

Atividade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam)

COSTA, Samira Tenório Cavalcante
ABREU-LIMA, Thiago Lucas
CARREIRO, Solange Cristina

Resumo

As amilases são enzimas que hidrolisam amido e podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana, sendo que as de origem microbiana são particularmente importantes por sua utilização em inúmeros processos industriais. O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade amilolítica de leveduras isoladas de batata-doce. Foi testada a capacidade amilolítica de 98 linhagens em meio sólido contendo amido solúvel, sendo que 16 apresentaram resultado positivo. Para essas 16 linhagens foi avaliado o índice enzimático (IE) em meio sólido com amido solúvel, amido de milho ou amido de mandioca. Os valores de IE variaram de 2,10 a 3,53 e, aparentemente, o tipo de amido não influenciou a capacidade amilolítica das linhagens. A produção de α -amilase e glicoamilase das 16 linhagens foram avaliadas em cultivo submerso contendo 2% de amido solúvel e foram obtidos valores entre 0,010 e 0,48 U/mL para α -amilase, com os máximos valores atingidos após 48 horas de cultivo. Nenhuma das linhagens apresentou atividade para glicoamilase.

Palavras-chave: leveduras, batata-doce, índice enzimático, α -amilase, glicoamilase .

Abstract

Amylases are enzymes that hydrolyze starch and can be produced by vegetables, animals or microorganisms, being those one from microorganisms particularly important for your role in industrial processes. The aim of this work was to assess the amylolytic capacity by yeasts isolated from sweet potato. It was tested the amylolytic capacity from 98 strains in solid medium with soluble starch, being that only 16 showed positive results. To these 16 it was assessed the enzymatic index (EI) in solid medium with soluble starch, corn starch or cassava starch. The EI values vary among 2.10 and 3.53 and, apparently, the source of starch does not influence the amylolytic capacity of the strains. The α -amylase and glucoamylase production by the 16 strains were assessed in submerged cultures with 2% of soluble starch and it was obtained values among 0.010 and 0.48 U/mL of α -amylase, with maximum values after 48 hours from cultivation. No strain showed glucoamylase activity.

Keywords: yeasts, sweet potato, enzymatic index, α -amylase, glucoamylase

I. Introdução

As amilases são enzimas que hidrolisam o amido liberando diversos produtos como dextrinas, maltose e glicose. O é composto pelos polissacarídeos amilose (15-20%) e amilopectina (80-85%) (HARGER et al., 1982). As amilases catalisam a hidrólise de ligações α -1,4 glicosídicas de polissacarídeos ou seus produtos de degradação. Sobre o amido, atuam liberando diversos produtos incluindo dextrinas e progressivamente polímeros ainda menores compostos de unidades de glicose (GUPTA et al., 2003).

No organismo humano, as amilases são produzidas na saliva e no pâncreas, mas elas também são produzidas por diversos fungos, bactérias e vegetais. A liquefação do amido por estas enzimas tem constituído a unidade operacional mais cara do processo de sacarificação. Assim, no campo da biotecnologia pesquisas sobre a produção de α -amilases termoestáveis de menor custo são recomendadas (SOUZA et al., 1996).

As amilases representam 25% do mercado de enzimas e encontram aplicações em todos os processos industriais que necessitam da hidrólise parcial ou completa do amido (SAXENA et al., 2007). As amilases encontram diversas aplicações biotecnológicas na indústria química, na indústria de alimentos e bebidas e também na indústria farmacêutica (GUPTA et al., 2003; PANDEY et al., 2005; SOCCOL et al., 2005).

De acordo com Gupta et al. (2003), as amilases podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, que rompem as ligações no interior da cadeia (endoamilases); as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glicoamilases, as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato.

As endoamilases catalisam a hidrólise de forma aleatória no interior da molécula do amido quebrando as ligações glicosídicas α -1,4 presentes na parte interna das cadeias de amilose ou amilopectina. Essa ação causa a formação de cadeias lineares de oligossacarídeos de vários comprimentos.

As α -amilases constituem uma família de hidrolases encontrada de eubactérias a eucariotos, agem na molécula de amido e polímeros assemelhados sendo responsáveis pela sua solubilização e é a endoamilase mais conhecida (NIELSEN; BORCHERT, 2000; OUDJERIOUAT et al., 2003).

As exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1,4, como a α -amilase ou ambas as ligações α -1,4 e α -1,6, como a glicoamilase. Outros exemplos de exoamilases são a ciclodextrina glicosiltransferase e a α -amilase maltogênica (PANDEY et al., 2005).

A β -amilase pode ser encontrada em vegetais e em algumas bactérias gram-positivas e atua como exo-hidrolase na penúltima ligação α -1,4-glicosídica do amido, glicogênio e oligossacarídeos relacionados, removendo a partir da extremidade não redutora da cadeia sucessivas unidades de β -maltose, com inversão da configuração do carbono anomérico inicial do açúcar liberado (PUJADAS et al., 1996).

A glicoamilase é responsável pela hidrólise sucessiva dos resíduos de glicose terminal dos finais não redutores das cadeias de amido. Também atua nos pontos de ramificação α -1,6-D-glicosídeo, mas com uma velocidade muito menor. Os produtos de reação são glicose e pequenas quantidades de polissacarídeos (MARC; ENGASSER, 1987). Assim como a α -amilase, a glicoamilase é mais ativa em cadeias longas do que curtas (FOGARTY; KELLY, 1980).

As leveduras, assim como os fungos filamentosos, estão espalhadas pelos mais distintos ecossistemas. Essa diversidade de ambientes habitados por esses micro-organismos tem possibilitado aos pesquisadores o isolamento de espécies com características desejáveis para a indústria (SKORUPA et al., 2002). É de grande interesse biotecnológico o isolamento e identificação de microrganismos potenciais produtores de enzimas, pois garante o suprimento destas aos variados processos industriais, desenvolvendo sistemas enzimáticos ímpares (ALVES et al., 2002). Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de produção de amilases por leveduras isoladas da batata-doce.

II. Metodologia

Para o isolamento das leveduras foram utilizadas 10 cultivares de batata-doce desenvolvidas pela UFT. As cultivares utilizadas foram Ana Clara (AC), Amanda (AM), Bárbara (BAR), Beatriz (BEA), Carolina Vitória (CV), Duda (DD), Izabela (IZA), Juliana (JU), Lívia (LIV) e Marcela (MAR) e uma ba-

tata de cada cultivar compôs uma unidade amostral.

As batatas foram lavadas com água e sabão e trituradas em um triturador de bancada previamente higienizado com água e sabão e sanitizado com álcool 70%. O caldo obtido da trituração foi coletado em frascos Erlenmeyer previamente esterilizados

em autoclave e 100 µL foram semeados (com auxílio de alça de Drigalski) em placas de Petri contendo meio Sabouraud-glicose (2% de glicose, 1% de peptonina, 0,5% de extrato de levedura e 1,8% de ágar), adicionado de 0,02% de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25°C por 48 horas. O plaqueamento foi feito em três repetições para cada variedade de batata-doce.

Após incubação as colônias obtidas que apresentaram características morfológicas de leveduras foram purificadas pela técnica de esgotamento por estrias múltiplas utilizando-se o mesmo meio de isolamento. As placas foram incubadas a 25°C por 48 horas. Cada cultura recebeu uma codificação e foi armazenada a -20°C. As características morfológicas macroscópicas que prevaleceram entre a maioria das colônias foram a cor branca, brilho opaco, forma circular, margem regular, superfície rugosa, elevação vulcão e consistência

seca seguindo o método de Yarrow (1998) e por meio de observação microscópica a partir de lâminas a fresco foram registradas forma e tamanho das células.

Para verificar a capacidade amilolítica das leveduras as linhagens foram inoculadas, com o auxílio de uma alça tipo agulha, em placas de Petri contendo meio composto por 2% de amido solúvel, 0,5% de extrato de levedura e 1,8% de ágar. Foram inoculadas 6 linhagens por placa e as placas foram incubadas à 25°C durante 5 dias. Após esse período as placas foram tratadas com vapor de iodo para a revelação dos halos de hidrólise. A figura 1 mostra a visualização dos halos de hidrólise após tratamento com vapor de iodo (SOUZA et al., 2011).

Todas as leveduras que apresentaram resultado positivo no teste de triagem foram testadas em três diferentes tipos de amido: amido solúvel, amido de milho e amido de mandioca. Foi utilizado o mesmo

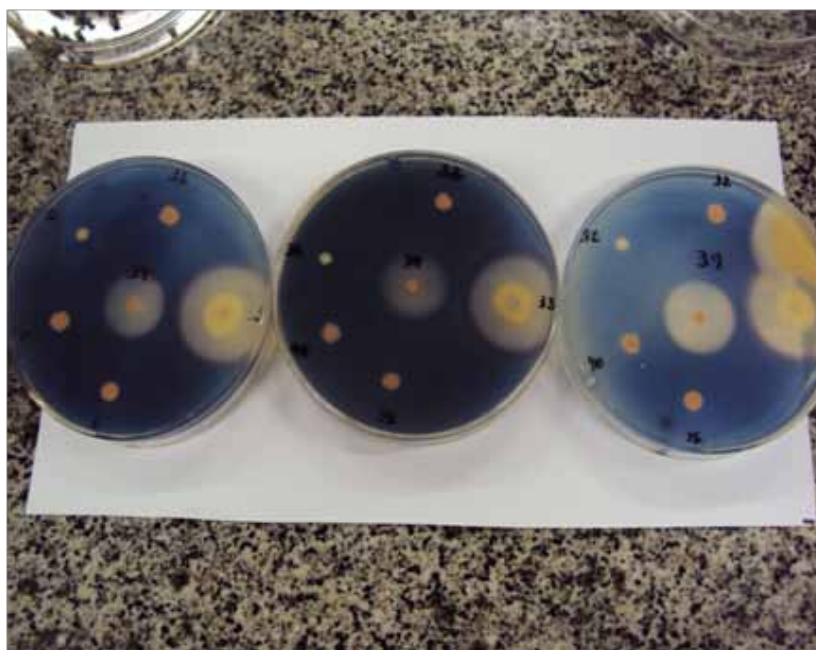


Figura 1 – Foto dos halos de degradação do meio com amido solúvel.

meio de cultura descrito acima seguindo-se o mesmo procedimento, variando-se o tipo de amido. Os diâmetros dos halos de hidrólise e das colônias foram medidos com paquímetro digital e a atividade enzimática foi expressa como índice enzimático (IE), que é dado pela relação entre o diâmetro médio dos halos de hidrólise e o diâmetro médio das colônias, segundo Hankin & Anagnostakis (1975). Todos ensaios foram realizados em três repetições.

O delineamento experimental consistiu de 48 tratamentos e três repetições. Os tratamentos foram

analisados em um esquema fatorial 16X3, representados por 16 linhagens e três tipos de amido (amido solúvel, amido de milho e amido de mandioca). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância usando-se o programa ASSISTAT - versão 7,5 beta 2008.

Todas as linhagens que apresentaram valores de $IE \geq 2,0$ foram submetidas aos testes para produção de amilase em fermentação submersa. As fermentações foram conduzidas em frascos erlenmeyer contendo 100 mL de meio estéril composto por 2% de

amido solúvel e 0,5% de extrato de levedura em tampão acetato de sódio 0,5 M (pH 5,5). A concentração celular inicial foi de 4g/L (peso úmido) e os frascos foram mantidos a 30°C sob agitação (150 rpm) por 120 horas. Alíquotas de 10 mL foram retiradas assepticamente em intervalos de 24 horas e submetidas a centrifugação (10.000 g) por 20 minutos em centrífuga refrigerada (5°C). A biomassa foi desprezada e o sobrenadante (extrato enzimático bruto) foi armazenado sob refrigeração (4°C) durante 24 horas. Cada fermentação foi realizada em três repetições e todos os procedimentos de pesagem da biomassa e retirada das alíquotas foram realizados dentro da câmara de fluxo laminar.

A atividade enzimática foi determinada após incubação do extrato enzimático bruto com uma solução de amido 0,5% (p/v). A mistura reacional foi composta de 500 µL de solução de amido solúvel a 0,5% (p/v), 200 µL de tampão acetato de sódio 0,5 M (pH 5,5) e 300 µL de extrato enzimático bruto. Após

30 minutos a 40°C a reação foi paralisada com choque térmico imergindo os tubos em água a 1°C e foram retiradas alíquotas da mistura reacional para determinação da atividade de α -amilase e glicoamilase.

A atividade de α -amilase foi determinada espectrofotometricamente medindo-se a variação da intensidade da cor do complexo iodo-amido segundo o método descrito por Fuwa (1954).

Uma unidade de α -amilase (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 0,1 mg de amido por mL por minuto nas condições de ensaio.

A atividade de glicoamilase foi determinada espectrofotometricamente pela dosagem da glicose liberada através do método da glicose oxidase, utilizando um kit comercial (LabTest).

Uma unidade de glicoamilase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por mL por minuto nas condições de ensaio.

III. Resultados e Discussão

Metodologias para se avaliar a habilidade dos micro-organismos em produzir enzimas extracelulares em meio sólido, sendo que o uso de meio sólido são particularmente úteis porque permitem a triagem de uma grande quantidade de micro-organismos ao mesmo tempo, embora na maioria das vezes não permitam uma

eficiente quantificação das enzimas produzidas (LIN et al., 1991; NETO; CUNHA 1987).

No teste de triagem, das 98 leveduras apenas 16 linhagens (16,3%) foram consideradas positivas para a atividade amilolítica, sendo que 75% dessas (12 linhagens) foram isoladas das cultivares AC, LIV e MAR (Tabela 1).

Cultivares de batata-doce	Total de isolados	Total de isolados positivos
AC	10	4
AM	8	0
BAR	11	0
BEA	9	1
CV	15	1
DD	8	0
IZA	8	0
JU	8	2
LIV	11	4
MAR	10	4
TOTAL	98	16

Tabela 1 – Resultados da triagem enzimática em meio sólido



As demais leveduras apesar de se desenvolverem no meio com amido como única fonte de carbono, não mostraram nenhum indício de atividade amilolítica além dos limites da colônia, sendo consideradas negativas para o teste. A baixa porcentagem de leveduras produtoras de amilases está de acordo com os resultados encontrados por Landell et al (2009) que, analisando o perfil enzimático das linhagens obtidas de bromélias, verificou que apenas 13% apresentaram resultado positivo para amilases.

Mautone (2008) obteve valores próximos a 30% de linhagens amilolíticas ao isolar 175 leveduras a partir de figueiras e Oliveira et al. (2006) obtiveram 29,7% de isolados amilolíticos para isolados de rizóbia de feijão caupi e soja. Essa variação pode ser explicada pela diversidade dos habitats dos quais os micro-organismos foram isolados.

O crescimento de micro-organismos em meio que possui amido como única fonte de carbono sugere que todos os isolados produzam amilase extracelular, uma vez que a molécula de amido não penetra na célula microbiana devido ao seu alto peso molecular. Dessa for-

ma, pode-se sugerir que todos os micro-organismos isolados possuem atividade amilolítica mas para algumas linhagens as enzimas não difundiram-se no meio de cultura, podendo ter ficado adsorvidas à parede celular ou no espaço periplasmático, o que não permite a formação de halo de hidrólise (SALYERS et al., 1996).

As 16 linhagens que apresentaram resultado positivo nos testes de triagem foram submetidas a testes em meio sólido com três tipos de amido. Valores de IE variaram entre 2,10 e 3,53 (Tabela 2).

Do ponto de vista prático, existem várias propostas para determinar a atividade enzimática por difusão radial em meio sólido. Os fatores determinantes que viabilizam esta seleção incluem a correlação direta entre o tamanho do halo e a capacidade degradativa dos micro-organismos (CESKA, 1971; HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975; LIN et al., 1991). Lealem & Gashe (1994) recomendam um valor de índice de atividade enzimática $\geq 2,0$ para se considerar um micro-organismo como produtor potencial de enzimas em meio sólido. As 16 linhagens testadas apresentaram valores médios de IE $\geq 2,1$ nos três diferentes tipos de amido (Tabela 2).

Linhagens	Índice Enzimático (IE)		
	AS	AMI	AMA
CV4	3,53 aA	3,47 aB	3,53 aA
AC6	2,67 bA	2,65 bA	2,53 bB
MAR3	2,10 cB	2,11 cAB	2,13 cA
LIV4	2,10 cA	2,11 cA	2,10 cA
LIV7	2,10 cA	2,10 cA	2,10 cA
LIV9	2,11 cA	2,10 cA	2,11 cA
AC1	2,12 cA	2,11 cA	2,11 cA
AC2	2,12 cA	2,11 cA	2,12 cA
AC4	2,10 cA	2,10 cA	2,11 cA
JU2	2,10 cA	2,11 cA	2,10 cA
JU4	2,10 cA	2,12 cA	2,13 cA
BEA7	2,11 cA	2,11 cA	2,13 cA
MAR2	2,12 cA	2,13 cA	2,11 cA
LIV2	2,10 cA	2,10 cA	2,11 cA
MAR7	2,10 cA	2,11 cA	2,10 cA
MAR11	2,11 cA	2,11 cA	2,12 cA

Tabela 2. Valores dos índices enzimáticos em três diferentes tipos de amido (média de três repetições)

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,05$).

AS= Amido solúvel; AMI= Amido de milho; AMA= Amido de mandioca.

Esses resultados corroboram com os dados de Oliveira et al. (2007) que obtiveram $IE \geq 2,1$, assim como os estudos de Silva et al. (2009) no qual as bactérias isoladas do feijão caupi apresentaram $IE \geq 2,0$.

Ao avaliar os índices enzimáticos nos diferentes tipos de amido, para cada linhagem individualmente, observou-se que para a linhagem CV4 o IE foi menor no meio com amido de milho e igual nos meios com amido solúvel e amido de mandioca. Nesses resultados, assim como nos resultados encontrados por Silva et al (2006), verificou-se que houve diferença no IE para um mesmo micro-organismo em diferentes tipos de amido. Para a linhagem AC6 o IE foi menor no meio com amido de mandioca e para a linhagem MAR3 o IE para o amido de milho foi estatisticamente igual aos meios com amido solúvel e amido de mandioca. Para todas as outras linhagens os IEs não diferiram estatisticamente entre os tipos de amido.

Segundo Teather & Wood (1990) o índice enzimático (IE) pode ser utilizado como uma medida útil para selecionar linhagens dentro de uma mesma espécie ou como um parâmetro simples e rápido para selecionar mutantes, o que foi verificado com sucesso por esses mesmos autores em linhagens de bactérias. As diferenças observadas nos IE de acordo com o tipo de amido podem estar relacionadas à própria estrutura do amido que é diferente em função da origem do polissacarídeo. As enzimas amilolíticas podem ou não agir sobre o grânulo de amido conforme o tamanho bem como a cristalinidade do mesmo e a proporção de amilose. A proporção relativa de amilose e amilopectina varia consideravelmente de acordo com a origem da planta, o amido do milho por exemplo apresenta 28% de amilose e 72% de amilopectina, enquanto que o amido da mandioca 17 e 83% respectivamente (SWINKELS, 1985).

De acordo com Dreher et al (1984) a própria associação entre os componentes do grânulo de amido o torna mais ou menos susceptível ao ataque das enzimas. Huber & Bemiller (2001) relatam que a porosidade dos grânulos de amido é outro fator que também pode influenciar a forma de atuação da enzima sobre o meio.

A atividade amilolítica em meio sólido para as linhagens AC6 e CV4 se mostrou maior quando comparada aos valores encontrados por Stamford (1998) que obteve para isolados de tubérculos de jacatupé, IE de 1,3 e 2,0 para *Aspergillus* sp e *Mucor* sp respectivamente. Soares et al. (2010) obtiveram valores de IE inferiores a 2,0 em linhagens mutantes de *Aspergillus*

nidulans. No entanto Stamford (1998) encontrou IE de 5,6 para *Aspergillus oryzae*.

Comparando as linhagens entre si, observou-se que os maiores IE foram obtidos para a CV4 e AC6 nos três tipos de amido, sendo essas linhagens consideradas as mais promissoras para a produção de amilase.

Como nem sempre ocorre uma relação direta entre a produção de enzimas extracelulares em placa e a produção em meio líquido (SOARES et al.,1999), foram testadas para produção de amilases em fermentação submersa todas as 16 linhagens, por apresentarem $IE \geq 2,0$.

Das 16 linhagens submetidas à fermentação submersa, apenas as linhagens AC6 e CV4 apresentaram atividade de α -amilase superior a 0,22. As demais linhagens apresentaram valores de atividade muito baixos ou não detectáveis (Tabela 3).

Observou-se que tanto a linhagem AC6 como a CV4 obtiveram o máximo de atividade com 48 horas de fermentação. Uma possível explicação para este fato pode ser que os produtos finais formados pela reação tenham tido efeito retroinibidor na atividade da α -amilase (TORO, 2006).

A baixa atividade enzimática observada nos demais isolados que também apresentaram halos de hidrólise em meio sólido pode ser explicada pela retenção das enzimas no espaço periplasmático, o que dificulta a detecção de atividade nos extratos brutos livres de células.

Observou-se que os maiores valores de atividade de α -amilase foram de 0,48 U/mL e 0,22 U/mL com 48 horas de fermentação, obtidos para as linhagens AC6 e CV4 respectivamente. A atividade de 0,22 U/mL obtida pela linhagem CV4 está de acordo com os valores de atividade obtidos por Wanderley et al (2004) que atingiram o valor máximo de 0,25 U/mL de α -amilase após 24 horas de incubação para a levedura *Cryptococcus flavus*. Almeida et al (2009) obtiveram valores abaixo de 0,20 U/mL para atividade dextrinizante de *Aspergillus awamori*.

O tempo de máxima produção de α -amilase também coincide com os resultados relatados por Galdino (2008), que ao avaliar um recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* contendo o gene de *C. flavus*, registrou atividade amilolítica máxima em 48 horas de cultivo. Do mesmo modo, Fernandes et al. (2007) relatam que as atividades específicas dextrinizantes mais elevadas para o fungo *Macrophomina phaseolina* foram detectadas nos tempos de 24 e 48 horas com diminuição dessas atividades nos tempos de 72 e 96 horas. Porém,



Linhagens	Atividade de α -amilase (U/mL)				
	24h	48h	72h	96h	120h
AC6	ND	0,48	0,05	0,022	0,06
CV4	0,01	0,22	0,04	0,055	0,0275
LIV2	0,02	0,012	0,03	0,06	0,041
LIV4	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01
LIV7	ND	0,04	0,021	0,016	0,013
LIV9	ND	0,018	0,06	0,032	0,021
AC1	ND	0,02	0,017	0,01	0,013
AC2	ND	0,06	0,02	0,014	0,023
AC4	0,013	0,011	0,02	0,01	ND
JU2	0,014	0,01	0,01	0,012	0,011
JU4	0,016	0,024	0,01	0,05	0,021
BEA7	0,012	0,025	0,023	0,09	ND
MAR2	ND	0,26	ND	0,04	0,01
MAR3	0,01	0,035	0,0175	0,00875	0,004375
MAR7	0,02	0,06	0,031	0,023	0,011
MAR11	0,01	ND	0,08	0,02	ND

ND = Não detectável.

Tabela 3. Resultados da atividade de α -amilase (média de três repetições).

Arsenen et al. (1998) e Cruz et al. (1997), obtiveram a maior produção de α -amilase com tempos de cultivo a partir de 96 horas para *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizopus* sp.

Comparativamente a outros micro-organismos, a atividade de 0,48 U/mL apresentada pela linhagem AC6 é superior a atividade de 0,31 U/mL de α -amilase encontrada por Oliveira et al. (2007) em isolados de rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato e é inferior à registrada por Estremote et al. (2009) que obtiveram atividade amilolítica de 12,70 U/mL para rizóbios isolados de solo cultivado com produtos amiláceos.

Resultados superiores de atividade também foram obtidos por Carvalho et al. (2004) que relataram para a bactéria *Bacillus* sp (61 U/mL) e por Ronaszek et al. (2000) para linhagens fúngicas (46 U/mL).

Quanto a expressão de glicoamilase, as linhagens apresentaram atividade muito baixa ou esta não foi detectada. Spencer-Martin & Van Uden (1985) afir-

mam que são poucas as leveduras capazes de produzir α -amilase e glicoamilase ao mesmo tempo. Relatos na literatura destacam que a glicoamilase na maioria das vezes é produzida principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. e *Endomyces* sp. (SOCCOL et al., 2005). Assim como Pandey et al. (2005) destacam as espécies de fungos *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. saitri*, *A. terreus*, *A. foetidus* e *Rhizopus foetidus* e *R. delemer* como bons produtores de glicoamilase. Vihinen & Mäntsälä (1989) afirmam que os fungos filamentosos são os micro-organismos considerados como melhores produtores de glicoamilase. Produções muito baixas de glicoamilase (0,07 U/mL) em bactérias cultivadas por 72 horas utilizando farelo de trigo como substrato foram encontradas por Raba-lho (2002).

Novos estudos utilizando outras condições de cultivo submerso para as linhagens AC6 e CV4 devem ser realizados na tentativa de atingir maiores valores de atividade enzimática.

IV. Conclusões

Do total de 98 isolados de 10 variedades de batata-doce, apenas duas linhagens (CV4 e AC6) se destacaram com os maiores valores de IEs nos

três tipos de amido. Essas duas linhagens mostraram potencial para a produção de α -amilase em meio contendo amido solúvel. Como a tendência

mostrada em vários estudos empregados para o isolamento de leveduras é que as populações são comumente dominadas por poucos gêneros mas

abundantes espécies, faz-se necessária a identificação das linhagens selecionadas e estudos sobre a fisiologia das mesmas.

V. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, M.C.O. et al. Análise da produção de amiloglicosidase e alfa-amilase por *Aspergillus awamori* através de fermentação batelada em frascos agitados. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Faculdade de Ciência e Tecnologia de Montes Claros-FACIT. São João dos Montes Claros, MG, 2009.

ALVES, M. H. et al. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal Microbiology*, v. 33, n. 4, p. 225-230, 2002.

ESTREMOTE, M. et al. Seleção de micro-organismos produtores de enzimas: xilanase e amilases. Projeto de Iniciação Científica. Curso de Zootecnia. Faculdade de Engenharia, Campus de Ilha Solteira, SP. 2009.

ARSENEN, S. et al. Increased production of α -amilase from *Thermomyces lanuginosus* by the addition of Tween 80 – Evolutionary implications. *Enzyme Microbial Technology*. V. 4, p. 249-252, 1988.

CARVALHO, A.F.A. et al. Isolamento e seleção de linhagens termofílicas produtoras de amilases. VI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. Anais Enzitec. 2004. Rio de Janeiro: Enzitec, v. 1, 2004.

CESKA, M. Enzyme catalysis of solidified media. *European Journal Biochemistry*, v.22, p.186-192, 1971.

CRUZ, R. et al. Relationship between carbon source, production and pater action of α -amilase from *Rhizopus* sp. *Revista de Microbiologia*, v. 28, p.101-105, 1997.

DREHER, M.L.; DREHER, C.J.; BERRY, J.W. Starch digestibility of foods: A nutritional perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.37, n.1, p.47-53, 1984.

FERNANDES, L.P. et al. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, vol. IV (1), 43-51, 2007.

FOGARTY, W.M; KELLY, C.T. Amylases, amyloglicosidases and related gluconases. In: ROSE, A.H. *Economic microbiology – microbial enzymes and bioconversions*. London, Academic Press, vol.5, 1980.

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

GALDINO, S.G. Clonagem e expressão de uma α -amilase de *Cryptococcus Flavus* e sua aplicação na degradação do amido. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). UNB. p. 123, 2008.

GUPTA, R. et al. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. *Process Biochemistry*. v. 38, n.11, p. 1-18, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em 25 Out. 2010.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilases Fúngica. In: *Bioquímica das Fermentações*, p. 56, 1982.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, v. 67, n. 3, p. 597 607, 1975.

HUBER, K.C.; BEMILLER, J.N. Visualization of channels and cavities of cornand sorghum starch granules. *Cereal Chemistry*, v. 74, p. 537-541, 2001.

LANDELL, M. F. et al. *Cryptococcus bromeliarum* sp. nov., an orange-coloured basidiomycetous yeast isolated from bromeliads in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (Online)*, v. 59, p. 910-913, 2009.



- LEALEM, F.; GASHE, B.A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef. (*Eraglostis tef.*). *Journal of Applied Bacteriology*, v. 77, p. 348-352, 1994.
- LIN, J.E.; CHANG, D.C.N.; SHEN, G.J. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. *Biotechniques*, v. 5, n.4, p.275-280, 1991.
- MARC, A.; ENGASSER, J.M. Kinetics and Modelling of starch saccharification by glucoamylase. IISHEB, 1987.
- MAUTONE, J.N. Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de folhas de figueiras do parque Itapoã, RS, Brasil. Dissertação de mestrado. PUCRS, Porto Alegre. 2008.
- NETO, J.A.; CUNHA, B.C. de A. Método rápido para a triagem de fungos amilolíticos e seus mutantes. *Revista de Microbiologia*, v. 18, p. 264-268, 1987.
- NIELSEN, J.E.; BORCHERT, T.V. Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1543 : 253-274. 2000.
- OLIVEIRA, A.N. et al. Produção de amilases por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 1, Mar. 2006.
- OLIVEIRA, A.N. et al. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 1, Mar. 2007.
- OUDJERIOUAT, N. et al. On the mechanism of α -amylase: Acarbose and cyclodextrin inhibition of barley amylase isozymes. *European Journal Biochemistry*, v. 270, p. 3871-3879, 2003.
- PANDEY, A. et al. *Enzyme Technology*. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, p. 760, 2005.
- PUJADAS, G. et al. Evolution of β -amylase: Patterns of variation and conservation in subfamily sequences in relation to parsimony mechanisms. *Proteins*, v.25, n.4, p.456-472, 1996.
- RABALHO, A.A. Isolamento de linhagens microbianas termofílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca. Dissertação de mestrado. UNESP. p.184, São José do Rio Preto, 2002.
- RONASZEK, G. et al. Screening the strains of thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* for amylolytic for amylolytic activities. *Acta Alimentaria*, v. 29 (1), p. 71-79, 2000.
- SALYERS, A.A.; REEVES, A.; D'ELIA, J. Solving the problem of how to eat something as big as yourself: Diverse bacterial strategies for degrading polysaccharides. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 17, p. 470-476, 1996.
- SAXENA, R.K. et al. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 2, p. 260-265, 2007.
- SILVA, V.N. et al. Co-inoculação de sementes de caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pela planta. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.36, n.2, p.95-99, 2006.
- SILVA, M. das Dores. et al. Fixação biológica do N₂ em feijão-caupi sob diferentes doses e fontes de fósforo solúvel. *Bioscience Journal*, 2009.
- SOARES, M.M.C.N.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, V. 30, p. 225-230, 1999.
- SOARES, I.A. et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol.30, n.3 Cited [2010-12-13], pp. 700-705, 2010.
- SOUZA, E.L. et al. Produção e Caracterização de α -Amilase Produzida por *Rhizopus* sp. In: *Archives of Biology and Technology*, v. 39 (4). p. 831-839. Dez, 1996.

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*, Campinas, 2011.

SOCCOL, C.R. et al. Glucoamylase. In: *Enzyme Technology*. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., p. 221-230, 2005.

SKORUPA, P.N.; MORAES, L.M.P.; TORRES, F.A.G. Caracterização de novas variantes de leveduras *Cryptococcus flavus* isolada da biodiversidade do Cerrado brasileiro. Pirenópolis, GO, Brasil, 2002.

SPENCER-MARTIN, I.; VAN UDEN, N. Inactivation of archive glucose transport in *Candida wickerhamii* is triggered by exocellular glucose. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 277-279, 1985.

STAMFORD T.L.M.; ARAUJO J.M.; STAMFORD M.P. Atividade enzimática de micro-organismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 18:382-385, 1998.

SWINKELS, J.J.M. Sources of starch, its chemistry and physics In: Van BEYNUM, G.M.A.; ROELS, J.A.

Starch conversion technology. New York: Marcel Dekker, Inc., p.15-46, 1985.

TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology* .43:777-780, 1990.

TORO, A.A. Caracterização de proteínas de reserva de mutantes de endosperma de milho de alta lisina. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba,, 250 p. 2006.

VIHINEN, M.; MÄNTSÄLÄ, P. Microbial Amylolytic Enzymes. Issue, v. 24, p. 329-418, 1989.

WANDERLEY, K.J. et al. Biochemical characterization of α -amilase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *Fems Microbiology letters*, v.231, p.165-169, 2004.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. (eds) *The Yeasts, taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science, p.77-100, 1998.