
**PROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMOTOLERANTES E TERMOFÍLICOS DE
DISTINTOS MATERIAIS COLETADOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS E ANÁLISE DE
POTENCIAIS PRODUTORES DE AMILASES**

Prospection of thermotolerant and thermophilic filamentous of different materials collected in Minas Gerais state and selection of potential amilolytic production

Vivian Machado Benassi¹
Aline Almeida¹

Resumo: As amilases são enzimas produzidas por muitos organismos, como plantas, animais e micro-organismos, sendo utilizadas em diversos processos industriais, como no processamento de amido; na produção de etanol, xaropes de glicose e de frutose; indústria têxtil; na fabricação de cerveja e indústrias de papel. **Objetivos:** isolar e caracterizar fungos filamentosos coletados de diferentes materiais no estado de Minas Gerais, Brasil, e, avaliar o potencial de produção de amilases pelos micro-organismos. **Metodologia:** coletaram-se oito amostras, sendo inoculadas em meio sólido, a 30°C, para isolamento de fungos filamentosos. Em seguida, analisou-se as características morfológicas e o possível gênero dos micro-organismos. Para análise de termofilia, os fungos foram cultivados em meio sólido Batata-Dextrose-Ágar de 30°C a 55°C, com intervalo de 5°C, seguindo o cálculo da taxa de crescimento por hora, após 48 horas de desenvolvimento. A análise de potenciais amilolíticos foi realizada com o cultivo de dez isolados em meio submerso, na temperatura ótima de cada micro-organismo, seguindo a determinação de amilases. **Resultados:** isolaram-se quarenta e oito fungos filamentosos de diferentes aspectos morfológicos, sendo possível identificar alguns fungos isolados com os gêneros: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rizoctonia*, *Mucor* e *Acremonio*. Os maiores níveis de atividade enzimática foram observados pelo *Mucor* sp. AD742 e pelo *Rhizoctonia* sp. AQ832. **Conclusões:** neste estudo, os fungos isolados apresentaram valores de atividade amilolítica expressivas, sendo um deles obtido da área de campo rupestre ferruginoso degradado e outro correspondente ao campo rupestre quartzítico.

Palavras-chave: Bioprospecção; Fungos Filamentosos; Amilase; Biodiversidade.

¹ Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Autor para correspondência: Vivian Machado Benassi.
E-mail: vivian.benassi@ict.ufvjm.edu.br

Artigo recebido em: 06/03/2018.
Artigo aceito em: 26/06/2018.
Artigo publicado em: 09/01/2019.

Abstract: amylases are enzymes produced by many organisms, such as plants, animals, and microorganisms, and are used in a variety of industrial processes, such as starch processing, ethanol production, glucose and fructose syrups, textile industry, the manufacture of beer and paper industries.

Objectives: isolate and characterize filamentous fungi collected from different materials in the state of Minas Gerais, Brazil, and evaluate the potential of amylases production by microorganisms. **Methodology:** eight samples were collected and inoculated in a solid medium at 30°C for the isolation of filamentous fungi, after which the morphological characteristics and the possible genus of the microorganisms were analyzed. For thermophilic analysis, the fungi were cultivated in Potato-Dextrose-Agar solid medium from 30°C to 55°C, with an interval of 5°C, following the calculation of the growth rate per hour, after 48 hours of development. The analysis of amylolytic potentials was carried out with the cultivation of ten isolates in submerged medium at the optimal temperature of each microorganism, following the determination of amylases. **Results:** forty-eight filamentous fungi were isolated from different morphological aspects, being possible to identify some isolated fungi with the genus *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rizoctonia*, *Mucor* and *Acremonio*. The highest levels of enzymatic activity were observed by *Mucor* sp. AD742 and *Rhizoctonia* sp. AQ832. **Conclusions:** in this study, isolates showed significant amylolytic activity values, one of them being obtained from the degraded ferruginous rupestrian field area and another corresponding to the quartzite rock field.

Keywords: Bioprospecting; Filamentous fungi; Amylase; Biodiversity.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países mais

biodiversos do planeta, incluindo os fungos filamentosos que são encontrados em toda a cobertura vegetal natural do solo, entretanto, há poucos estudos acerca dessa diversidade¹.

Os micro-organismos são dotados de um imenso potencial de degradação de matéria orgânica por colonizarem diversos *habitats* como solos, compostos em decomposição, águas, plantas, entre outros. Essa diversidade de *habitats* garantiu a esses organismos, evolutivamente, a capacidade de sintetizar uma série de enzimas com diferentes características² como as amilases, que, atualmente, são utilizadas em processos industriais por catalisarem, de forma específica, o substrato amido, sendo utilizada nas indústrias alimentícias, têxteis, de papel, farmacêutica, de detergentes, entre outras³.

Vale ressaltar que, a maioria das enzimas utilizadas na indústria possui origem microbiana devido à

Capacidade de produção destas em elevadas quantidades, em curtos períodos de tempo, por apresentarem alta facilidade de extração, além da possibilidade de manipulação genética dos organismos produtores⁴. Dessa forma, faz-se necessário uma bioprospecção de fungos filamentosos em diferentes ambientes, incluindo a procura por novas fontes de enzimas de valor industrial⁵⁻⁶.

Os fungos incluem seres de dimensões consideráveis como os cogumelos e muitas formas microscópicas, como bolores e leveduras. São eucarióticos, e, por utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono e energia, são denominados quimioheterotróficos⁷. Ao considerar estas características e que estes organismos colonizam diversos ambientes, o presente trabalho objetivou isolar fungos filamentosos coletados em diferentes localidades, avaliá-los quanto à temperatura de crescimento, bem como verificar os potenciais produtores de amilases.

METODOLOGIA

Coleta de amostras e isolamento de fungos filamentosos

Coletaram-se amostras de quatros locais distintos em Minas Gerais: i. área de aterro sanitário desativada; ii. área de campo rupestre ferruginoso conservado; iii. área de campo rupestre ferruginoso degradado, iv. área de campo rupestre quartzítico, além de duas frações de mandioca em estágio de deterioração.

A primeira área de coleta tratou-se de um lixão, desativado no ano de 2011, localizado dentro dos limites da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, *campus* Diamantina, MG, situada nas coordenadas 651181 W e 7986500 S, altitude 1.296,1 m. A área é caracterizada por frações bem definidas de vegetação com grande diversidade de

espécies, apresentando árvores de grande e médio porte, além da presença de gramíneas nativas e exóticas bem estabelecidas (Figura 1-A)⁸.

Nas áreas relacionadas aos campos rupestres, predominou-se vegetação associada à afloramentos rochosos. No campo rupestre ferruginoso conservado, observou-se vegetação herbácea, arbustiva e abundante quantidade de ferro, cuja oxidação conferiu coloração avermelhada sobre a camada superficial intemperizada (Figura 1-B), e, na área de campo degradado, localizado nas coordenadas 0666920 W e 7905464 S, houve a predominância da gramínea *Melinis minutiflora* P. Beauv. (capim gordura) (Figura 1-C), enquanto que, o campo rupestre quartzítico, localizado à 06510044 W 7910854 S, apresentou quartzo associado, principalmente, às gramíneas nativas (Figura 1-D).

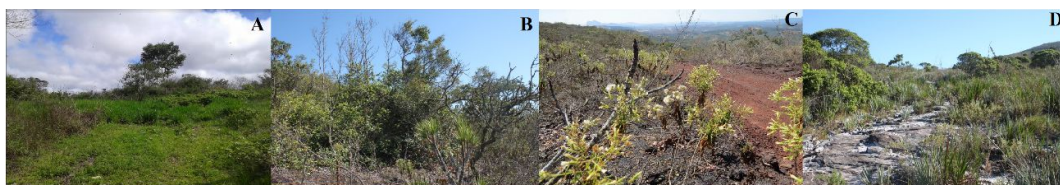


Figura 1: A. Área de lixão desativado. B. Campo Rupestre Ferruginoso Conservado. C. Campo Rupestre Ferruginoso Degradado. D. Campo Rupestre Quartzítico.

As coletas em campo foram realizadas, de forma asséptica, objetivando abranger toda área amostral, sendo retiradas 10 amostras de cada local das áreas de campo rupestres e 6 amostras da área de lixão. O isolamento dos fungos foi realizado em meio de cultura, proposto por Emerson (1941)⁹, mantidas em estufa bacteriológica à 30°C, durante quatro dias, sendo analisado o crescimento de fungos filamentosos a cada 24 horas.

A nomenclatura utilizada para os isolados foi associada à pessoa que fez a coleta, local da coleta, dia do isolamento e quantidade de isolados no dia, sendo que L, se relaciona ao lixão desativado; M, amostra de mandioca; C, à área de campo rupestre ferruginoso conservado; D, ao campo rupestre ferruginoso degradado, e, Q, ao campo rupestre quartzítico.

Análise das características macroscópica e microscópica dos fungos isolados

Os fungos filamentosos foram repicados em meio de cultivo⁹ a 30°C, durante 4 dias. Analisou-se as características morfológicas macroscópicas quanto ao tamanho, textura, pigmentação, superfície, borda, topografia e cor da colônia.

O microcultivo foi realizado de acordo com a técnica de Riddell (1950)¹⁰, utilizando-se o meio de cultivo Ágar Sabouraud Dextrosado Prodímol[®], a 30°C, por cinco dias, para a visualização das estruturas de frutificação, as quais, associadas às características morfológicas, permitem a possível identificação do gênero dos fungos filamentosos.

Análise da temperatura de crescimento em meio de cultura sólido

Analisou-se a temperatura de crescimento dos fungos filamentosos em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) Himedia[®], de 30°C a 55°C, com intervalo de 5°C, durante 48 horas, sendo calculada a taxa de crescimento fúngico em cm.h⁻¹.

Seleção dos fungos filamentosos: potenciais produtores amilolíticos

Selecionaram-se dez fungos filamentosos que apresentaram maior taxa de crescimento por hora, os quais foram cultivados em 25 mL meio de cultura submerso CP¹¹, contidos em Erlenmeyers de 125 mL, durante cinco dias, em estufa bacteriológica, de forma estacionária, na temperatura ideal de crescimento de cada isolado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Coleta, isolamento, análise das características morfológicas e o possível gênero dos fungos filamentosos

A bioprospecção é a pesquisa da biodiversidade de uma região caracterizando-se pela exploração sistemática e legal da diversidade de vida existente em qualquer local do meio ambiente, que intenciona o enriquecimento de recursos genéticos e bioquímicos para fins tecnológicos¹³.

Após o tempo de crescimento fúngico, o extrato bruto enzimático foi obtido através de filtração a vácuo. Os filtrados, contendo as enzimas extracelulares, foram submetidos à medição do pH, volume (mL) e quantificação da atividade amilolítica, utilizando-se substrato amido 1% (m/v) em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, a 55°C¹².

O método foi previamente padronizado por uma curva padrão de glicose (0,1 a 1,0 mg/mL), sendo a unidade de atividade definida como a quantidade de enzima que hidrolisa um μmol de substrato por minuto, nas condições de ensaio. A atividade enzimática foi expressa em U.mL⁻¹.

Pode-se observar que, a partir das amostras coletadas, isolaram-se quarenta e oito fungos filamentosos, dos quais, dezesseis foram obtidos da área de lixão, vinte e dois das áreas de campo rupestre. Destes, sete foram isolados do campo ferruginoso conservado; seis da área degradada e nove do campo quartzítico, assim como, da mandioca, em estágio de decomposição, foram isolados dez fungos filamentosos.

Cerca de 52% dos isolados apresentaram textura algodonosa; 14,6% pulverulenta; 12,5% granulosa; 8,3% butirosa e aveludada, enquanto que

somente dois deles (AQ843 e AD743) apresentaram textura camurça, representando 4,2% dos isolados. Com relação à topografia, observou-se que, a maioria dos isolados apresentou característica convexa, três deles (AC641, AQ843 e AC651) pregueada e apenas dois isolados (AD741 e AQ852) com característica umbilicada.

Visualizou-se a presença de pigmentação em doze isolados, com grande variação na cor. A maior parte dos isolados apresentou superfície lisa, no entanto, os isolados das frações da mandioca (AM431, AM451, AM552, AM456, AM521) apresentaram textura granulosa, e, a característica fissurada, foi observada em AC641, AC651, AQ841, AQ843.

A partir do microcultivo, foi possível visualizar estruturas reprodutivas em 83% dos isolados, sendo associado a oito gêneros: *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Mucor* e *Rhizoctonia*.

As características dos gêneros *Rhizopus* e *Aspergillus* foram observadas em 42% dos isolados, sendo que os fungos AL131, AL132, AL221, KL141, KL221, KL241, KL322,

AD731, AD751, AQ831 possuíram estruturas semelhantes a esporangióforo, aderida ao esporângio, contendo esporangiósporos imóveis e presença de rizóides nas extremidades das hifas (Figura 2).

Por sua vez, os fungos filamentosos, identificados como AC643, AC651, AC652, AC661, AC662, AD743, AD752, AQ842, AQ843, AQ844, AQ852 e AQ853, tratam-se, possivelmente, do gênero *Aspergillus*, sendo que esses microorganismos apresentam facilidade de cultivo em laboratório, além de grande importância econômica¹⁴ (Figura 2).

Os isolados AD742 e AD751 foram caracterizados como *Mucor*, muitos dos quais possuem potencialidade de desenvolver morfologias vegetativas diferentes em resposta às situações ambientais¹⁵ (Figura 2). Por outro lado, a estrutura vegetativa assexuada, que caracteriza o gênero *Penicillium*, foi observada nos isolados AC661, AC662, AD741, sendo possível visualizar fiáides e conídios de formato arredondado, sustentados pelo conidióforo (Figura 2).

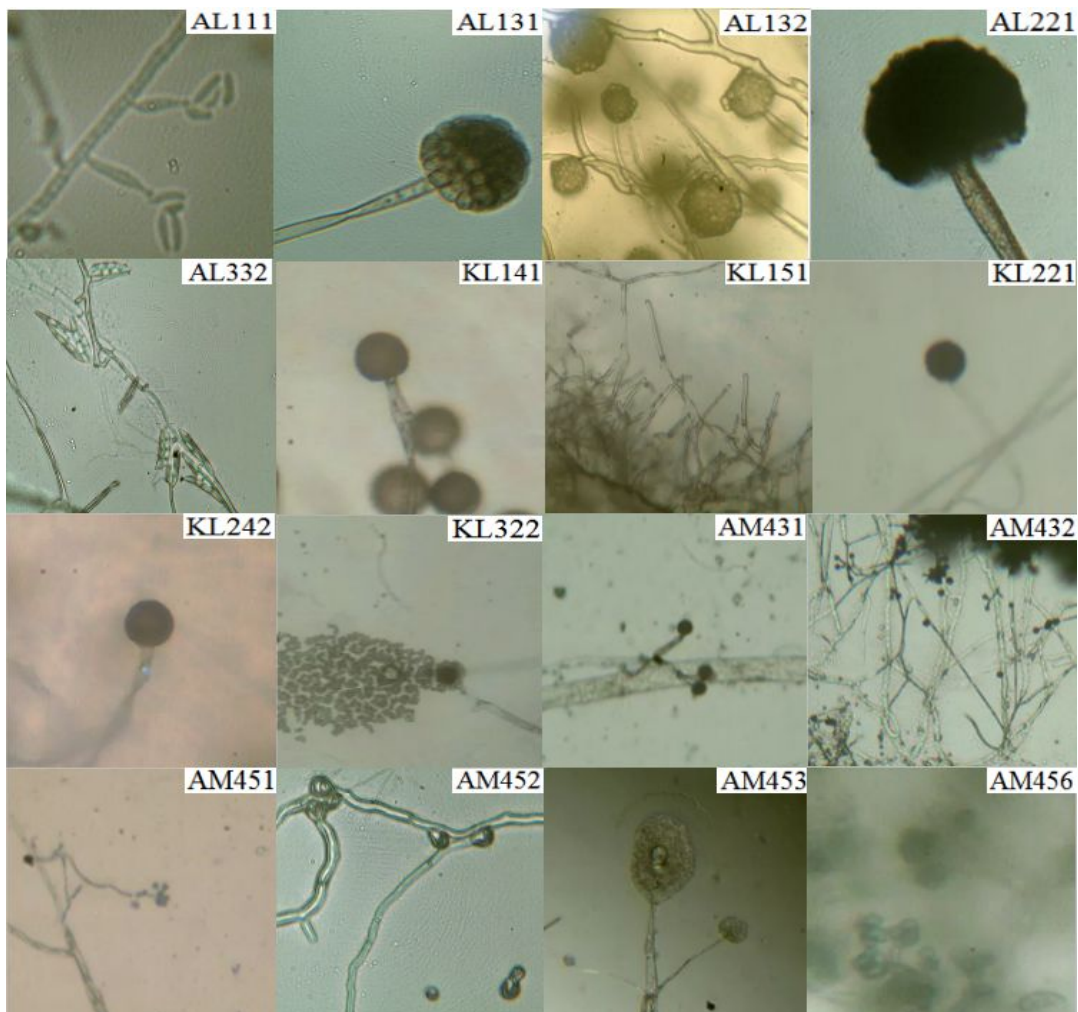
Os fungos filamentosos identificados como AL111 e AL332

apresentaram esporos transparentes e alongados ao longo da hifa, semelhantes aos que caracterizam o gênero *Fusarium*, da classe Sordariomycetes, pertencente ao filo Ascomycota, que agrupa, de forma geral, espécies que produzem manchas brancas, rentes ao substrato,

agrupadas em aglomerados. Na observação dos micro-organismos AM552 e AQ832, foi possível visualizar hifas de espessura considerável, formando ângulo de 90° no seu brotamento, características condizentes com o gênero *Rhizoctonia* (Figura 2).

PROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
TERMOTOLERANTES E TERMOFÍLICOS DE
DISTINTOS MATERIAIS COLETADOS NO ESTADO
DE MINAS GERAIS E ANÁLISE DE POTENCIAIS
PRODUTORES DE AMILASES

BENASSI, V. M.



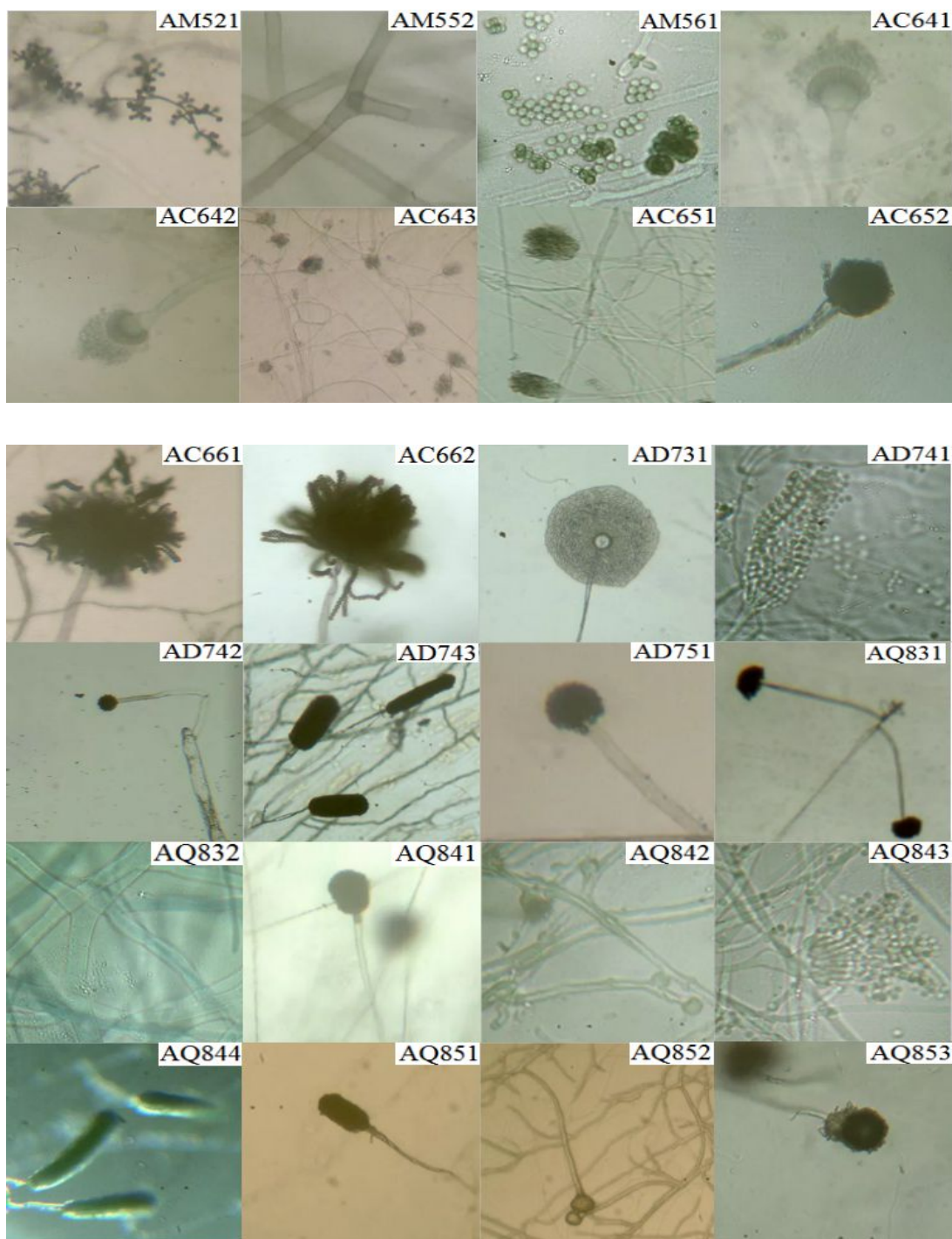


Figura 2: Microscopia óptica de luz dos fungos filamentosos isolados nos aumentos de 100x e 400x utilizando programa *Mias 2008*.

Vale citar que, os fungos filamentosos isolados da mandioca

(AM456, AM521, AM432 e AM451) apresentaram estruturas que podem associá-los ao gênero *Trichoderma*, caracterizados por parasitarem outros fungos e colonizarem amplamente o ambiente¹⁶. Por fim, para os isolados da área de lixão, identificados como KL121, KL122, KL123, KL151, KL241, KL321, KL341 e os do campo rupestre quartzítico AQ841 e AQ851, não foi possível visualizar esporos para associá-los a gêneros conhecidos.

Determinação da temperatura de crescimento dos fungos filamentosos isolados de distintos materiais

Os resultados, para esta análise, mostraram que os isolados *Rhizopus* sp. AL131 e *Rhizopus* sp. AL221 apresentaram maior crescimento em relação aos demais quando cultivados a 30°C e 35°C, obtendo-se a maior taxa de crescimento o *Rhizopus* sp. AL131 com 0,149 cm.h⁻¹ a 30°C, observando-se uma

queda na taxa de crescimento de 87%, quando submetidos a 35°C. No entanto, nesta temperatura, os isolados KL123 e AM521 não apresentaram crescimento (Tabela 1).

Na temperatura de 40°C, pode-se observar uma queda significativa no crescimento dos fungos, sendo que os isolados AL131, AL332, KL123, KL151, KL242 e KL321 não apresentaram crescimento. Enquanto que, a 45°C, a taxa de crescimento cessou em 42% dos isolados (Tabela 1).

Vale citar que, nenhum isolado, coletado no lixão e nas frações de mandioca, apresentou crescimento quando submetidos a 45°C. Enquanto que, os isolados, coletados nos campos rupestres (AC651, AD741 e AQ853), cresceram à temperatura de 50°C, porém estes isolados não apresentaram crescimentos quando submetidos a 55°C (Tabela 1).

Tabela 1: Taxa de crescimento (cm.h^{-1}) dos fungos filamentosos isolados em diferentes temperaturas em meio de cultura sólido Batata-Dextrose-Ágar.

Isolados	Temperatura									
	30°C		35°C		40°C		45°C		50°C	
AL111	0,0196	±0,0020	0,0084	±0,0012	0,0010	±0,0000	-	-	-	-
AL131	0,1494	±0,0050	0,1618	±0,0012	0,0947	±0,0151	-	-	-	-
AL132	0,0580	±0,0026	0,0530	±0,0012	-	-	-	-	-	-
AL221	0,1440	±0,0140	0,1542	±0,0036	0,0413	±0,0057	-	-	-	-
AL332	0,0118	±0,0016	0,0070	±0,0012	-	-	-	-	-	-
KL121	0,0215	±0,0012	0,0056	±0,0006	0,0010	0,0000	-	-	-	-
KL122	0,0237	±0,0015	0,0070	±0,0012	0,0014	0,0006	-	-	-	-
KL123	0,0219	±0,0052	-	-	-	-	-	-	-	-
KL141	0,0470	±0,0020	0,0056	±0,0006	0,0010	0,0000	-	-	-	-
KL151	0,0212	±0,0030	0,0042	±0,0000	-	-	-	-	-	-
KL221	0,0463	±0,0025	0,0351	±0,0033	0,0156	0,0052	-	-	-	-
KL241	0,0700	±0,0036	0,0120	±0,0022	0,0198	0,0018	-	-	-	-
KL242	0,0465	±0,0016	0,0024	±0,0006	-	-	-	-	-	-
KL321	0,0823	±0,0083	0,0115	±0,0015	-	-	-	-	-	-
KL322	0,0552	±0,0021	0,0288	±0,0022	0,0010	±0,0000	-	-	-	-
KL341	0,1013	±0,0147	0,0535	±0,0162	0,0339	±0,0037	-	-	-	-
AM431	0,0534	±0,0011	0,0829	±0,0024	0,0026	±0,0005	-	-	-	-
AM432	0,0491	±0,0026	0,0070	±0,0012	0,0021	±0,0000	-	-	-	-
AM433	0,0576	±0,0061	0,0257	±0,0006	0,0028	±0,0006	-	-	-	-
AM451	0,0472	±0,0039	0,0056	±0,0012	0,0010	±0,0000	-	-	-	-
AM452	0,0316	±0,0006	0,0020	±0,0000	0,0010	±0,0000	-	-	-	-
AM453	0,0497	±0,0006	0,0309	±0,0078	-	-	-	-	-	-
AM456	0,0413	±0,0026	0,0063	±0,0036	0,0010	±0,0000	-	-	-	-
AM521	0,0479	±0,0028	-	-	-	-	-	-	-	-
AM552	0,0546	±0,0071	0,0729	±0,0006	0,0010	±0,0000	-	-	-	-
AM561	0,0514	±0,0022	0,0020	±0,0000	0,0010	±0,0000	-	-	-	-
AC641	0,0230	±0,0022	0,0483	±0,0000	0,0233	±0,0022	-	-	-	-
AC642	0,0250	±0,0010	0,0457	±0,0034	0,0212	±0,0006	-	-	-	-
AC643	0,0257	±0,0016	0,0536	±0,0052	0,0212	±0,0006	-	-	-	-
AC651	0,0222	±0,0015	0,0517	±0,0018	0,0233	±0,0006	0,0010	±0,0005	0,0060	±0,0005
AC652	0,0193	±0,0051	0,0497	±0,0020	0,0257	±0,0006	-	-	-	-
AC661	0,0267	±0,0016	0,0243	±0,0042	0,0097	±0,0016	-	-	-	-
AC662	0,0233	±0,0026	0,0243	±0,0000	0,0094	±0,0010	-	-	-	-
AD731	0,0475	±0,0022	0,0464	±0,0037	0,0024	±0,0006	-	-	-	-
AD741	0,0150	±0,0015	0,0222	±0,0005	0,0238	±0,0021	0,0098	±0,0005	0,0017	±0,0005
AD742	0,0504	±0,0016	0,0962	±0,0000	0,0451	±0,0030	-	-	-	-
AD743	0,0229	±0,0026	0,0344	±0,0006	0,0281	±0,0028	-	-	-	-
AD751	0,0489	±0,0050	0,0500	±0,0000	0,0289	±0,0016	-	-	-	-
AD752	0,0632	±0,0050	0,0806	±0,0000	0,0792	±0,0048	-	-	-	-
AQ831	0,0503	±0,0030	0,0611	±0,0032	0,0627	±0,0030	0,0626	±0,0060	-	-
AQ832	0,1006	±0,0109	0,0319	±0,0012	0,0104	±0,0000	-	-	-	-
AQ841	0,0295	±0,0006	0,0340	±0,0022	0,0201	±0,0012	0,0057	±0,0000	-	-
AQ842	0,0267	±0,0051	0,0253	±0,0042	0,0130	±0,0037	-	-	-	-
AQ843	0,0156	±0,0016	0,0319	±0,0006	0,0250	±0,0018	-	-	-	-
AQ844	0,0319	±0,0012	0,0222	±0,0033	0,0160	±0,0026	-	-	-	-
AQ851	0,0260	±0,0017	0,0337	±0,0022	0,0139	±0,0030	-	-	-	-
AQ852	0,0264	±0,0016	0,0285	±0,0026	0,0063	±0,0010	-	-	-	-
AQ853	0,0375	±0,0006	0,0319	±0,0012	0,0210	±0,0025	0,0036	±0,0010	0,0021	±0,0010

Micro-organismos produtores de amilases

Selecionaram-se dez fungos filamentosos com maior taxa de crescimento no meio de cultura sólido Batata-Dextrose-Ágar, sendo esses: AL131, AL221, AM431, AM456, AM552, AC651, AD742, AD752, AQ831, AQ832, os quais foram cultivados em meio de cultura, contendo

amido como fonte de carbono, para análise da produção amilolítica.

Pode-se observar que, os fungos filamentosos *Mucor* sp. AD742 e *Rhizoctonia* sp. AQ832 apresentaram maior atividade da amilase, 1,68 U.mL⁻¹ e 1,44 U.mL⁻¹, respectivamente, seguidos dos micro-organismos AL131 e AL221, que apresentaram uma atividade semelhante (Figura 3).

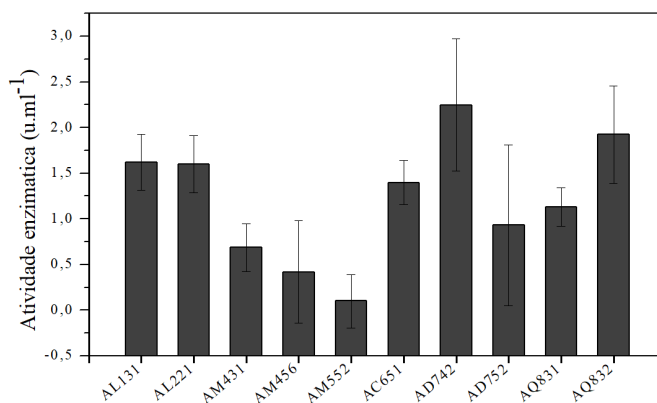


Figura 3: Atividade amilolítica dos fungos filamentosos isolados em meio de cultura submerso, contendo amido como fonte de carbono.

DISCUSSÃO

As pesquisas em áreas naturais são necessárias para se mapear novos organismos, e, cada vez mais, trabalhos vêm destacando a importância de

prospecção de fungos filamentosos¹⁷, visto que estes representam uma rica importância em recursos genéticos para aplicação em inúmeros processos e produtos biotecnológicos³. Neste contexto, o isolamento e seleção de

fungos filamentosos facilita a descoberta de potenciais produtores de enzimas com características desejáveis em processos industriais.

A busca por espécies fúngicas tem sido um importante aliado para a descoberta de novos metabólitos, sendo que a adaptação metabólica dessas espécies a diversificados *habitats* pode levar ao desenvolvimento de rotas Biosintéticas especializadas, e, proporcionar a produção de compostos com estruturas únicas e atividade biológica diferenciada¹⁸.

No trabalho de Luz e colaboradores (2016)¹⁹, coletaram-se dez amostras na região de Minas Gerais, obtendo trinta e seis diferentes micro-organismos, os quais apresentaram potencial biotecnológico, sendo que 53% dos isolados mostraram atividade amilolítica. Entretanto, no trabalho de Gonçalves e colaboradores (2016)²⁰, ao se explorar a diversidade fúngica, associada a diferentes altitudes de rochas no deserto do Atacama, foi possível a obtenção de 81 isolados com características diferentes, dentre os quais, o gênero *Penicillium* apresentou maior significância.

Os diversos metabólitos secretados por micro-organismos possuem múltiplas finalidades. Atualmente, essa exploração resulta na

obtenção de enzimas microbianas²¹, exopolissacarídeos²², amilases com alta estabilidade e especificidade²³.

As amilases são capazes de hidrolisar as ligações *O*-glicosídicas do amido, sendo classificadas em dois grandes grupos, de acordo com seu mecanismo de ação: as endoamilases, hidrolisam o amido no interior da molécula, rompendo ligações do tipo α -1,4 e α -1,6, resultando, assim, em oligossacarídeos de diversos comprimentos, e, as exoamilases, atuam nas ligações mais externas do substrato, a partir da extremidade não redutora, formando produtos de baixa massa molecular³.

Ressalta-se que, dentre as amilases de origem microbiana, principalmente, as α -amilases possuem importante participação na hidrólise do amido encontrado em abundância na natureza²⁴. A produção dessas enzimas, por fungos filamentosos, varia de acordo com o gênero e a espécie envolvida²⁵. Muitas espécies de *Arpergillus*, *Fusarium*, *Lipomyces*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Rhizomu* expressam genes de α -amilase e glucoamilases²⁶. Entretanto, vale citar que, a maioria dos estudos sobre fungos, que produzem α -amilase, são limitados a algumas espécies mesofílicas.

A identificação de espécies

atualmente é realizada por biologia molecular, sendo uma forma mais moderna e precisa¹⁸. Entretanto, observação microscópica possui relevância quando se procedem à identificação de fungos filamentosos²⁻⁷, além de existir determinadas características macroscópicas que permitem uma primeira identificação dos gêneros dos fungos filamentosos. Como exemplo, pode-se referir que os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* possuem rápido crescimento com colônias brancas e formação de tufos verdes ou amarelos no decorrer de sete dias de crescimento²⁷.

Sabe-se que o sistema vegetativo de fungos filamentosos é constituído por hifas que formam o micélio, contendo septos regulares ou não. As hifas, geralmente, são oriundas de esporos que germinam em condições de temperatura e umidade ideais. Sendo assim, a observação microscópica é fundamental para classificação desses fungos, permitindo a identificação do gênero, e, muitas vezes, da espécie².

De acordo com Pelczar, Chan e Krieg (1997)²⁸, os organismos podem ser considerados psicrófilos, mesófilos e técnica que, na maioria das vezes, é

termófilos, conforme a temperatura ideal de crescimento.

Os organismos psicrófilos crescem, preferencialmente, dentro de 15°C a 20°C, podendo desenvolver-se em temperaturas mais baixas, enquanto que os mesófilos, que envolvem a maioria dos micro-organismos relatados na literatura, crescem, preferencialmente, em temperaturas entre 25°C a 40°C. Assim, de acordo com autor, os isolados identificados como AC642, AC651, AD741, AD752, AQ831 e AQ 841 são classificados como termotolerantes, sendo que os AC651, AD741 e AQ853 cresceram à temperatura de 50°C, enquanto que os demais isolados das amostras, oriundas do lixão e mandioca, foram considerados mesófilos.

Outra característica interessante observada nos isolados foi a presença de pigmentação excretada por doze isolados, caracterizando como uma potencial fonte de pigmentos naturais e uma alternativa às fontes atualmente utilizadas, despertando o interesse de vários segmentos¹⁸.

A fermentação submersa é a utilizada nos países ocidentais para a

produção de enzimas devido à facilidade de crescimento dos micro-organismos em condições controladas como temperatura e pH, acrescido da facilidade de recuperação das enzimas extracelulares, mostrando-se satisfatória para a seleção inicial do melhor produtor enzimático²⁹.

A atividade amilolítica extracelular no meio CP¹¹, observada para o fungo *Rhizopus oryzae*, segundo Almeida (2015)³⁰, foi de 2,8 U.mL⁻¹, valor pouco superior aos observados para os fungos, neste trabalho, AD742 (1,68U.ml⁻¹) e AQ832 (1,44U.ml⁻¹). No entanto, é importante salientar que a atividade amilolítica extracelular pode ser otimizada, influenciada pelas fontes de carbono, nitrogênio e minerais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Bioprospecção de fungos filamentosos é uma alternativa viável que permite explorar o potencial biotecnológico de determinada região, pois possibilita o conhecimento das espécies de micro-organismos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. Os isolados *Aspergillus* sendo considerados potenciais para a produção de amilases.

COLABORADORES

utilizadas⁶. Dessa forma, demonstra-se que os fungos filamentosos isolados, possivelmente, são micro-organismos potenciais produtores de enzimas amilolíticas.

As enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas nos processos industriais e são aplicadas na hidrólise de várias substâncias naturais. Deste modo, o uso de amilases em indústrias tem sido prevalente por muitas décadas e existem várias fontes microbianas para a produção eficiente dessa enzima, mas apenas algumas estirpes selecionadas de fungos e bactérias atendem aos critérios de produção comercial³¹. Assim, a busca de novos micro-organismos, que podem ser utilizados para a produção de amilase, é um processo contínuo.

sp. A651 e AQ853, bem como o *Penicillium* sp. AD741 foram classificados com termotolerantes. Os fungos filamentosos isolados *Mucor* sp. AD742 e *Rhizoctonia* sp. AQ832, da área de campo rupestre, apresentaram maiores valores de atividade enzimática pela quantificação de açúcar redutor,

Todos os autores participaram de todas as etapas de preparação deste manuscrito e declaram não haver

conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

À Agência de fomento da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pela bolsa de Mestrado da discente Aline

REFERÊNCIAS

1. PEREIRA J.O., DE SOUZA A.Q.L., DE SOUZA A.D.L., DE CASTRO FRANÇA S., DE OLIVEIRA L.A. Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon. In: de Azevedo J., Quecine M. (eds) *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*. Springer, Cham. p. 71-103, 2017.
2. MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M.; PARKER, J.. *Brock biology of microorganisms*. Vol. 13. Pearson, 2017.
3. POLIZELI, M. L. T.M.; SILVA, T. M. (orgs). *Amilases Microbianas*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2016.
4. WAKAI, S.; ARAZOE, T., OGINO, C., & Almeida, autora principal do trabalho, sendo esses resultados parte da Dissertação de Mestrado da aluna, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM - Diamantina-MG.
5. KONDO, A.. *Future insights in fungal metabolic engineering*. Bioresource technology, 2017.
6. BENASSI, V. M., et al. Production and action of an *Aspergillus phoenicis* enzymatic pool using different carbon sources. *Braz. J. Food Technol.* v. 15, n. 3, p. 253-260, Set. 2012.
7. NWAGU, T. N.; OKOLO, B. N. Extracellular Amylase Production of a Thermotolerant *Fusarium* sp. Isolated from Eastern Nigerian soil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.54 n.4: pp. 649-658, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-132011000400002&script=sci_arttext4>. Acesso em set. 2017.
8. TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. *Microbiologia-12ª Edição*. Artmed Editora, 2016.

8. INMET - Instituto Nacional de Meteorologia; Estações e Dados do município de Diamantina. Eixo Monumental Sul Via S1 - Sudoeste - Brasília-DF - CEP: 70680-900. 2017. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/>>. Acesso em dez. 2017.
9. EMERSON, R. *An experimental study of the life cycles and taxonomy of Allomyces*. *Lloydia*, v. 4, p. 77-144, 1941.
10. RIDDELL, R. W. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. *Mycologia*, v. 42, p. 265–270, 1950.
11. PEIXOTO, S. C., et al. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. *Int. Microbiol.*, v. 6, p. 269-273, 2003. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10123-003-0140-1>>. Acesso em set 2017.
12. MILLER, G. L. *Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar*. *Analytical Chemistry*, v. 11, p. 426-428, 1959.
13. BENASSI, V.M. LUCAS, R. C. D., JORGE, J. A., & POLIZELI, M. D. L. T. D. Screening of thermotolerant and thermophilic fungi aiming β -xylosidase and arabinanase production. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 4, p. 1459-1467, 2014.
14. BAKER, Scott E.; BENNETT, Joan W. *An overview of the genus Aspergillus. The Aspergilli: Genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods*, p. 3-13, 2007.
15. BARTNICKI-GARCIA, S.; NICKERSON, Walter J. Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *Biochimica et biophysica acta*, v. 58, n. 1, p. 102-119, 1962.
16. HARMAN, G. E., HOWELL, C. R., VITERBO, A., CHET, I., & LORITO, M. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, v. 2, n. 1, p. 43, 2004.
17. PASIN, T. M., BENASSI, V. M., MOREIRA, M. A., JORGE, J. A., & POLIZELI, M. L. T. M. Prospecting Filamentous Fungi for Amylase Production: Standardization of *Aspergillus japonicus* Culture Conditions. v.4 n.4, p.482-498, 2014.
18. TAKAHASHI, J. A., Lima, G. S., dos Santos, G. F., Lyra, F. H., Hughes, A. F., & Gonçalves, F. A. G.. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. *Revista Virtual de Química*, v.9, n.6, p.2351-2382, set. 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net>.
19. LUZ, B. D. da S. BICAS, J. L.;

- SARROUH, B.; LOFRANO, R. C. Z..
Bioprospecção de microrganismos
produtores de enzimas de interesse industrial
realizada no Parque Estadual Serra do Ouro
Branco, Brasil. *Interbio*, v.10 n.1, Jan-Jun,
2016.
20. GONÇALVES, V. N., CANTRELL, C.
L., WEDGE, D. E., FERREIRA, M. C.,
SOARES, M. A., JACOB, M. R., & ZANI,
C. L. Fungi associated with rocks of the
Atacama Desert: taxonomy, distribution,
diversity, ecology and bioprospection for
bioactive compounds. *Environmental
microbiology*, v. 18, n. 1, p. 232-245, 2016.
21. SOBRAL, LAUREANA V. et al.
Antimicrobial and enzymatic activity of
anemophilous fungi of a public university in
Brazil. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, v.89, n.3,
pp.2327-2340, Out-2017. Disponível em:
<[http://dx.doi.org/10.1590/0001-
3765201720160903](http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160903)>. Acesso em fev.,
2018.
22. FREITAS, F.; TORRES, C. A.V.; REIS,
M. A.M. Engineering aspects of microbial
exopolysaccharide production. *Bioresource
technology*, v. 245, p. 1674-1683, 2017.
23. SINDHU, R., Binod, P., Madhavan, A.,
Beevi, U. S., Mathew, A. K., Abraham, A &
Kumar, V. *Molecular improvements in
microbial α -amylases for enhanced stability
and catalytic efficiency*. *Bioresource
technology*, 2017.
24. ZHANG, Q.; HAN, Y.; XIAO, H.;
*Microbial alfa-amylase: A biomolecular
overview*. *Process Biochemistry* v.53 p.88-
101, 2017.
25. GRIFFIN, D. H. *Fungal physiology*.
[S.l.]: John Willey & Sons Incorporation,
1994. 458 p.
26. VIKTOR, M. J., Rose, S. H., Van Zyl,
W. H., & Viljoen-Bloom, M. Raw starch
conversion by *Saccharomyces cerevisiae*
expressing *Aspergillus tubingensis*
amylases. *Biotechnology for biofuels*, v. 6, n.
1, p. 167, 2013.
27. SAMSON, R.A., HOUBRAKEN, J.,
THRANE, U., FRISVAD, J.C.,
ANDERSEN, B., Food and CBS-KNAW
Fungal Biodiversity Centre. Utrecht,
Netherlands. *Indoor Fungi*, Vol. 2., 2010.
28. PELCZAR, M. J. JR.; CHAN, E. C. S.;
KRIEG, N. R. *Microbiologia: Conceitos e
Aplicações*, vol. 2, 2 edição, São Paulo,
MAKRON Books, p. 517, 1996.
29. ORLANDELLI, Ravelly Casarotti et al.
Enzimas de interesse industrial: produção

por fungos e aplicações. SaBios-Revista de Saúde e Biologia, v. 7, n. 3, p.97-109, 2012

30. ALMEIDA, P. Z. Diversidade do potencial amilolítico em fungos filamentosos: purificação e caracterização de uma glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis*. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

31. ARAUJO COELHO, L. V., ATANÁSIO BORBA, C. B., VIEIRA DE MELO, E. J., ALVES DE OLIVEIRA DA SILVA, L., O potencial de *Streptomyces* isolados na região de maués na produção de enzimas hidrolíticas. *Ciência e Natura*, Santa Maria v.39 n.2, p. 202 – 210 2017. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=467551029001>>. Acesso em 10 de jan. 2018