Dedico a Deus, minha família que me apoiou todo esse tempo e a você que
não desistiu dos seus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar meus caminhos de forma a tornar todos os meus sonhos realidade, por mais impossíveis que parecessem. No momento certo, na hora certa, de uma forma inacreditável as coisas acontecem.

Agradeço também a minha família que sempre me apoiou. A minha mãe Maria que nunca me deixou desistir, ao meu pai Célio e irmãos Fernando e Fellipe pelo amor.

Agradeço de coração a Professora Michele pela oportunidade de aprender tanto e crescer como pessoa e profissional. Todos os seus ensinamentos são valiosos para mim. Agradeço também a professora Tirzhá por toda a ajuda.

Um grande obrigada as minhas amigas mais queridas do LENGEBIO: Franciele, Cristina, Tatiane, Suélen e Herta por todo ânimo, risos, apoio, amizade e carinho ao longo desses 2 anos. Vocês me ajudaram muito, sempre. A todos os meus amigos da Pós-Graduação por todo carinho e horas de estudo. Assim como, todos os amigos que me ouviram e mesmo de longe me mandaram mensagens de carinho, Vanessa, Telma, Darkclene e tantos outros amigos maravilhosos que Deus me deu o prazer de conhecer.

Agradeço ao Laboratório de Engenharia Bioquímica e Biotecnologia (LENGEBIO), ao Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA), a Central Analítica, ao Laboratório de Catálise e Processos Químicos (LCPQ) do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná e ao Laboratório de Bioprocessos de Cogumelos (LBC) da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO, PR) por tornarem este sonho possível, bem como, a CAPES por apoiar este sonho.

“A única forma de chegar ao impossível é acreditar que é possível”.

Lewis Carroll

*“Uma criança, um professor, um livro e uma caneta podem mudar o mundo.
A educação é a única solução. Educação antes de tudo”.* **Malala**
E amor ao próximo, sempre, mesmo que o próximo não seja ou não esteja próximo.

RESUMO

As amilases são enzimas com amplas aplicações industriais, as quais podem ser produzidas por basidiomicetos saprófitos, não patogênicos, atraindo grande interesse comercial, devido à facilidade de cultivo e produção enzimática extracelular. A seleção de cepas de basidiomicetos com maior potencial na produção de enzimas amilolíticas (α -amilase e glucoamilase) por cultivo submerso foi realizada utilizando 12 cepas. A cepa que apresentou maior potencial de produção de amilases foi *Coprinus comatus* ($2,31 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 48 horas de cultivo). Esta pesquisa é uma das poucas que avalia o potencial de basidiomicetos para a produção de amilases em cultivo submerso e a primeira reportada na literatura que avalia quantitativamente *C. comatus*. Em seguida, realizou-se um delineamento do tipo Plackett-Burman 11/12 para a seleção de variáveis significativas. Três fatores apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) para α -amilase e glucoamilase: amido, ureia e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. O incremento da produção utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional foi de 180% para α -amilase e 1184% para glucoamilase, ao qual resultou na obtenção de dois modelos representados pelas superfícies de resposta para ambas enzimas. Na cinética final foi obtida atividade máxima em 48 horas para α -amilase ($5,84 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; $213 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) e em 44 horas para glucoamilase ($8,87 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; $147,93 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$). *C. comatus* apresentou produtividade para α -amilase de $0,12 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, em 48 horas de cultivo com fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{A/X/S}$) de $0,02 \text{ g}$ de biomassa (gdb) $\cdot \text{g}^{-1}$ de substrato (gds), de substrato em enzima ($Y_{A/P/S}$) de $508,34 \text{ U}\cdot\text{gds}^{-1}$ e de biomassa em enzima ($Y_{A/P/X}$) de $25532,55 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. No meio para produção de glucoamilase esta cepa apresentou $Y_{G/X/S}$ foi de $0,02 \text{ gdb}\cdot\text{gds}^{-1}$, $Y_{G/P/S}$ de $766,20 \text{ U}\cdot\text{gds}^{-1}$ e $Y_{G/P/X}$ de $37744,54 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, com produtividade de $0,20 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ no pico de atividade. As enzimas foram caracterizadas quanto ao pH, temperatura de reação e íons metálicos. O pH e temperatura ótimos para α -amilase foram de 6,5 e 50°C . Para a glucoamilase foram encontrados pH e temperatura ótimos igual a 6,0 e 50°C . A presença do íon Mg^{2+} aumentou significativamente a produção de α -amilase (43,16%). Por sua vez, glucoamilase teve um aumento de 168,46% na presença de íon Mn^{2+} e 157% na presença de Ca^{2+} . A otimização da atividade enzimática de *C. comatus* aumentou a atividade de α -amilase em 153% em relação a atividade obtida na seleção e para glucoamilase houve um aumento de 2234%.

Palavras-chave: Basidiomicetos; α -amilase; Glucoamilase; Bioprocessos; Parâmetros cinéticos;

ABSTRACT

Amylases are enzymes with broad industrial applications, which can be produced by non-pathogenic saprophytic basidiomycetes, attracting great commercial interest due to the ease of cultivation and extracellular enzymatic production. The selection of basidiomycete strains with greater potential for the production of amylolytic enzymes (α -amylase and glucoamylase) via submerged culture was carried out using 12 strains. The strain with the highest potential to produce amylases was *Coprinus comatus* ($2,31 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 48 hours of culture). This research is one of the few that evaluates the potential of basidiomycetes for the production of amylases in submerged culture and the first one reported in the literature that quantitatively evaluates *C. comatus*. Next, a Plackett-Burman Screening Design 11/12 was carried out to select the significant variables. Three factors presented significant effect ($p < 0,05$) for α -amylase and glucoamylase: starch, urea and $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. The increase in production using Rotational Central Composite Design, 180% for α -amylase and 1184% for glucoamylase, resulted in two models represented by the surface of response for both enzymes. In the final kinetics, the maximum activity was obtained after 48 hours for α -amylase ($5,84 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; $213 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) and in 44 hours for glucoamylase ($8,87 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; $147,93 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$). The *C. comatus* showed a 48 hour productivity for α -amylase of $0,12 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, with a substrate conversion factor in biomass ($\text{Y}_{\text{A}/\text{X}}$) of $0,02 \text{ g}$ of biomass ($\text{gdb}\cdot\text{g}^{-1}$ of substrate (gds), enzyme substrate ($\text{Y}_{\text{A}/\text{P}}$) of $508,34 \text{ U}\cdot\text{gds}^{-1}$ and biomass in enzyme ($\text{Y}_{\text{A}/\text{P}/\text{X}}$) of $25532,55 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. In the medium for the production of glucoamylase is available in $\text{Y}_{\text{G}/\text{X}}$ was $0,02 \text{ gdb}\cdot\text{gds}^{-1}$, $766,20 \text{ U}\cdot\text{gds}^{-1}$ $\text{Y}_{\text{G}/\text{P}}$ and $37744,54 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ $\text{Y}_{\text{G}/\text{P}/\text{X}}$, yielding $0,20 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ at peak activity. The enzymes were characterized for pH, reaction temperature and metallic ions. Optimal pH and temperature for α -amylase were 6,5 and 50°C , while for glucoamylase they were 6,0 and 50°C . The presence of Mg^{+2} ion increased significantly the α -amylase production (43,16%). Glucoamylase, in turn, had an increase of 168,46% in the presence of Mn^{+2} ion and 157% in the presence of Ca^{+2} . The optimization of the *C. comatus* enzymatic activity increased the α -amylase activity in 153% in relation to the activity obtained in the selection, while the increase in glucoamylase was 2234%.

Keywords: Basidiomycetes; α -amylase; Glucoamylase; bioprocesses; Kinetic parameters;

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

FIGURA 1 – DIFERENTES HIDRÓLISES REALIZADAS PELAS AMILASES NA MOLÉCULA DE AMIDO	21
FIGURA 2 – ESTRUTURA DE UM MACROMICETO	25
FIGURA 3 – <i>COPRINUS COMATUS</i> COM A FORMAÇÃO DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO.....	27
FIGURA 4 – ESTRUTURA MOLECULAR E ESQUEMÁTICA DA AMILOPECTINA.....	28
FIGURA 5 – ESTRUTURA MOLECULAR E ESQUEMÁTICA DE DE AMILOSE.....	28
FIGURA 6 – PRINCIPAIS ETAPAS REALIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE AMILASES	37
FIGURA 7 – PREPARO E INCUBAÇÃO DO MEIO CZAPEK PARA A OBTENÇÃO DO PRÉ-INÓCULO	39
FIGURA 8 – COLETA DAS AMOSTRAS DO CULTIVO SUBMERSO (CSm) PARA A DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	40
FIGURA 9 – ETAPAS PARA A REALIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES.....	50
FIGURA 10 - RESULTADOS DA ATIVIDADE DE α -AMILASE OBTIDOS EM 48, 96 E 120 h DE CULTIVO PELAS 12 CEPAS AVALIADAS DURANTE ESTUDO DE SELEÇÃO (N=3, $\bar{X} \pm$ ERRO PADRÃO). AS CONDIÇÕES DE CULTIVO ERAM pH 6,0, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 120 RPM. Ab = <i>Agaricus blazei</i> ; Cc = <i>Coprinus comatus</i> ; Gl = <i>Ganoderma lucidum</i> ; Gf = <i>Grifola frondosa</i> ; Le = <i>Lentinus edodes</i> ; Po-eu = <i>Pleurotus ostreatus</i> (europea); Po = <i>Pleurotus ostreatus</i> ; Po-pb = <i>Pleurotus ostreatus</i> (Pato Branco); Psc = <i>Pleurotus sajor-caju</i> ; Abis: <i>Agaricus bisporus</i>	51
FIGURA 11 - RESULTADOS DA ATIVIDADE DE GLUCOAMILASE OBTIDOS EM 48, 96 E 120 h DE CULTIVO PELAS 12 CEPAS AVALIADAS DURANTE ESTUDO DE SELEÇÃO (N=3, $\bar{X} \pm$ ERRO PADRÃO). AS CONDIÇÕES DE CULTIVO ERAM pH 6,0, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 120 RPM. Ab = <i>Agaricus blazei</i> ; Cc = <i>Coprinus comatus</i> ; Gl = <i>Ganoderma lucidum</i> ; Gf = <i>Grifola frondosa</i> ; Le = <i>Lentinus edodes</i> ; Po-eu = <i>Pleurotus ostreatus</i> (europea); Po = <i>Pleurotus ostreatus</i> ; Po-pb = <i>Pleurotus ostreatus</i> (Pato Branco); Psc = <i>Pleurotus sajor-caju</i> ; Abis: <i>Agaricus bisporus</i> ; Ha: <i>Hericium americanum</i>	53
FIGURA 12 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A ATIVIDADE DE α -AMILASE (A) E GLUCOAMILASE (B) EM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES AVALIADAS NO DCCR, AMIDO E UREIA PARA <i>COPRINUS</i>	

COMATUS EM CULTIVO SUBMERSO. AS CONDIÇÕES DE CULTIVO ERAM pH 6,0, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 120 RPM.....58

FIGURA 13 - RESULTADOS DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE POR *COPRINUS COMATUS*. PERFIL DE CONSUMO DE SUBSTRATO (CONCENTRAÇÃO DE AMIDO, g.L^{-1}), BIOMASSA (g.L^{-1}), ATIVIDADE ESPECÍFICA (U.mg^{-1}), pH. AS DEMAIS CONDIÇÕES FORAM FIXADAS DURANTE O CSm: TAXA DE INOCULAÇÃO: 10% v.v⁻¹; pH INICIAL=6,0; TEMPERATURA $28 \pm 2^\circ\text{C}$; AGITAÇÃO: 120 RPM.....60

FIGURA 14 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE EM RELAÇÃO AO pH DO MEIO REACIONAL (A) E DA TEMPERATURA DE REAÇÃO (B) (N=3, $\bar{X} \pm \text{ERRO PADRÃO}$).....62

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1 – EXPERIMENTOS QUE UTILIZARAM MACROMICETOS COMO FONTE DE AMILASES.	23
TABELA 2 - PARÂMETROS GERAIS PARA O CULTIVO DE MACROMICETOS.....	29
TABELA 3– TEMPERATURA IDEAL PARA A REAÇÃO ENZIMÁTICA DE DIFERENTES CEPAS DE MACROMICETOS	32
TABELA 4 - PATENTES RELACIONADAS A PRODUÇÃO DE AMILASES POR MACROMICETOS.....	35
TABELA 5- EMPRESAS MUNDIAIS E MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE AMILASES.....	36
TABELA 6 – CEPAS ESTUDADAS.....	38
TABELA 7 - ETAPAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE α -AMILASE	40
TABELA 8 – ETAPAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE GLUCOAMILASE.....	42
TABELA 9 - ENSAIOS REALIZADOS PARA A SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS COM EFEITO SIGNIFICATIVO ($P < 0.05$) NO PLACKETT-BURMAN SCREENING DESIGN PARA <i>COPRINUS COMATUS</i> EM CULTIVO SUBMERSO. J* E K* SÃO VARIÁVEIS DUMMY; 13*, 14* E 15* PONTOS CENTRAIS.....	43
TABELA 10 - OS NÍVEIS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES EMPREGADAS NO PLACKETT-BURMAN SCREENING DESIGN PARA A CEPA <i>COPRINUS COMATUS</i> EM CULTIVO SUBMERSO	43
TABELA 11 - SELEÇÃO DE VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS POR DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA AS AMILASES PELO <i>COPRINUS COMATUS</i> EM CULTIVO SUBMERSO. 15*, 16* E 17* PONTOS CENTRAIS.....	44
TABELA 12 – OS NÍVEIS PARA AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES UTILIZADAS NO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL PARA <i>COPRINUS COMATUS</i> EM CULTIVO SUBMERSO.....	44
TABELA 13 – ATIVIDADE DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE NOS ENSAIOS DO PLACKETT-BURMAN EXPERIMENTAL DESIGN PRODUZIDAS POR <i>COPRINUS COMATUS</i> EM CULTIVO SUBMERSO, COM pH 6,0, TEMPERATURA DE $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 120 RPM; * = PONTOS CENTRAIS.....	54
TABELA 14 - MATRIZ DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE POR <i>Coprinus comatus</i> EM CSm, COM pH 6,0, TEMPERATURA DE $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 120 RPM.....	56

TABELA 15 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO QUADRÁTICO PARA A PREDIÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE. ^a SOMA DE QUADRADOS; ^b GRAUS DE LIBERDADE; ^c QUADRADO MÉDIO; ^d F-RATIO= IMPORTÂNCIA DO MODELO (REGRESSÃO/ RESIDUAL.....57

TABELA 16 – ATIVIDADE RELATIVA DAS ALIMASES PRODUZIDAS POR *COPRINUS COMATUS* COM INFLUÊNCIA DOS ÍONS METÁLICOS LEVANDO EM CONSIDERAÇÃO O TESTE DE TUKEY A $P < 0,05$ DE CONFIABILIDADE. 1 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2 - MgSO_4 ; 3 - CuSO_4 ; 4 - $\text{Fe}_2(\text{SO})_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DP	- Densidade da partícula
°C	- Graus Centígrados
G	- Gramas
h	- Horas
pH	- Potencial Hidrogeniônico
rpm	- Rotações por minuto
min	- Minutos
U	- Unidade internacional de atividade enzimática
L	- Litro
mL	- Mililitro
µL	- Microlitro
EEB	- Extrato Enzimático Bruto
DNS	- Ácido 3,5-dinitrosalicílico
CSm	- Cultivo submerso
CS	- Cultivo em meio sólido
t_d	- Tempo de duplicidade
µ_{máx}	- Velocidade máxima específica de crescimento (h ⁻¹)
Y_{xtotal}	- Produtividade horária total (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
Y_{X/S}	- Fator de conversão de substrato em biomassa (gdb·gds ⁻¹)
Y_{P/S}	- Fator de conversão de substrato em produto (U·gds ⁻¹)
Y_{P/X}	- Fator de conversão de biomassa em produto (U·gdb ⁻¹)
gds	- gramas de substrato
gdb	- gramas de biomassa
PB	- Plackett-Burman
DCCR	- Delineamento Composto Central Rotacional

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	OBJETIVOS.....	18
2.1.	Objetivo geral	18
2.2.	Objetivos específicos.....	18
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1.	Enzimas	19
3.2.	Amilases	20
3.2.1.	α -amilase	22
3.2.2.	Glucoamilase	22
3.3.	Fontes de amilases.....	22
3.4.	Macromicetos	25
3.4.1.	<i>Coprinus comatus</i>	26
3.5.	Substratos para a produção de amilases	27
3.6.	Processos de produção de amilases	28
3.6.1.	Parâmetros de cultivo.....	29
3.7.	Componentes nutritivos para produção de amilases	29
3.7.1.	Fontes de carbono.....	29
3.7.2.	Fontes de nitrogênio	30
3.7.3.	Íons Metálicos	30
3.7.4.	Temperatura.....	31
3.7.5.	pH.....	32
3.7.6.	Agitação	32
3.8.	Otimização de bioprocessos para amilases	33

3.9.	Patentes relacionadas a produção de amilases por macromicetos	33
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1.	Macromicetos	37
4.2.	Isolamento de cepa	38
4.3.	Reativação das cepas para preparo de pré-inóculo.....	39
4.4.	Seleção das cepas produtoras de enzimas amilolíticas	39
4.4.1.	Determinação da atividade de α -amilase	40
4.4.2.	Determinação da atividade de glucoamilase	41
4.5.	Estratégia experimental e otimização de alguns parâmetros químicos para a bioprodução de amilases por csm utilizando a cepa selecionada	42
4.6.	Cinética final do cultivo submerso (CSm) otimizado	45
4.6.1.	Determinação da concentração de amido.....	46
4.6.2.	Determinação do pH do meio de cultivo	46
4.6.3.	Determinação de biomassa ao longo da cinética final em cultivo submerso	46
4.6.4.	Determinação de teor de proteína no meio de cultivo submerso .	46
4.6.5.	Determinação de parâmetros cinéticos do bioprocessamento otimizado.....	47
4.7.	Caracterização parcial das amilases quanto fatores importantes na reação enzimática.....	49
4.7.1.	Determinação do pH ótimo, temperatura ótima e efeito dos íons metálicos para a atividade das amilases produzidas pelo <i>C. comatus</i> em cultivo submerso	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1.	Seleção de cepa de basidiomiceto para a produção de amilases em cultivo submerso (CSm)	51

5.2.	Otimização da atividade enzimática por <i>Coprinus comatus</i> em cultivo submerso	54
5.3.	Cinética final para <i>Coprinus comatus</i> em meio otimizado	59
5.4.	Caracterização do efeito do ph, temperatura e íons metálicos para a atividade de α -amilase e glucoamilase.....	62
6.	CONCLUSÃO	65
6.1.	Sugestões para trabalhos futuros	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXO A - Curva Padrão FUWA.....	83
	ANEXO B - Curva Padrão DNS.....	83
	ANEXO C - Preparo do reativo DNS.....	84
	ANEXO D - Curva Padrão BradFord.....	84
	ANEXO E - Preparo do reativo BradFord.....	85

1. INTRODUÇÃO

As enzimas amilolíticas são utilizadas na produção de xaropes, edulcorantes, liquefação e sacarificação de amido, maturação e aromatização de queijo, farinha, cereais infantis, em cervejarias, no tratamento da pasta de cacau para produção de xarope de chocolate, entre outras aplicações (GOUD et al., 2009; SUNDARRAM, MURTHY, 2014; ELMARZUGI et al., 2014; ABD-ELHALEM et al, 2015; ZHANG et al., 2016; SHUKLA, SINGH, 2016; SINDHU et al, 2017).

As amilases representam a maior parte do mercado de enzimas, correspondendo de 25 a 30% deste (ELMARZUGI et al., 2014). Atualmente, não há amilases industriais de macromicetos disponíveis no mercado. Poucas pesquisas científicas avaliaram o potencial destes quanto à produção de amilases, principalmente em cultivo submerso. Algumas espécies de macromicetos apresentam características saprófitas e ausência de toxicidade (PRAKASAM et al, 2011), sendo consideradas sistemas com potencial para a produção de enzimas, embora ainda pouco explorados (SPIER *et al.*, 2015). Diante dessas características, os macromicetos tornam-se fontes promissoras para a produção de amilases.

A otimização apropriada do meio de cultivo é extremamente importante para garantir produtividade e economia de custos. Os delineamentos experimentais são frequentemente usados para otimizar processos para a produção de amilases de várias espécies microbianas (RAMESH; MURTY, 2014; IMEN; MAHMOUD, 2015; DUTTA; DEB; MAJUTAR, 2016). O método Plackett-Burman (PB) é um delineamento estatístico de dois níveis usado para selecionar variáveis que apresentem efeito significativo sobre a resposta desejada (PLACKETT; BURMAN, 1946; IMEN & MAHMOUD, 2015; SPIER et al., 2010). Os níveis ótimos dos fatores significativos selecionados por PB podem ser determinados por um delineamento fatorial. A aplicação de delineamento composto central rotacional (DCCR) para gerar a superfície de resposta pode ser uma ferramenta útil para incrementar a produção de enzimas.

O objetivo deste estudo foi selecionar uma cepa de macromiceto que apresentou maior produção de amilases e otimizar a composição do meio sintético em cultivo submerso, visando o incrementando da produção destas

enzimas por delineamentos estatísticos. Além disso, as amilases produzidas foram caracterizadas parcialmente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente projeto de pesquisa apresentou como objetivo geral a otimização de algumas variáveis que afetaram a produção de enzimas amilolíticas por cultivo submerso (CSm) utilizando uma cepa de macromiceto comestível ainda não explorada cientificamente e comercialmente.

2.2. Objetivos específicos

- Selecionar uma cepa de macromiceto com maior capacidade de produção de enzimas amilolíticas em cultivo submerso (CSm) usando meio de cultivo contendo amido solúvel;
- Identificar, selecionar e avaliar variáveis químicas que possam afetar a produção de amilases pela cepa selecionada;
- Maximizar a produção das enzimas amilolíticas, por meio de delineamentos experimentais;
- Realizar cinética do cultivo submerso nas condições ideais para determinar o tempo de cultivo com máxima produção das enzimas bem como os parâmetros cinéticos do bioprocessamento;
- Oferecer ao mercado uma alternativa tecnológica para a obtenção de amilases fúngicas ainda não reportadas;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Enzimas

As primeiras transformações enzimáticas registradas datam de aproximadamente 6.000 a.C. na China, Suméria e Egito, muito antes da concepção do termo enzima. As enzimas atuavam no processo de fabricação de alimentos como queijo, pão, cerveja, vinho e vinagre. No entanto, apenas por volta de 1.800 d.C. iniciaram-se os estudos relacionados com as enzimas por diversos pesquisadores como Kühne, Pasteur, Lieig e Buchner (SCHÄFER, 2007). Relatos sobre uma das primeiras patentes datam de 1913, concedida para Otto Röhm, que utilizava a protease em detergentes de roupa (AEHLE, 2007; TALENS-PERALES et al., 2016).

No final do século XIX a teoria “Chave-Fechadura” proposta por Fischer, que leva em consideração a seletividade característica das enzimas foi postulada. É explanado na teoria que o substrato se encaixa no sítio ativo específico para si na enzima, formando o complexo chave-fechadura. Posteriormente a essa teoria, Michaelis e Menten postularam sobre a formação de complexos formados entre substratos e enzimas (complexo substrato-enzima), para na sequência formar um produto específico. Após a reação, ocorre a liberação da enzima para o meio e isto possibilita a utilização desta em um novo ciclo catalítico. Esse tipo de modelo cinético tem sido aperfeiçoado ao longo dos anos (GRÖGER, ASANO, 2012).

As enzimas são catalisadores biológicos sustentáveis da natureza. São proteínas capazes de atuar sobre diversos tipos de compostos dependendo da sua especificidade. Atuando sobre substrato(s) específicos transformando-os em outro(s) composto(s) distinto(s), os produto(s). Isto ocorre com uma alta taxa de reação, pois reduzem a energia de ativação requerida para a reação (VITOLLO, 2009). Essa função única das enzimas se deve as suas complexas estruturas tridimensionais e ao sítio ativo integrado nesta estrutura (GRÖGER; ASANO, 2012).

As enzimas são biodegradáveis, derivadas de fontes renováveis, com menor impacto ambiental, pois geram baixa quantidade de resíduos, levando ao aumento na busca por novas e mais eficientes fontes enzimáticas (DICOSIMO, 2013; SHELDON; PELT, 2013).

As enzimas podem ser provenientes de fonte animal, vegetal ou microbiana. Dentre as enzimas microbianas, destacam-se as fúngicas, pois os fungos possuem uma grande capacidade de degradar uma variedade de fontes orgânicas (RYTIOJA *et al.*, 2014). Diversas pesquisas ao longo dos anos têm sido realizadas para explorar novos fungos produtores, como Souza *et al.* (2008) que estudaram a produção de enzimas com interesse biotecnológico produzidos por basidiomicetos da Amazônia. Wisniewski *et al.* (2010) pesquisaram a produção de amilases em resíduos de cerveja. Zancan *et al.* (2015) analisaram a produção enzimática por basidiomicetos cultivados em resíduos lignocelulósicos, entre diversas outras pesquisas.

Diante dos avanços nas áreas de biotecnologia e engenharia bioquímica, é possível produzir enzimas com maior aplicabilidade quando comparadas aos catalisadores químicos. Isso está ligado diretamente à possibilidade de manipulação genética para conferir propriedades desejadas (pH ótimo, substrato específico, seletividade e atividade) e tornar possível a aplicação industrial com um preço mais acessível (SHELDON; PELT, 2013; SUNDARRAM; MURTHY, 2014).

Atualmente o mercado mundial de enzimas movimenta mais de 4 bilhões de dólares e o Brasil é responsável por aproximadamente 6% desse montante. Apesar do Brasil representar uma parcela pequena, é um mercado que vem crescendo ao longo dos anos (STAHLKE *et al.*, 2015), tornando a pesquisa e a investigação de novas fontes enzimáticas comercialmente viáveis um campo em expansão.

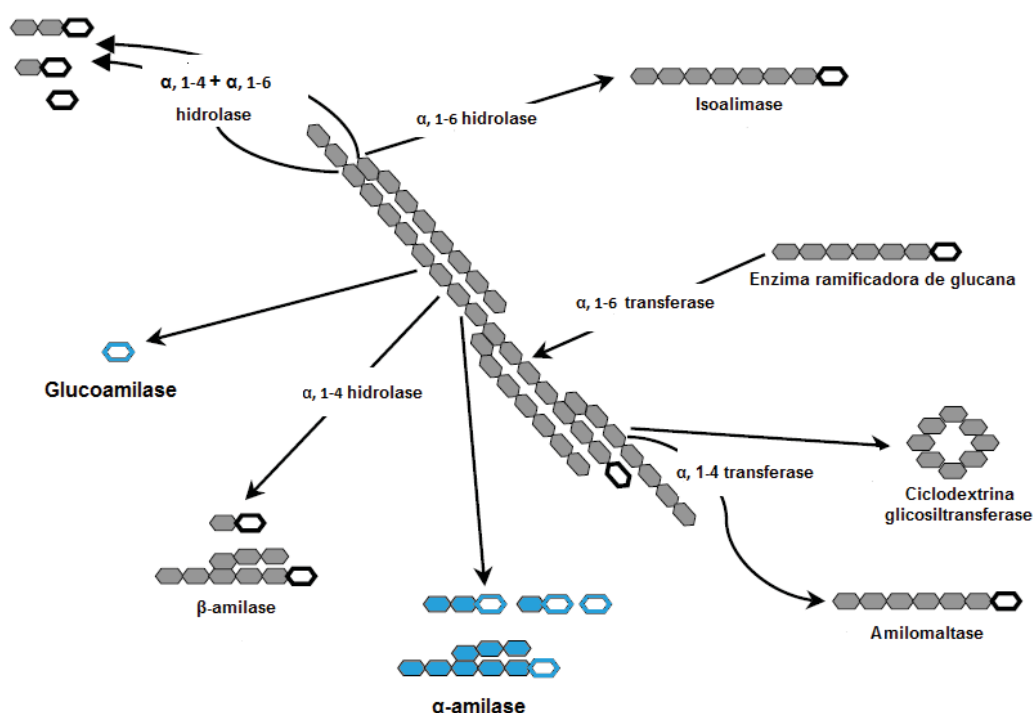
3.2. Amilases

As amilases hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos, que incluem principalmente dextrinas, maltose, maltotriose e glicose (WHITEHURTS; OORT, 2010). São classificadas de acordo com a hidrólise realizada nas ligações glicosídicas. Uma das características mais importantes nesse tipo de conversão é a possibilidade de transformar o amido em diferentes biomoléculas com importância industrial, tais como: etanol, sorbitol, ácido glutâmico, ácido lático, ácido cítrico e lisina (KUMAR *et al.*, 2012; TIWARI *et al.*, 2015).

As amilases destacam-se no mercado mundial de enzimas com uma representatividade entre 25 e 30% (ELMARZUGI *et al.*, 2014). Podem ser

divididas em duas categorias: exoamilases e endoamilases. As exoamilases hidrolisam as extremidades não redutoras nas frações do amido de forma sucessiva acarretando a formação de produtos finais de cadeias curtas. As endoamilases por sua vez catalisam a hidrólise dos grânulos de amido de forma aleatória formando oligossacarídeos lineares ou ramificados com variados comprimentos de cadeia. As diversas amilases e sua ação na molécula de amido são abordadas na Figura 1 (GUPTA et al., 2003).

FIGURA 01 - DIFERENTES HIDRÓLISES REALIZADAS PELAS AMILASES NA MOLÉCULA DE AMIDO.



FONTE: ADAPTADO DE MAAREL *et al.* (2002).

As enzimas amilolíticas são utilizadas nas indústrias de pães, xaropes, farinhas, cervejarias, entre outras (SINDHU et al, 2017; TIWARI et al., 2016; ZHANG et al., 2016; GOUD et al., 2009).

As enzimas de origem fúngica apresentam maior destaque por abrangerem uma grande diversidade de espécies que possuem facilidade de manipulação genética, de crescimento em diversos substratos, requerem menor espaço para a sua produção e tempo reduzido para síntese de enzimas (SUNDARRAM, MURTHY, 2014). A produção de amilases foi observada por diversos fungos como o *Crinipellis pernicioso* por Bastos (2005), *Macrocybe*

titans por Wisniewski et al. (2010), *Aspergillus niger* por Bagheri et al. (2014) e Spier (2005), *Penicillium chrysogenum* por Balkan e Ertan (2007), entre outros. Os macromicetos que são um subfilo do reino fungi, vêm sendo estudados quanto ao seu potencial enzimático, apesar dos poucos e limitados estudos, como pode ser verificado na Tabela 1.

3.2.1. α -amilase

A α -amilase (E.C.3.2.1.1) é uma endoenzima capaz de hidrolisar de forma aleatória as ligações glicosídicas α -1,4 das moléculas de amido. Essa característica possibilita a diminuição rápida da massa molecular média dos grânulos de amido e a formação de malto-oligossacarídeos de cadeia curta, 2 a 12 unidades de glicose, α -dextrinas-limite ramificadas liberando também algumas moléculas de glicose (BALKAN; ERTAN, 2007; TIWARI *et al.*, 2015).

O sítio ativo das α -amilases é formado por pelo menos 5 sub-sítios com necessidade de que o substrato possua pelo menos 3 unidades de glicose para poder agir (CELESTINO *et al.*, 2014).

3.2.2. Glucoamilase

A glucoamilase ou amilogucosidase (E.C. 3.2.1.3) é uma exoenzima que degrada os fragmentos lineares das moléculas de amido a partir das extremidades não redutoras liberando unidades de glicose. Esta enzima hidrolisa de forma lenta as ligações α -1,6 da amilopectina. O pH ótimo é faixa de 3,5 a 6,0 e a temperatura ideal entre 40 a 70°C, dependendo da fonte (DAMODORAN *et al.*, 2010; TIWARI *et al.*, 2016).

3.3. Fontes de amilases

As amilases podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana, mas diversas pesquisas ao longo dos anos têm evidenciado o potencial de produção dessas enzimas pelas fontes microbianas, como os fungos (SYED *et al.*, 2016; SUNDARRAM, MURTHY, 2014; CELESTINO *et al.*, 2014).

Pesquisadores como Uddin *et al.* (2013), Du *et al.* (2013), Tatsumi *et al.* (2016); e Jonathan e Adeyo (2011) realizaram estudos sobre a utilização de cogumelos como fontes de amilases. Na Tabela 1 estão relatadas pesquisas realizadas avaliando o potencial enzimático dos basidiomicetos.

TABELA 1 – EXPERIMENTOS QUE UTILIZARAM MACROMICETOS COMO FONTE DE AMILASES.

Tipo de cultivo	Macromicetos	Resultado	Tipo de amilase produzida	Comentário	Referência
CS	<i>Coprinus comatus</i> , <i>Cordyceps sinensis</i> , <i>Hericium erinaceus</i> , <i>Hohenbuehelia myxotricha</i> , <i>Lepista luscina</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , entre outros	Todas as 30 cepas apresentaram atividade de amilases (análise qualitativa).	Amilase total	<i>Coprinus Comatus</i> apresentou atividade positiva para amilase.	Krupodorova et al. (2014)
CF	<i>Lentinus edodes</i>	1,79 U de amilase.	Amilase total	Possui atividade amilásica mesmo em pó.	Tatsumi et al. (2016)
CS e CSm	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	7,2 U.frasco ⁻¹ (200 mL).	Amilase total	7 tratamentos com diferentes.	Gutiérrez-Soto et al. (2015)
CF	<i>Tricholoma saponaceum</i> , <i>Inocybe sp.</i> , <i>Laccaria lateritia</i> Malençon e outros fungos	Atividade de < 20 U·mL ⁻¹ até >30 U·mL ⁻¹ . <i>Inocybe sp.</i> apresentou a maior atividade entre as cepas estudadas, aproximadamente 40 U·mL ⁻¹ .	Amilase total	Possuem potencial para a produção de celulase, lacase, protease e tirosinase além do potencial amilolítico.	Khaund e Joshi (2014)
CF	<i>Agaricus sp</i>	17,57 U g ⁻¹ de amilase.	Amilase total	Avaliado pH, temperatura e tempo de incubação na reação enzimática.	Uddin et al. (2013)
CF	<i>Hericium erinaceum</i>	A atividade foi aumentada 378 % por Mn ²⁺ .	Amilase total	pH ótimo de 4.6 a 40°C. Mn ²⁺ e Fe ³⁺ aumentaram a atividade e Hg ²⁺ inibiu.	Du et al. (2013)
CSm	<i>Tricholoma matsutake</i>	8,3 mU·mL ⁻¹ no amido de trigo, 8,0 mU·mL ⁻¹ amido de milho, 6,2 mU·mL ⁻¹ amido solúvel, 16,01 mU·mL ⁻¹ em amilose e glicose 1,5 mU·mL ⁻¹ .	Glucamilase	25°C por 30 dias.	Wan et al. (2012)
CSm	<i>Pleurotus ostreatus</i>	A maior atividade foi 87,2 µg de glucose·g ⁻¹ dm. por h.	Amilase total	24°C por 30 dias.	Slawinska e kalbarczyk (2011)
CSm	<i>Agaricus blazei</i> , <i>Agaricus sp.</i> , <i>Coriolopsis occidentalis</i> , <i>Coriolus versicolor</i> , <i>Termitomyces clypeatus</i> , <i>Termitomyces</i>	Maior atividade de 0,6 U·mL ⁻¹ por <i>Agaricus blazei</i> .	Amilase total	Foi avaliado diferentes fontes de N, carbono, influência da temperatura e pH. 28°C por 5 dias.	Jonathan e Adeoyo (2011)

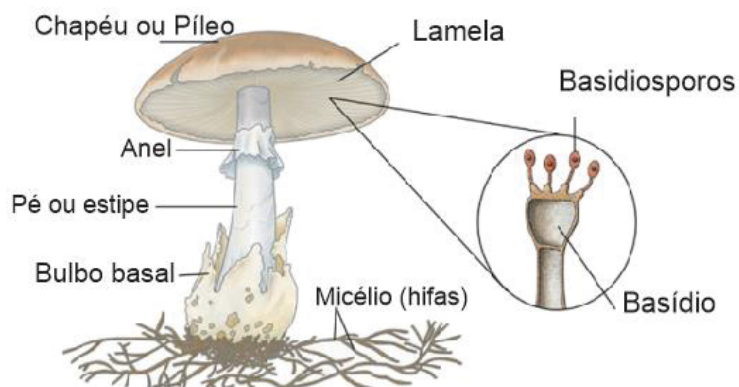
<p><i>globulus</i>, <i>Pleurotus tuber-regium</i>, <i>Podocorypha bolleana</i>, <i>Pogonomyces lthyroides</i> e <i>Nothopanus hygrophanus</i></p>									
CS	<i>Macrocybe titans</i>	13 U·g ⁻¹ de α-amilase e 19 U·g ⁻¹ de glucoamilase.	α-amilase e glucoamilase	Foi realizada a atividade enzimática a partir de 22 dias de cultivo.	Wisniewski et al. (2010)				
CS	50 Basidiomicetos do Sul da Índia	46% apresentaram atividade amilásica.	Amilase total	Análise qualitativa. 30°C por 5 dias.	Goud et al. (2009)				
CF	<i>Tricholoma matsutake</i>	Atividade máxima de 111,7 mU·mL ⁻¹ para α-amilase e 29,8 mU·mL ⁻¹ para glucoamilase.	α-amilase e glucoamilase	24°C por 80 dias.	Kusuda et al. (2008)				
CS	<i>Ganoderma lucidum</i>	267 U·g ⁻¹ em 20 dias de incubação	α-amilase	25°C no escuro.	Han et al. (2005)				
CF	<i>Lyophyllum shimeiji</i>	Maior atividade de α-amilase (62,9 U·mL ⁻¹) em 160 dias de incubação.	Amilase total, α-amilase e glucoamilase	Ativada por Ca ²⁺ e inibida por Ba ²⁺ e Ag ⁺ .	Kusuda et al. (2004)				
CSm e CS	<i>Lentinus edodes</i>	No micélio foi 5,1 mU·g ⁻¹ e do corpo de frutificação foi 26,4 mU·g ⁻¹	Glucoamilase	A glucoamilase tem grande atividade com a formação do corpo de frutificação.	Zhao et al. (2000)				
CSm e CSS	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	0,58 U·mg ⁻¹ em CSm em 72 h e 2,3 U·mg ⁻¹ em CSS em 96 h. Amilase total foi 3,35 mg maltose·mL ⁻¹ ·h ⁻¹ para <i>P. tuber-regium</i> e 4,53 mg maltose·mL ⁻¹ ·h ⁻¹ para <i>T. lobayensis</i> ; Para α-amilase foi 3,04 mg maltose/mL·h e 4,152 mg maltose·mL ⁻¹ ·h ⁻¹ , respectivamente.	α-amilase	37°C / 120 rpm / 96 h.	Siqueira et al. (1997)				
CF	<i>Pleurotus tuber-regium</i> e <i>Tricholoma lobayensis</i>		Amilase total e α-amilase	Extrato retirado do corpo de frutificação.	Kadiri et al. (1990)				
CS	<i>Absidia blakesleeana</i> , <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Peziza auburouniv</i> e <i>Polyporus sulphureus</i>	O <i>Lentinus edodes</i> teve a maior produção de 619 U·mL ⁻¹ .	N.E.	Foi realizado teste qualitativo e após teste quantitativo. 30°C/ 72 h.	El-Zalaki e Hamza (1979)				

CS = cultivo sólido; CSm = cultivo submerso; CSS = cultivo semi-sólido; CF = Corpo de Frutificação.

3.4. Macromicetos

Os macromicetos ou basidiomicetos (cogumelos) são fungos que degradam matéria orgânica como fonte de energia. Os fungos são eucarióticos, heterotróficos, pluricelulares (fungos filamentosos) que apresentam a formação de filamentos denominados hifas, que por sua vez constituem o micélio. O micélio forma estruturas que dão origem aos esporos, que propagam a espécie, na fase reprodutiva tanto assexuada como sexuada. Os basidiosporos só aparecem quando há presença do corpo de frutificação ou basidioma (FIGURA 2) (HANSON, 2008; FORZZA, 2010).

FIGURA 2 – ESTRUTURA DE UM MACROMICETO.



FONTE: PROSIEIX LTDA (2012).

A classificação mais recente dos fungos levou em consideração o genoma total. Os filos considerados na nova classificação do Reino Fungi são: o Monokaryotic composto por Chytridiomycota, Chytridiomycota e Zygomycota; o Basidiomycota formado por Pucciniomycota, Ustilaginomycotina, Wallemia e Agaricomycotina; a Ascomycota composta por Taphirinomycotina, Saccharomycotina, Pezizomycotina; e a Protozoa formado por Neocallimastigomycota e Microsporídia (CHOI; KIM, 2017). Os macromicetos estudados no presente trabalho estão classificados no filo Basidiomycota.

Os macromicetos possuem micélios septados, formando esporos (basidiosporos) na reprodução sexuada. Os basídios por sua vez formam estruturas especializadas denominadas basidiosporos. Os basídios são encontrados nos basidiomas (ou corpos de frutificação), podem alcançar

tamanhos diversos e são responsáveis pela produção de basidiosporos (FORZZA, 2010).

A produção de macromicetos comestíveis vem se expandindo de forma significativa no Brasil em consequência do seu alto valor nutricional como fonte proteica e de carboidratos. Estes possuem uma pequena porcentagem lipídica, além da grande maioria possuir propriedades medicinais, como efeito antioxidante, imunomodulatório e protetor (MINOTTO *et al.*, 2014). No mundo todo estima-se que existam por volta de 1.800 espécies. (SPIER *et al.*, 2015). Os cogumelos são uma alternativa viável para suprir as necessidades nutricionais das populações (ROMERO-ARENAS *et al.*, 2015).

Resíduos como palha de milho, polpa de café, talos de algodão, cascas de arroz, serragem de madeira, entre outros subprodutos da agroindústria podem ser usados como substrato para o cultivo de cogumelos comestíveis. Isto não apenas aumenta o interesse neste tipo de produção como também acarreta um grande benefício ambiental (ABDULLAN; IQBAL-ZAFAR, 1999; PHILIPPOUSSIS; DIAMANTOPOULOU, 2011). Os resíduos agroindustriais também podem ser utilizados para produção enzimática pelos macromicetos (TONINI *et al.*, 2007). Dentre as enzimas produzidas encontram-se as amilases, as quais até o momento foram pouco exploradas.

3.4.1. *Coprinus comatus*

O *Coprinus comatus* é um macromiceto comestível (FALANDYSZ, 2016) que vem sendo estudado quanto ao seu poder de redução nos níveis de glicemia (ZHOU *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2008; HAN *et al.*, 2006; HAN *et al.*, 2006; BAILEY *et al.*, 1984), seu poder antitumoral (ROUHANA-TOUBI *et al.*, 2015; ZAIDMAN *et al.* 2008), de recuperar o fígado de danos alcóolicos (OZALP *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2009), de produção de antioxidantes (TEŠANOVIĆ *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2009) e de descontaminação de solos poluídos (TANG *et al.*, 2018), entre muitos outros estudos e aplicações.

Apesar dos inúmeros estudos realizados sobre o *Coprinus comatus* (Figura 3), atualmente apenas a pesquisa realizada por Krupodorova *et al.* (2014) avaliou o potencial desta cepa (de forma qualitativa) para a produção de amilases de forma industrial. Isto demonstra o potencial que este macromiceto possui para ser explorado como uma nova fonte enzimática, não só por sua

capacidade de produzir amilases, mas por produzir biomoléculas importantes para a saúde, ser comestível, não produzir toxinas e poder ser aplicado em diferentes áreas.

FIGURA 3 – *COPRINUS COMATUS* COM A FORMAÇÃO DO CORPO DE FRUTIFICAÇÃO.



FONTE: MICHAEL KUO, 2014.

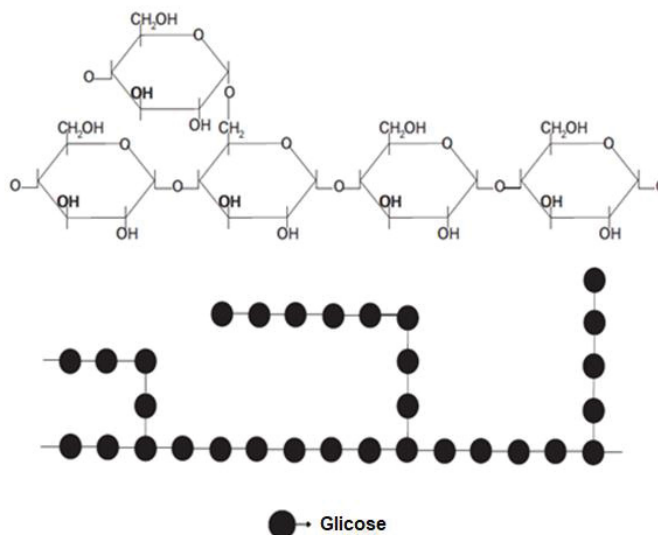
3.5. Substratos para a produção de amilases

O amido é um homopolissacarídeo composto de amilopectina e amilose encontrado em maior proporção em tubérculos e grãos. As proporções em que amilose e amilopectina estão presentes na composição do amido variam consideravelmente em relação a espécie, idade, tempo de maturação e forma de cultivo do vegetal. Estes fatores conferem características diferenciadas no amido, alterando suas funcionalidades e propriedades físico-químicas (TEIXEIRA *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2003).

A amilose e amilopectina são polímeros unicamente formados por D-glicose ligados por ligações (α -1,4). A amilopectina (Figura 4), também possui ramificações unidas entre si por uma ligação (α -1,6). Possui uma massa molecular entre 10^7 Da (DP~60.000) a 5×10^8 Da (DP~3.000.000). Este polissacarídeo está presente de 70 a 85% nos grânulos de amido, possuindo uma extremidade redutora e uma não redutora. A amilose (Figura 5) é um polissacarídeo formado de cadeias helicoidais lineares de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas α -1,4. Este polissacarídeo está presente em

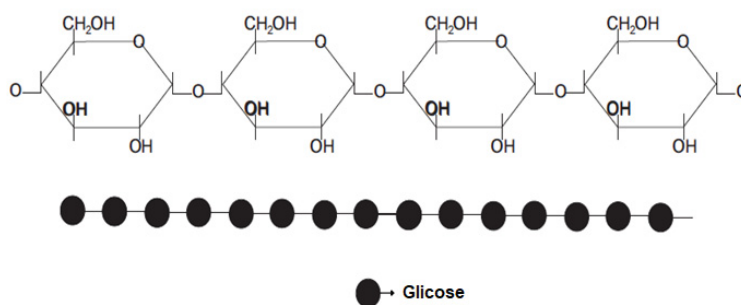
proporções de 15 a 30% no amido. A amilose apresenta a cada 180 a 320 moléculas de glicose, ou seja, aproximadamente 0,5% das ligações, um ponto de ramificação que torna está menos suscetível a certos tipos de enzimas (LEHNINGER, 2002; CONN e STUMPF, 1980; CEREDA et al., 2002; ELIASSON, 2004; DAMODARAN *et al*, 2010).

FIGURA 4– ESTRUTURA MOLECULAR E ESQUEMÁTICA DA AMILOPECTINA.



Fonte: ADAPTADO DE RIBEIRO E SERAVALLI (2007).

FIGURA 5 – ESTRUTURA MOLECULAR E ESQUEMÁTICA DA AMILOSE.



FONTE: ADAPTADO DE RIBEIRO E SERAVALLI (2007).

3.6. Processos de produção de amilases

Na produção enzimática de micro e macro organismos existem principalmente três tipos de processos. O cultivo sólido (CS) conhecido como fermentação no estado sólido (FES), cultivo semi-sólido (CSS) e o cultivo submerso (CSm) conhecida como fermentação submersa (SUNDARRAM, MURTHY, 2014). Quando se trata do uso de microrganismos (fungos) substitui-se o termo fermentação por cultivo.

O cultivo sólido (CS) é definido como aquele com inexpressiva presença de água livre (PANDEY, 2003; KRISHNA, 2005). A água livre define-se como a aquela que está restrita nas membranas e que não apresenta fluxo (PASTERNAK *et al.*, 2009).

O cultivo submerso (CSm) utiliza substratos líquidos como meio nutritivo. O CSm possibilita com maior facilidade, se comparado ao CS, o controle da temperatura, pH, aeração além dos outros parâmetros do processo (SUNDARRAM, MURTHY, 2014). Segundo Tešanović *et al.* (2017), este tipo de cultivo é promissor para a produção de compostos antioxidantes em comparação a outros.

3.6.1. Parâmetros de cultivo

Fatores como nutrientes (macronutrientes e micronutrientes), temperatura, pH e agitação são fatores que podem influenciar a taxa de crescimento dos microrganismos, o rendimento em biomassa e a produção de metabólitos (SALES-CAMPOS *et al.*, 2011). É imprescindível a otimização dos parâmetros de forma prévia e a manutenção durante o período de cultivo (SINGH *et al.*, 2015). Na tabela 2 são apresentados alguns parâmetros para o cultivo de microrganismos.

TABELA 2 - PARÂMETROS GERAIS PARA O CULTIVO DE MICRORGANISMOS

Parâmetro	Valor ótimo
Temperatura (°C)	28
pH	6
Agitação (rpm)	120

¹ Porcentagem em massa/volume

rpm: rotações por minuto

FONTE: Slawinska e Kalbarczyk (2011); Siqueira *et al.* (1997); Du *et al.* (2013); Jonathan e Adeoyo, 2011;

3.7. Componentes nutritivos para produção de amilases

3.7.1. Fontes de carbono

O carbono está diretamente ligado ao crescimento e produção enzimática microbiana. Os microrganismos podem utilizar diversas fontes de amido como: grãos de cevada (KUSUDA *et al.*, 2004), amido de milho, trigo, batata, batata doce, arroz (WAN *et al.*, 2012), suco de batata (UDDIN *et al.*, 2013), farelo de soja (SALES-CAMPOS *et al.*, 2011), entre outros. O amido é

uma fonte viável para grandes produções industriais devido ao seu baixo custo, segundo Kumar *et al.* (2012) e Sales-Campos *et al.* (2011).

Alguns autores empregaram cultivo submerso para a produção de amilases por macromicetos utilizando amido (TATSUMI *et al.*, 2016; GUITIÉRREZ-SOTO *et al.*, 2015; KHAUND; JOSHI, 2014; UDDIN *et al.*, 2013; DU *et al.*, 2013; WAN *et al.*, 2012; SLAWINSKA; KALBARCZYK, 2011; JONATHAN; ADEOYO, 2011), devido a suas vantagens frente a outros tipos de cultivo e extração enzimática.

3.7.2. Fontes de nitrogênio

O nitrogênio pode ser proveniente de fontes orgânicas e inorgânicas. Fontes como cloreto de amônio apresentam baixa eficiência para estimular a produção enzimática, enquanto nitrato de amônio e nitrato de sódio aumentam o rendimento enzimático (SUNDARRAM; MURTHY, 2014). As fontes mais utilizadas para suplementação do meio são os sais de amônia, nitratos e ureia (MILES; CHANG, 1997).

Em estudo realizado por Jonathan e Adeoyo (2011) a suplementação do meio com ureia proporcionou um incremento na produção amilase para *Pleurotus tuher-regium* (0.43 U mL^{-1}), *Agaricus sp.* (0.37 U mL^{-1}), *Corilopsis occidentalis* (0.30 U mL^{-1}) e *Agaricus blazei* (0.30 U mL^{-1}). Outro estudo indicou que a fonte de nitrogênio orgânica peptona no meio resultou no aumento de produção de amilase de *Podoscypha bolleana*. A peptona também estimulou a produção de biomassa micelial por *Pleurotus florida* em um estudo relatado por Gbolagade *et al.* (2006).

A produção de glucoamilase pelo fungo filamentoso *Scytalidium thermophilum* aumentou de 87% a 96% com a adição de compostos como acetato de amônio, sulfato de amônio e o nitrato de amônio e a atividade específica desta enzima aumentou em cinco vezes com o acetato de amônio (CEREIA *et al.*, 2000).

3.7.3. Íons Metálicos

Os íons podem estar envolvidos nos processos catalíticos participando das reações de redox ou de transferência de elétrons além de participar do processo durante a reação enzimática (NAIZMI *et al.*, 2006). Estes também estão

envolvidos evitando reações secundárias que possam ocorrer de forma indesejada, estabilizando a conformação 3D e a conformação catalítica de forma ativa (PALMER, 2001). Nove minerais são considerados de suma importância na produção enzimática, dentre eles estão os macronutrientes Mg, K, S e P e os micronutrientes Mn, Fe, Cu, Mo e Zn isso em concentrações variadas conforme o organismo (FLEGG *et al.*, 1985). Grande parte das enzimas são denominadas metaloenzimas, pois exibem uma atividade enzimática maior quando na presença de íons metálicos (VYAS; SHARMA, 2015). A amilase é uma metaloenzima que necessita de pelo menos um íon Ca^{2+} , por isso os macros e micronutrientes bem como Na^{2+} , Cl e SO_4 não influenciam a produção de amilases como a α -amilase tanto quanto o Ca^{2+} e Mg, mas tem um papel importante no crescimento do micélio (GUPTA, 2003; SARANRAJ; STELLA, 2013).

Para que haja sucesso no crescimento da biomassa dos macromicetos e na produção de enzimas é necessário a realização de testes preliminares para entender sua fisiologia e suas necessidades nutricionais (SALES-CAMPOS *et al.*, 2011).

3.7.4. Temperatura

Para que haja melhor desempenho dos macromicetos é necessário um controle rigoroso de temperatura nas etapas de crescimento e produção enzimática. As temperaturas variam conforme a cepa, bem como a enzima tem características distintas levando em consideração a fonte (SUNDARRAM; MURTHY, 2014). A temperatura de crescimento das cepas varia de 24 °C (SLAWINSKA; KALBARCZYK, 2011; KUSUDA *et al.*, 2008) a 30 °C (GOUD *et al.*, 2009).

A temperatura de reação enzimática varia conforme a cepa, como pode ser observado na Tabela 3. A cepa *Agaricus blazei* apresentou sua máxima atividade de amilase ($0,60 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) em 25 °C e *Podoscyha bolleana* ($0,24 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) em 30 °C (JONATHAN; ADEOYO, 2011). *Thicholoma matsuke* apresentou maior atividade enzimática em 50 °C (HUR *et al.*, 2001) na reação enzimática. Outro estudo realizado com *Thicholoma matsuke* resultou como a temperatura ótima de reação é 60 °C (KUSUDA *et al.*, 2006).

TABELA 3 – TEMPERATURA IDEAL PARA A REAÇÃO ENZIMÁTICA DE DIFERENTES CEPAS DE MACROMICETOS.

Cepa	Temperatura de cultivo (°C)	Enzima	Temperatura de reação (°C)	Referência
<i>Lyophyllum shimeji</i>	24	Glucoamilase	37	Kusuda et al., 2006;
<i>Agaricus sp.</i>	28	Amilase	75	Uddin et al., 2013;
<i>Tricholoma matsutake</i>	25	Glucoamilase	37	Wan et al., 2012;
<i>Agaricus blazei</i> , <i>Pleurotus tuber-regium</i> , <i>Agaricus sp.</i> , entre outras	28	Amilase	25 - 30	Jonathan e Adeoyo, 2011;
<i>Pleurotus ostreatus</i>	24	Amilase	50	Slawinska e Kalbarczyk, 2011;

3.7.5. pH

O pH é um dos parâmetros limitantes no crescimento dos macromicetos, assim como indicador do início e do fim da síntese enzimática (GUPTA, 2003). O pH ideal é um fator importante pois reflete na estabilidade da enzima sintetizada, por isso, é necessário o controle deste durante o processo de produção e de ação da enzima, tendo em vista que enzimas são sensíveis a mudança de pH (SUNDARRAM, MURTY, 2014).

O pH ideal para produção de α -amilases por fungos é pH 7,0, enquanto que para a produção de glucoamilase o pH ótimo é de 5,0 (SHUKLA, SINGH, 2016; SYED *et al.*, 2016; BAGHERI *et al.*, 2014).

3.7.6. Agitação

A agitação é imprescindível para o crescimento de organismos aeróbios pois influencia na taxa de oxigenação e na mistura dos nutrientes (GUPTA *et al.*, 2003). Segundo Siqueira *et al* (1997) a agitação de 120 rpm foi ideal para a produção de amilases por *Pycnoporus sanguineus*, enquanto que para Kim *et al.* (2003) para produção de biomassa de *Paecilomyces sinclarii* teve-se em melhores condições com agitação a 250 rpm com um fluxo constante de 5 vvm proporcionando dissolução do oxigênio acima de 30%.

3.8. Otimização de bioprocessos para amilases

A otimização juntamente com a modelagem de processos são de suma importância, pois são ferramentas de implantação de performance de sistemas que maximizam o rendimento sem haver aumento nos custos (BAS; BOYACI, 2007). O melhor planejamento experimental é escolhido levando em consideração o número de variáveis independentes a serem estudadas; isso é feito após uma seleção prévia das variáveis, seguida da otimização destas utilizando a superfície de resposta (RODRIGUES; LEMMA, 2014; COCKSHOTT; SULLIVAN, 2001).

A superfície de resposta possibilita avaliar os efeitos de uma série de variáveis sobre uma determinada resposta ao mesmo tempo, além da observação de possíveis interações (efeito sinérgico ou antagônico) entre as mesmas (COLLA, 2008). Com esta ferramenta é possível avaliar um fator por vez, mantendo-se as outras variáveis fixas ou variando-se todos os fatores conjuntamente (RODRIGUES; LEMMA, 2014).

A presença de duas ou três variáveis independentes (fatores) torna necessário aplicar o delineamento fatorial completo e posteriormente o delineamento composto central rotacional (DCCR), também chamado de metodologia de superfície de resposta. Para quatro ou mais variáveis, empregam-se planejamentos fracionários ou planejamentos tipo Plackett-Burman (PB) com o objetivo de avaliar o efeito das variáveis estudadas sobre as respostas (COLLA, 2008).

3.9. Patentes relacionadas a produção de amilases por microrganismos

Em consulta à base de patentes *Espacenet Patent Search*, que possui em seu acervo documentos de mais de 90 países, incluindo o Brasil, inserindo o termo “basidiomycetes” foram gerados 965 resultados. Ao se filtrar a pesquisa com os termos “basidiomycetes; enzymes” os resultados foram reduzidos a 33, porém apenas uma patente foi encontrada nas 2 bases de pesquisa de patentes *Espacenet* e INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Brasil) de amilases produzidas por microrganismos. A pesquisa realizada no *Google Patents* resultou em cinco patentes (Tabela 4), duas das quais também encontradas na *Espacenet* e INPI, que se assemelham com a enzima estudada por

macromicetos, porém o método de obtenção dessas enzimas sofre mudanças nas duas primeiras patentes pelo meio de cultivo e falta de explicação em relação a quantificação da atividade enzimática. A terceira patente difere por usar extração forçada com solvente. A quarta refere-se a enzimas para a produção de xarope. A quinta patente é sobre a produção de amilases por um macromiceto, mas em cultivo sólido, não submerso como o presente estudo.

TABELA 4 - PATENTES RELACIONADAS A PRODUÇÃO DE AMILASES POR MACROMICETOS

Nº. da patente	Título da patente	Enzima	Macromiceto	Observações	País
CS8803839	Amilase fúngica.	α -amilase	<i>Pleurotus sp.</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Filammulina velutipes</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> e <i>Lentinus edode</i>	Produzir amilase sacarogénica derivada de um meio de cogumelo.	China
US4605619	Processo para a preparação de frutose a partir de amido.	α -amilase e glucoamilase	<i>Stereum striatum</i> , <i>Perenniporia compacta</i> , <i>Sebacina colcea</i> e <i>Irpepex mollis</i>	Processo de sacarificação pelas enzimas dos cogumelos utilizando meio de xarope de milho, sulfato de manganês, sulfato de potássio e xilose.	EUA
EP0097973A2	Processo para a preparação de frutose.	α -amilase e glucoamilase	<i>Irpepex mollis</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Perenniporia compacta</i> , <i>Ramaricium albofanesens</i> , <i>Sebacina calcea</i> , <i>Coriolus versicolor</i> , <i>Panellus stipticus</i> , <i>Mucronella aggregata</i> , <i>Filammulina velutipes</i> e <i>Phellinus torulosus</i>	Xarope de milho, sulfato de manganês, sulfato de potássio e xilose.	Europa
KR20130134351	Método para a produção de amilases sacarogénicas a partir de substratos de cogumelos.	α -amilase	<i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Filammulina velutipes</i> e <i>Lentinus edode</i>	Extração da enzima com solvente.	Coreia
WO2016MY0005 6 20160826	<i>Pycnoporus sanguineus</i> (ganobf2) para produção de enzimas lignocelulolíticas usando resíduos agroindustriais.	Amilases	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Produção de amilases e enzimas lignocelulolíticas através do cultivo sólido utilizando resíduos agroindustriais.	Malásia

As patentes existentes são poucas e não englobam todas as vertentes possíveis quanto a produção e fontes de macromicetos, o que possibilita uma vasta gama de campos a serem explorados. A falta de patentes e a capacidade mostrada pelas poucas pesquisas realizadas sobre o potencial dos macromicetos em produzir amilases mostra que este é um campo promissor a ser explorado.

A grande maioria das empresas produtoras de enzimas atualmente utiliza como fontes bactérias ou fungos para a produção de amilases conforme pode ser verificado na tabela 5.

TABELA 5 – EMPRESAS MUNDIAIS E MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE AMILASES

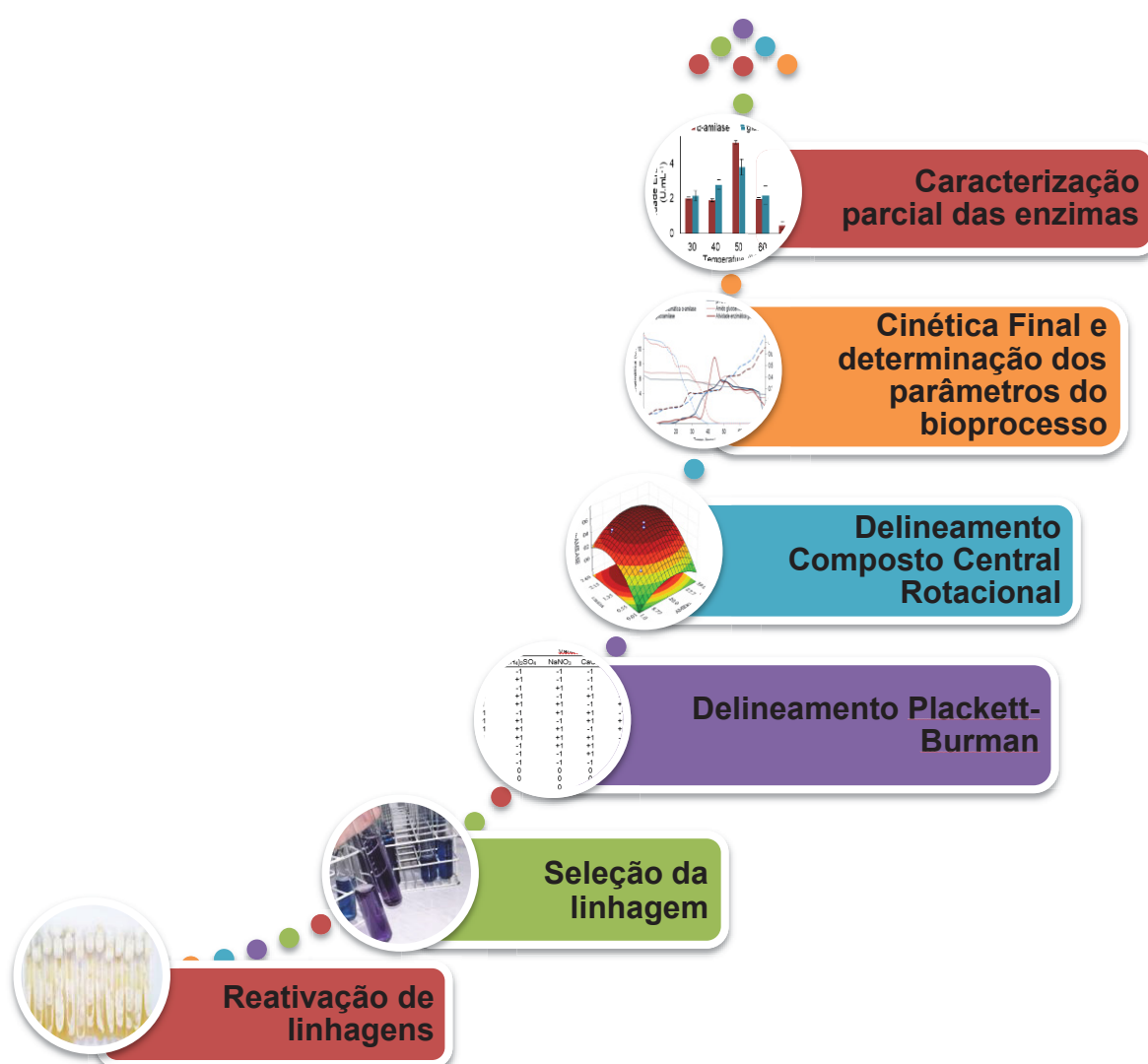
Nome Comercial	Tipo de amilase	Microrganismo produtor	Fabricante	País
Termamyl® 2X	α -amilase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novozyme	Dinamarca
A7095 SIGMA	Glucoamilase	<i>Aspergillus niger</i>	Sigma-Aldrich	EUA
Fuelzyme®	α -amilase termoestável	<i>Thermococcus</i> sp.	BASF	Alemanha
SPEZYME® RSL	α -amilase	<i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Trichoderma reesei</i> .	Dupont™	EUA

Amilases como Termamyl® 2X (Novozyme), Fuelzyme® (BASF) e SPEZYME® RSL (Dupont™) são comercializadas atualmente no intuito de suprir esse mercado crescente. No entanto, ainda não existem amilases industriais advindas de macromicetos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos (Figura 6) foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica e Biotecnologia (LENGBIO), no Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) e no Laboratório de Catálise e Processos Químicos (LCPQ) do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná.

FIGURA 6 - PRINCIPAIS ETAPAS REALIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE AMILASES.



4.1. Macromicetos

Algumas cepas de macromicetos foram utilizadas para avaliar o potencial de produção de amilases. Onze (11) cepas foram disponibilizadas pelo

Laboratório de Bioprocessos de Cogumelos (LBC) da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO, PR) e uma (01) cepa de *Agaricus bisporus* (Nippon, Curitiba, Paraná) adquirida no comércio local (Curitiba, PR), isolada e mantida no banco de cepas do LENGEBIO. A Tabela 6 mostra as espécies de macromicetos que foram utilizadas no presente projeto de pesquisa.

TABELA 6 – CEPAS ESTUDADAS.

Cepas	Origem
<i>Agaricus bisporus</i> (Abis)	LENGBIO - UFPR, PR
<i>Pleurotus ostreatus (europea)</i> (Po-eu)	LBC – UNICENTRO, PR
<i>Pleurotus ostreatus (lab)</i> (Po)	LBC – UNICENTRO, PR
<i>Pleurotus sajor-caju</i> (Psc)	LBC – UNICENTRO, PR
<i>Grifola frondosa</i> (Gf)	LBC – UNICENTRO, PR
<i>Lentinus edodes</i> (Le)	LBC – UNICENTRO, PR
<i>Hericium americanum</i> (Ha)	LBC – UNICENTRO, PR
<i>Ganoderma lucidum</i> (Gl)	LBC – UNICENTRO, PR
<i>Pholiota nameko</i> (Pn)	LBC – UNICENTRO, PR
<i>Agaricus blazei</i> (Ab)	LBC – UNICENTRO, PR
<i>Coprinus comatus</i> (Cc)	LBC – UNICENTRO, PR
<i>Pleurotus ostreatus (Pato Branco)</i> (Po-pb)	LBC – UNICENTRO, PR

Todas as cepas foram reativadas em meio Agar batata dextrose (PDA), previamente autoclavados (121°C/15 minutos) e resfriados em tubos de ensaio inclinados. Um fragmento de micélio foi transferido com auxílio de uma alça de platina estéril para a superfície do meio PDA. Os tubos foram incubados a 28 °C por 5 - 7 dias (ou até completo crescimento do micélio na superfície do meio). Os tubos de ensaio, com tampão de algodão, foram cobertos com película flexível (2520 Parafilm “M” American, USA) e armazenados a 4°C por 3 meses.

4.2. Isolamento de cepa

O isolamento da linhagem *Agaricus bisporus* foi realizado com base no método descrito por Stutz e Alvarez (2017) que consiste na transferência de um fragmento do corpo de frutificação para uma placa de Petri contendo meio PDA. Todos os materiais e o fluxo laminar foram esterilizados antes da manipulação do basidioma.

Amostras do corpo de frutificação obtido no mercado municipal foi esterilizado através de imersão em álcool 70% v/v por um minuto, seguido de

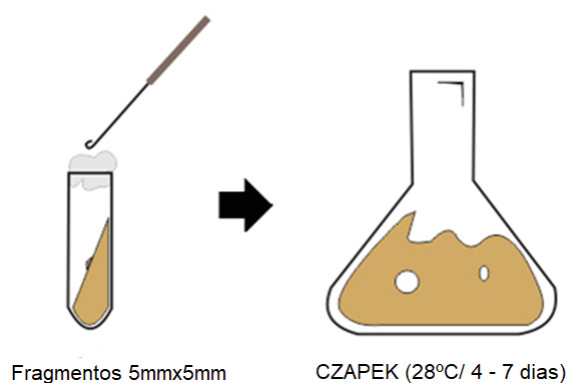
repouso por 1 minuto para a assepsia superficial. Esta etapa foi repetida por três vezes. Em seguida as amostras do macromiceto foram mantidas no fluxo laminar durante 15 minutos com a luz UV (germicida) acesa. Depois as amostras foram manipuladas com rapidez próximo ao bico de Bunsen, onde foi cortado ao meio com auxílio de bisturi e pinça estéril. Um fragmento interno do píleo foi transferido para uma placa de Petri contendo meio PDA (Potato Dextrose Agar) previamente esterilizado e solidificado. A placa foi incubada em estufa a 28°C por 7 dias para crescimento micelial.

4.3. Reativação das cepas para preparo de pré-inóculo

As cepas foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio CZAPEK (g.L⁻¹: 30 de sacarose, 2 de nitrato de sódio, 1 de fosfato dipotássio, 0,5 de sulfato de magnésio, 0,5 de cloreto de potássio, 0,01 de sulfato ferroso), (CZAPEK, 1902) com o pH ajustado a 6,0 em pHmetro (Modelo PHS-3B, Phtek) e esterilizado (121 °C/15 min) em autoclave.

Fragmentos (5 mm x 5 mm) de micélio foram transferidos para os frascos Erlenmeyer (Figura 7). Após homogeneização os frascos foram incubados a 28°C por 4 - 7 dias (dependendo da cepa).

FIGURA 7 - PREPARO E INCUBAÇÃO DO MEIO CZAPEK PARA A OBTENÇÃO DO PRÉ-INÓCULO.

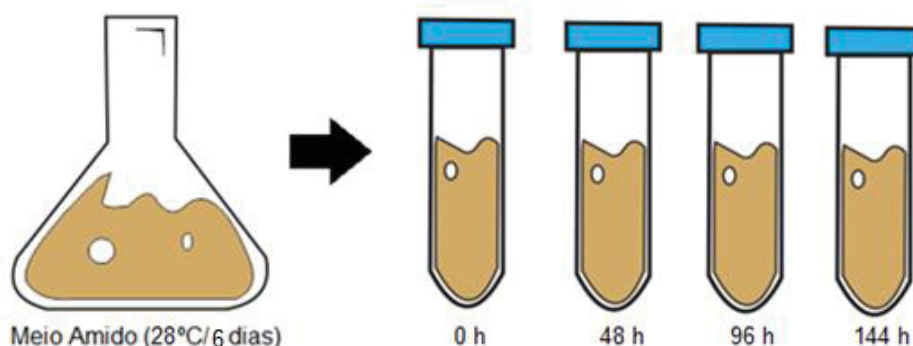


4.4. Seleção das cepas produtoras de enzimas amilolíticas

Uma alíquota de 10 mL do pré-inóculo (10 % v.v⁻¹), previamente homogeneizada foi transferida para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de meio amido. O meio de cultivo utilizado foi composto por g.L⁻¹: 10 de amido solúvel P.A., 2 de fosfato de potássio monobásico, 1,4 de sulfato de amônio, 0,3 de cloreto de cálcio, 0,3 de sulfato de magnésio e 0,3 de ureia, com o pH ajustado

para 6.0 em pHmetro, autoclavado (121 °C/15 min) e resfriado até a temperatura ambiente. Os frascos foram incubados a 28 °C por 6 dias (144 h) a uma agitação de 120 rpm. Amostras de 2,5 mL foram retiradas nos tempos 0, 48, 96 e 144 horas e transferidas para tubos de centrifuga de 15 mL de capacidade (previamente autoclavados) (Figura 8). Estas amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos (adaptado de Hassan e Karim, 2015). O sobrenadante (denominado de EBE – Extrato Bruto Enzimático) foi utilizado para a determinação de atividade enzimática. Os experimentos foram feitos em triplicatas.

FIGURA 8 – COLETA DAS AMOSTRAS DO CULTIVO SUBMERSO (CSm) PARA A DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA.



4.4.1. Determinação da atividade de α -amilase

A determinação da atividade de α -amilase (Tabela 7) levou em consideração a redução do complexo amido-iodo, utilizando uma adaptação do método proposto por Fuwa (1954) (redução de volumes dos reagentes). Xiao et al. (2006), comprovaram a eficiência deste método frente ao método de DNS para a determinação de α -amilase. Uma alíquota de 200 μ L de solução de amido a 1% (preparada em tampão acetato, pH 6,0) e 100 μ L de extrato bruto enzimático (EBE), diluído em 100 μ L de tampão acetato com o mesmo pH, foram adicionados em tubos de ensaio e incubados em banho-maria a 37 ± 2 °C durante 30 min. Para interromper a reação, adicionou-se uma solução de ácido acético 2M (400 μ L) e 400 μ L de solução de iodo/iodeto (iodo a 0,2% p.v⁻¹, iodeto de potássio a 2% p.v⁻¹ e água destilada, 1:1:3). Na sequência, foi diluída em 20 mL de água destilada, homogeneizada e a absorbância lida a 700 nm em um espectrofotômetro (modelo UV-6100PC DOUBLE BEAM, Shanghai, CHN). O

branco enzimático foi realizado da mesma forma que a amostra de teste, porém o EBE foi adicionado após a adição de ácido acético (2M).

TABELA 7 – ETAPAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE α -AMILASE.

Branco Enzimático	Ensaio	Branco para zerar o espectrofotômetro
200 μ L de sol. amido 1%	200 μ L de sol. amido 1%	200 μ L de sol. amido 1%
50°C por 30 minutos	100 μ L de EBE	100 μ L de tampão
400 μ L de ácido acético	100 μ L de tampão	50°C por 30 minutos
100 μ L de EEB	50°C por 30 minutos	400 μ L de ácido acético
100 μ L de tampão	400 μ L de ácido acético	100 μ L de tampão
400 μ L de solução iodo/iodeto	400 μ L de solução iodo/iodeto	400 μ L de solução iodo/iodeto
20 mL de água	20 mL de água	20 mL de água
Homogeneização	Homogeneização	Homogeneização
Ler a 700nm	Ler a 700nm	Ler a 700nm

A atividade da α -amilase foi expressa em Unidades Internacionais (U). Um (01) U representa a quantidade de enzima capaz de converter 0,1 mg de amido por mL por minuto na reação sob as condições de teste (37 ± 2 °C /30 min).

Uma curva padrão (ANEXO 1) foi preparada utilizando soluções de amido solúvel P.A. em diferentes concentrações ($0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ até $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para converter valores de absorbância obtidos em mg de amido por mL.

4.4.2. Determinação da atividade de glucoamilase

A quantificação da atividade de glucoamilase foi conduzida por meio da quantificação de açúcares redutores (AR) liberados após a reação enzimática. O método colorimétrico de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) descrito por Bernfeld (1955), modificado (tempo de reação) por Miller (1959) foi empregado. Um volume de 250 μ L de solução de amido ($1\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$ preparado tampão acetato pH=6,0), 125 μ L do EBE diluído e 125 μ L de tampão acetato em mesmo pH compuseram o meio reacional. Este foi incubado em banho-maria à 37 ± 2 °C por 30 minutos. Uma alíquota de 500 μ L da solução de DNS (descrição do preparo deste reagente segue no ANEXO 3) foi adicionado para interromper a reação enzimática, seguido de fervura por 5 min e resfriamento em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 4 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada e a absorbância lida a 540 nm em espectrofotômetro (Modelo UV-6100PC DOUBLE BEAM, Shanghai, CHN). O branco enzimático foi realizado como a amostra de teste, diferindo apenas na adição de EEB que ocorreu após a adição de DNS para interromper a reação enzimática.

A quantificação de açúcar redutor (Tabela 8) foi determinada através da curva padrão de glicose (ANEXO 2). Uma unidade internacional (U) de atividade de glucoamilase é considerada a quantidade de enzima que libera 1 μmol de glicose $\text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

TABELA 8 – ETAPAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE GLUCOAMILASE.

Branco Enzimático	Ensaio	Branco para zerar o espectrofotômetro
250 μL de amido 1%	250 μL de amido 1%	250 μL de amido 1%
125 μL de tampão	125 μL de tampão	250 μL de tampão
37°C por 30 minutos	125 μL de EEB	37°C por 30 minutos
500 μL de DNS	37°C por 30 minutos	500 μL de DNS
125 μL de EEB	500 μL de DNS	5 minutos em ebulição
5 minutos em ebulição	5 minutos em ebulição	4 mL de água destilada
4 mL de água destilada	4 mL de água destilada	Homogeneização
Homogeneização	Homogeneização	Ler a 540 nm
Ler a 540 nm	Ler a 540 nm	-

4.5. Estratégia experimental e otimização de alguns parâmetros químicos para a bioprodução de amilases por CSm utilizando a cepa selecionada

A cepa com maior atividade enzimática no *screening* foi selecionada para avaliação da influência de diferentes minerais e nutrientes na produção de amilases por Plackett-Burman Screening Design (PB).

As variáveis independentes utilizadas para a composição do cultivo submerso foram: concentração de amido (fonte de carbono), fósforo (KH_2PO_4), diferentes fontes de nitrogênio (ureia, NaNO_3 ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e íons metálicos ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, MnSO_4 , MgSO_4 e CaCl_2) foram avaliados pelo Plackett-Burman Screening Design (PB) 11/12 (Tabela 9). Este modelo é usado para avaliar e visualizar os fatores mais significativos na produção enzimática, mas não descreve as interações entre os fatores (PLACKETT; BURMAN, 1946). Os valores codificados e decodificados são apresentados na Tabela 10.

Os valores de amido para o delineamento tipo Plackett-Burman foi determinado utilizando uma faixa de 10 a 40 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. O valor mínimo foi utilizado com base no meio da seleção das cepas e o valor máximo foi definido conforme a viscosidade no meio mantendo-o fluido para que fosse permitida a transferência de oxigênio durante o cultivo submerso aeróbio.

O KH_2PO_4 foi avaliado de 2 a 4 g.L^{-1} pois a deficiência deste nutriente pode suprimir o crescimento e desenvolvimento de micro-organismos (KALAKOVSKAYA, 2015).

As fontes de nitrogênio e os íons foram avaliadas quanto à presença e ausência. Isto teve como objetivo analisar a influência de cada componente separadamente em relação à cepa e as enzimas. Os níveis máximos basearam-se no meio Czapek (1902), no meio utilizado na seleção de cepas, conforme reportado por Sethi e Gupta (2015) e Abd-Elhalem *et al.* (2015).

TABELA 9 – ENSAIOS REALIZADOS PARA A SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS COM EFEITO SIGNIFICATIVO ($P < 0.05$) NO PLACKETT-BURMAN SCREENING DESIGN PARA *COPRINUS COMATUS* EM CULTIVO SUBMERSO. J* E K* SÃO VARIÁVEIS DUMMY; 13*, 14* E 15* PONTOS CENTRAIS;

Ensaio	Variáveis										
	Amido	KH_2PO_4	Ureia	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NaNO_3	CaCl_2	MgSO_4	MnSO_4	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	J*	K*
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABELA 10 – OS NÍVEIS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES EMPREGADAS NO PLACKETT-BURMAN SCREENING DESIGN PARA A CEPA *COPRINUS COMATUS* EM CULTIVO SUBMERSO.

Variáveis Independentes (g.L^{-1})	Níveis codificados e decodificados		
	-1	0	+1
Amido	10,00	25,00	40,00
KH_2PO_4	2,000	3,000	4,000
Ureia	0,000	0,290	0,580
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,000	0,660	1,320
NaNO_3	0,000	0,420	0,850
CaCl_2	0,000	0,150	0,300
MgSO_4	0,000	0,150	0,300
MnSO_4	0,000	0,080	0,160
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0,000	0,005	0,010

As variáveis significativas ($p \leq 0,05$) do teste de PB foram avaliadas (com nova faixa de estudo) em um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (Tabela 11) com três repetições no ponto central e seis pontos axiais (2^3 com 16 corridas). Os valores reais e codificados são apresentados na Tabela 12.

Os valores de amido para o experimento de DCCR (1 a 40 g·L⁻¹) apresentam também os níveis axiais -1,68 e +1,68. O valor máximo estipulado foi mantido próximo a 40 g·L⁻¹, pois valores maiores de amido são de difícil dissolução e aumentam a viscosidade no meio, dificultando a transferência de calor e massa durante o cultivo.

Para a ureia e ferro, os valores para o DCCR foram definidos como valor mínimo um valor praticamente nulo, o valor médio para o ferro foi (0,01 g·L⁻¹) (valor máximo utilizado no estudo anterior - Plackett-Burman) e a concentração média utilizado da ureia teve como base a relação C:N dos pontos centrais.

A concentração de KH₂PO₄ foi mantida no valor médio (3 g·L⁻¹), pois é essencial para a formação estrutural celular. No entanto como este fator não apresentou significância na produção das enzimas ele não foi utilizado para o DCCR.

TABELA 11- SELEÇÃO DE VARIÁVEIS SIGNIFICATIVAS POR DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA AS AMILASES PELO *COPRINUS COMATUS* EM CULTIVO SUBMERSO. 15*, 16* E 17* PONTOS CENTRAIS.

Ensaio	Variáveis		
	Amido	Ureia	Fe ²⁺
1	-1,00	-1,00	-1,00
2	-1,00	-1,00	1,00
3	-1,00	1,00	-1,00
4	-1,00	1,00	1,00
5	1,00	-1,00	-1,00
6	1,00	-1,00	1,00
7	1,00	1,00	-1,00
8	1,00	1,00	1,00
9	-1,68	0,00	0,00
10	1,68	0,00	0,00
11	0,00	-1,68	0,00
12	0,00	1,68	0,00
13	0,00	0,00	-1,68
14	0,00	0,00	1,68
15*	0,00	0,00	0,00
16*	0,00	0,00	0,00
17*	0,00	0,00	0,00

TABELA 12 – OS NÍVEIS PARA AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES UTILIZADAS NO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL PARA *COPRINUS COMATUS* EM CULTIVO SUBMERSO.

Variáveis Independentes (g·L ⁻¹)	Níveis codificados e descodificados				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Amido	1,000	8,770	20,000	27,700	39,000
Ureia	0,010	0,550	1,350	2,150	2,690
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,001	0,005	0,010	0,014	0,019

A composição do substrato utilizado para o crescimento de fungos, bem como a concentração de nitrogênio influenciam a síntese de enzimas (Stajić *et al.*, 2006). Um dos fatores mais importantes é a relação carbono/nitrogênio (C/N) para equilibrar a síntese de biocompostos e a produção de biomassa, esse fator também é importante para a síntese de enzimas (Stajić *et al.*, 2006). A concentração de C:N para o meio ideal para a produção das enzimas foi avaliada no DCCR. Nas corridas houve uma variação de uma concentração mínima de 1:1 quando o amido estava no nível de -1,68, uma concentração máxima de 1930:1 quando a uréia estava no nível -1,68 e os pontos médios foram 14,5:1.

O modelo da atividade de ambas enzimas, foi validado (em triplicata) para a α -amilase e um meio para a glucoamilase, utilizando concentrações de amido, ureia e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ otimizadas no DCCR.

Todos os ensaios do PB e do DCCR foram realizados aleatoriamente, e os dados foram analisados usando o software STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK). A qualidade do ajuste da equação do modelo de segunda ordem foi expressa pelo coeficiente de determinação R^2 , e sua significância estatística foi determinada por análise de variância (ANOVA) e F-test.

4.6. Cinética final do cultivo submerso (CSm) otimizado

Após a otimização dos parâmetros químicos de cultivo foram realizados dois ensaios cinéticos em frascos de 250 mL, incubados em pH 6,0, 28 ± 2 °C a 120 rpm para α -amilase e para glucoamilase. O meio foi realizado nas condições ótimas escolhidas a partir dos fatores com efeito significativo para a produção de cada enzima testada no DCCR. Alíquotas foram retiradas a cada 4 h até 80 horas para as análises das atividades enzimáticas (subitem 4.4.1 e 4.4.2), concentração de proteína, de teor de amido, biomassa e pH. A partir dos dados da cinética final também foram calculados os parâmetros cinéticos de tempo de duplicação (t_d), velocidade específica ($\mu_{m\acute{a}x}$), produtividade horária total da biomassa e a produtividade horária total do produto (α -amilase e glucoamilase) e os fatores de conversão conforme item 4.6.5.

4.6.1. Determinação da concentração de amido

As amostras retiradas ao longo do tempo de cultivo foram avaliadas quanto ao teor de amido pelo método amido-iodo (FUWA, 1954). A curva padrão (Anexo 1) foi utilizada.

4.6.2. Determinação do pH do meio de cultivo

O pH do sobrenadante foi medido pelo método potenciométrico usando um medidor de pH (Model MPA 210, Max Lab, BR).

4.6.3. Determinação de biomassa ao longo da cinética final em cultivo submerso

A biomassa formada durante o cultivo utilizado para a cinética final visando a síntese de amilases foi determinada pelo método termogravimétrico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). O volume do meio de cultivo foi filtrado com auxílio de bomba à vácuo em funil de porcelana com papel filtro e um kitasato (Suctron Eletronic, Schuster, Brasil). O papel filtro com biomassa retida foi incubado a 105 °C / 24 h. Após foi resfriado em dessecador. A biomassa foi calculada através de diferença gravimétrica, utilizando a equação 1. O filtrado foi utilizado para quantificação do amido.

$$X_s = \frac{(m_2 - m_1)}{V} \quad (1)$$

Sendo:

X_s = biomassa seca ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

m_2 = massa do filtro com a biomassa seca (g);

m_1 = massa do filtro seco (g);

V = volume de cultivo filtrado (L);

4.6.4. Determinação de teor de proteína no meio de cultivo submerso

O teor de proteína foi determinado utilizando o método desenvolvido por Bradford (1976). Este método baseia-se na formação do complexo de cor entre o corante Coomassie Brilliant Blue G250 e as proteínas. Uma alíquota de 50 μL do EBE e uma de 1,5 mL do reagente de Bradford (ANEXO 5) foi adicionada a

um tubo de ensaio, homogeneizado e lido a 595 nm de absorvância. A determinação da concentração de proteína foi realizada utilizando a curva padrão (ANEXO 4).

O teor de proteína foi utilizado para determinar a atividade específica usando a equação 2, onde esta atividade é expressa em $U \cdot mg^{-1}$.

$$A_{esp} = \frac{A}{P} \quad (2)$$

Em que:

A_{esp} = é a atividade específica ($U \cdot mg^{-1}$);

A = é a atividade enzimática da amilase ($U \cdot mL^{-1}$);

P = é o teor de proteína contida no substrato ($mg \cdot mL^{-1}$);

4.6.5. Determinação de parâmetros cinéticos do bioprocesso otimizado

Os parâmetros cinéticos foram estabelecidos utilizando cálculos de velocidade máxima específica de crescimento microbiano ($\mu_{m\acute{a}x}$), tempo de duplicação (t_d), produtividade de biomassa, fatores de conversão que serão elucidados nos tópicos a seguir, visando determinar esses parâmetros no bioprocessos já otimizado.

4.6.5.1. Cálculo da velocidade máxima específica de crescimento

Os valores de crescimento e produção de biomassa foram utilizados para construção das curvas de crescimento dos microrganismos. Os valores correspondentes à fase de crescimento exponencial celular (log) foram utilizados para o cálculo de velocidade máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$), conforme a equação 3:

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{t_f - t_i} \quad (3)$$

Em que:

$\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidade específica de crescimento (h^{-1});

t_i e t_f = tempo inicial e final da fase log (h^{-1});

X_i = Concentração de biomassa inicial ($g \cdot L^{-1}$);

X_f = Concentração de biomassa final ($g \cdot L^{-1}$);

4.6.5.2. Cálculo do tempo de duplicação

O tempo de duplicação celular (t_d) foi calculado de acordo com a equação 4:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (4)$$

t_d = tempo de duplicação (h);

$\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidade específica de crescimento (h^{-1});

4.6.5.3. Cálculo da produtividade em biomassa e em produto

A produtividade horária total da biomassa formada foi calculada segundo a equação 5:

$$Y_{x\ total} = \frac{X_f - X_i}{t_t} \quad (5)$$

$Y_{x\ total}$ = produtividade horária total ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$);

t_t = tempo total de cultivo (h);

X_i = Concentração de biomassa inicial ($g \cdot L^{-1}$);

X_f = Concentração de biomassa final ($g \cdot L^{-1}$);

A produtividade horária total do produto (amilases) formado foi calculada conforme a equação 6:

$$Y_{P\ total} = \frac{P - P_0}{t} \quad (6)$$

$Y_{P\ total}$ = produtividade horária total do produto (amilases) ($U \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$);

t = tempo total de cultivo (h);

P_0 = Concentração inicial de produto ($g \cdot L^{-1}$), sendo o produto as amilases;

P = Concentração final de produto ($g \cdot L^{-1}$), sendo o produto as amilases;

4.6.5.4. Cálculo dos fatores de conversão

Para o cultivo dos microrganismos para a produção de amilases, foram calculados os fatores de conversão do substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), fator de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$) e de biomassa em produto ($Y_{P/X}$), conforme as equações abaixo:

$$Y_{\frac{X}{S}} = -\frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (7) \quad Y_{\frac{P}{S}} = -\frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (8) \quad Y_{\frac{P}{X}} = \frac{P - P_0}{X - X_0} \quad (9)$$

Em que:

X_0 = Concentração de biomassa inicial ($g \cdot L^{-1}$);

X = Concentração de biomassa final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

P_0 = Concentração inicial de produto ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), sendo o produto as amilases;

P = Concentração final de produto ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), sendo o produto as amilases;

S_0 = Concentração inicial de substrato ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

S = Concentração final de substrato ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

4.7. Caracterização parcial das amilases quanto fatores importantes na reação enzimática

Após realizados os testes de otimização dos parâmetros químicos e a determinação do tempo e meio ideal através da cinética final foi realizada a caracterização parcial das enzimas quanto aos parâmetros importantes na reação enzimática. O tempo de reação não foi avaliado devido a testes prévios que já o definiram.

4.7.1. Determinação do pH ótimo, temperatura ótima e efeito dos íons metálicos para a atividade das amilases produzidas pelo *C. comatus* em cultivo submerso

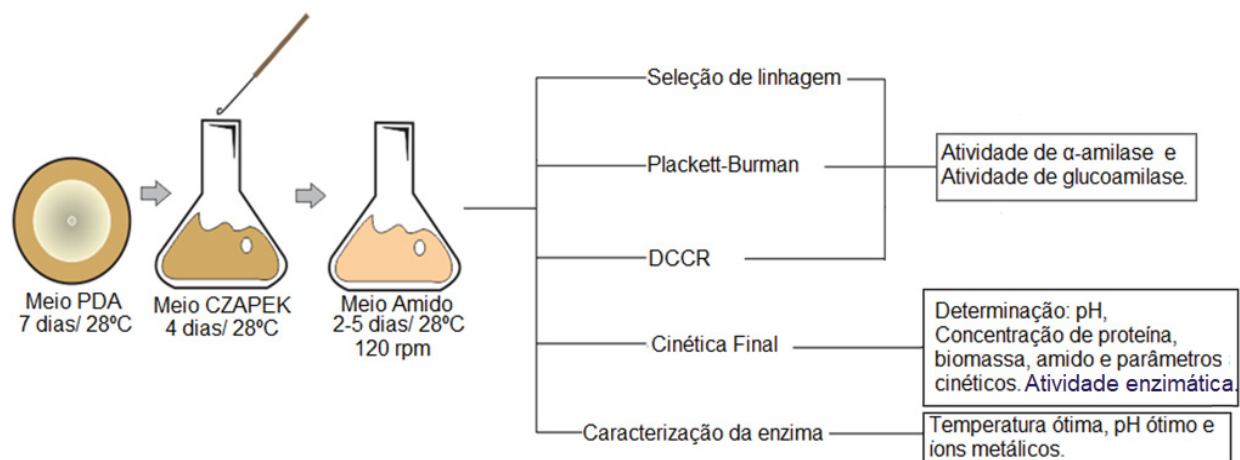
O pH ótimo foi determinado utilizando tampão acetato (pH 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5), tampão fosfato (pH 7,0) e tampão Tris (pH 8,0 e 9,0) durante as reações enzimáticas para a determinação das atividades de α -amilase e glucoamilase. As condições de tempo e temperatura dos ensaios enzimáticos foram as mesmas utilizadas nos ensaios padrões descritos anteriormente e os resultados foram comparados com a amostra controle analisada nas condições padrões (subitem 4.4.1 e 4.4.2).

Para a determinação da temperatura ótima foram testadas diferentes temperaturas de incubação da reação enzimática (de 30, 40, 50, 60 e 70 °C). Demais condições da reação enzimática foram as mesmas do ensaio padrão. Os resultados comparados com a amostra controle.

A influência dos íons metálicos foi avaliada utilizando diferentes soluções tampão: 1,0 mM, 2,5 mM e 5,0mM de $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , CuSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO})_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, que foram preparados e utilizados para os ensaios de atividade enzimática. Os resultados foram comparados com a amostra controle. As condições dos ensaios foram realizadas com base em estudo reportado por Du

et al. (2012, com modificações) e por Nwamaka (2011, com modificações) para ambas as enzimas.

FIGURA 9 – ETAPAS PARA A REALIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASES.

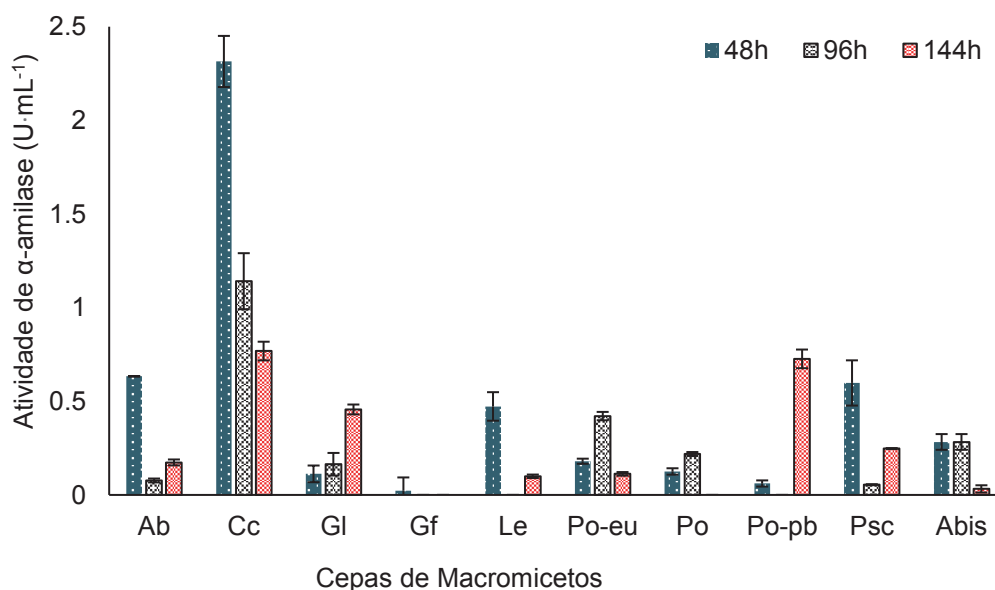


5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção de cepa de basidiomiceto para a produção de amilases em cultivo submerso (CSm)

Na Figura 10 estão representados os resultados de atividade enzimática de α -amilase ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) para as cepas que apresentaram resultados positivos em 48, 96 e 144 horas de cultivo. Das doze cepas estudadas, nove apresentaram atividade de α -amilase em pelo menos um dos tempos avaliados. As cepas *H. americanum* e *P. nameko* não apresentaram atividade enzimática em nenhum dos tempos de cultivo. As cepas *A. blazei*, *C. comatus*, *G. frondosa*, *L. edodes*, *P. sajour-caju* e *A. bisporus* obtiveram os picos de atividade em 48 horas, com 0,63, 2,31, 0,02, 0,47, 0,59 e 0,28 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente. Enquanto, para *P. europea* e *P. ostreatus* (europea) foi 0,42 e 0,22 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 96 horas e as cepas *G. lucidum* e *P. ostreatus* (Pato Branco) apresentaram 0,45 e 0,72 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 144 horas.

FIGURA 10 - RESULTADOS DA ATIVIDADE DE α -AMILASE OBTIDOS EM 48, 96 E 120 h DE CULTIVO PELAS 12 CEPAS AVALIADAS DURANTE ESTUDO DE SELEÇÃO ($N=3$, $\bar{X}\pm\text{ERRO PADRÃO}$). AS CONDIÇÕES DE CULTIVO ERAM pH 6,0, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 120 RPM. Ab = *Agaricus blazei*; Cc = *Coprinus comatus*; Gl = *Ganoderma lucidum*; Gf = *Grifola frondosa*; Le = *Lentinus edodes*; Po-eu = *Pleurotus ostreatus* (europea); Po = *Pleurotus ostreatus*; Po-pb = *Pleurotus ostreatus* (Pato Branco); Psc = *Pleurotus sajour-caju*; Abis: *Agaricus bisporus*;



O tempo de cultivo é um fator crucial na produção de enzimas. Tempos de cultivo prolongados podem reduzir a atividade enzimática devido a diminuição na concentração do substrato, ou pela formação de substâncias inibidoras. Por outro lado, reduzidas

parcelas de tempo podem resultar em detecção de baixa produtividade de enzimas (SUNDARRAM & MURTY, 2014). Em geral, para a produção industrial de enzimas, exige-se que as cepas apresentem alta produtividade, de forma a reduzir o tempo de processo. A partir de testes prévios (dados não apresentados) decidiu-se avaliar a atividade amilolítica em 48, 96 e 144h de cultivo. *C. comatus* apresentou maior produção de α -amilases, com um pico de atividade enzimática de $2,314 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 48h de cultivo. Este tempo é consideravelmente reduzido quando comparado às demais cepas e também é semelhante ao tempo de cultivo adequado para produção de enzimas de outras fontes microbianas tais como bactérias. Spier *et al.* (2007), por exemplo, concluíram que para alcançar máxima produção de amilases por *Aspergillus niger* em cultivo sólido o tempo ideal é de 60 horas.

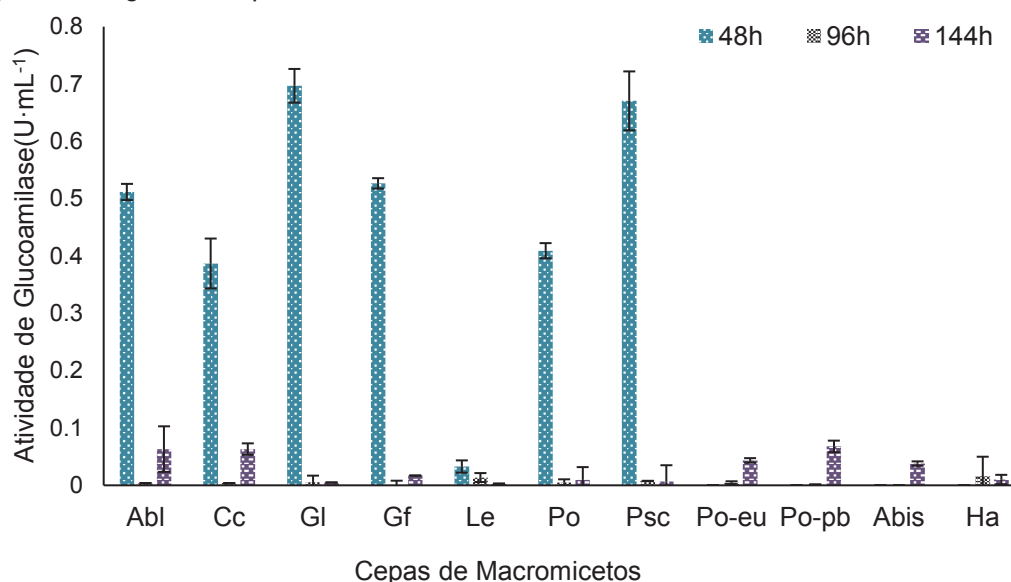
No presente trabalho, *Agaricus blazei* apresentou atividade enzimática igual a $0,63 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 48 horas de cultivo; enquanto, Jonathan & Adeoyo (2011) encontraram ($0,09$ a $0,6 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *Agaricus blazei* e $0,07$ a $0,39 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *Agaricus sp.*) em 7 dias de cultivo (168 h). Esta variação na atividade enzimática demonstra a importância de se adaptar as condições de cultivo para cada cepa estudada (Kumar; Satyanarayan, 2007; Soni *et al.*, 2006). No presente estudo; os mesmos parâmetros de cultivo foram utilizados para todas as cepas testadas, o que pode justificar os resultados de atividade pouco expressivos para algumas destas.

A melhor cepa produtora de amilases, *C. comatus*, apresentou uma tendência na redução da atividade após 48 horas de cultivo e a concentração de amido diminuiu até próximo ao valor de zero após este período. A redução da concentração do substrato indutor durante o cultivo e a formação de glicose – tida como inibidora da produção de amilases por diversas cepas fúngicas – podem ser mencionadas como possíveis causas da redução na atividade enzimática (NAILI *et al.*, 2016). Açúcares liberados pela degradação do amido não consumido pelas células microbianas também podem resultar na inibição da síntese de amilases. Nwagu *et al.* (2011) observaram que a glicose reprime a expressão/síntese de amilases por *Fusarium sp.*

Para outras cepas, existe uma oscilação na atividade enzimática em diferentes tempos de cultivo. A avaliação da atividade em tempos intermediários poderia revelar bons resultados. No entanto; uma retirada excessiva de amostras poderia comprometer o processo fermentativo, além de ocasionar maiores riscos de contaminações. As atividades de glucoamilase em 48, 96 e 144h de cultivo estão apresentadas na Figura 11, em que é possível verificar que 11 cepas apresentaram resultados positivos de

atividade enzimática. Apesar de não apresentar o resultado mais expressivo, a cepa *C. comatus* demonstrou novamente potencial na produção de glucoamilase, com pico de atividade enzimática de $0,38 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 48 horas de cultivo. As cepas com maior produção de glucoamilase em 48 h foram *G. lucidum* e *P. sajor-caju*, com $0,69$ e $0,67 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, não apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

FIGURA 11 - RESULTADOS DA ATIVIDADE DE GLUCOAMILASE OBTIDOS EM 48, 96 E 120 h DE CULTIVO PELAS 12 CEPAS AVALIADAS DURANTE ESTUDO DE SELEÇÃO ($N=3$, $\bar{X} \pm \text{ERRO PADRÃO}$). AS CONDIÇÕES DE CULTIVO ERAM pH 6,0, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 120 RPM. Ab = *Agaricus blazei*; Cc = *Coprinus comatus*; Gl = *Ganoderma lucidum*; Gf = *Grifola frondosa*; Le = *Lentinus edodes*; Po-eu = *Pleurotus ostreatus* (europea); Po = *Pleurotus ostreatus*; Po-pb = *Pleurotus ostreatus* (Pato Branco); Psc = *Pleurotus sajor-caju*; Abis: *Agaricus bisporus*; Ha: *Hericium americanum*.



A metodologia usual utilizada para quantificar a atividade de amilases é pela liberação de produto (açúcares redutores). No entanto, a α -amilase atua sobre a cadeia do amido de forma aleatória, liberando não apenas açúcares redutores, mas também oligossacarídeos com comprimentos de cadeia variados (SILVA, 2014). Estes oligossacarídeos podem ser depois metabolizados pela ação de outras enzimas que não necessariamente atuam sobre a molécula do amido, utilizado como substrato reacional. Tal fato poderia explicar os resultados inferiores obtidos para atividade de glucoamilase, assim como as diferenças entre a degradação do amido e liberação de açúcares redutores no meio reacional.

Apesar da atividade enzimática das cepas estudadas ser inferior à relatada para cepas utilizadas industrialmente (TORRADO *et al.*, 2013), a otimização das condições de cultivo em estudos posteriores pode maximizar esta atividade. Além disso, os

macromicetos tem maior afinidade por cultivos estáticos, pois a formação micelial ocorre na superfície do meio, permitindo maior contato com o ar atmosférico (oxigênio) a oxigenação, o que não ocorre em cultivo submerso, onde a formação de *pellets* e aumento da viscosidade do meio podem ocasionar redução da oxigenação (MOORE *et al.*, 2011) devido as barreiras tais como filme de líquido estagnado na superfície do aglomerado celular. Estes fatos corroboram com a adaptabilidade das cepas para o cultivo submerso, o que pode viabilizar esta forma de cultivo para a produção de outras biomoléculas além das enzimas.

Diante da maior atividade de α -amilase, degradação do substrato em 48 horas e potencial na síntese de glucoamilase a cepa *C. comatus* foi escolhida para os próximos ensaios de otimização das enzimas amilolíticas.

5.2. Otimização da atividade enzimática por *Coprinus comatus* em cultivo submerso

Os resultados obtidos na produção de amilases por *Coprinus comatus* utilizando o Plackett-Burman (PB) Screening Design 11/12 estão apresentados na Tabela 13. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Realizaram-se testes adicionais com a cepa *C. comatus* que resultaram em tempo de reação ideal para atividade α -amilase de 15 minutos, sendo este o tempo reacional para esta enzima e 30 min para glucoamilase.

TABELA 13 – ATIVIDADE DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE NOS ENSAIOS DO PLACKETT-BURMAN EXPERIMENTAL DESIGN PRODUZIDAS POR *Coprinus comatus* EM CULTIVO SUBMERSO, COM pH 6,0, TEMPERATURA DE $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 120 RPM; * = PONTOS CENTRAIS;

Ensaio	Atividade enzimática (U·mL ⁻¹)	
	α -amilase	Glucoamilase
1	2,53±0,23	0,00±0,01
2	1,66±0,30	3,06±0,19
3	5,27±0,11	0,36±0,01
4	1,21±0,12	1,14±0,14
5	1,14±0,15	5,05±0,01
6	1,89±0,34	1,38±0,06
7	4,89±0,04	0,40±0,01
8	2,68±0,05	0,26±0,02
9	3,43±0,05	0,18±0,00
10	0,93±0,03	0,68±0,04
11	0,69±0,03	1,72±0,02
12	0,17±0,02	1,67±0,04
13*	3,00±0,16	2,25±0,27
14*	3,01±0,40	2,51±0,13
15*	3,30±0,08	2,22±0,14

A atividade de α -amilase variou entre 0,17 (ensaio 12) a 5,27 U·mL⁻¹ (ensaio 3) e a de glucoamilase foi de 0,00 (ensaio 1) a 5,05 U·mL⁻¹ (ensaio 5). Observando os efeitos

das variáveis, verifica-se que tanto para a produção de α -amilase como glucoamilase a ureia, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ e amido apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$). Tanto a ureia como o $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ apresentaram efeito positivo para a produção de α -amilase, porém negativo para a de glucoamilase. A ureia é considerada uma fonte de nitrogênio (N) essencial para a produção de amilases por fungos (Jonathan e Adeoyo, 2011; Gupta *et al.*, 2003), porém em concentrações elevadas $0,5 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ de substrato podem inibir a produção das mesmas (Kammoun *et al.*, 2008). Os íons metálicos são considerados indutores na produção de amilases (RAZA; REHMAN, 2016). Entretanto, Bagheri *et al.* (2014) observou que o íon Fe^{2+} inibiu a produção de glucoamilase por *Aspergillus niger*. Tais resultados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho.

A concentração de amido, cujos valores testados variaram de 1 a $39 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, resultou em um efeito negativo sobre a atividade enzimática de α -amilase e positivo na produção de glucoamilase. Estes resultados indicam que menores concentrações de amido favorecem a produção de α -amilase, mas as concentrações maiores são favoráveis para a produção de glucoamilase.

A adição do KH_2PO_4 resultou em efeito significativo ($p < 0,05$) apenas na produção da glucoamilase. Kumar e Satyanarayana (2006) também obtiveram o aumento da produção de glucoamilase com a presença de KH_2PO_4 para *Thermomucor indicae-seudaticae*. O fosfato é um dos principais compostos responsáveis pela regulação da síntese dos metabolitos primários e secundários, além de desempenhar um papel importante no crescimento dos organismos e na produção de amilases (GUPTA *et al.*, 2003).

Dentro das faixas estudadas, as demais variáveis ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; NaNO_3 ; CaCl_2 ; MgSO_4 ; MnSO_4 , não exerceram efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre as respostas de atividade de α -amilase e glucoamilase.

Os resultados de atividade de α -amilase e glucoamilase obtidos da execução dos 17 ensaios do DCCR estão apresentados na Tabela 14.

TABELA 14. MATRIZ DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE POR *COPRINUS COMATUS* EM CSm, COM pH 6,0, TEMPERATURA DE $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 120 RPM.

Ensaio	Atividade enzimática ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	α -amilase	Glucoamilase
1	1,40 \pm 0,01	0,00 \pm 0,08
2	1,47 \pm 0,28	0,00 \pm 0,05
3	4,59 \pm 0,03	0,67 \pm 0,08
4	4,12 \pm 0,01	0,77 \pm 0,13
5	1,71 \pm 0,13	2,71 \pm 0,44
6	1,85 \pm 0,12	1,75 \pm 0,11
7	5,04 \pm 0,55	0,63 \pm 0,30
8	5,09 \pm 0,08	1,97 \pm 0,12
9	1,64 \pm 0,22	0,81 \pm 0,07
10	5,00 \pm 0,27	0,33 \pm 0,10
11	0,30 \pm 0,01	1,19 \pm 0,80
12	4,87 \pm 0,16	3,39 \pm 0,40
13	4,38 \pm 0,01	4,07 \pm 0,88
14	5,26 \pm 0,04	4,88 \pm 0,41
15*	5,97 \pm 0,12	4,04 \pm 0,42
16*	5,16 \pm 0,14	4,64 \pm 0,35
17*	4,68 \pm 0,12	4,68 \pm 0,52

Por meio da Tabela 14, verifica-se que atividade enzimática da α -amilase variou entre 0,30 a 5,97 ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) a qual foi afetada principalmente pela concentração de ureia utilizada. Tal fato é evidenciado pelo efeito positivo desta variável, assim como pelo menor valor de p (linear $p=0,0001$ e quadrático $p=0,001$) observado. A concentração de amido também apresentou efeito positivo e significativo (linear $p=0,019$ e quadrático $p=0,008$) na atividade da α -amilase. Estas duas variáveis, amido e ureia, também exerceram efeito repressor na atividade de glucoamilase (termo quadrático da variável amido A^2 $p=0,002$ e termo quadrático da variável ureia $p=0,02$). Desta forma, o aumento da concentração destas resultou em menores atividades.

A adição do $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ no meio não apresentou efeito significativo ($p<0,05$) na produção de nenhuma das enzimas, porém a interação desta variável com as demais foi significativa. Desta forma, todas as variáveis foram mantidas para o cálculo da ANOVA (Tabela 15).

TABELA 15 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO QUADRÁTICO PARA A PREDIÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE. ^a SOMA DE QUADRADOS; ^b GRAUS DE LIBERDADE; ^c QUADRADO MÉDIO; ^d F-RATIO= IMPORTÂNCIA DO MODELO (REGRESSÃO/ RESIDUAL).

Fonte de variação	Produção de α -amilase				Produção de Glucoamilase				
	Ss ^a	Df ^b	Ms ^c	F ratio	Ss ^a	Df ^b	Ms ^c	F-ratio	
Regressão	48,96	3	16,32	62,86	40,92	3	13,64	17,68	
Residual	3,37	13	0,26		10,03	13	0,77		
Falta de Ajuste	2,52	5	0,50	1,19	9,78	5	1,95	15,80	
Erro Puro	0,84	2	0,42		0,24	2	0,12		
Total	52,34	16			50,95	16			
				$R^2 = 93,55$; $F_{0,95; 3; 13} = 3,41$; p-value= 5,39E-08 $F_{cal,5;2} = 19,29$					$R^2 = 80,31$; $F_{0,95; 3; 13} = 3,41$; p-value= 7,14E-05 $F_{cal,5;2} = 19,29$

De acordo com a Análise de Variância (ANOVA), 93,55 e 80,31% da variação (R^2) da atividade de α -amilase e glucoamilase, respectivamente, foram explicadas pelo modelo. Segundo Haaland (1989), para processos biológicos, modelos que apresentem o $R^2 > 80$ são adequados, devido as variações inerentes ao processo. Além disso, o $F_{calculado}$ para regressão foi significativo ($F_{calc} \geq F_{tabelado}$) e a Falta de ajuste não apresentou significância, mostrando que o modelo tanto para atividade da α -amilase como glucoamilase se ajusta de forma adequada aos dados experimentais, podendo ser gerada a equação de cada modelo (Eq. 2) e as superfícies de resposta.

A produção de α -amilase (Z_A , Eq. 14) e de glucoamilase (Z_G , Eq. 15) em $U \cdot mL^{-1}$ poderiam ser previstas pelas seguintes equações dos modelos abaixo. Os modelos são quadráticos com duas interações.

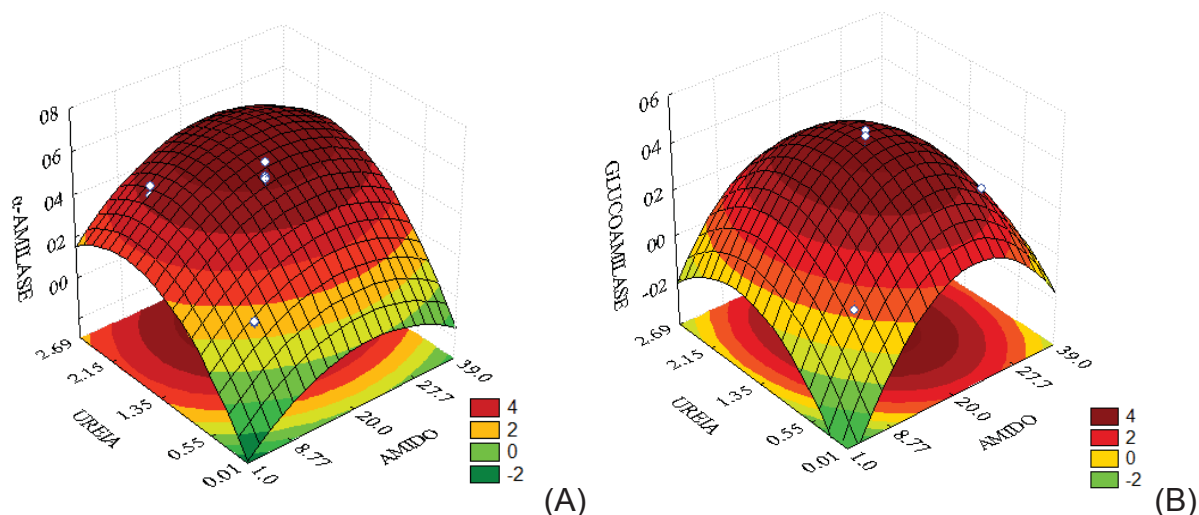
$$Z_A = 5,29 + 0,568A - 0,757A^2 + 1,47B - 1,02B^2 + 0,09AB + 0,74AC - 0,079BC \quad (14)$$

$$Z_G = 4,53 + 0,352A - 1,65A^2 + 0,241B - 1,04B^2 - 0,413AB + 0,036AC + 0,29BC \quad (15)$$

Em que:

A= concentração de amido ($g \cdot L^{-1}$), B= concentração de ureia ($g \cdot L^{-1}$), C=concentração de $Fe_2(SO_4)_3$ ($g \cdot L^{-1}$). Para a confecção das superfícies de resposta, utilizou-se a interação entre amido ($g \cdot L^{-1}$) e ureia ($g \cdot L^{-1}$), mantendo o $Fe_2(SO_4)_3$ ($g \cdot L^{-1}$) no nível do ponto central.

FIGURA 12. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A ATIVIDADE DE α -AMILASE (A) E GLUCOAMILASE (B) EM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES AVALIADAS NO DCCR, AMIDO E UREIA PARA *COPRINUS COMATUS* EM CULTIVO SUBMERSO. AS CONDIÇÕES DE CULTIVO ERAM pH 6,0, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 120 RPM.



Com base na Figura 12 as maiores atividades de α -amilase são obtidas nas concentrações de 9,00 a 36,00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de amido e de 1,10 a 2,69 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ureia. Já a glucoamilase apresentou as maiores atividades nas concentrações de 10,00 a 25,00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ amido e 0,80 a 2,00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ureia. A produção máxima de α -amilase pode ser obtida usando amido 23,20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 1,93 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ureia e 0,02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, mantendo KH_2PO_4 a uma concentração média de 3,00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, com a proporção de C/N no meio de cerca de 12:1. A atividade máxima de glucoamilase pode ser obtida no meio contendo 20,70 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de amido, 1,46 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ureia e 0,011 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, mantendo KH_2PO_4 a uma concentração média de 3,00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e C/N foi 13,5:1. Torres López *et al.* (2011), obtiveram para *Ganoderma lucidum* uma razão C/N ideal de 16,7:1. Enquanto Zaghi Junior *et al.* (2010), obtiveram para *Agaricus brasiliensis* uma proporção de 11:1. Embora esta estirpe não tenha necessidade de crescimento significativo para a produção de enzimas, apresentou semelhança quanto a relação C/N das outras cepas de macromicetos para o crescimento e produção de enzimas.

Com base nos resultados de região ótima para a produção de cada enzima, foi escolhido uma condição inicial em que a resposta Z_A e Z_G coincidam na região ótima, visando a realização de um experimento para validação dos modelos obtidos (Eq. 14 e Eq. 15). Para a α -amilase com o meio composto de 23,00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de amido, 2,00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ureia, 0,01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, e mantendo a concentração de 3,00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de KH_2PO_4 foi obtido 5,93 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de atividade. Para a glucoamilase, com o meio composto por 23,00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de amido, 1,67 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ureia e 0,01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, mantendo KH_2PO_4 em uma

concentração média de $3,00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ foi alcançada a atividade de $4,31 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estes resultados não diferiram estatisticamente das atividades previstas pelo modelo (α -amilase= $5,95 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ e glucoamilase= $4,28 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

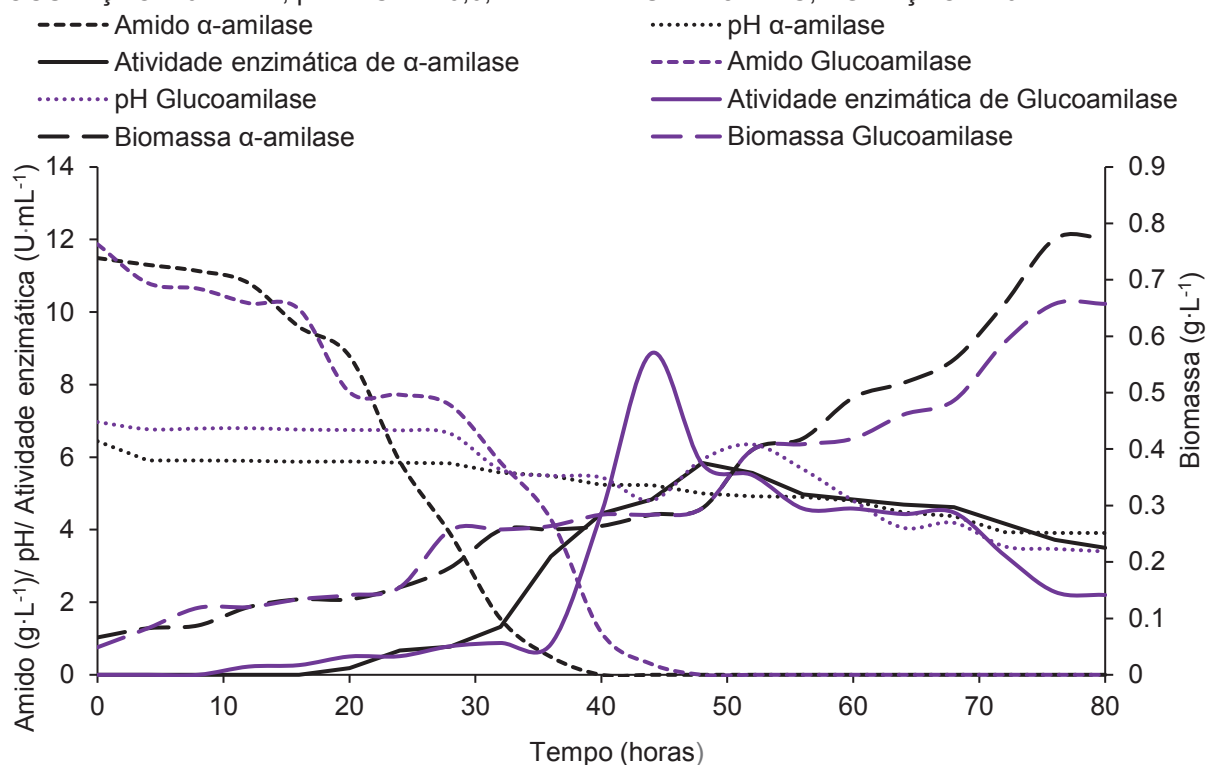
Sethi e Gupta (2015) otimizaram as condições do meio de cultura para a produção de amilase por fungos como *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, entre outros, com atividade máxima após otimização de $0,88 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *Aspergillus niger*. Kumar *et al.* (2014) avaliaram o efeito de alguns fatores sobre a produção enzimática de α -amilase utilizando *Bacillus altitudinis* em cultivo submerso, obtendo uma produção de $5,64 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 2 dias de cultivo. Atividade semelhante à obtida pela presente pesquisa. Isto mostra o potencial dos basidiomicetos para a produção de amilases.

Com a otimização, obteve-se um aumento de 158% na atividade de α -amilase nas condições de seleção para a de otimização de $2,31 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ para $5,97 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$. Por sua vez, a atividade enzimática da glucoamilase apresentou um aumento de 1184% em comparação a atividade obtida no screening (de $0,38 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ para $4,88 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$).

5.3. Cinética final para *Coprinus comatus* em meio otimizado

Os resultados das cinéticas de produção de glucoamilase e α -amilase realizadas com os parâmetros otimizados são apresentados na Figura 13. A cada 4 horas as amostras foram retiradas e analisadas quanto a produção de biomassa, pH, atividade enzimática e a atividade específica para cada enzima.

FIGURA 13 - RESULTADOS DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE POR *COPRINUS COMATUS*. PERFIL DE CONSUMO DE SUBSTRATO (CONCENTRAÇÃO DE AMIDO, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), BIOMASSA ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH. AS DEMAIS CONDIÇÕES FORAM FIXADAS DURANTE O CSm: TAXA DE INOCULAÇÃO: 10% v·v⁻¹; pH INICIAL=6,0; TEMPERATURA $28 \pm 2^\circ\text{C}$; AGITAÇÃO: 120 RPM.



A atividade máxima de α -amilase ($5,84 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, equivalente a $213 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de atividade específica) foi obtida em 48 horas de cultivo. O pH variou de 6,4 a 3,9, com pH de 5 em 48 horas. A biomassa variou de $0,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a $0,77 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, com $0,29 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em 48 horas de cultivo. O amido foi consumido em 40 horas de cultivo. A produtividade em 48 horas para esta enzima foi de $0,12 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, os fatores para *C. comatus* nesse meio e período foi de $Y_{A/X/S}$ $0,02 \text{ g}$ de biomassa (gdb)· g^{-1} de substrato (gds), $Y_{A/P/S}$ de $508,34 \text{ U}\cdot\text{gds}^{-1}$ e $Y_{A/P/X}$ de $25532,55 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. A atividade máxima de glucoamilase ($8,87 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, equivalente a $147,93 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de atividade específica) foi obtida em 44 horas de cultivo. A biomassa variou de $0,048 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em 0 horas de cultivo a $0,65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em 80 horas com $0,28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em 44 horas e o pH variou de 6,7 a 3,5, com pH de 4,8 em 44 horas e o amido foi degradado em 48 horas de cinética. A produtividade no pico de atividade foi de $0,20 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, o fator para *C. comatus* neste meio de cultivo e período foi de $Y_{G/X/S}$ foi de $0,02 \text{ gdb}\cdot\text{gds}^{-1}$, $Y_{G/P/S}$ de $766,20 \text{ U}\cdot\text{gds}^{-1}$ e $Y_{G/P/X}$ de $37744,54 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$.

A cepa estudada apresentou uma fase lag, que corresponde a fase de adaptação as condições do meio, até aproximadamente 18 horas de cultivo para α -amilase e 8 horas para glucoamilases. Após a fase log teve início e permaneceu até 76 h de cultivo, depois

deste período houve uma estabilização do crescimento da cepa nos dois cultivos, ocorrendo a fase estacionária. Por isso, os cálculos foram realizados levando em consideração a fase log.

Sethi *et al.* (2014) realizaram um estudo sobre a produção de amilases por diferentes fungos e realizaram a cinética para a melhor cepa (*Aspergillus terreus*) em diferentes fontes de carbono (cascas de laranja, bolo de mostarda e outros). A fonte que resultou na maior quantidade de biomassa, aproximadamente $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, não apresentou a maior atividade enzimática. No presente estudo não houve uma alta produção de biomassa mas foi obtido uma atividade satisfatória, mostrando que não necessariamente é preciso uma grande produção de biomassa para a produção enzimática.

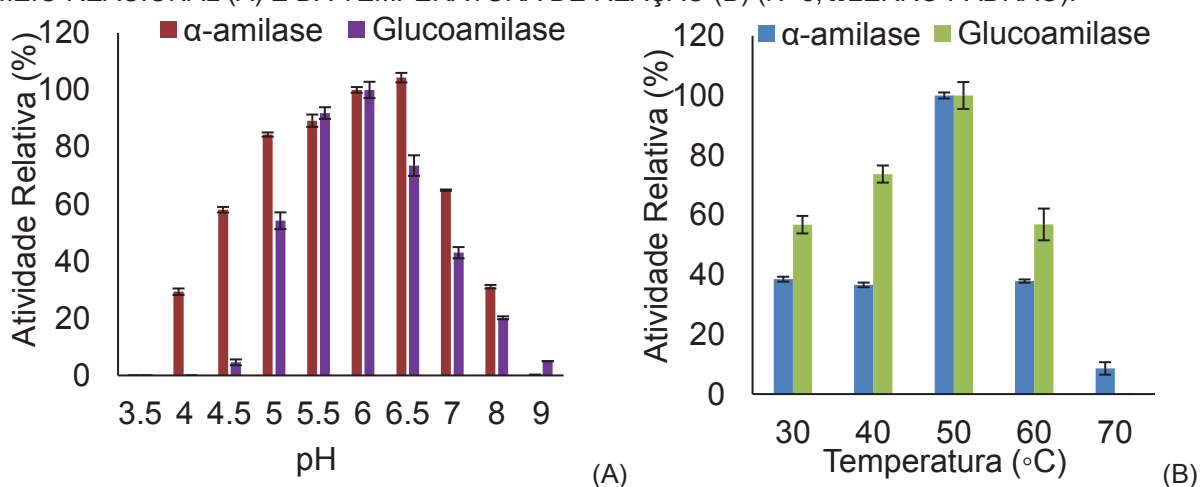
A conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) para a cepa estudada no meio de cultivo para α -amilase em 76 h de cinética foi de $0,06 \text{ gdb}\cdot\text{gds}^{-1}$, de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi de $323,01 \text{ U}\cdot\text{gds}^{-1}$ e de biomassa em produto ($Y_{P/X}$) de $4948,74 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. Por sua vez, para o meio de glucoamilase ($Y_{G/X}$) foi $0,05 \text{ gdb}\cdot\text{gds}^{-1}$, ($Y_{G/P/S}$) foi $192,61 \text{ U}\cdot\text{gds}^{-1}$ e ($Y_{G/P/X}$) $3755,92 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. Senthil *et al.* (2014), avaliaram os fatores de conversão de *Aspergillus terreus* para a produção de amilases em 96 h em diferentes meios submersos e obtiveram máximos valores de ($Y_{X/S}$) $0,19 \text{ gdb}\cdot\text{gds}^{-1}$, ($Y_{P/S}$) $25,00 \text{ U}\cdot\text{gds}^{-1}$ e ($Y_{P/X}$) $2374,50 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. Apesar das condições de cultivo serem relativamente parecidos com o do presente estudo, a produção de biomassa foi superior para *Aspergillus terreus* ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) fato este que resulta em um fator de conversão de substrato em biomassa chega a ser 7 vezes maior. Os outros fatores de conversão quando relacionados à produção enzimática foram maiores para *C. comatus*, evidenciado pela maior atividade deste em relação ao *Aspergillus terreus* (com máxima atividade de $2,50 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$). Isto pode ter ocorrido pela utilização de resíduos para a composição do meio de cultivo visando a produção enzimática.

Os parâmetros cinéticos para *C. comatus* em CSm para o meio de α -amilase apresentaram valores máximos de $\mu_{Amáx}$ de $0,032 \text{ h}^{-1}$, tempo de duplicação de 21,44 h e produtividade horária total de biomassa de $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Por sua vez, para o meio de glucoamilase $\mu_{Gmáx}$ foi $0,034 \text{ h}^{-1}$, tempo de duplicação de 20,24 h e produtividade horária total de biomassa de $0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Estes parâmetros são importantes para o escalonamento e para controle da produção e planejamento em produções em maiores escalas.

5.4. Caracterização do efeito do pH, temperatura e íons metálicos para a atividade de α -amilase e glucoamilase

Para a caracterização das enzimas foram avaliados o pH do meio reacional, a temperatura de reação e a adição de íons metálicos. A caracterização das enzimas é importante para definir a faixa de atuação para as possíveis aplicações. A Figura 16 demonstra a influência do pH e a temperatura nas atividades de α -amilase e glucoamilase.

FIGURA 14 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE α -AMILASE E GLUCOAMILASE EM RELAÇÃO AO pH DO MEIO REACIONAL (A) E DA TEMPERATURA DE REAÇÃO (B) (N=3, $\bar{x} \pm$ ERRO PADRÃO).



A atividade de α -amilase permaneceu estável na faixa de pH 4,0 a 8,0, com o pH ideal em 6,5, havendo um acréscimo de 4% na atividade nesse pH. Em pH 4,0 e 9,0 ocorreu uma diminuição de até 70% da atividade. A glucoamilase manteve-se ativa de 4,5 a 9,0, com o pico de atividade em pH 6,0. Nos pH 4,5 e 9,0 observou-se uma diminuição de aproximadamente 95% da atividade enzimática. De acordo com Du et al. (2013) o pH ideal para a atividade de amilases por *Hericium erinaceum* é de 4,6. Bernardes et al. (2014) estudaram a atividade de amilase por *Rhizomucor miehei* e as análises mostraram que o pH ideal é 5,0. Almeida et al. (2017) obtiveram o pH ideal para *R. oryzae* de 6,5 para a atividade de amilases, semelhante ao do presente trabalho. Kunamneni et al. (2005) observaram as melhores atividades em pH 6,0 para *Thermomyces lanuginosus*.

A temperatura influenciou no aumento da atividade para ambas amilases a 50°C. A 70°C possivelmente inicia a desnaturação de glucoamilase e α -amilase praticamente não apresentou atividade remanescente, com uma perda de 92% da atividade,

característica encontrada também por Hernández *et al.* (2006) para *Aspergillus niger*. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 16(B).

A glucoamilase e α -amilase apresentaram maior atividade enzimática em temperatura de 50 °C. Mesma temperatura encontrada por Bernardes *et al.* (2017) para *R. oryzae*, Kunamneni *et al.* (2005) para *Thermomyces lanuginosus*, Jadhav e Singh *et al.* (2014) para α -amilase livre de *Bacillus licheniformis*, Talekar e Chavare (2012) para enzima livre imobilizada de α -amilase comercial, Vyas e Sharma (2015) para *Bacillus sonorensis* e Hernández *et al.* (2006) para *Aspergillus niger*.

O pH e temperatura ideal para ambas as enzimas torna possível a aplicação destas na indústria de panificação para a degradação da farinha em açúcares fermentescíveis para a posterior fermentação por leveduras (Maarel *et al.*, 2002).

A influência dos íons analisados nas concentrações de 1mM, 2,5 mM e 5 mM é apresentada na Tabela 16. O teste de Tukey a $p < 0,05$ de confiabilidade foi realizado separadamente para cada enzima. A atividade relativa para as amilases foi calculada levando em consideração a atividade da amostra controle (100%) em que não houve a adição de íons.

TABELA 16 – ATIVIDADE RELATIVA DAS ALIMASES PRODUZIDAS POR *COPRINUS COMATUS* COM INFLUÊNCIA DOS ÍONS METÁLICOS LEVANDO EM CONSIDERAÇÃO O TESTE DE TUKEY A $P < 0,05$ DE CONFIABILIDADE. 1 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2 - MgSO_4 ; 3 - CuSO_4 ; 4 - $\text{Fe}_2(\text{SO})_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;

	Atividade Relativa de α -amilase (%)					Atividade Relativa de glucoamilase (%)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Controle	100 ^a	100 ^c	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^c	100 ^b	100 ^b	100 ^b	100 ^c
1mM	82 ^b	104 ^c	99 ^a	9 ^d	98 ^a	257 ^a	196 ^a	119 ^b	126 ^a	186 ^b
2,5mM	83 ^b	117 ^b	89 ^b	93 ^b	102 ^a	218 ^{ab}	224 ^a	110 ^b	62 ^b	33 ^d
5mM	89 ^{ab}	143 ^a	67 ^c	81 ^c	100 ^a	180 ^b	226 ^a	172 ^a	67 ^b	268 ^a

A atividade de α -amilase aumentou na presença do íon Mg^{2+} (2,5 e 5 mM), com o maior aumento em 5mM e foi reprimida por Ca^{2+} (1 e 2,5 mM), Cu^{2+} (2,5 e 5 mM) e Fe^{2+} (1, 2,5 e 5 mM). Por sua vez, a atividade de glucoamilase apresentou um aumento quando na presença de Ca^{2+} (1, 2,5 e 5 mM), Mg^{2+} (1, 2,5 e 5 mM), Fe^{2+} (1 mM) e Mn^{2+} (1 e 5mM), com pico de atividade em Mn^{2+} 5mM e em Ca^{2+} , e foi reprimida por Fe^{2+} (2,5 e 5 mM) e Mn^{2+} (2,5 mM).

No presente estudo o íon Mg^{2+} estimulou a atividade em 43%, este mesmo íon apresentou efeito positivo no estudo realizado por Vyas e Sharma (2015). Du *et al.* (2013), por sua vez, obtiveram aumento da atividade em presença de Mn^{2+} , resultado observado para a glucoamilase nesta pesquisa, em que íon Mn^{2+} aumentou mais de 168% da atividade. Almeida *et al.* (2017) analisaram as cepas de *Aspergillus brasiliensis*

e *Rhizopus oryzae* quanto a produção de glucoamilase e ambas as cepas foram ativadas por Mn^{2+} .

Segundo Nwagu e Okolo (2011), Mg^{2+} estimulou 136% e Ca^{2+} 118% a atividade de amilase por *Fusarium sp.* O íon magnésio apresentou um aumento na atividade semelhante ao encontrado para α -amilase em 5mM deste íon. Por sua vez, o cálcio apresentou maior estímulo que o apresentado no estudo anterior para glucoamilase. A melhoria da atividade enzimática das amilases na presença de íons como Ca^{2+} e Mn^{2+} , pode ser baseada na capacidade que este tipo de enzima tem de interagir com aminoácidos carregados (LINDEN *et al.* 2003)

Singh *et al.* (2014) observaram uma inibição de até 50,96% por Fe^{2+} para a atividade das amilases por *Streptomyces sp.* Por sua vez no presente estudo este íon inibiu a atividade enzimática em até 91%, tendo apenas a concentração de 1mM para a produção de glucoamilase como um incremento na atividade. As amilases relatadas em sua maioria apresentam dependência do íon metálico Ca^{2+} como estabilizador enzimático, característica vista para glucoamilase, que teve um aumento de mais de 157% na atividade enzimática na presença de 1mM deste íon. Para α -amilase este íon mostrou-se inibitório assim como o encontrado por Singh *et al.* (2014) para a cepa *Streptomyces sp.* MSC702.

5. CONCLUSÃO

- Entre as 12 cepas avaliadas, 11 apresentaram atividade enzimática em algum dos tempos avaliados, sendo a cepa *Coprinus comatus* selecionada para a otimização.
- Por meio do delineamento Plackett-Burman foram selecionados 3 fatores para a otimização por delineamento composto central rotacional que foram amido, ureia e ferro. Destes fatores apenas amido e ureia apresentaram significância no DCCR.
- A otimização aumentou a atividade de α -amilase em 153% e de glucoamilase em 2234%.
- O meio utilizado é composto por poucos nutrientes (amido, fósforo, ureia e ferro) e conseqüentemente de baixo custo, para ambas as enzimas. Desta forma *C. comatus* demonstra grande potencial para a utilização industrial pois, além do grande potencial produtor, também apresenta produção das enzimas de forma extracelular facilitando a recuperação destas.
- A enzima α -amilase apresentou atividade máxima em 48 horas ($5,84 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, equivalente a $213 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) e glucoamilase em 44 horas ($8,87 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, equivalente a $147,93 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$).
- Os parâmetros de bioprocessamento para *C. comatus* em meio ideal para α -amilase apresentou produtividade em 48 horas de $0,12 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, com $Y_{A/X/S}$ de $0,02 \text{ gdb}\cdot\text{gds}^{-1}$, com $Y_{A/P/S}$ de $508,34 \text{ U}\cdot\text{gds}^{-1}$ e $Y_{A/P/X}$ de $25532,55 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. No meio para produção de glucoamilase esta cepa apresentou $Y_{G/X/S}$ de $0,02 \text{ gdb}\cdot\text{gds}^{-1}$, $Y_{G/P/S}$ de $766,20 \text{ U}\cdot\text{gds}^{-1}$ e $Y_{G/P/X}$ de $37744,54 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, com produtividade de $0,20 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ no pico de atividade.
- Para α -amilase a temperatura reacional ótima foi 50°C e pH ideal de 6,5. Para a glucoamilase a temperatura reacional ideal também foi de 50°C , e o pH ótimo foi o 6,0.
- A atividade de α -amilase apresentou um aumento de 43,16% com a presença do íon Mg^{2+} . Por sua vez, glucoamilase apresentou um incremento de 168,46% na presença de íon Mn^{2+} e 157% na presença de Ca^{2+} .

6.1. Sugestões para trabalhos futuros

Estudos futuros visando o incremento da produção enzimática por meio do estudo mais aprofundado dos fatores físicos envolvidos nos cultivos submersos, assim como testes utilizando resíduos agroindustriais, estudos de aumento de escala e utilizando diferentes modelos de biorreatores; a separação e a purificação bem como estudos do acabamento das enzimas poderiam viabilizar a produção e obtenção dessas enzimas de importância econômica.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELHALEM, B. T.; EL-SAWY, M., GAMAL, R. F.; ABOU-TALEB, K. A. Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. *Annals of Agricultural Science*, v. 60, pg. 193-202, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aoas.2015.06.001>
- ABDULLAN, N.; IQBAL-ZAFAR, S. Lignocellulose biodegradation by white rot basidiomycetes: overview. *Int J Mush Sci*, v.2, pg.59–78, 1999.
- AEHLE, W. *Enzymes in Industry – Production and Applications*. Edited by Wolfgang Aehle. Third, Completely Revised Edition, 2007. ISBN: 978-3-527-31689-2.
- ALMEIDA, P. Z.; PEREIRA, M. G.; CARVALHO, C. C.; HEINEN, P. R.; ZIOTTI, L. S.; MESSIAS, J. M.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. *Biota Neotropica*, v. 17, n. 3, 2017. Doi: 10.1590/1676-0611-bn-2017-0337.
- ARIETA, P. de F. Caracterização de produtos comerciais à base de amido de milho. Trabalho de Graduação (Bacharelado em Engenharia de Materiais) – Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- BAGHERI, A.; KHODARAHMI, R.; MOSTAFAIE, A. Purification and biochemical characterisation of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*. Relation to starch processing. *Food Chemistry*, v. 161, pg. 270-278, 2014.
- BAILEY, C. J.; TURNER, S. L.; JAKEMAN, K. J.; HAYES, W. A. Effect of *Coprinus comatus* on plasma glucose concentrations in mice. *Planta med*, v. 50, n.6, pg. 525-526, 1984. DOI: 10.1055/s-2007-969791
- BALKAN, B.; ERTAN, F. Production of α -Amylase for *Penicillium chrysogenum* under Solide-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products. *Food Technol. Biotecnol.*, v. 45, pg. 439-442, 2007.
- BAŞ, D.; BOYACI, İ. H. Modeling and optimization II: Comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction. *Journal of Food Engineering*, v. 78, n. 3, p. 846-854, 2007. ISSN 0260-8774.
- BASTOS, C. N. Produção de enzimas extracelulares por *Crinipellis perniciososa*. *Fitopatol. bras.*, v.30, n.3, pg.286-288, 2005.
- BERNARDES, A. V.; MARTINS, E. S.; MATA, J. F.; FERREIRA, O. E. Utilization of agro-industrial by-products for the production of α -amylase by *Rhizomucor miehei*. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v8, n. 2, pg. 1439-1451, 2014. D.O.I. 10.3895/S1981-36862014000200012
- BERNARDI, E.; DONINI, L. P.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Utilização de diferentes substratos para a produção de inóculo de *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. *Revista Ciência Agronômica*, v. 38, n. 1, pg. 84-89, 2007.

- BERNFELD, P. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology*, v.1, pg. 149-157, 1955.
- BRADFORD, M. M. *Anal. Biochem.*, n. 72, pg. 248, 1976.
- BRAGA, G. U. L.; DESTÉFANO, R. H. R.; MESSIAS, C. L. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. *Revista Mibrobiologia*, v.30, n.2, pg.107-113, 1999. DOI: 10.1590/S0001-37141999000200004.
- BUCHS, J. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Enginwweing Journal*, v.7, pg.91-98, 2001.
- CELESTINO, J. R., DUARTE, A. C., SILVA, C. M. M., SENA, H H, FERREIRA, M. P. S. B. C., MALLMANN, N. H, LIMA, N. P. C., TAVARES, C. C., SOUZA, R. O. S., SOUZA, E. S. & SOUZA, J. V. B. 2014. *Aspergillus 6V4*, a strain isolated from manipueira, produces high amylases levels by using wheat bran as a substrate. *Enzyme Research*, v.1, n.4, 2014.
- CEREIA, M.; TERENCEI, H. F.; JORGE, J. A.; GREENE, L. J.; ROSA, J. C.; POLIZELI, M. de L. T. M. Glucoamylase activity from the termophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. Biochemical and regulatory properties. *Journal Basic Microbiology*, v. 40, n. 2, pg. 83-92, 2000.
- CHA, W-S; PARK, S-S.; KIM, S-J.; CHOI, D. Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. *Bioresource Technology*, v. 101, pg. 6475-6481, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.02.048.
- CHANG, S-C.; LIN, M-J.; CHAO, Y-P.; CHIANG, C-J.; JEA, Y-S.; LEE, T-T. Effects of spent mushroom compost meal on growth performance and meat characteristics of grower geese. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 45, n.6, 2016. DOI: DOI: 10.1590/S1806-92902016000600001.
- CHOI, J.; KIM, S-H. Fungal Tree of Life: A “genome tree”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017. DOI: 10.1073/pnas.1711939114.
- COCKSHOTT, A. R.; SULLIVAN, G. R. Improving the fermentation medium for *Echinocandin B* production. Part I: sequential statistical experimental design. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 7, pg. 647-660, 2001.
- COLLA, E. Seleção de leveduras produtoras de trealose e otimização da produção utilizando estratégias sequenciais de planejamento experimental. (Tese de doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E. S. de; 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*, v. 15, n. 4, pg. 268-273, 2005.

CUI, F.-J.; CHEN, X.-X.; LIU, W.-M.; SUN, W.-J.; HUO, S.; YANG, Y. Control of *Grifola frondosa* morphology by agitation and aeration for improving mycelia and exo-polymer production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2016. DOI: 10.1007/s12010-016-2006-y.

CZAPEK, F. Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweißbildung der pflanzen (Studies on nitrogen fixation and protein formation of plants): Beiträge zur Chemischen Physiologie und Pathologie (Contribution to Chemical Physiology and Pathology), v.1, pg.540–560; v.3, pg.47–66, 1902–1903.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de Alimentos de Fennema. Tradução Adriano Brandelli [et al.] - 4 ed., Editora Artmed, Porto Alegre, 2010.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. da. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.39, pg. 945-954, 2009.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, v. 12, pg. 214-219, 1980.

DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. *Chem. Soc. Rev.*, v. 42, 2013. DOI: 10.1039/c3cs35506c.

DONG, C.H.; YAO, Y.J. Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. *J Appl Microbiol*, v.99, pg. 483–492, 2005.

DRAUZ, K.; GRÖGER, G.; MAY, O. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. Third Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Published 2012.

DU, F.; WANG, H. X.; NG, T. B. An amylase from fresh fruiting bodies of the monkey head mushroom *Hericium erinaceum*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 49, n. 1, pg. 23-27, 2013.

DURAN, R. M.; GREGERSEN, S.; SMITH, T. D.; BHETARIYA, P. J.; CARY, J. W.; HARRIS-COWARD, P. Y.; MATTISON, C. P.; GRIMM, C.; CALVO, A. M. The role of *Aspergillus flavus* in the production of extracellular proteins during growth on starch substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, pg. 081-5094, 2014. DOI: 10.1007/s00253-014-5598-6

DUTTA, P.; DEB, A.; MAJUMDAR, S. Optimization of the medium for the production of extracellular amylase by the *Pseudomonas stutzeri* ISL B5 isolated from municipal solid waste. *International Journal of Microbiology*, v. 2016, 2016. DOI: 10.1155/2016/4950743
EALISSON, A.-C. Starch in food - Structure, function and applications. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 2004.

ELMARZUGI, N. A.; ENSHASY, H. A.; ABDULHAMID, M.; HASHAM, R.; AZIZ, A.; ELSAYED, E. A.; OTHMAN, N. Z.; SALAMA, M. A. Amylase economic and application value. *World Journal of Pharmaceutical Research*, v.3, n. 3, pg. 4890-4906, 2014.

EL-ZALAKI, M. E.; HAMZA, M. A. Edible mushrooms as producers of amylases. *Fd. Chem.*, 1979.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Boletim de pesquisa e desenvolvimento: Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. Fortaleza, 2013.

FALANDYSZ, J. Mercury bio-extraction by fungus *Coprinus comatus*: a possible bioindicator and mycoremediator of polluted soils? Environmental Science and Pollution Research. V. 23, n. 8, pg. 7444-7451, 2016)

FIGUEIRÉDO, V. R. de; DIAS, E. S. Buton mushroom cultivation in function of temperature. Ciência Rural, Santa Maria, Online, 2013.

FLEGG, P.B.; SPENCER, D.M.; WOOD, D.A. The biology and technology of the cultivated mushroom. Chichester: John Wiley, 1985.

FOGLIATTO, F. S. Otimização de experimentos com variáveis de resposta descritas por perfis. Pesquisa Operacional, v. 28, n. 3, pg. 577-595, 2008.

FOKINA, O.; EIPPER, J.; KERZENMACHER, S.; FISCHER, R. Selective natural induction of laccases in *Pleurotus sajor-caju*, suitable for application at a biofuel cell cathode at neutral pH. Bioresource Technology, v. 218, pg 455-462, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.06.126.

FORZZA, R.C.; org., et al. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 871 p., v. 1, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

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

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

GAITÁN-HERNÁNDEZ, R.; ESQUEDA, M.; GUTIÉRREZ, A.; SÁNCHEZ, A.; BELTRÁN-GARCÍA, M.; MATA, G. Bioconversion of agrowastes by *Lentinula edodes*: the high potential of viticulture residues. Applied Microbiology and Biotechnology, v.71, n.4, pg.432-439, 2006.

GBOLAGADE, J.; SOBOWALE, A.; ADEJOYE, D. Optimization of sub-merged culture conditions for biomass production in *Pleurotus florida* (mont.) Singer, a Nigerian edible fungus. African Journal of Biotechnology, v. 5, n. 16, pg. 1464-1469, 2006.

GIGRAS, P.; SAHAI, V.; GUPTA, R.; Statistical Media Optimization and Production of ITS - Amylase from *Aspergillus oryzae* in a Bioreactor. Current Microbiology, v. 45, pg. 203–208, 2002.]

GRÖGER, H.; ASANO, Y. Introduction – Principles and Historical Landmarks of Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. In: Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Third Edition, 2012.

GIOVANINNI, I. S. Cultivated Basidiomycetes as a source of new products: - in vitro cultivation development, - selection of strains resistant to *Trichoderma viride*, - search for new active compounds, - factors influencing plasticity in *Grifola frondosa*. Universite de Neuchatel, Faculte des Sciences, Neuchatel, Switzerland, 2006.

GOUD, M. J. P.; SURYAM, A.; LAKSHMIPATHI, V.; CHARYA, M. A. S. Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basidiomycetes. African Journal of Biotechnology, v. 8, n.3, pg. 354-360, 2009.

GUDI, S. K.; GURRAMKONDA, C.; RATHER., G.; CHANDRA, M. G. S.; MANGAMURI, U. K.; PODHA, S.; CHOI, Y-L. Glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger* FME: Detergente-mediated production, purification, and characterization. Journal of the Korean Society for applied biological chemistry, v. 56, n. 4, pg 427-433, 2013.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. 67 Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry, v. 38, pg. 1599– 1616, 2003.

HAALAND, PD. Experimental design in biotechnology. New York: Marc. Dek. Inc 1989.

HAN, C.; CUI,B.; WANG, Y. Vanadium uptake by biomass of *Coprinus comatus* and their effect on hyperglycemic mice. Biological Trace Element Research, v. 124, n. 1, pg. 35-39, 2008.

HAN, C.; YUAN, J.; WNAG, Y.; LI, L. Hypoglycemic activity of fermented mushroom of *Coprinus comatus* rich in vanadium. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. V. 20, n. 3, pg- 191-196, 2006. DOI: 10.1016/j.jtemb.2006.06.003

HAN, J. R.; AN, C. H.; YUAN, J. M. Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Hericium erinaceum* for degrading starch and upgrading nutritional value. Int J Food Microbiol, v. 1, pg. 61-66, 2003.

HAN, J. R.; AN, C. H.; YUAN, J. M. Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Ganoderma lucidum* for degrading starch and upgrading nutritional value. Journal of Applied Microbiology, v.99, n.4, pg. 910–915, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02672.x>

HASSAN, H.; KARIM, K. A. Optimization of alpha amylase production from rice straw using solid-state fermentation fo *Bacillus subtilis*. International Journal of Science, Environment and Technology, v.4, n.1, pg. 1-16, 2015.

HANSON, J. R. The Chemistry of Fungi. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2008.

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

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.; ERIKSSON, O.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P.M.; LUCKING, R.; THORSTEN,

H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P.; MCLAUGHLIN, D.; POWELL, M.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.; STALPERS, J.; VILGALYS, R.; AIME, M.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.; CASTLEBURY, L.; CROUS, P.; DAI, Y-W.; GAMS, W.; GEISER, D.; GRIFFITH, G.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R.; HYDE, K.; IRONSIDE, J.; KO LJALG, U.; KURTZMAN, C.; LARSSON, K.H.; LICHTWAEDT, R.; LONGCORE, J.; DLIKOWSKA, M.; MILLER, A.; MONCALVO, J-M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASTO, E.; REEB, V.; ROGERS, J.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J.P.; SCHUBLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M. M.; WINKA, K.; YAO, Y-J.; ZHANG, N. A. Higher-level Phylogenetic Classification of the Fungi. *Mycological Research* v.111, pg. 509-547, 2007.

HUR, T-C.; KA, K-H.; JOO, S-H.; TERASHITA, T. Characteristics of the amylase and its related enzymes produced by ectomycorrhizal fungus *Thicholoma matsuke*. *Mycobiology*, v. 29, n. 4, pg. 183-189, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985.

IMEN, O. M.; MAHMOUD, K. Statistical optimization of cultural conditions of an halophilic alpha-amylase production by halophilic *Streptomyces* sp. Grown on orange waste powder. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.4, pg. 685-693, 2015. DOI:10.1016/j.bcab.2015.08.011

JADHAV, S. B.; SINGHAL, R. S. Pullulan-complexed α -amylase and glucosidase in Alginate beads: enhanced entrapment and stability. *Carbohydrate Polymers*, v. 105, pg. 49-56, 2014.

JONATHAN, S. G.; ADEOYO, O. R. Evaluation of ten wild Nigerian mushrooms for amylase and cellulase activities. *Mycobiology*, v. 39, n. 2, pg. 103-108, 2011. DOI: 10.4489/MYCO.2011.39.2.103

KAMMOUN, R.; NAILI, B.; BEJAR, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresource Technology*, v.99, n.13, 2008.

KANAMNENI. U.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid-state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100, n. 2, pg. 168-171, 2005. DOI: 10.1263/jbb.100.168

KIM, S. W.; HWANG, H. J.; XU, C. P.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Effect of aeration and agitation on the production of mycelia biomass and exopolysaccharides in an entomopathogenic fungus *Paecilomyces sinclairii*. *Lett. Appl. Microbiology*, v. 36, pg. 321-326, 2003.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems: an overview. *Critical Review in Biotechnology*, v. 25, pg. 1-30, 2005.

KUEK, C. Shake-flash culture of *Laccaria laccata*, na ectomycorrhizal basidiomycete. *Appl Microbial Biotechnol*, v.45, pg. 319-326, 1996.

KUMAR, P.; SATYANARAYANA, T. Optimization of culture variables for improving glucoamylase production by alginate-entrapped *Thermomucor indicae-seudaticae* using statistical methods. *Bioresource Technology*, v. 98, og. 1252 -1259, 2007.

KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Purification and kinetics of raw starch hydrolyzing thermostable and neural glucoamylase of thermophilic mold *Thermomucor indicae-seudaticae*. *Biotechnol. Progress*, v.19, pg. 936-944, 2003.

KUMAR, V.; SAHAI, V.; BISARIA, V. S. Production of amylases and chlamydospores by *Piriformospora indica*, a root endophytic fungus. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, pg. 124-128, 2012. DOI:10.1016/j.bcab.2012.02.002.

KUMAR, Y.; SINGH, P. K.; SINGH, A. K.; MASI, H.; PETER, J. K.; BENJAMIN, J. C.; RATH, S. Production optimization of alpha amylase from *Bacillus altitudinis*. *International Journal of Scientific Engineering and Technology Research*, v. 3, n.4, pg. 564-573, 2014.

KUSUDA, M.; UEDA, M.; KONISHI, Y.; ARAKI, Y.; YAMANAKA, K.; NAKAZAWA, M.; MIYATAKE, K.; TERASHITA, T. Detection of β -glucosidase as saprotrophic ability from na ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience*, v. 47, pg. 184-189, 2006.

LÉVÊQUE, E.; JANECEK, S.; HAYE, B.; BELARBI, A. *Thermophilic archaeal* amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, pg 3-14, 2000. DOI: 10.1016/S0141-0229(99)00142-8.

LINDEN, A.; MAYANS, O.; MEYER-KLAUCKE, W.; ANTRANIKIAN, G.; WILMANN, M. Differential regulation of a hyperthermophilic amylase with a novel (Ca, Zn) two-metal center by zinc. *J Biol Chem* 278:9875-9884, 2003.

MA, G.; TANG W.; SUN, K.; FENG, E.; LEI, Z. *Coprinus comatus*-based nitrogen-doped active carbon for high performance supercapacitor. *Nano*, v. 12, n.8, 2017. DOI: 10.1142/S179329201750103X

MAAREL, M. J. E. C. van der; VEEN, B. van der; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, v. 94, pg 137-155, 2002.

MANTOVANI, T. R. D.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Effect of the addition of nitrogen sources to cassava fiber and carbon-to-nitrogen ratios on *Agaricus brasiliensis* growth. *Can. J. Microbiol.*, v. 53, pg. 139-143, 2007.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Revista de Microbiologia*, v. 30, pg. 77-84, 1999.

MICHAEL KUO. UNIVERSITY OF ILLINOIS. Disponível em: <https://www.press.uillinois.edu/wordpress/?p=14446>. Acessado em: 18/01/2018 as 06:06.

MILES, P. G., CHANG, S. T. Mushroom biology: concise basics and current developments. Singapore: Word Scientific Publishing, 1997.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., Washington, v. 31, p. 426-429, 1959.

MINOTTO, E.; BERNARDI, E.; WILLE, C. N.; NASCIMENTO, J. S. de. Crescimento micelial de *Agaricus bisporus* em meios de cultivo e substratos alternativos; Revista de la Facultad de Agronomía, la Plata, v. 113, pg. 66-72, 2014.

MISHRA, S.; BEHERA, N. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. African Journal of Biotechnology, v. 7, n. 18, pg. 3326-3331, 2008.

MORRE, D.; ROBSON, G. D.; TRINCI, A. P. J. 21st Century Guidebook to Fungi. Cambridge, UK, 2011.

MUSZYNSKA, B.; KALA, K.; SULKOWSKA-ZIAJA, K.; KRAKOWSHA, A.; OPOKA, W. *Agaricus bisporus* and its in vitro culture as a source of indole compounds released into artificial digestive juices. Food Chemistry, v. 199, pg. 509-515, 2016.

NAILI, B.; SAHNOUN, M.; BEJAR, S.; KAMMOUN, R. Optimization of submerged *Aspergillus oryzae* S2 α -amylase production. Food Science and Biotechnology, v. 25, n. 1, pg. 185-192, 2016.

NAIZMI, A.R., REINISH, T., HINZ, H.J. Ca-binding to *Bacillus licheniformis* α - amylase (BLA). Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 453, pg.16-23, 2006.

NEKIUNAITE, L; ARNTZEN, M. O.; SVENSSON, B.; VAAJE-KOLSTAD, G.; HACHEM, M. A. Lytic polysaccharide monooxygenases and other oxidative enzymes are abundantly secreted by *Aspergillus nidulans* grown on different starches. Biotechnology for Biofuels, v. 9, 2016. DOI: 10.1186/s13068-016-0604-0

NWAGU, T. N.; OKOLO, B. N. Extracellular amylase production of a thermololerant *Fusarium sp.* isolated from eastern Nigerian soil. Brazilian Archives of Biology and Techology, v. 54, n. 4, pg. 649-658, 2011.

ORLANDELLI, R. C.; SANTOS, M. S.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO, J. L. de; PAMPHILE, J. A. Use of agro-industrial wastes as substrates for α -amylase production by endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. Acta Scientiarum. Technology, Maringá, v. 39, n. 3, pg. 255-261, 2017.

OZALP, F. O.; CANBEK, M.; YAMAC, M.; KANBAK, G.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D.; UYANOGLU, M.; SENTURK, H.; KARTKAYA, K.; OGLAKCI, A. Consumption of *Coprinus comatus* polysaccharide extract causes recovery of alcoholic liver damage in rats.

Pharmaceutical Biology, v. 52, n. 8, pg. 994-1002, 2014. DOI: 10.3109/13880209.2013.874536

Palmer T. Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Chemical Chemistry, Horwood Publication, Chichester, 2001.

PALMER, J. J. How to Brew. Editora Natl Book Network., EUA, 2006.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v. 13, pg. 81-84, 2003.

PARENTI, A.; MUGUERZA, E.; IROZ, A. R.; OMARINI, A.; CONDE, E.; ALFARO, M.; CASTANERA, R.; SANTOYO, F.; RAMÍREZ, L.; PIZABARRO, A. G. Induction of laccase activity in the White rot fungus *Pleurotus ostreatus* using water polluted with wheat straw extracts. Bioresource Technology, v. 133, pg. 142-149, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.072.

PASTERNAK, O.; SOCHEN, N.; GUR, Y.; INTRATOR, N.; ASSAF, Y. Free water elimination and mapping from diffusion MRI. Journal Magnetic Resonance in Medicine, v. 62, n. 3, pg. 717-739, 2009. DOI: 10.1002/mrm.22055

PAZ, M. F.; VIEIRA, E.; BREYER, C. A.; GIOVANNI, R. N.; BERTOLDI, F. C. Cultivo de *Pleurotus sajor-caju* em bagaço de uva Isabel. Evidência: Biotecnologia e Alimentos, v.6, pg.187-194, 2006.

PHILIPPOUSSIS, A.; DIAMANTOPOULOU, P. Agro-Food industry wastes and agricultural residues conversion into high value products by mushroom cultivation. Proceeding of 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products – pg. 339-351, 2011.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments, Biometrika, v.33, pg.305–325, 1946.

POLITZER, K.; BON, E. P. da.; ALVES, F. C.; FERRARA, M. A.; FREITAS, S. P.; LEITÃO, V. F.; COSTA, R. B.; SILVA, M. V. A. da. Enzimas Industriais e Especiais: Visão geral da área de enzimas, conclusões e recomendações. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, v. 1, 2006. Disponível em: www.redetec.org.br/wp-content/uploads/2015/02/tr03_enzimas.pdf. Acessado em: 04 de novembro de 2016.

PRAKASAM, V.; KARTHIKAYANI, B.; THIRIBHUVANAMALA, G.; CHANDRASEKAR, G.; VEERALAKSHMI, S.; AHILA, P.; SAKTHIVEL, K.; MALARKODI, B. *Tricholoma giganteum* – A new tropical edible mushroom for commercial cultivation in india. Agro-Food Industry Wastes and Agricultural Residues Conversion into High Value Products by Mushroom Cultivation. pg. 14, 2011.

PROSIEX LTDA. Los hongos basidiomicetos. 2012. Disponível em: <https://inmunosetas.wordpress.com/2012/02/21/los-hongos-basidiomicetos/> Acessado em: 22 de novembro de 2016.

RAMESH, V. MURTY, V. R. Sequential statistical optimization of media components for the production of glucoamylase by thermophilic fungus *Humicola grisea* MTCC 352. Hindawi Publishing Corporation, Enzyme Research, v. 2014, 2014. DOI: /10.1155/2014/317940.

RASHAD, M. M.; ABDU, H. M.; MAHMOUD, A. E.; NOOMAN, M. U. Nutritional analysis and enzyme activities of *Pleurotus ostreatus* cultivated on *Citrus limonium* and *Carica papaya* wastes. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, v.3, n.4, pg. 3352-3360, 2009.

RAZA, Z. A.; REHMAN, A. Optimization of amylase activity in the presence of various metal ions and surfactants in aqueous system. Journal Biochemical Technology, v. 7, n.1, pg. 1058-1062, 2016.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de Alimentos. Editora Blucher, 2ª edição, São Paulo, 2007.

ROLDÁN-CARRILLO, T.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; DÍAZ-CERVANTES, D.; VÁZQUEZ-TORRES, H.; MANZUR-GUZMÁN, A.; TORRES-DOMÍNGUEZ, A. Starch-based plastic polymer degradation by the White rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse pith: enzyme production. Bioresource Technology, v. 86, pg. 1-5, 2003.

ROMÃO, A. S.; SPÓSITO, M. B.; ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W. L. Enzymatic differences between the endophyte *Guignardia mangiferae* (Botryosphaeriaceae) and the citrus pathogen *G. citricarpa*. Genetics and Molecular Research, v. 10, n.1, pg. 243-252, 2011.

ROMERO-ARENAS, O.; GUERRERO, M. A. M.; HUATO, M. A. D.; VALVERDE, B. R.; LÓPEZ-OLGUÍN, F. Production of mushroom Shiitake (*Lentinula edodes* Pegler) in synthetic blocks using agroforestry wastes. Revista Mexicana de Ciências Agrícolas –v. 6, n. 6, 2015.

ROUHANA-TOUBI, A.; WASSER, S. P.; FARES, F. The Shaggy Ink Cap Medicinal Mushroom, *Coprinus comatus* (Higher Basidiomycetes) Extract Induces Apoptosis in Ovarian Cancer Cells via Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathways. International Journal of Medicinal Mushrooms, v.17, n.12, pg. 1127-1136, 2015.

RYTIOJA, J.; HILDÉN, K.; YUZON, J.; HATAKKA, A.; VRIES, R. P. de; MÄKELÄ, M. R. Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 78, pg. 614-649, 2014. DOI: 10.1128/MMBR.00035-14.

S, R. C. R; ANDRADE, C. T., 2000 - Investigação dos processos de gelatinização e extrusão de amido de milho. Polímeros: Ciência e Tecnologia, São Paulo, v. 10, n. 1, pg. 24-30, 2000.

SABOURY, A. A.; KARBASSI, F. Thermodynamic studies on the interaction of calcium ions with alpha-amylase. Thermochemica Acta, v. 362, pg. 121-129, 2000. DOI: 10.1016/S0040-6031(00)00579-7.

SALES-CAMPOS, C.; VIANEZ, B. F.; ABREU, R. L. S. de. Productivity and nutritional composition of *Lentinus strigosus* (Svhwinitz) fries mushroom from the Amazon region cultivated in sawdust supplemented with soy bran. Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products, 2011.

SALLES, P. Avaliação de um reator tipo tambor rotativo para hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado em Engenharia Mecânica, USP, pg.86, 2013.

SARANRAJ, P.; STELLA, D. Fungal amylase – A review. International Journal of Microbiological Research, v. 4, n. 2, pg. 203-211, 2013.

SAXENA, R. K.; DUTT, K.; AGARWAL, L.; NAYYAR, P. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus sp.* PN5. Bioresource Technology, v. 98, n.2, pg. 260–265, 2007. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.01.016

SCHÄFER, T. Discovering new industrial enzymes for food applications. Novel enzyme technology for food applications. Woodhead Publishing in Food Science. Technology and Nutrition, Cambridge England, 2007.

SETHI, S.; GUPTA, S. Isolation, characterization and optimization of cultural conditions for amylase production from fungi. Journal of Global Biosciences. v. 4, n.9, pg. 3356-3363, 2015.

SETHIM B. K.; SATYANARAYAN, S.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. L. Extracellular biosynthesis of amylase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using agro-residues. Journal of Microbiology and Biotechnology Research, v. 4, n. 3, pg. 8-14, 2014.

SHAH, I. J.; GAMI, P. N.; SHUKLA, R. M.; ACHARYA, D. K. Optimization for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using submerged fermentation technology. Basic Research Journal of Microbiology, v. 1, n. 4, pg. 01-10, 2014.

SHELDON, R. A.; PELT, S. van. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. Chem. Soc. Rev., v. 42, 2013. DOI: 10.1039/c3cs60075k.

SHUKLA, R. J.; SINGH, S. P. Structural and catalytic properties of immobilized α -amylase from *Laceyella sacchari* TSI-2. International Journal of Biological Macromolecules, v. 85, pg 208-216, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.12.079

SHUKLA, R. J.; SINGH, S. P. Structural and catalytic properties of immobilized α -amylase from *Laceyella sacchari* TSI-2. International Journal of Biological Macromolecules, v. 85, pg 208-216, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.12.079

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. α -Amylase. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering - Production, Isolation and Purification of Industrial Products, 2017. DOI: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00001-4.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. Food Chemistry, v.81, n.219-231, 2003. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00416-8.

SITARZ, A. K.; MIKKELSEN, J. D.; HØJRUP, P.; MEYER, A. S. Identification of a laccase from *Ganoderma lucidum* CBS 229.93 having potential for enhancing cellulase catalyzed lignocellulose degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, v, 53, pg. 378-385, 2013. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2013.08.003.

SLAWINSKA, A.; KALBARCZYK, J. Evaluation of enzymatic activity of *Pleurotus ostreatus* regarding stages of mycelium development. *Acta Scientiarum Polonorum*, v. 10, n. 2, pg. 195-202, 2011.

SONI, P.; PRASAD, G.S.; BANERJEE U.C. Optimization of physicochemical parameters for the enhancement of carbonyl reductase production by *Candida Viswanathii*. *Bioprocess and Biosyst Eng.*, v.29, n.3, pg. 149-156, 2006.

SOUZA, H. Q. de; OLIVEIRA, L. A. de; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, pg. 116-124, Campinas, SP, 2008.

SPIER, M. R. Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglusidade por fermentação no estado sólido. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, pg.7, 2005.

SPIER, M. R.; BEHSNILIAN, D.; ZIELINSKI, A.; KONIETZNY, U.; GREINER, R. Studies towards the stabilisation of a mushroom phytase produced by submerged cultivation. *The Protein Journal*, v. 34, p. 367-379, 2015.

SPIER, M. R.; SCHEIDT, G. N.; PORTELLA, A. C.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; WOICIECHOWSKI, A. L.; GREINER, R.; SOCCOL, C. R. Increase in phytase synthesis during citric pulp fermentation. *Chemical Engineering Communications*, n. 198, pg 298-297, 2010.

SPIER, M. R.; VANDENBERGHE, L.; MEDEIROS, A. B.; SOCCOL, C. R. Application of different types of bioreactors in bioprocesses. In: P.G. Antolli and Z. Liu. (Org.). *Biobioreactors: design, properties and applications*. 1ed. New York: Nova Science Publishers, Inc., v. 1, pg. 55-90, 2011.

STAHLKE, D.; Mercado Global de Enzimas Industriais. Enzimas na fabricação de alimentos, ABIAM – Associação Brasileira da Indústria e Comércio de Ingredientes e Aditivos para Alimentos, 2015. Disponível em: http://abiam.com.br/workshop-abiam/item/download/15_113baf97f94db0f5ab52eff026d16b9b. Acessado em: 4 de novembro de 2016.

STAJIĆ, M., PERSKY, L., FRIESEM, D., HADAR, Y., WASSER, S.P., NEVO, E., VUKOJEVI, J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme Microb. Technol.*, 38, 65-73, 2006.

STUTZ, H.; ALVAREZ, D. C. Produção de Cogumelos: Uma exoerência na Região Centro-Sul do Paraná. Ed. CRV, 2017.

SUNDARRAM, A., & MURTHY, T. P. K. α -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, v.2, n.4, pg. 166-175, 2014. DOI: 10.12691/jaem-2-4-10

SYED, F.; ALI, K.; ASAD, M. J.; FRAZ, M. G.; KHAN, Z.; IMRAN, M.; TAJ, R.; AHMAD, A. Preparation and characterization of a green nano-support for the covalente immobilization of glucoamylase from *Neurospora sitophila*. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, v. 162, pg. 309-317, 2016. DOI: /10.1016/j.jphotobiol.2016.07.002.

TALEKAR, S.; CHAVARE, S. Optimization of immobilization of α -amulase in Alginate gel and its comparative biochemical studies with free α -amylase. *Recente Research in Science and Technology*, v.4, n.2, pg. 01-05, 2012

TALENS-PERALES, D.; MARIN-NAVARRO, J.; POLAINA, J. Enzymes: functions and characteristics. *Encyclopedia of Food and Health*, pg. 532-538, 2016. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00256-7

TANG, X.; LIU, B.; DENG, Q.; ZHANG, R.; LI, X.; XU, H. Strengthening detoxication impacts of *Coprinus comatus* on nickel and fluoranthene co-cantaminated soil by bacterial inoculation. *Journal of Environmental Management*, v, 206, pg. 633-641, 2018. DOI: 10.1016/j.jenvman.2017.11.009

TANG, Y-J.; SHU, L-W.; LI, H-M.; LI, D-S. Submerged culture of mushrooms in bioreactors – challengs, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technology Biotechnology*, v.45, n. 3, pg. 221-229, 2007.

TATSUMI, E.; KONISHI, Y.; TSUJIYAMA, S. Application of residual polysaccharide-degrading enzymes in dried shiitake mushrooms as na enzyme preparation in food processing. *Biotechnol. Lett.*, 2016. DOI: DOI 10.1007/s10529-016-2176-2

TEIXEIRA, M. V.; FRANCEZ, Y.; COLA, A. P.; OLIVEIRA, D. V.; SILVA, E.; MUTRAN, T. J. Detecção da Presença de Amido em Queijos do Tipo Prato e Mozzarella. *Science in Health*, pg. 79-85, 2014.

TEŠANOVIĆ, K.; PEJIN, B.; ŠIBUL, F.; MATAVULJ, M.; RAŠETA, M.; JANJUŠEVIĆ, L.; KARAMAN, M. A comparative overview of antioxidative properties and phenolic profiles of different fungal origins: fruiting bodies and submerged cultures of *Coprinus comatus* and *Coprinellus truncorum*. *Journal of Food Science and Tecnology*, v. 54, n.2, pg. 430-438, 2017.

TIWARI, S. P.; SRIVASTAVA, R.; SINGH, C. S.; SHUKLA, K.; SINGH, R. K.; SINGH, P.; SINGH, R.; SINGH, N. L.; SHARMA, R. Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. *Journal of Global Biosciences*, v. 4, n. 1, pg. 1886-1901, 2016.

TOMASIK, P.; HORTON, D. Enzymatic conversion of starch. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, v. 68, 2012. DOI: 10.1016/B978-0-12-396523-3.00001-4

TOMAZIC, S.J. Protein stabilization. In: *Biocatalysts for industry. Topic in Applied chemistry*. New York and London: Plenum Press, pg. 330, 1991.

TONINI, R. C. G.; SANTOS, F. dos; ISHIKAWA, N. K.; TAVARES, L. B. B. Utilização de bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis*) Mart. Arecaceae como substrato de frutificação para o cultivo axênico de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler. Revista Brasileira de Biociências, v. 5, pg. 204-206, 2007.

TORRADO, A.; VÁZQUEZ, J.; PRIETO, M.; FUCIÑOS, P.; MONTEMAYOR, M.; PASTRANA, L.; GONZÁLEZ, M.; MURADO, M. Amylase production by *Aspergillus oryzae* in a solid-state bioreactor with fedbatch operation using mussel processing waste waters as feeding medium. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 88, pg. 226-236, 2013.

TORRES LÓPEZ, A. M.; QUINTERO DÍAZ, J. C.; ATEHORTUA GARCÉS, L. Efecto de nutrientes sobre la producción de biomasa del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*. Revista Colombiana de Biotecnología, v. 13, n. 1, pg. 103–109, 2011.

UDDIN, M. R.; FERDOUS, K.; RAHMAN, M. A.; ROY, A. K.; KHAN, M. R. Amylatic Activity of *Agaricus* and Moulds for the Production of Bioethanol. Chemical Engineering and Science, v. 1, n. 1, pg. 7-11, 2013. DOI: 10.12691/ces-1-1-2.

URBEN, A. F. Fatores que afetam a assimilação de nutrientes e produção de princípios ativos nos cogumelos. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL, 2004, Brasília. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, pg. 125-133, 2004.

UZIR, M. H.; DON, M. M. Biochemical Engineering A Concise Introduction. Malasya: Universiti Sains Malaysia, 2007.

VASCONCELOS, N. M. de; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. de S. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, 2013.

VETCHINKINA, E. P.; LOSHCHININA, E. A.; BUROV, A. M.; DYKMAN, L. A.; NIKITINA, V. E. Enzymatic formation of gold nanoparticles by submerged culture of the basidiomycete *Lentinus edodes*. Journal of Biotechnology, v. 182, n. 183, pg. 37-45, 2014.

VITOLLO, M. Industrial uses of enzymes. Biotechnology, v. VI.

VYAS, G.; SHARMA, N. Production and optimization of α -amilase from a novel termoalkalophilic *Bacillus sonorensis* GV2 isolated from mushroom compost. Proc Indian Natn Sci Acad, n 81, pg 1207-1221, 2015. DOI: 10.16943/ptinsa/2015/v81i5/48339.

WAN, J.; LI, Y.; YI, R.; MONGKOLTHANARUK, W.; KINJO, Y.; TERASHITA, T.; YAMANAKA, K.; SHIMOMURA, N.; YAMAGUCHI, T.; AIMI, T. Characterization of the glycoside hydrolase family 15 glucoamylase gene from the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*. Mycoscience, v. 53, pg. 194-202, 2012. DOI: 10.1007/s10267-011-0153-0

WHITEHURST, R. J.; OORT, M. van. Enzymes in food technology. Blackwell Publishing Ltd., 2010.

WISNIEWSKI, A. C.; ALMEIDA, M. A. L. de; PALMAS, M. B.; TAVARES, L. B. B. Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja. Revista Brasileira de Biociências, v. 8, n 3, pg. 285-293, Porto Alegre, RS, 2010.

WU, J.-Z; CHEUNG, P. C. K.; WONG, K.-H; HUANG, N.-L. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. Food Chemical, v. 85, pg. 101-105, 2004.

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. Analytical Biochemistry, v. 351, pg. 146-148, 2006.

YASMIN, F.; ADBULLAH, M.; SETHI, A. A.; SALEEM, H.; NARMEEN, A.; ANSARI, A.; KHAN, S. A.; QADER, S. A. U. Solid state fermentation: A cost effective approach for production of starch liquefying fungal amylase using agro industrial wastes. Sci. Int. (Lahore), v. 28, n, 3, pg. 2703-2706, 2016.

YU, J.; CUI, P.-J.; ZENG, W.-L.; XIE, X.-L.; LIN, G.-B.; ZENG, L. Protective effect of selenium-polysaccharides from the mycelia of *Coprinus comatus* on alloxan-induced oxidative stress in mice. Food Chemistry, v. 117, n.1, pg. 42-47, 2009. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.03.073

ZAGHI JUNIOR, L. L.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Carbon-to-nitrogen ratios for *Agaricus brasiliensis* on the axenic method. Acta Scientiarum, v 32, n. 1, pg. 55-60, 2010.

ZAIDMAN, B.-Z.; WASSER, S.P.; NEVO, E.; MAHAJNA, J. *Coprinus comatus* and *Ganoderma lucidum* interfere with androgen receptor function in LNCaP prostate cancer cells. Molecular Biology Reports, v. 35, n.2, pg. 107-117, 2008.

ZANCAN, L. R.; BARRETO, A. R.; MENEZES, C. R. de. Estudo da produção enzimática fúngica por basidiomicetos cultivados em resíduos lignocelulósicos. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, v. 19, n. 3, pg. 850-860, Santa Maria, RS, 2015. DOI: 105902/2236117018368.

ZHANG, Q.; HAN, Y.; XIAO, H. Microbial α -amylase: A biomolecular overview. Process Biochemistry, 2016. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.11.012.

ZHAO, J.; CHEN, Y. H.; KWAN, H. S. Molecular cloning, characterization, and differential expression of a glucoamylase gene from the basidiomycetous fungus *Lentinula edodes*. Applied and Environmental Microbiology, v. 66, n. 6, pg. 2531-2535, 2000.

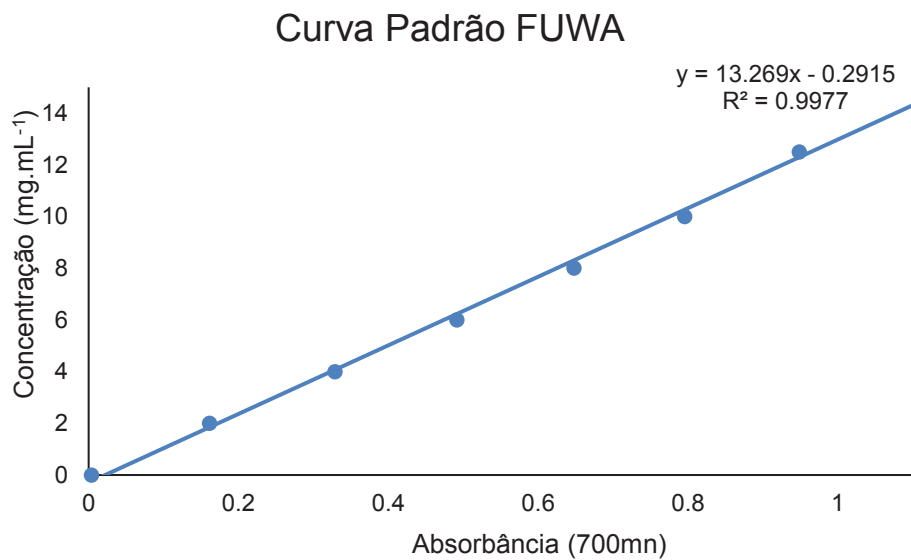
ZHENG, L.; ZHAI, G.; ZHANG, J.; WANG, L.; MA, Z.; JIA, M.; JIA, L. Antihyperlipidemic and hepatoprotective activities of mycelia zinc polysaccharide from *Pholiota nameko* SW-

02. International Journal of Biological Mscromolecules, v. 70, pg. 523-529, 2014. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.07.037.

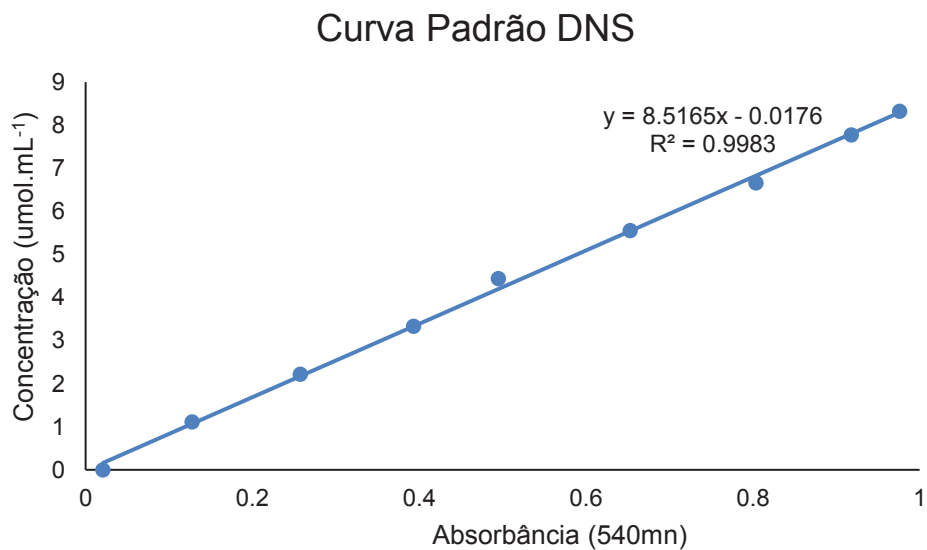
ZHOU, S.; LIU, Y.; YANG, Y.; TANG, Q.; ZHANG, J-S. Hypoglycemic Activity of Polysaccharide from Fruiting Bodies of the Shaggy Ink Cap Medicinal Mushroom, *Coprinus comatus* (Higher Basidiomycetes), on Mice Induced by Alloxan and Its Potential Mechanism. International Journal of Medicinal Mushrooms,v. 17, n. 10, pg. 957-964, 2015.

ANEXOS

ANEXO A - Curva Padrão FUWA



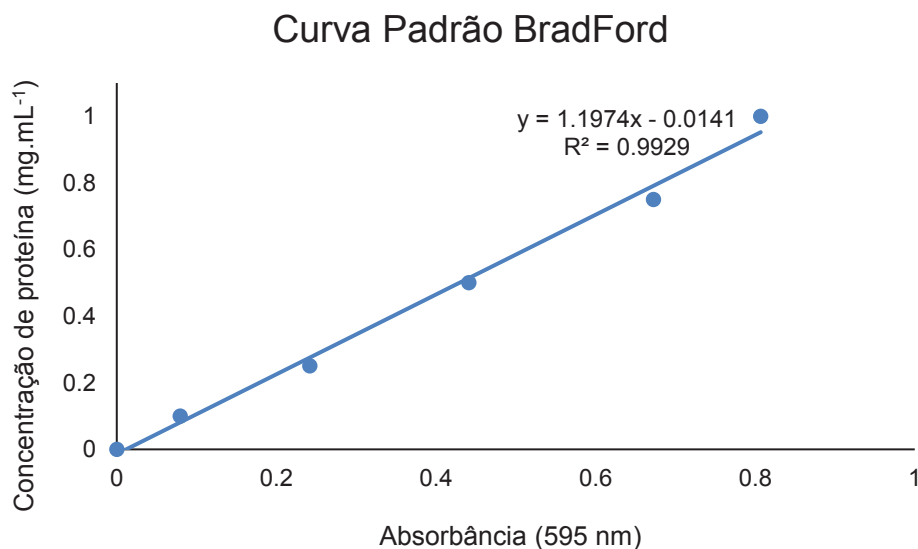
ANEXO B - Curva Padrão DNS



ANEXO C - Preparo do reativo DNS

Para um volume final de 500 mL, dissolveu-se 5 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 100 ml de uma solução de hidróxido de sódio NaOH 2 M recém preparada (solução A). Paralelamente a este preparo, realizou-se a dissolução de 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 250 mL, sobre aquecimento e agitação constantes (solução B). Mantendo as condições de aquecimento e agitação adicionou-se a solução A sobre a solução B, até que houvesse a completa dissolução do DNS. Logo após o resfriamento da solução está foi transferida para um balão de 500 mL e seu volume aferido com água destilada. O reagente foi armazenado em um frasco âmbar, envolto em papel alumínio para evitar o contato com a luz. (VASCONCELOS et al., 2013; SPIER, 2005).

ANEXO D – Curva Padrão BradFord



ANEXO E - Preparo do reativo de BradFord

Em balança analítica pesar 50 mg de Coomassie brilliant blue G250 e dissolver em 25 mL de etanol, em seguida deixar *overnight*. A esta solução deve-se adicionar 50 mL de ácido fosfórico (85%), transferir de forma analítica para um balão volumétrico de 500mL e após, completar o volume com água milli-Q. A solução deve ser filtrada duas vezes e mantida ao abrigo da luz (em frasco âmbar envolto por papel alumínio).