



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E
BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

JAQUELINE SIQUEIRA NUNES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS
POR FUNGOS ISOLADOS DA COMPOSTAGEM- UMA ENZIMA DE INTERESSE
BIOTECNOLÓGICO**

**SUMÉ-PB
2017**

JAQUELINE SIQUEIRA NUNES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS
POR FUNGOS ISOLADOS DA COMPOSTAGEM– UMA ENZIMA DE INTERESSE
BIOTECNOLÓGICO**

**Trabalho de conclusão de curso apresentada
ao curso de Engenharia de Biotecnologia e
Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento
Sustentável do Semiárido, da Universidade
Federal de Campina Grande, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e
Bioprocessos.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Glauciane Danusa Coelho

**SUMÉ-PB
2017**

N972a Nunes, Jaqueline Siqueira.

Avaliação do potencial de produção de enzimas amilolíticas por fungos isolados da compostagem – uma enzima de interesse biotecnológico. / Jaqueline Siqueira Nunes. - Sumé - PB: [s.n], 2018.

51 f.

Orientadora: Profa. Dra. Glauciane Danusa Coelho.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Bacharelado em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Biotecnologia e Bioprocessos. 2. Fungos. 3. Produção de enzimas. I. Título.

UFCG/BS

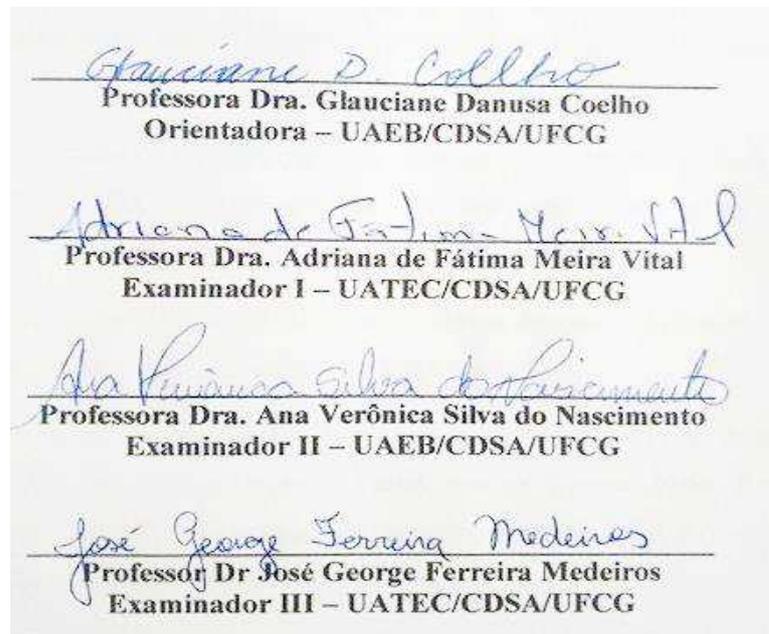
CDU: 561.28 (043.1)

JAQUELINE SIQUEIRA NUNES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS
POR FUNGOS ISOLADOS DA COMPOSTAGEM- UMA ENZIMA DE INTERESSE
BIOTECNOLÓGICO**

**Trabalho de conclusão de curso apresentada
ao curso de Engenharia de Biotecnologia e
Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento
Sustentável do Semiárido, da Universidade
Federal de Campina Grande, como
requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e
Bioprocessos.**

BANCA EXAMINADORA



Trabalho aprovado em: 07 de Dezembro de 2017.

SUMÉ - PB

AGRADECIMENTOS

É difícil agradecer a todas que de algum modo diretamente ou indiretamente fizeram parte deste ciclo, de muito aprendizado, medos, descobertas e superações. Por isso, aos que eu não lembrar de citar, sintam-se agradecidos também.

Primeiramente agradeço a Deus que esteve comigo sempre. Gratidão senhor por sempre está presente em tudo na minha vida.

Aos meus pais Adriana e Noberto por fazerem de tudo por mim. Vocês são os responsáveis por essa conquista e eu sempre serei grata a vocês. Amo vocês. Esta vitória é muito mais de vocês do que minha.

Aos meus irmãos Janine, Noberto Jr., Grabielly e Grazielly que amo infinitamente.

A Thaiane por sempre me ajudar quando preciso, e por estar sempre presente em minha vida.

A minha vó Edileuza e tio Ezequiel pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

A minha orientadora Prof^a Dr.^a Glauciane pelo seus conselhos, ajudas, ensinamentos e por sempre estar ali quando precisei, sempre serei grata por tudo que a senhora fez e faz por mim.

A Professora Adriana Meira Vital, coordenadora do Programa de Ações Sustentáveis para o Cariri (PASCAR), por ter permitido a realização das coletas no tanque de compostagem.

Aos professores do CDSA que me acompanharam durante a graduação, me ajudando a crescer como profissional e ser humano, muito grata por tudo.

A turma de Eng. Biotecnologia e Bioprocessos, 2012.1 (Aisla, Ana Carla, Carol, Darlyson, Eder, Elielson, Jessica, Jurema, Mayk, Maysa, Magna, Neto, Renato, Rodolfo, Semyres, Yasmim) vocês foram essenciais para minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

Aos companheiros do Laboratorio de Microbiologia, Caio e Renato, obrigado por me ajudarem neste e em outros trabalhos.

Agradecimento especial ao Maxsuel da Costa Leal pela ajuda nas identificações dos isolados fúngicos.

A Alandson pela ajuda nos estudos, companhia em momentos difíceis, pela amizade oferecida e por todo carinho.

Aos professores doutores Adriana de Fátima Meira Vital, Ana Verônica Silva do Nascimento e José George Ferreira Medeiros por participarem da banca examinadora e dividir comigo este momento tão importante e esperado.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

A compostagem é um processo de decomposição da matéria orgânica e que ocorre devido à produção de enzimas extracelulares provenientes de microrganismos presentes no sistema. Dentre as enzimas produzidas destaca-se as de atividade amilolítica. Essas enzimas são amplamente aplicadas em processos biotecnológicos nas indústrias têxteis, papel e celulose, couro, detergentes, bebidas destiladas, cervejas, panificação, cereais para alimentação infantil, produção de xaropes, ração animal, indústria química e farmacêutica. O presente trabalho teve como objetivo o isolamento de fungos com capacidade de produzir enzima amilolíticas, além de acompanhar a variação de temperatura em um processo de compostagem. As coletas foram realizadas a partir do 10º dia após a montagem da composteira e repetidas a cada 15 dias, totalizando sete coletas. No momento da coleta foi feita a aferição da temperatura e foram retiradas amostras para isolamento de fungos. A produção das enzimas foi verificada por meio do método de difusão em gel de ágar, em placas de Petri contendo amido, para a determinação da atividade amilolítica. Foram calculados os índices enzimáticos (IE) por meio da relação entre o halo de degradação do substrato e o halo de crescimento fúngico. A temperatura no tanque de compostagem variou entre 36°C e 43°C. No decorrer das coletas foram obtidos 36 isolados fúngicos, sendo que seis foram obtidos na fase termofílica. Os maiores IE foram obtidos entre os fungos isolados nas coletas 3, 6 e 7. Diante dos altos valores de IE obtidos pode-se afirmar que o tanque de compostagem representa um local potencial para o isolamento de microrganismos com capacidade de produzir enzimas de interesse industrial, com o conseqüente desenvolvimento de tecnologias enzimáticas.

PALAVRAS-CHAVE: Amido. Índice Enzimático. Composteira. Aplicações biotecnológicas.

ABSTRACT

Composting is a process of decomposition of organic matter and occurs as a result of the production of extracellular enzymes from microorganisms present in the system. Among the enzymes the amylolytic ones stand out. These enzymes are widely applied in biotechnological processes in the textile, pulp and paper, leather, detergent, distilled beverages, beers, baking, cereals for infant food, syrup production, animal feed, chemical and pharmaceutical industries. The objective of the present work was to isolate fungi capable of producing amylolytic enzymes, in addition to monitoring temperature variation in a composting process. The collections were performed from the 10th day after the composter assembly and repeated every 15 days, totaling seven collections. At the time of collection the temperature was measured and samples were taken for fungal isolation. The enzymes production was verified by the agar gel diffusion method in Petri dishes containing starch for the determination of the amylolytic activity. The enzymatic indices (IE) were calculated by the relationship between the substrate degradation halo and the fungal growth halo. The temperature in the composting tank varied between 36 ° C and 43 ° C. During the collection, 36 fungal isolates were obtained, and six were obtained in the thermophilic phase. The higher IE were obtained among the isolated fungi in collections 3, 6 and 7. In view of the high IE values obtained it can be stated that the composting tank represents a potential site for the isolation of microorganisms with the capacity to produce enzymes of industrial interest , with the consequent development of enzymatic technologies.

KEYWORDS: Starch. Enzymatic Index. Compostela. Biotechnological applications.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Resíduos orgânicos potencialmente utilizáveis na compostagem.....20
- Figura 2** – (A) Um pequeno segmento da amilose, um polímero linear de moléculas de D-glicose. (B) Estrutura da amilopectina mostrando um ponto de ramificação. (C) Disposição das moléculas de amilose e amilopectina no grão de amido.....23
- Figura 3** - Representação da atuação de alfa-amilase e beta-amilase. As setas indicam as diferentes regiões de atuação das enzimas: alfa-amilase atua em qualquer ligação 1,4 da molécula do carboidrato, enquanto beta-amilase atua em ligações 1,4 próximas as pontes da molécula de amido.....25
- Figura 4** - Local que foi coletado as amostras.....28
- Figura 5** - Esquema adotado para diluição em série.....29
- Figura 6** – Técnica de Identificação dos fungos.....32
- Figura 7** - Variação de temperatura no tanque de compostagem nas sete coletas realizadas (-■-). Os limites superiores e inferiores indicam o desvio padrão. As fases da compostagem estão representadas por letras, sendo A: fase mesofílica, B: fase termofílica, C: fase de resfriamento e de maturação.....35
- Figura 8** - Umidade da amostra verificada após 24h. Os limites indicam o desvio padrão.....35
- Figura 9** - Índices enzimáticos (IE) para a atividade amilolítica obtida para os fungos isolados durante a fase mesofílica da compostagem. A: Coleta n°1; B: coleta n° 2. Os limites superiores e inferiores indicam o desvio padrão.....36
- Figura 10** - Índices enzimáticos (IE) para a atividade amilolítica obtida para os fungos isolados durante a fase termofílica da compostagem: coleta n° 3. Os limites superiores e inferiores indicam o desvio padrão.....37
- Figura 11** - Índices enzimáticos (IE) para a atividade amilolítica obtida para os fungos isolados durante a fase de resfriamento e maturação. A: coleta n° 4; B: coleta n° 5; C: coleta n° 6; D: coleta n° 7. Os limites superiores e inferiores indicam o desvio padrão.....38
- Figura 12** - Produção de amilase média dos microrganismos isolados durante a compostagem. A região hachurada indica a região mesofílica.....41
- Figura 13** - Estrutura microscópicas dos isolados A (primeira coleta isolado 4), B (segunda coleta isolado 2), C e D (terceira coleta isolados 1 e 7), E (quarta coleta isolado 1), F (quinta coleta isolado 2), G (sexta coleta isolado 5) e H (sétima coleta isolado 3).....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo com aveia.....	31
Tabela 2 - Composição do meio de cultivo BDA.....	31
Tabela 3 - Composição do meio de cultivo utilizado para detecção de amilase.....	31
Tabela 4 - Números de Isolados obtidos em cada coleta.....	33
Tabela 5 - Números de colônias de cada coleta.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

b – coeficiente linear da regressão

°C – Graus Celsius

CDSA – Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido

C/N – Carbono/Nitrogênio

g – gramas

IE – Índice enzimático

m_i – massa inicial das amostras (g)

m_f – massa final das amostras (g)

mL – Mililitro

pH – Potencial Hidrogeniônico

r – raio (cm)

t – tempo (dia)

U – umidade em base úmida

UFMG – Universidade Federal de Campina Grande

VCR – velocidade de crescimento radial (cm/dia).

LISTA DE SÍMBOLOS

Φ_h - diâmetro do halo

Φ_c - diâmetro da colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 COMPOSTAGEM.....	17
3.2 FATORES QUE INTERFEREM NO PROCESSO DE COMPOSTAGEM.....	17
3.2.1 Temperatura	18
3.2.2 Umidade	18
3.2.3 Aeração	18
3.2.4 Relação C/N	19
3.2.5 Granulometria	19
3.2.6 Microrganismos	20
3.3 RESÍDUOS ORGÂNICOS.....	20
3.4. AMIDO E ENZIMAS AMIOLÍTICAS.....	23
3.4.1 Amido	23
3.4.2 Enzimas Amilolíticas	24
3.4.2.1 Aplicações biotecnológicas das amilases.....	26
4 METODOLOGIA	28
4.1 TANQUE DE COMPOSTAGEM.....	28
4.2 COLETAS.....	28
4.3 PLAQUEAMENTO.....	29
4.4 ISOLAMENTO.....	29
4.5 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE.....	29
4.6 VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE).....	30

4.7 MEIOS DE CULTURA.....	30
4.7.1 Meio de aveia.....	30
4.7.2 Meio BDA.....	31
4.7.3 Meio diferencial para determinação da produção de atividade enzimática.....	31
4.8 MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS.....	31
4.9 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 COLETAS, PLAQUEAMENTO E ISOLAMENTO.....	33
5.2 TEMPERATURA E UMIDADE DA COMPOSTEIRA.....	34
5.3 DETECÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AMILASE.....	36
5.4 PRODUÇÃO DE AMILASE DURANTE O PROCESSO DE COMPOSTAGEM.....	40
5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS.....	41
6 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

A compostagem é uma técnica controlada de decomposição microbiana, de oxidação e de oxigenação de uma mistura heterogênea de materiais orgânicos (KIEHL, 2004). Entre as vantagens desse processo destacam-se: a decomposição de matéria orgânica, a reciclagem de nutrientes, o aumento da vida útil de aterros sanitários e a redução da emissão de gás metano (MASSUKADO, 2008; INÁCIO; MILLER, 2009).

A eficiência da compostagem é devido a ação e interação dos microrganismos, para a decomposição do material lignocelulósico o que requer intensa liberação de enzimas extracelulares (GOMES et al., 2007). Alguns dos microrganismos presentes na compostagem são fungos produtores de enzimas, as quais têm despertado muito interesse econômico (BRAGA; DESTÉFANO; MESSIAS, 1999). Dentre as enzimas produzidas pode-se citar as enzimas amilolíticas que podem ser aplicadas nas indústrias de alimentos, sabão em pó e detergentes, na fabricação de papel e tecidos, em sínteses orgânicas (SZAKACS, 2004), nas indústrias têxteis, couro, bebidas destiladas, cervejas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, entre outros (BARATTO et al., 2011).

De acordo com pesquisas feitas pelas empresas Companies and Markets (2012) e The Freedonia Group (2014), o mercado mundial de enzimas industriais movimentou aproximadamente US\$3,74 bilhões no ano de 2015 e, até o período de apresentação desse trabalho, havia a perspectiva de aumento em torno de 6,4% para o ano de 2017. Esse crescimento se dá por meio da soma de diversos setores econômicos, como de detergentes, alimentos, farmacêuticos, biocombustíveis, rações para animais e têxtil que vem empregando essa enzima (PANDEY et al. 2011).

Nesse contexto, a prospecção de microrganismos capazes de produzir enzimas de interesse industrial, como as amilases, é de extrema relevância para o desenvolvimento de processos biotecnológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar fungos com capacidade de produzir enzimas amilolíticas durante um processo de compostagem.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar as fases térmicas e umidade durante um ciclo de compostagem;
- ✓ Identificar os fungos com potencial para produção de enzimas amilolíticas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 COMPOSTAGEM

Dias (2009) define a compostagem como uma técnica aplicada no controle da decomposição de materiais orgânicos para a obtenção, em um curto tempo, do material estável, rico em húmus e nutriente mineral; com atributos físicos, químicos e biológicos superiores àqueles encontrados na(s) matéria(s) prima(s).

Segundo Kiehl (2004), a compostagem é uma técnica controlada de decomposição microbiana, de oxidação e de oxigenação de uma mistura heterogênea de material orgânico, sendo caracterizada por uma fase inicial rápida de fitotoxicidade. Em seguida ocorre uma fase de bioestabilização, e finalmente a terceira fase, ocorrendo a humificação ou maturação, acompanhada da mineralização de determinados componentes da matéria orgânica, como N, P, Ca e Mg, que passam da forma orgânica para a inorgânica, ficando disponíveis às plantas (KIEHL, 1985).

Assim, a compostagem é um processo biológico, aeróbio e controlado de transformação de resíduos orgânicos em substâncias húmicas por meio de microorganismos tais como fungos e bactérias (KUBITZA; CAMPOS, 2006; INÁCIO; MILLER, 2009). Se a compostagem for corretamente manejada pode proporcionar ótimas condições na obtenção da estabilização dos componentes poluentes, o que possibilita que os resíduos orgânicos retornem ao solo como um fertilizante natural, livre de bactérias patogênicas, vírus e parasitas (HAY, 1996; KIEHL, 1998).

As fases da compostagem podem ser classificadas de acordo com a variação da temperatura (BERNAL; ALBUQUERQUE; MORAL, 2009; TRAUTMANN; OLYNCIW, 2005):

- i. **Mesofílica** predominam as temperaturas moderadas, até 40°C, e com duração média de dois a cinco dias.
- ii. **Termofílica:** quando o composto atinge a temperatura máxima (>40°C), sendo assim degradado mais rapidamente. Esta fase geralmente tem a duração de poucos dias a vários meses, de acordo com as características do material a ser compostado.
- iii. **Resfriamento:** nessa fase ocorre a queda da temperatura para valores da temperatura ambiente.

iv. **Maturação:** estabilização que produz um composto maturado, altamente estabilizado e humificado, livre de toxicidade.

3.2 FATORES QUE INTERFEREM NO PROCESSO DE COMPOSTAGEM

3.2.1 Temperatura

Muitos pesquisadores consideram a temperatura como sendo o mais importante indicador da eficácia do processo de compostagem, estando relacionada com a atividade metabólica dos microrganismos, que é diretamente afetada pela aeração (LI; ZHANG; PANG, 2008), teor de umidade (PETRIC; SESTAN; SESTAN, 2009; KUMAR; OU; LIN, 2010; KARADG et al., 2013), granulometria (BERNAL; ALBUQUERQUE; MORAL, 2009; BERNHARDT; FASINA, 2009; RUGGIERI et al., 2012) e disponibilidade de nutrientes (PIOTROWSKA-CYPLIK et al., 2013; VALENTE, 2013).

De acordo com Kiehl (1985), a variação de temperatura define grupos de microrganismos que podem ser classificados em a) criofílicos (temperatura ambiente ~ 25°C); b) mesofílicos (30-45°C); e c) termofílicos (acima de 50°C). Kiehl (2004) ainda relata que em temperaturas superiores a 70°C a atividade microbiana torna-se reduzida. E temperaturas em torno de 80°C resultam na paralisação do processo e risco de combustão espontânea do material compostado. O que reforça a necessidade de aeração do sistema de compostagem.

3.2.2 Umidade

A umidade é um parâmetro de grande importância a ser controlado, uma vez que é a água que promove o transporte de nutrientes dissolvidos, indispensáveis para as atividades metabólicas e fisiológicas dos microrganismos (KIEHL, 1985). O valor de umidade considerável varia de acordo com as condições do material compostado, com o tamanho das partículas e com o estágio de decomposição no qual a leira já se encontra. Entretanto, é sugerido que o valor esteja entre 40-70% (KIEHL, 2004).

Teores de umidade inferiores a 40% devem ser evitados, pois podem fazer com que a atividade biológica seja reduzida, retardando o desenvolvimento do processo (VALENTE et al., 2009). Assim, se umidade estiver ficando baixa, é necessário que faça irrigação da leira, de preferência no período do revolvimento para que a água seja distribuída por igual (MASSUKADO, 2008).

De acordo com Barreira (2005) e Valente et al. (2009) quando o teor de umidade dos resíduos da compostagem estiver muito alto o processo será dificultado, pois o excesso de umidade faz com que os poros sejam preenchidos com água. Os resíduos decompostos, que são hidrofílicos, irão aderir as moléculas de água à superfície, saturando os seus micro e macroporos, impedindo a difusão de oxigênio e propiciando condições anaeróbicas. Este acontecimento pode ser percebido pelos maus odores. Quando a umidade estiver alta, há a necessidade de se fazer injeção de ar ou acrescentar material seco.

3.2.3 Aeração

Segundo Fernandes e Silva (1999) a aeração de uma leira de compostagem é responsável por: (1) aumentar a porosidade do meio, que sofre compactação natural devido seu próprio peso; (2) diminuir o teor de umidade dos resíduos; (3) expor as camadas externas às temperaturas mais elevadas e também (4) eliminar o calor excessivo do interior da leira, controlando a temperatura do processo. Kiehl (2004) relata que na presença de oxigênio há ausência de maus odores e o tempo de degradação é menor.

Os revolvimentos precisam ser feitos obrigatoriamente quando a temperatura estiver muito elevada (acima do 70°C), quando a umidade estiver acima de 55-60% ou quando há presença de moscas e maus odores (KIEHL, 2004; BARREIRA, 2005; MASSUKADO, 2008). Em condições de aparente normalidade (de temperatura e umidade) é recomendado fazer o revolvimento para que se introduza ar rico em oxigênio e se libere o ar saturado de gás carbônico. Ainda é ressaltado que as partes da leira que devem merecer maior atenção durante o revolvimento são as mais externas, expostas ao sol e ao vento, mais frias e ressecada (KIEHL, 2004).

3.2.4 Relação C/N

A relação entre carbono e nitrogênio é usada para avaliar os níveis de maturação de materiais orgânicos (VALENTE et al., 2009). Para o processo da compostagem, alguns autores sugerem que no início do processo a relação C/N esteja no entorno de 30/1, ou seja, trinta partes de carbono para uma de nitrogênio. Segundo Kiehl (2004) valores entre 26/1 e 35/1 são considerados como favoráveis.

Nas etapas da compostagem, o carbono é fonte de energia para os microrganismos heterotróficos que degradam o composto, já o nitrogênio é um elemento importante para a síntese de proteínas e crescimento das colônias (SHARMA et al., 1997).

Durante o processo de compostagem é notada a redução da relação C/N por meio da oxidação da matéria orgânica pelos microrganismos (ZHANG; HE, 2006). O tempo necessário para estabilização ou a maturação dos resíduos orgânicos está relacionado com relação C/N inicial dos materiais usados como substratos. O produto final da compostagem necessita ser analisado para efeito de qualidade do composto (MOREL et al., 1985). Segundo Barreira (2005) no final do processo a relação C/N deve decair chegando próxima a 10/1, indicando, assim, que o material será considerado como compostado.

3.2.5 Granulometria

O tamanho das partículas dos resíduos é de grande importância no processo para reger o movimento de gases e líquidos (KIEHL, 2004). Bidone e Povinelli (1999) relatam que a granulometria ideal para a montagem da leira deve ser entre 1 e 5 cm. Porém, Valente et al. (2009) afirmam que misturar diversos tipos de resíduos orgânicos é o melhor jeito para tentar corrigir o tamanho das partículas, beneficiando a homogeneização da massa em compostagem e obtendo uma melhor porosidade.

3.2.6 Microrganismos

Material orgânico é o habitat de vários microrganismos, sendo que eles utilizam minerais, compostos orgânicos, água e oxigênio para crescimento e atividades metabólicas (FIALHO, 2007). Os principais microrganismos presentes na compostagem são bactérias, fungos, no entanto, podem aparecer outros organismos como algas, protozoários, nematóides, vermes, insetos e larvas, mas isto depende especialmente das características do material a ser usado. Os microrganismos geralmente já são encontrados nos resíduos utilizados, dessa forma, o processo de compostagem precisa de um ambiente com condições favoráveis de umidade, nutrientes e oxigênio, degradação e estabilização da matéria orgânica (KIEHL, 2004).

No processo da compostagem existe uma predominância de microrganismos, que variam conforme as características do composto, como o teor de umidade, a disponibilidade de oxigênio, a temperatura relação C/N e pH (KIEHL, 1985).

3.3 RESÍDUOS ORGÂNICOS

Na compostagem, a composição do material que será usado na mistura é muito importante. Material que possui hidratos de carbono, lípidos e proteínas, são fontes ideais de carbono e de energia para os microrganismos. Por outro lado, materiais que têm em grande

parte da composição a celulose e a lignina e possuem pouco nitrogênio são degradados muito lentamente (BATISTA; BATISTA, 2007).

Dentre o material rico em carbono podemos destacar o material lenhoso como a casca de árvores, as aparas de madeira e a serragem, as podas dos jardins, folhas das árvores, palhas e fenos, e papel. Entre os compostos nitrogenados podemos citar as folhas verdes, estrumes de animais, urinas, solo, restos de vegetais hortícolas, erva, entre outros (BRITO, 2005).

Mustin (1987) desenvolveu uma classificação de resíduos compostáveis de acordo com a origem, natureza química e física. Ele também relata que somente resíduos orgânicos de origem biológica são compostáveis, já o material orgânico de origem química não é compatível, como por exemplo os plásticos.

Segundo Cunha Queda (1999) há uma grande diversidade, quantidade, qualidade e complexidade de substratos destinados à compostagem, já que os resíduos empregados na composteira são normalmente resíduos orgânicos biodegradáveis de origem agro-pecuária, agro-industrial e urbana. A Figura 1 mostra diversos resíduos potencialmente utilizáveis na compostagem.

Figura 1 - Resíduos orgânicos potencialmente utilizáveis na compostagem.



Fonte: Cunha Queda (1999).

3.4. AMIDO E ENZIMAS AMIOLÓTICAS

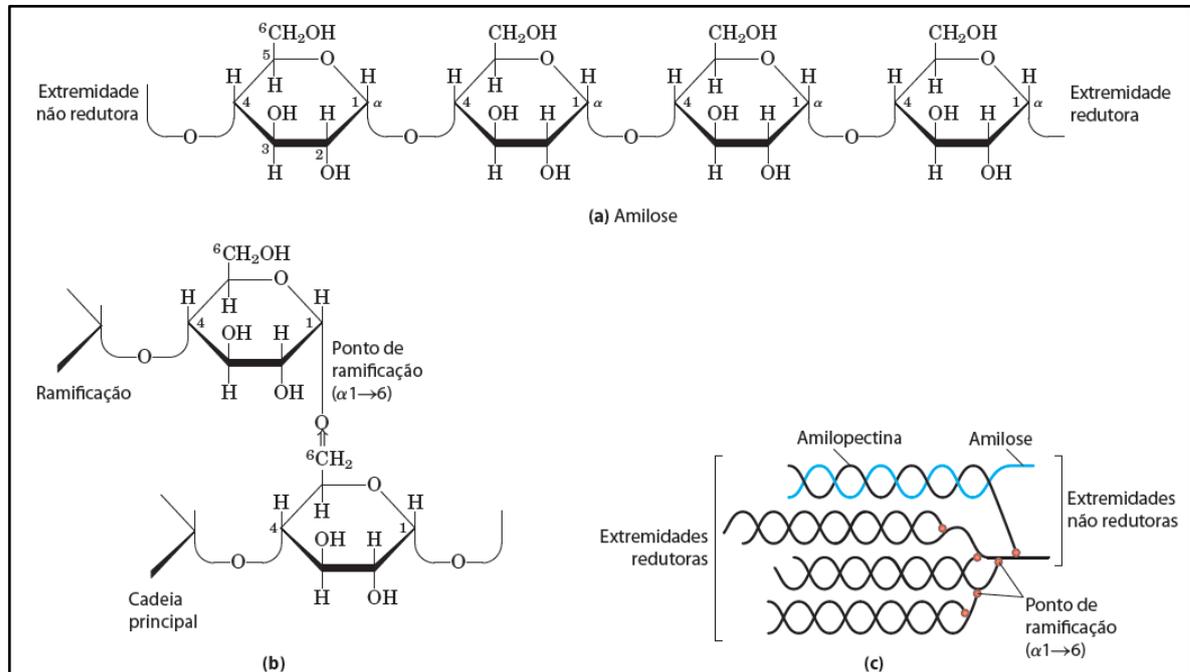
3.4.1 Amido

Segundo Vieille e Zeikus (2001) o amido é o maior polissacarídeo de reserva das plantas e o segundo mais abundante depois da celulose. O amido é aplicado em vários processos industriais, incluindo a produção de material biológico para alimentos, emulsão estabilizante e agente substituto de óleo (SYNOWWIECKI, 2007). Os derivados do amido também podem ser aplicados em diversos setores tais como fluídos de perfuração de petróleo, adesivos, papel e revestimentos de algodão, ou gelificantes, emulsionantes e agentes de aumento de viscosidade em produtos alimentares. Alguns produtos são gerados por meio de hidrólise, como maltodextrinas, xaropes de frutose elevada, tais como xarope de milho em escala industrial. Sendo que para a aplicação do amido em produtos alimentícios, este é especialmente processado por aquecimento ou homogeneização de amilose e amilopectina (VAN DER MAAREL; LEMMHUIS, 2013).

Os xaropes de glicose, que são derivados de milho ou amido de trigo, viraram a matéria-prima básica para a indústria de bioetanol (BAI et al., 2010; ROY et al., 2013).

A amilose é constituída por cadeias lineares helicoidais compostas de glicose unidas por ligação glicosídica α -1,4. Já a amilopectina é constituída por uma estrutura ramificada, com cadeias de resíduos de glicose em ligação glicosídica α -1,4, das quais partem ramificações com ligações α -1,6 (LASZLO et al., 1986). A figura 2 mostra a estrutura da amilose e da amilopectina.

Figura 2 – (A) Um pequeno segmento da amilose, um polímero linear de moléculas de D-glicose. (B) Estrutura da amilopectina mostrando um ponto de ramificação. (C) Disposição das moléculas de amilose e amilopectina no grão de amido.



Fonte: Nelson e Cox (2014).

A hidrólise enzimática do amido é realizada em duas fases: a liquefação e a sacarificação. Na liquefação, os grânulos de amido são dispersos em solução aquosa, aquecidos (gomificação) e hidrolisados parcial e irreversivelmente, com a ajuda da α -amilase. Após o processo de liquefação, a solução de maltodextrina é hidrolisada em glicose por meio de uma enzima desramificante, que pode ser uma endoenzima (isoamilase e pululanase) ou exoenzima (β -amilase e glicoamilase). Elas atuam sobre as ligações glicosídicas α -1,6 da amilopectina. O resultado dessa etapa é a sacarificação (VAN DER MAAREL et al., 2002).

A atividade e a estabilidade na maioria das amilases usadas nas indústrias atualmente estão em declínio, pelo fato que as enzimas precisam suportar um pH baixo no processamento do amido, no entanto o processo de liquefação de amido funciona a um pH restrito de cerca de 6,5. Assim, a identificação e exploração microbiana de amilases termoestáveis e acidófilas são de grande demanda (EMTENANI et al., 2015).

Entretanto, a maneira convencional de processamento de amido necessita de um elevado fornecimento de energia, aumentando o preço dos produtos à base dessa molécula. Desse modo, estão sendo feitos esforços para a produção de enzimas amilolíticas capazes de

atuar em materiais com pH ácido, e a temperatura moderada muito abaixo da temperatura de gelatinização, tornando o processamento do amido mais econômico para as indústrias (ASOODEH et al., 2010; ROY et al., 2013).

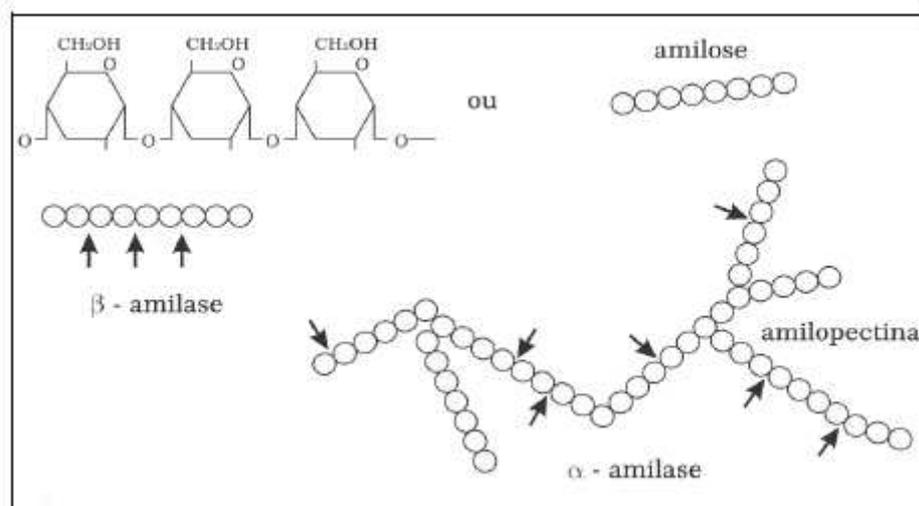
3.4.2 Enzimas Amilolíticas

Segundo Peixoto et al (2003) as amilases são enzimas que hidrolizam ligações glicosídicas α -1,4 da molécula de amido. Essas enzimas são usadas pelas plantas para degradar o amido de algumas raízes; Os animais usam as amilases para a digestão do amido e os microrganismos que utilizam-nas para converter o amido em fonte de carbono.

As amilases atuam como endoenzima ou exoenzima específicas para a quebra do amido. Estas enzimas degradam o amido em compostos relacionados por meio da hidrólise das ligações glicosídicas α -(1,4) e/ou α -(1,6) (BRENDA, 2017).

De acordo com o tipo de hidrólise, as amilases podem ser classificadas como α -amilases e β -amilases dependendo das ligações em que atuam nos substratos (Figura 3). Elas hidrolizam os polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de *D*-glicose, ou seja, causam a quebra do amido a açúcares redutores. Como visto na literatura a glicoamilase e a α -amilase são as enzimas mais importantes empregadas no processamento de amido (PANDEY et al., 2005; TANGPHATSORNRUANG et al., 2005; CARVALHO et al., 2008; FERREIRA-NOZAWA et al., 2008; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2008; RAJAGOPALAN; KRISHNAN, 2008; SOUZA, MAGALHÃES, 2010; HASHEMI; DARWISH, 2010).

Figura 3 - Representação da atuação de alfa-amilase e beta-amilase. As setas indicam as diferentes regiões de atuação das enzimas: alfa-amilase atua em qualquer ligação 1,4 da molécula do carboidrato, enquanto beta-amilase atua em ligações 1,4 próximas as pontes da molécula de amido.



A hidrólise do amido era feita por meio da via química com alta temperatura. Essa técnica está sendo substituída pela hidrólise enzimática em mais de 75% dos processos (KANDRA, 2003; WANG; LIANG; LIANG, 2011). Este método é um dos mais simples para produção de carboidratos com propriedades funcionais especiais (MOORE; DO CANTO; AMANTE, 2005).

3.4.2.1 Aplicações biotecnológicas das amilases

As amilases podem ser aplicadas em vários processos biotecnológicos e industriais, constituindo importante complexo enzimático, que totaliza de 25 a 33% da produção mundial de enzimas, ocupa o segundo lugar logo após as proteases (NGUYEN et al., 2002; GUPTA et al., 2003; EIJSINK et al., 2008; SOUZA; MAGALHÃES, 2010; BORGIO, 2011; MARKET RESEARCH NEWS, 2011; KUMAR; SAHAI, BISARIA, 2012).

As amilases, como já foi destacado, são enzimas com bastante utilização nas indústrias de detergentes, alimentícia, têxtil e química, na panificação, indústria farmacêutica, na hidrólise do amido e na produção de biocombustíveis (MOREIRA et al., 1999; NIELSEN et al., 2000; VAN DER MAAREL et al., 2002; SUMERLY, 2003; GUPTA et al., 2003; DEMIRKAN et al., 2005; PANDEY et al., 2005; SOCCOL et al., 2005; MITIDIERI et al., 2006; ALVA et al., 2007; SOUZA, MAGALHÃES, 2010; CASTRO et al., 2010; WANG et al., 2011). A produção de hidrolisados de amido obtendo-se glicose e frutose é um mercado com ótimo retorno para aplicação dessas enzimas. O amido é convertido em xaropes de milho com alto teor de frutose e, devido a alta capacidade adoçante, é bastante usado como adoçante na indústria de refrigerantes (GUPTA et al., 2003).

Dentre outras aplicações das amilases destacam-se a preparação de auxiliares da digestão, sucos de frutas, bebidas e produção de bolos (COUTO, SARNROMÁN, 2006). As α -amilases são vastamente empregadas na panificação para degradar o amido da farinha em pequenas dextrinas, que são fermentadas pela levedura. O benefício destas enzimas na massa resulta no aumento da taxa de fermentação e na redução da viscosidade, gerando um produto final com melhor volume e textura (SOUZA, MAGALHÃES, 2010).

A aplicação da amilase na indústria têxtil faz com que exista um redimensionamento dos tecidos mediante a hidrólise do amido (MARYAN, MONTAZER, 2013). Uma quantidade removível da pasta de amido aplicada ao fio é removida com o objetivo de aumentar a resistência à fricção durante o processamento. Quando essa pasta não é retirada o

processamento final das roupas fica comprometido (tingimento, clareamento ou outro tipo de acabamento) (SPIER, 2005; GUANDALINI, 2007).

Nas indústrias de papel as amilases são empregadas para transformar o amido que é aplicado como cobertura do papel e fornece proteção contra danos mecânicos durante o processamento, e também para melhorar a qualidade do produto final (GUPTA et al., 2003).

Cada vez mais vem aumentando a expansão na área de aplicações de enzimas, aumentando o desempenho dos detergentes líquidos enzimáticos (MITIDIERI et al., 2006).

Segundo SIGMA-ALDRICH (2014) um fator limitante para a utilização das amilases é o alto custo. Tendo em vista o valor estimado para aquisição de α -amilase de *Rhizopus sp* contendo 40 U/mg é de R\$ 1.491,00/g.

Esses dados justificam a importância da prospecção de microrganismo capazes de produzir enzimas amilolíticas.

4 METODOLOGIA

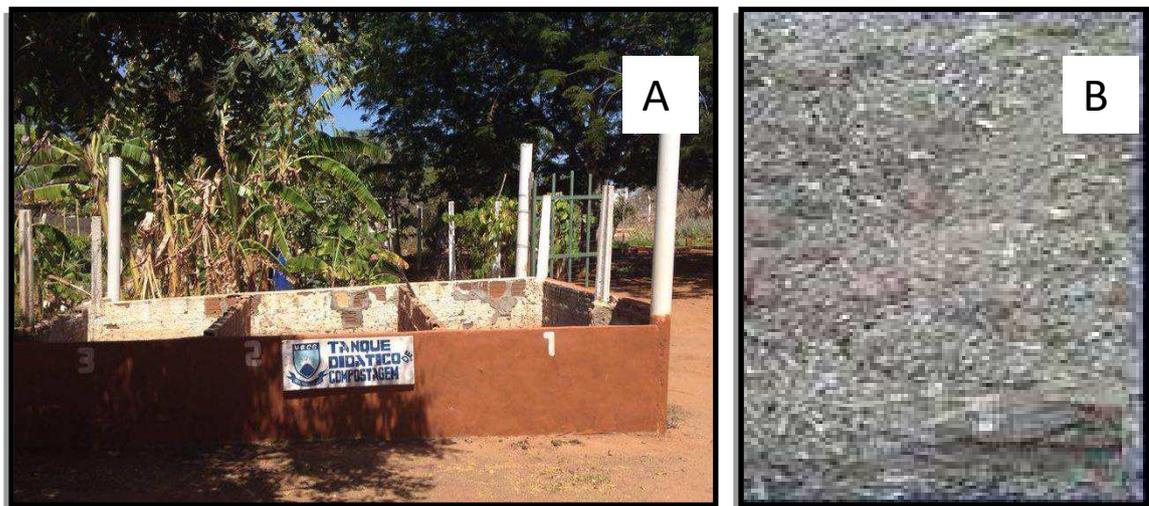
4.1 TANQUE DE COMPOSTAGEM

Este é localizado no viveiro de mudas, no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (UFCG CDSA), campus de Sumé e a sua manutenção foi conduzida pelos estudantes do Programa de Ações Sustentáveis para o Cariri (PASCAR).

4.2 COLETAS

As coletas foram realizadas a partir do 10º dia após a montagem da composteira e foram realizadas a cada 15 dias, durante todo o processo de compostagem. No momento da coleta foi feita a aferição da temperatura em seis pontos do tanque de compostagem, nos quais foram retiradas amostras de cinco pontos do tanque de compostagem. As amostras foram misturadas e utilizadas para a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC), plaqueamento e isolamento de fungos, bem como para a determinação da umidade da composteira. Na figura 4 são apresentadas as imagens do local de coleta.

Figura 4 – Visão geral do tanque de compostagem em que foram feitas as coletas (A) e aspecto do composto pronto (B).



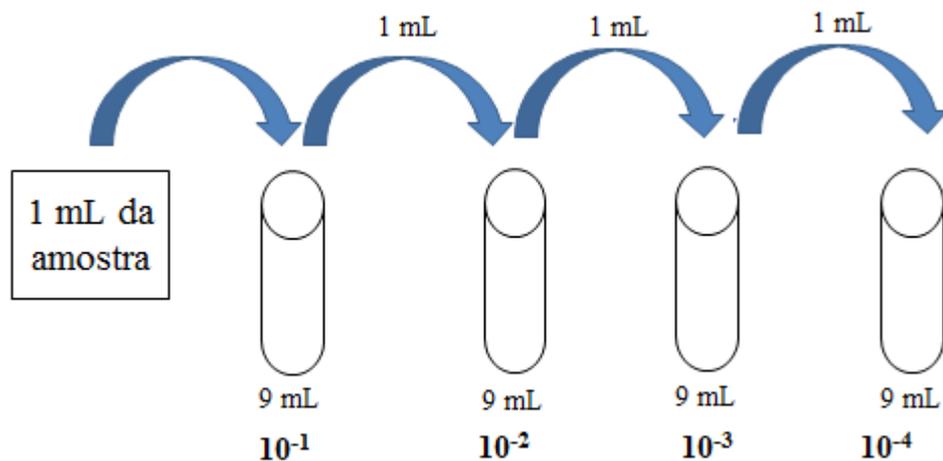
Fonte: Dados da pesquisa.

O material coletado foi colocado em sacos plásticos e foi conduzido até o Laboratório de Microbiologia na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA), na cidade de Sumé, onde todos os experimentos foram realizados.

4.3 PLAQUEAMENTO

Um (1,0)g do material coletado da composteira foi adicionado a 10,0 mL de água destilada esterilizada. A suspensão foi diluída em série (Figura 5) até a concentração de 10^{-4} , e 1,0 mL desta foi usado inocular as placas de Petri contendo meio de aveia (Tabela 1). As placas inoculadas foram incubadas a 28°C até o crescimento das colônias. Em seguida foi feita a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) de cada diluição. Os testes foram feitos em duplicatas.

Figura 5 - Esquema adotado para diluição em série.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.4 ISOLAMENTO

As UFCs observadas no meio de aveia foram isoladas em placas de Petri contendo meio BDA (Tabela 2), substituindo dextrose por sacarose comercial e foram incubadas a 28°C durante cinco (5) dias, ou até que as placas fossem preenchidas. Os isolados foram conservados em geladeira em sistema Castellani.

4.5 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE

Em cápsulas de porcelana previamente taradas foram medidos 3,0g de cada resíduo seco. As cápsulas contendo as amostras foram colocadas na estufa a 100°C até durante 24 h. Em seguida foram resfriadas em dessecador durante 20 minutos e a massa foi aferida em balança analítica (BRASIL, 2005). A umidade, expressa em base úmida, foi calculada pela Equação 1.

$$U(\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

Sendo:

U: umidade em base úmida;

m_i : massa inicial das amostras (g);

m_f : massa final das amostras (g).

4.6 VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS E DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO (IE)

A produção das enzimas no meio de cultura foi verificada por meio do método de difusão em gel de ágar, em placas de Petri tendo o amido (1%), para a determinação da atividade amilase (Tabela 3). As atividades enzimáticas foram caracterizadas por meio da formação de halos de degradação do substrato (fonte de carbono). Os ensaios foram realizados em triplicata. Após 72 h de incubação a 30°C as placas foram reveladas com adição de 2 mL de solução de iodo.

O halo de degradação do substrato, bem como o halo de crescimento fúngico foram medidos com auxílio de régua milimetrada.

Os isolados fúngicos que apresentaram halo de degradação em torno da colônia tiveram a produção da atividade fungica avaliada pelo cálculo do índice enzimático (IE), dado pela relação do diâmetro médio do halo de degradação do substrato pelo diâmetro médio da colônia, conforme na equação 2 (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

$$IE = \frac{\phi h}{\phi c} \dots\dots\dots(2)$$

Sendo que:

Φh - diâmetro do halo;

Φc - diâmetro da colônia.

4.7 MEIOS DE CULTURA:

4.7.1 Meio de aveia

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo com aveia.

Composição	Quantidade
Aveia	40,0g
Ágar	20,0g
Água destilada	q.s.p.1L

Fonte: Dados da pesquisa.

4.7.2 Meio BDA

Tabela 2 - Composição do meio de cultivo BDA.

Composição	Quantidade
Batata	200,0g
Dextrose	20,0g
Ágar	20,0g
Água destilada	q.s.p. 1L

Fonte: Dados da pesquisa.

4.7.3 Meio diferencial para determinação da produção de atividade enzimática

Tabela 3 - Composição do meio de cultivo utilizado para detecção de amilase.

Composição	Quantidade
Amido	20,0g
Ágar	20,0g
Água destilada	1L

Fonte: Dados da pesquisa.

Após o preparo, os meios de cultura foram esterilizados em autoclave durante 20 minutos a 121°C e 1 atm. Os meios foram vertidos em placas de Petri (20,0 mL/placa), previamente esterilizada e após solidificação foi introduzido o inóculo.

4.8 MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS

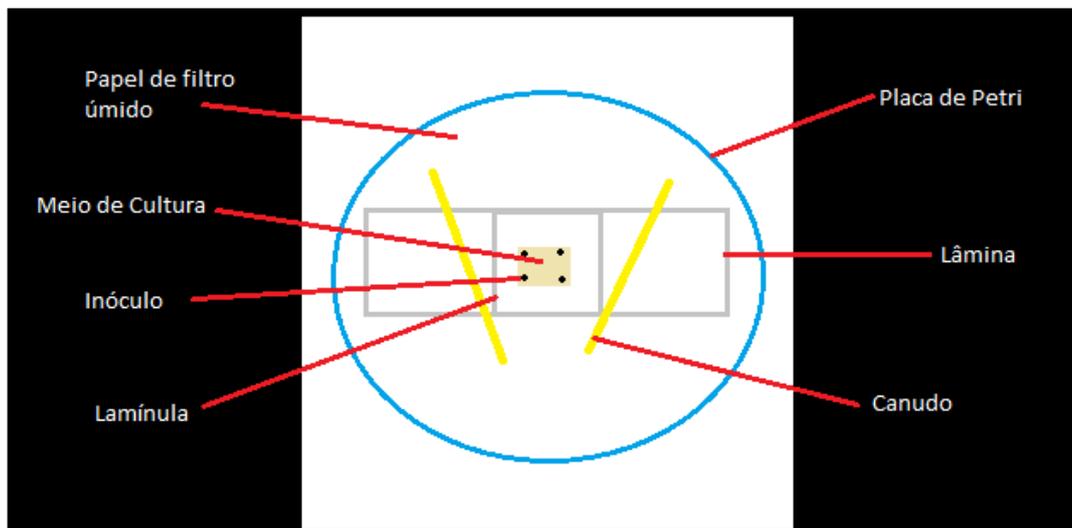
Para maior tempo de conservação dos isolados fúngicos, estes foram conservados pelo método descrito por Castellani (1931), em que foram colocados colônias puras de fungos em

micro tubos, tipo eppendorf, previamente esterilizados, contendo água destilada esterilizada. Posteriormente os frascos foram selados, identificados e mantidos em temperatura ambiente.

4.9 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

A técnica de microcultivo utilizada para identificação dos isolados foi baseada na Agência de Vigilância Sanitária (2004). Em uma placa de Petri esterilizada foi adicionado meio de cultura (BDA) até a solidificação, em seguida uma pequena parcela do meio foi transferido para uma lâmina esterilizada, na qual foi colocado o fungo de interesse, em seguida foi coberto por uma lamínula também esterilizada. Este conjunto foi inserido em uma placa de Petri estéril contendo papel filtro umedecido e dois canudos também esterilizados, como suporte (Figura 6). Para cada fungo foi realizado o modelo em triplicata, em seguida, o material foi incubado a 25°C, com acompanhamento do crescimento por 72 horas em microscopia óptica. As características morfológicas microscópicas foram consideradas para a identificação e comparadas com imagens obtidas em literatura especializada.

Figura 6 – Técnica de Identificação dos fungos.



Fonte: Dados da pesquisa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COLETAS, PLAQUEAMENTO E ISOLAMENTO

O processo de compostagem durou noventa e três dias. No total foram realizadas sete (7) coletas. Ao final das sete coletas foram obtidos 36 isolados fúngicos conforme apresentado na tabela 4. Mesmo com uma grande quantidade de isolados obtidos, pode-se afirmar que não foram isolados todos os microrganismos presentes no sistema, pois conforme Miller (1992) o processo de compostagem é marcado por uma contínua mudança das espécies de microrganismos, devido às modificações nas condições do meio, sendo praticamente impossível identificar todos os presentes.

Tabela 4 - Números de Isolados obtidos em cada coleta.

COLETAS	ISOLADOS OBTIDOS
01	04
02	05
03	07
04	06
05	04
06	05
07	05

Fonte: Dados da pesquisa.

As amostras retiradas do tanque de compostagem foram diluídas em série e plaqueadas conforme descrito no item Plaqueamento. A tabela 5 apresenta os valores de UFCs verificadas em cada coleta. Os números de UFC apresentados indicam que durante todo o processo de compostagem ocorreu grande quantidade de microrganismo. De acordo com Rappe e Giovannoni (2003) independentes de isolamento e cultivo apenas uma pequena parte dos microrganismos (<10% em solo) podem ser isolados e cultivados.

Tabela 5 - Números de colônias de cada coleta.

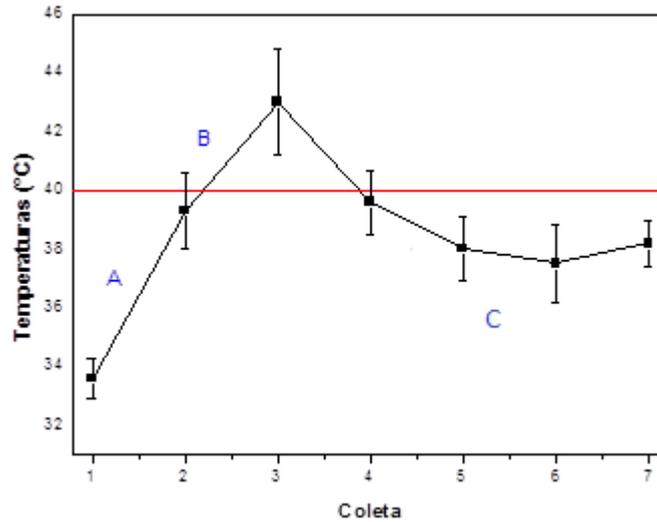
COLETAS	UFC.g⁻¹
01	5,0 x 10 ⁴
02	6,0 x 10 ⁴
03	3,5 x 10 ⁴
04	3,0 x 10 ⁴
05	2,4 x 10 ⁴
06	4,7 x 10 ⁴
07	3,5 x 10 ⁴

Fonte: Dados da pesquisa.

5.2 TEMPERATURA E UMIDADE DA COMPOSTEIRA

A temperatura no tanque de compostagem variou entre 34,0°C e 43,0°C. Segundo Trautmann e Olynciw (2005) o processo de compostagem pode ser dividido em quatro fases conforme a variação da temperatura. Na figura 7 podem ser observadas as fases mesofílica, que está situado abaixo da linha vermelha, e termofílica, indicada acima da linha vermelha. Ainda, é possível observar 3 (três) fases, sendo a primeira a fase mesofílica (A) com duração média de 15 dias, na qual foram realizadas duas coletas, a segunda fase, a termofílica (B) com duração média de um mês. Nessa fase foi realizada apenas uma coleta. E a terceira fase, de resfriamento e maturação (C) que teve início com a diminuição da temperatura, na qual foram realizadas quatro coletas.

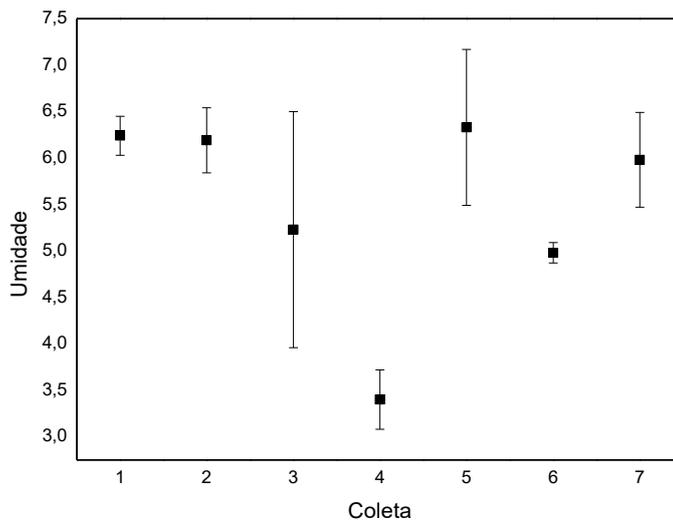
Figura 7 - Variação de temperatura no tanque de compostagem nas sete coletas realizadas (-■-). Os limites superiores e inferiores indicam o desvio padrão. As fases da compostagem estão representadas por letras, sendo A: fase mesofílica, B: fase termofílica, C: fase de resfriamento e de maturação.



Fonte: Dados da pesquisa.

Na figura 8 encontram-se os resultados dos teores de umidade referentes ao momento de cada coleta. Como pode ser observado, os valores variaram de 3% a 6,2%. Segundo Kiehl (1985) os valores ideais de umidade na compostagem estão na faixa de 40% a 60%.

Figura 8 - Umidade da amostra verificada após 24h. Os limites inferiores e superiores indicam o desvio padrão.



Fonte: Dados da pesquisa.

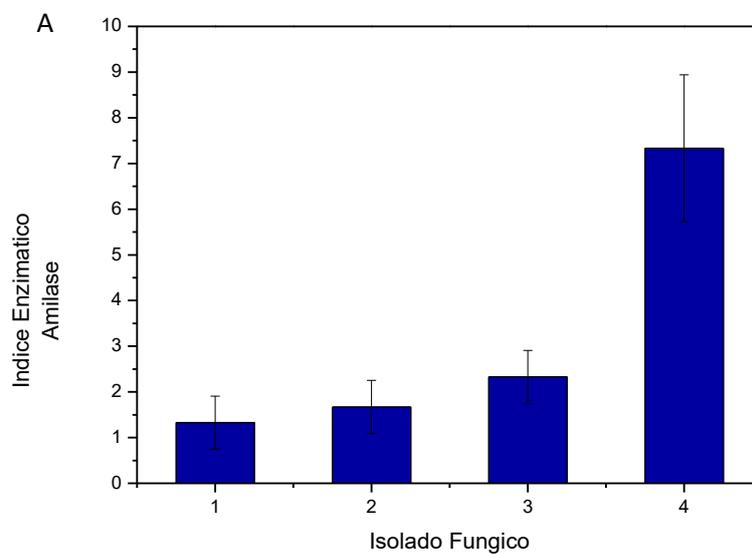
A aeração é considerada como o principal mecanismo capaz de evitar altos índices de temperatura durante o processo de compostagem, além de aumentar a velocidade de oxidação

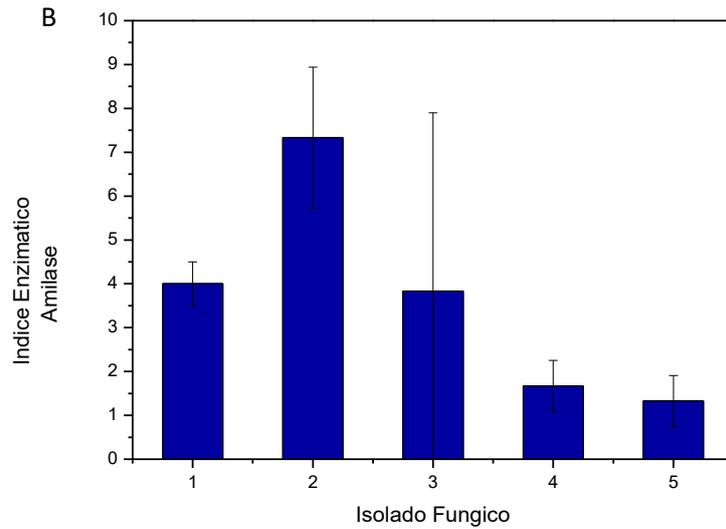
e de diminuir a liberação de odores e reduzir o excesso de umidade de um material em decomposição (PEREIRA NETO, 1994; KIEHL, 2004). Dessa forma, os baixos valores de temperatura e umidade devem-se, provavelmente, ao fato das coletas terem sido realizadas um dia após o revolvimento do composto, o que proporcionou diminuição da temperatura e da umidade.

5.3 DETECÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA AMILASE

Todos os fungos isolados nas coletas 1 e 2 (figura 9A e 9B) apresentaram produção de enzimas amilolíticas, sendo que, nas primeira e segunda coletas destacaram-se os isolados fúngicos n° 4 e n°2, respectivamente, ambos com IE de 7,33.

Figura 9 - Índices enzimáticos (IE) para a atividade amilolítica obtida para os fungos isolados durante a fase mesofílica da compostagem. A: Coleta n°1; B: coleta n° 2. Os limites superiores e inferiores indicam o desvio padrão.

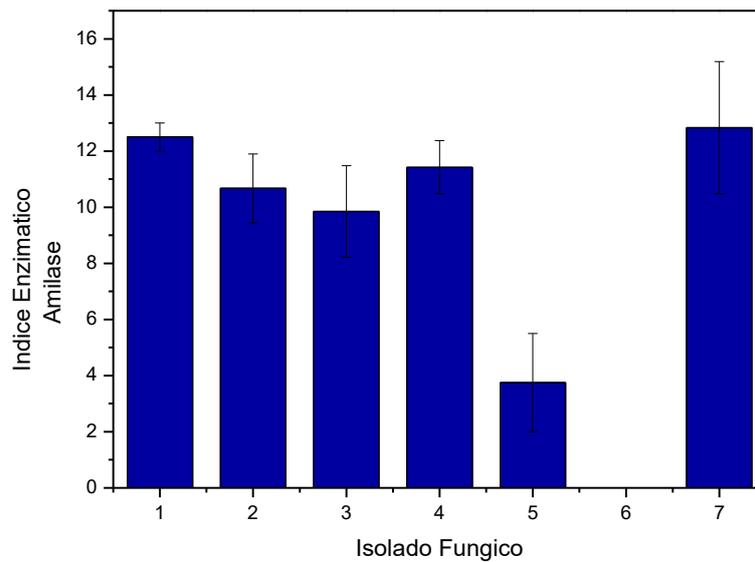




Fonte: Dados da pesquisa.

Na terceira coleta (figura 10) com exceção do isolado fúngico n° 6, todos os demais apresentaram atividade amilolítica, nas condições avaliadas. Os isolados 1, 4 e 7 apresentaram maiores valores de IE, com 12,5; 11,42 e 12,83, respectivamente.

Figura 10 - Índices enzimáticos (IE) para a atividade amilolítica obtida para os fungos isolados durante a fase termofílica da compostagem: coleta n° 3. Os limites superiores e inferiores indicam o desvio padrão.

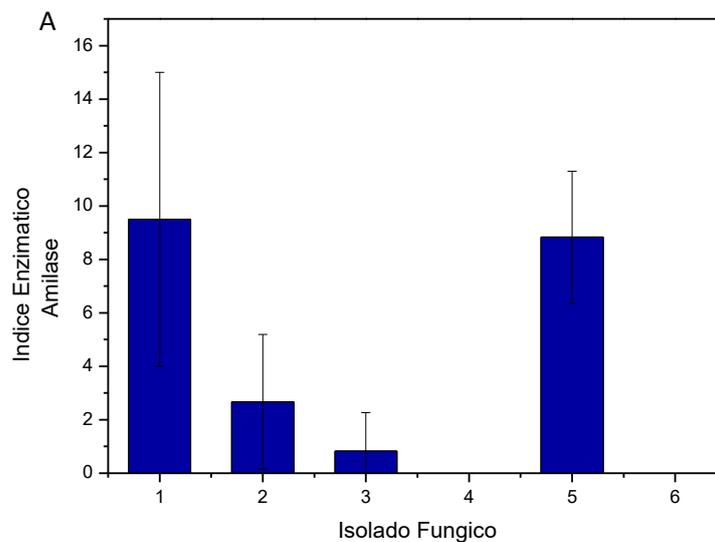


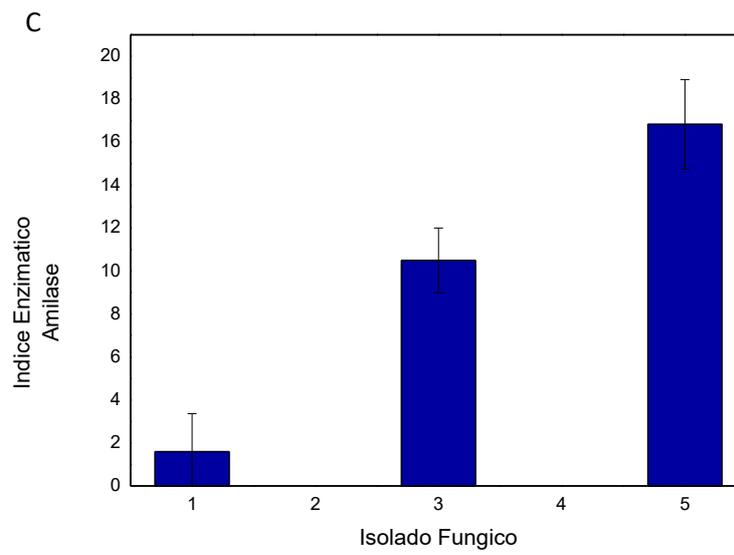
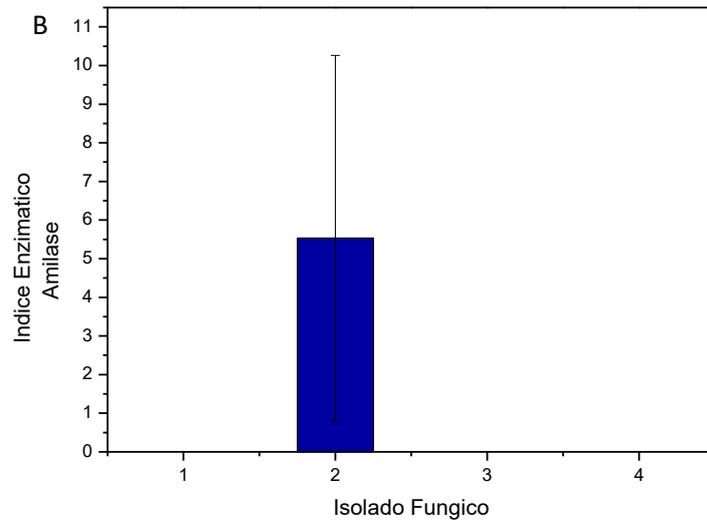
Fonte: Dados da pesquisa.

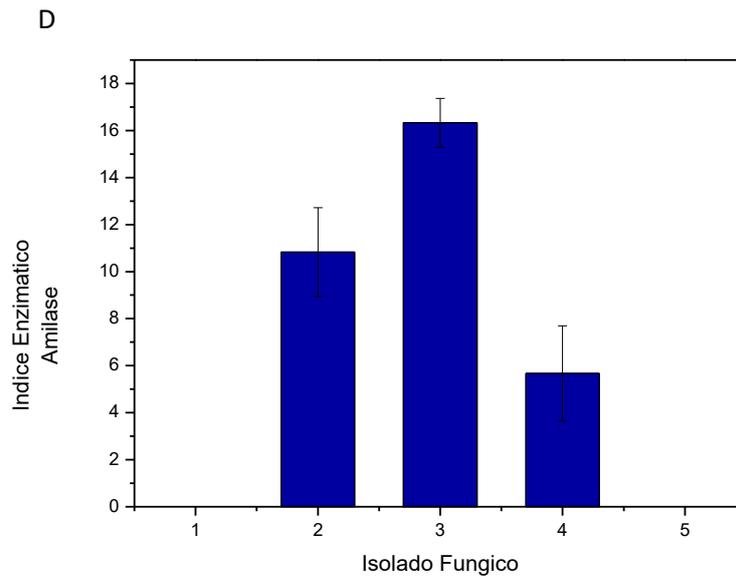
Na quarta coleta (figura 11A) os isolados 1 e 5 apresentaram de IE 9,5 e 8,8, respectivamente, enquanto os isolados n° 4 e n°6 não apresentaram essa atividade. Na quinta coleta (figura 11 B) apenas o isolado fúngico n° 2 foi capaz de degradar o amido, com IE determinado em 5,53. Nas sexta e sétima coletas (figura 11 C e 11 D) os maiores valores de IE foram de 16,83 e 16,33 produzidos pelos isolados fúngicos n°5 e n° 3, respectivamente.

Os altos valores de desvio padrão nas figuras 9 a 11 devem - se a dificuldade da enzima em se difundir no gel de ágar, o que pode ser afetado pela temperatura de incubação, uma vez que esta pode deixar o meio mais ou menos fluido, facilitando ou dificultando difusão da enzima pelo meio (GIONGO et al.;2006 e GONÇALVES et al. 2007).

Figura 11 - Índices enzimáticos (IE) para a atividade amilolítica obtida para os fungos isolados durante a fase de resfriamento e maturação. A: coleta n° 4; B: coleta n° 5; C: coleta n° 6; D: coleta n° 7. Os limites superiores e inferiores indicam o desvio padrão.







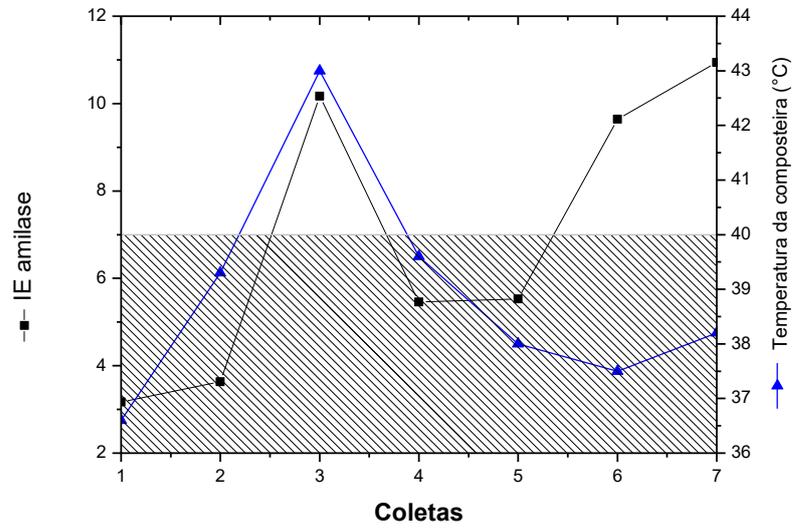
Fonte: Dados da pesquisa

Os resultados comprovam que os microrganismos presentes na compostagem são capazes de produzir enzimas amilolíticas e que essas enzimas participam da degradação da matéria orgânica.

5.4 PRODUÇÃO DE AMILASE DURANTE O PROCESSO DE COMPOSTAGEM

Na figura 12 está apresentada a média de produção de enzimas amilolíticas (IE) verificadas para os isolados fúngicos obtidos nesse estudo. Verifica-se nesse figura que os fungos produtores de enzimas degradadoras do amido participam de todo o processo de compostagem, sendo que a maior expressão dessa atividade foi verificada nos fungos isolados da fase termofílica (coleta n° 3), e da fase de maturação (coletas 6 e sete). Possivelmente, a presença desses microrganismos em todo processo indica que inicialmente ocorre degração do amido livre e nas fases subsequentes, esses microrganismos passam a degradar o amido que anteriormente estava disposto no interior das células vegetais, e que foi liberado para o meio externo devido a degradação de polímeros mais complexos como a celulose. Visto que em trabalho realizado anteriormente (DELGADO, 2017) verificou-se um pico de atividade de celulasas na coleta n°5.

Figura 12 - Produção de amilase média dos microrganismos isolados durante a compostagem. A região hachurada indica a região mesofílica.

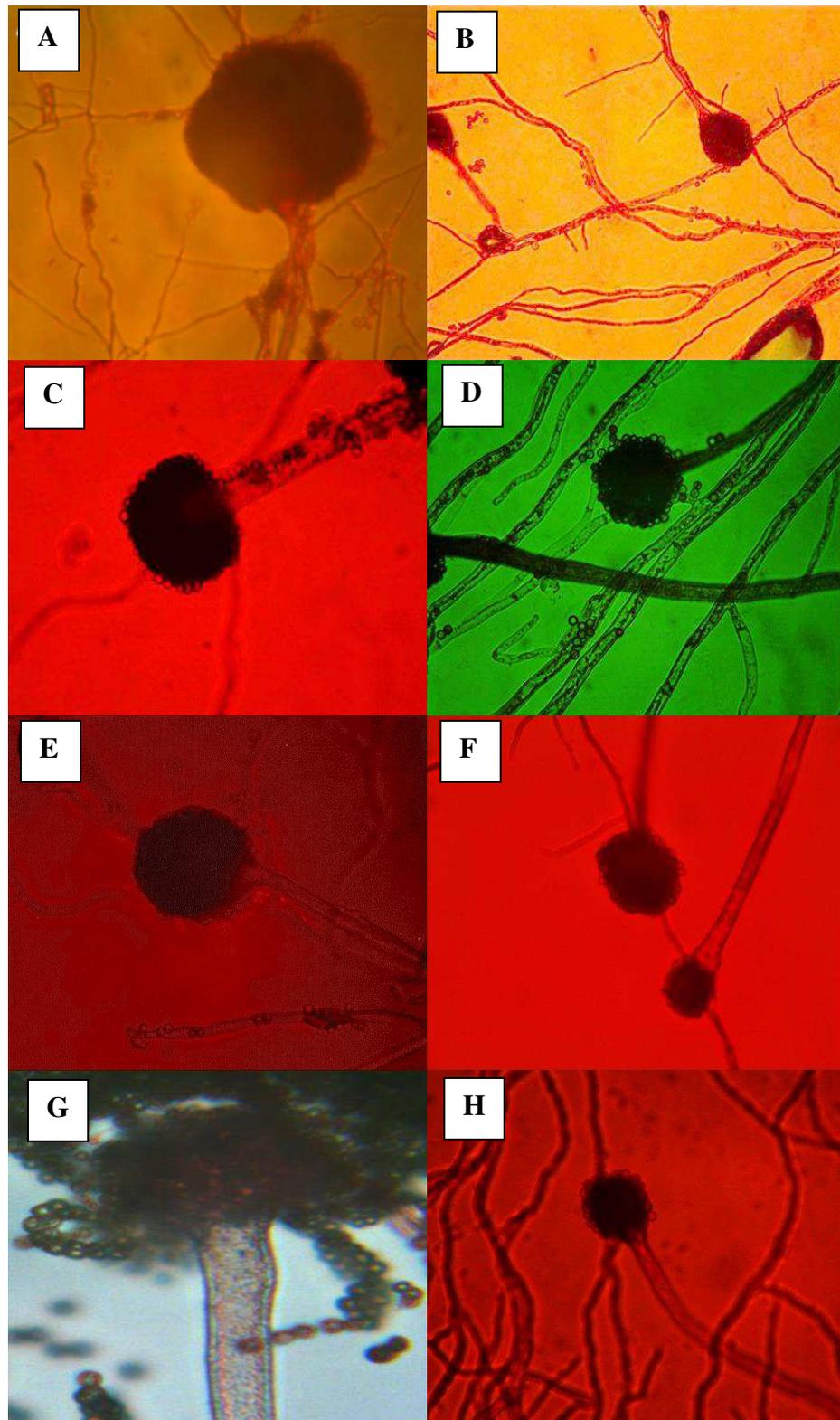


Fonte: Dados da pesquisa.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Após a detecção da produção de enzimas, os melhores produtores de enzimas amilolíticas foram submetidos a identificação.

Figura 13 - Estrutura microscópicas dos isolados A (primeira coleta isolado 1-72h), B (segunda coleta isolado 2-24h), C e D (terceira coleta isolados 1 e 7 - 48h), E (quarta coleta isolado 1 -72h), F (quinta coleta isolado 2-48h), G (sexta coleta isolado 5-48h) e H (sétima coleta isolado 3-48h).



Fonte: Dados da pesquisa.

Diante das imagens obtidas os fungos foram identificados como pertencentes ao gênero *Aspergillus*. A figura 13 representa as estruturas microscópicas na qual pode ser identificado o gênero dos maiores produtores de amilase.

O gênero *Aspergillus* possui cerca de 260 espécies (SAMSON; VARGA, 2009). Este gênero é considerado cosmopolita e vastamente encontrado na natureza (KLICH, 2002; PITT; HOCKING, 1997). Em relação à morfologia dos *Aspergillus*, as colônias possuem uma variação na coloração, sendo esta a fundamental característica macroscópica para classificação. As colorações geralmente são em tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco (KLICH, 2002; VARGA et al., 2004).

As espécies possuem um conidióforo, asseptado e com a base geralmente no formato de “T” ou “L”, sendo chamado de “célula pé”, acoplada a uma hifa vegetativa. O conidióforo vai da célula pé até à vesícula, na qual as células conidiogênicas métulas e fiálides são constituídas (KLICH, 2002; KOZAKIEWICZ, 1989; RAPER; FENNELL, 1965).

6 CONCLUSÕES

- Este trabalho proporcionou a elaboração de uma coleção de fungos filamentosos com potencial de produção de enzimas amilolíticas;
- O estudo da temperatura permitiu identificar as fases mesófila e térmica do processo de compostagem acompanhado;
- Dos trinta e seis (36) isolados fúngicos obtidos, vinte e seis (26) apresentaram potencial para a produção de amilase;
- Todos os fungos isolados durante o processo foram identificados como pertencentes ao gênero *Aspergillus*, que é considerado como um gênero cosmopolita.
- O presente trabalho trás a possibilidade de desenvolvimento de bioprocessos, visando a produção de enzimas amilolíticas, bem como aplicações em processos industriais.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Detecção e Identificação dos fungos de Importância Médica**. Módulo VIII, 30 p, 2004.
- ALVA, S.; ANUPAMA, J.; SAVLA J.; CHIU, Y.Y.; et al. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. **Afr J Biotechnol**; v.6, n.5, p 576-81. 2007.
- ASOODEH, A.; CHAMANI, J.; LAGZIAN, M. A novel thermostable, acidophilic α -amylase from a new thermophilic "*Bacillus* sp. Ferdowsicous" isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. **Mashhad: International Journal of Biological Macromolecules**, v.46, p. 289-297, 2010.
- BAI, Y.; WANG, J.; ZHANG, Z.; SHI, P.; LUO, H.; HUANG, H.; LUO, C.; YAO, B. A novel family 9 β -1,3(4)-glucanase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 with potential applications in the brewing industry. **Verlag: Applied Microbiology Biotechnology**, v.87, p.251-259, 2010.
- BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de Microrganismos Produtores de Enzimas Hidrolíticas Isolados da Região do Meio Oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, Joaçaba v. 11 n. 2, p. 15-28, 2011.
- BARREIRA, L. P. **Avaliação das usinas de compostagem do estado de São Paulo em função da qualidade dos compostos e processos de produção**. 2005. 204f. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- BATISTA, J.G.F., BATISTA, E.R.B. **Compostagem: Utilização em horticultura**. Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, Açores, 2007, 252 p.
- BERNAL, M. P.; ALBURQUERQUE, J. A.; MORAL, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. **Bioresource Technology**, v.100, p.5444-5453, 2009.
- BERNHART, M.; FASINA, O. O. Moisture effect on the storage, handling and flow properties of poultry litter. **Waste Management**, v.29, p.1392-1398, 2009.
- BIDONE, F.R.A.; POVINELLI, J. **Conceitos básicos de resíduos sólidos**. São Carlos: EDUSP, 109p. 1999.
- BORGIO, J.F. Immobilization of microbial (wild and mutant strains) amylase on coconut fiber and alginate matrix for enhanced activity. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 01, n. 03, p. 255-264, 2011.
- BRAGA, G. U. L.; DESTÉFANO, R. H. R.; MESSIAS, C. L. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 2, p. 107-113, 1999.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. Brasília: Editora MS. 2005, 1017p.
- BRENDA Database: **The Comprehensive Enzyme Information System**. (2017). Disponível em: < . <http://www.brenda-enzymes.org/>>. Acesso em: 05 abr. 2017.

BRITO, L.M.C.M. **Manual de Compostagem**. Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, Instituto Superior de Viana do Castelo. 2005 Disponível em<<http://www.ci.esapl.pt/mbrito/compostagem>>. Acesso em: 13 de Abr de 2017.

CARVALHO, R.V. et al. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n2, p 380-386, 2008.

CASTELLANI, A. A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Mclean. v. 70, p. 181-184, 1931.

CASTRO, A.M.; CARVALHO, D.F.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R. Economic analysis of the production of amylases and other hydrolases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of babassu cake. **Enzyme Research**, p. 1-9, 2010.

COMPANIES AND MARKETS – Disponível em:<<http://www.companiesandmarkets.com/Market/Industrial/All?Sectors=IS1013&Keywords=enzyme&SearchType=Phrase&OrderByType=Date&ReportPublishType=All&Publishers=-1>>. Acesso em: 08 de novembro de 2017.

CUNHA QUEDA, A.C.F. **Dinâmica do azoto durante a compostagem de materiais biológicos putrescíveis**. (Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Agro-Industrial). Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa. 1999, 257 p.

DELGADO, R. F. de A. **Avaliação potencial de fungos obtidos durante processo de compostagem para produção de celulase (FPASE)**. 2017. Trabalho e Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos)- Universidade Federal de Campina Grande, Sumé-PB, 2017. 53 p.

DEMIRKAN, E.S. et al. α -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2629-2636, 2005.

DIAS, D. C. DA S. **Estratégias para gerenciamento de resíduos sólidos urbanos no município de piracanjuba-GO**. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Goiás - Goiânia – GO, 2009.

EIJSINK, V.G.H., VAAJE-KOLSTAD, G., VARUM, K.M., HORN, S.J. Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. **Trends Biotechnol**, v. 26, p 228-235. 2008.

EMTENANI, S.; ASOODEHA, A.; EMTENANI, S. Gene cloning and characterization of a thermostable organic-tolerant α -amylase from *Bacillus subtilis*. Mashhad: **International Journal of Biological Macromolecules**. v.72, p.290–298, 2015.

FERNANDES, F.; SILVA, S. M. C. P. **Manual prático para compostagem de biossólidos**. Rio de Janeiro: ABES, 79p. 1999.

FERREIRA-NOZAWA, M.S.; REZENDE, J.L.; GUIMARÃES, L.H.S.; TERENCEZI, H.F.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Mycelial glucoamylases produced by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* strains 15.1 and 15.8: purification and biochemical characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p. 344-352, 2008.

- FIALHO, L.L. **Caracterização da matéria orgânica em processo de compostagem por métodos convencionais e espectroscópicos**. 2007. 170f. Tese (Doutorado em Ciências – Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Carlos. 2007.
- GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.
- GIONGO, J.L. **Caracterização e Aplicação de proteases Produzidas por Linhagens de Bacillus sp.** UFRS, 81p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós – Graduação em Microbiologia agrícola e do Ambiente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. RS, 2006.
- GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quim. Nova**. V. 30: 136-145, 2007.
- GONÇALVES, F.A.G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2007.
- GUANDALINI, N.C. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo Metarhizium anisopliae utilizando resíduos amiláceos como substrato**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas/SP, 2007.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p 597- 607. 1975.
- HASHEMI, M.; DARWISH, S.M.I. Production of bioethanol and associated by- products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass & Bioenergy**, Saudi Arabia, p. 953-959. 2010.
- HAY, J. C. Pathogen destruction and biosolids composting. **Biocycle**, Emmaus, v. 37, n. 6, p. 67-76, 1996.
- INÁCIO, C. T.; MILLER, P. R. M. **Compostagem: ciência e prática para a gestão de resíduos orgânicos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009.
- KANDRA, L. α -amylases of medical and industrial importance. **Journal of Molecular Structure**, v. 666-667, p. 487- 498, 2003.
- KARADAG, D.; ÖZKAYA, B.; ÖLMEZ, E.; NISSILA, M. E.; ÇAKMAKÇI, M.; YILDIZ, S.; PUHAKKA, J. A. Profiling of bacterial community in a full-scale aerobic composting plant. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.77, p.85-90, 2013.
- KIEHL, Edmar José. **Fertilizantes Orgânicos**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1985, 492p.
- KIEHL, Edmar José. **Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto**. 4.ed. Piracicaba: E. J. Kiehl, 2004, 173p.

- KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 1, p. 21-27, 2002.
- KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus* species on stored products. **Mycological Papers**, Netherlands, v. 161, p. 1-188, 1989.
- KUBITZA, F.; CAMPOS, J. L. O aproveitamento dos subprodutos do processamento de pescado. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 94, p. 23-29, 2006.
- KUMAR, M.; OU, Y-L.; LIN, J-G. Co-composting of green waste and food waste at low C/N ratio. **Waste Management**, v.30, n.4, p.602-609, 2010.
- KUMAR, V.; SAHAI, V.; BISARIA, V.S. Production of amylase and chlamydospores by *Piriformospora indica*, a root endophytic fungus. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 124-128, 2012.
- LASZLO, H.; BASSO, L. M.; COELHO, C. M. L. **Química de Alimentos**, Nobel, São Paulo, p.98, 1986.
- LI, X.; ZHANG, R.; PANG, Y. Characteristics of dairy manure composting with rice straw. **Bioresource Technology**, v.99, p.359-367, 2008.
- MARKET RESEARCH NEWS. In: Report - **Global Industrial Enzymes Market: An Analysis**. 2011.
- MARYAN, A.S, MONTAZER, M. A cleaner production of denim garment using one step treatment with amylase/celulase/laccase. **J Clean Prod**, 2013, v.57, p 320-6.
- MASSUKADO, L.M. **Desenvolvimento do processo de compostagem em unidade descentralizada e proposta de software livre para o gerenciamento municipal dos resíduos sólidos domiciliares**. 2008. 204 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- MILLER, F.C. Composting as a process base don the control of ecologically selective factors. In Meeting, F. B. **Soil Microb. Ecol.**, v.18. p 515 – 543, 1992.
- MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A.H.S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1217–1224, 2006.
- MOORE, G.R.P.; DO CANTO, L.R.; AMANTE, E.R. Cassava and corn starch in maltodextrin production. **Química nova**, v. 28, n.4, p. 596-600, 2005.
- MOREIRA, F.G., LIMA, F.A., PEDRINHO, S.R.F., LENARTOVICZ, V., SOUZA, C.G.M.,PERALTA, R.M. Production of amylases by *Aspergillus tamarii*. **Rev Microbiol**; v.30, p 157-62. 1999.
- MOREL, J.L.; COLIN, F.; GERMON, J.C.; GODIN, P.; JUSTE, C. Methods for evaluation of the maturity of municipal refuse compost. In: Gasser, J.K. Composting of agricultural and other wastes. **Elsevier**: Londres, p.56-72, 1985.
- MUSTIN, M. **Le compost Gestion de la matière organique**. Édition François Dubusc, 1987, 954 p.

- NELSON, D.L.; COX, M.M. 2014. **Principios de bioquímica de Lehninger**. 6ª edição. Editora artmed, Porto Alegre. 1328p.
- NGUYEN, Q.D.; REZESSY-SZABÓ, J.M.; CLAEYSSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, Á. Purification and characterization of amyolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enz. Microbial Technol.** v. 31, p. 345-352, 2002.
- NIELSEN, J.E.; BORCHERT, T.V. Proteinengineering of bacterial α -amylases. **Biochimistry Biophysic Acta**, v. 1543, n. 2, p. 253-74, 2000.
- PANDEY, A. et al. *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*. **Academic Press**, Reino Unido, v.1, 2011.
- PANDEY, A; WEBB, C; SOCCOL, C.R; LARROCHE, C. *Enzyme technology*. **New Delhi: Asiatech Publishers**, 2005. p.760.
- PEIXOTO S.C., JORGE J.A., TERENCE H.F., POLIZELI M.L.T.M., *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases, **International Microbiology**. v. 6, p269-273. 2003.
- PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; SANDRIM, V.C.; GUIMARÃES, L.H.S.; JORGE, J.A.; et al. Evidence of thermostable amyolytic activity from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, p. 329-334, 2008.
- PEREIRA NETO, J.T. 1994. Tratamento, reciclagem e impacto ambiental de dejetos agrícolas. In: Conferência sobre Agricultura e Meio Ambiente, 1., 1992, Viçosa. **Anais...** UFV-NEPEMA. Viçosa. p. 61-74.
- PETRIC, I.; SESTAN, A.; SESTAN, I. Influence of initial moisture content on the composting of poultry manure with wheat straw. **Biosystems Engineering**, v.104, p.125-134, 2009.
- PIOTROWSKA-CYPLIK, A.; CHZANOWSKI, L.; CYPLIK, P.; DACH, J.; et al. Composting of oiled bleaching earth: Fatty acids degradation, phytotoxicity and mutagenicity changes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.78, p.49-57, 2013.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 540 p.
- RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C. Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3044-3050, 2008.
- RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus Aspergillus**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965. 686 p.
- RAPPE, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annu. Rev. Microbiol.** V.57, p 369-394.2003.
- ROY, J.K.; BORAH, A.; MAHANTA, C.L.; MUKHERJEE, A.K. Cloning and overexpression of raw starch digesting α -amylase gene from *Bacillus subtilis* strain AS01a in *Escherichia coli* and application of the purified recombinant α -amylase (AmyBS-I) in raw starch digestion and

- baking industry. Assam: **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.97, p.118– 129, 2013.
- RUGGIERI, L.; GEA, T.; ARTOLA, A.; SANCHEZ, A. A study on air filled porosity evolution in sludge composting. **International Journal of Environment and Waste Management**, v.9, n.1, p.56-58, 2012.
- SAMSON, R. A; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, Oxford, v. 47, p. 13-20, 2009. Suppl.
- SHARMA, V. K.; CANDITELLI, M.; FORTUNA, F.; CORNACCHIA, C. Processing of urban and agroindustrial residues by anaerobic composting: review. **Energy Conversion and Management**. v.38, p.453-478, 1997.
- SIGMA-ALDRICH. 2014. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2017.
- SOCOL, C.R. ILOKI, I.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M. Glucoamylase. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., p. 221-230. 2005.
- SOUZA, P.M.; MAGALHÃES, P.O. Application of microbial alfa-amylase in industry – a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 850-861, 2010.
- SPIER, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- SUMERLY, R. et al. Hidrólise do Amido. **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. v. 3, cap. 15. p. 377-395. 2003.
- SYNOWWIECKI, J. **Industrial Enzymes: The use os starch processing enzymes in the food industry**. Gdansk: Springer. p. 19-33, 2007.
- SZAKACS, G. Production of Industrial Enzymes in Solid-State Fermentation. In: Anais International Congress on Bioprocess in Food Industries, **Clermont-Ferrand**, France. 2004. v. 1. p. 20.
- TANGPHATSORNRUANG, S.; NACONSIE, M.; THAMMARONGTHAM, C.; NARANGAJAVANA, J. Isolation and characterization of an alpha-amylase gene in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Physiology Biochemistry**, v 43, n. 9, p. 821-827, 2005.
- THE FREEDONIA GROUP. Disponível em: <<https://www.freedoniagroup.com/>>. Acesso em: 08 de novembro de 2017.
- TRAUTMANN, N.; OLYNCIW, E. Compost Microorganisms. In: Cornell Composting, **Science & Engineering**, 2005.
- VALENTE, B. S.. **Tecnologias aeróbias no tratamento de resíduos da produção animal: compostagem e vermicompostagem**. 2013. 102f. Tese de Doutorado em Ciências (Produção Animal) - Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- VALENTE, B. S.; XAVIER, E.G.; MORSELLI, T. B. G. A.; JAHNKE, D. S.; et al. Fatores que afetam o desenvolvimento da compostagem de resíduos orgânicos. **Archivos de Zootecnia**. v.58. p.60-76, 2009.

VAN DER MAAREL, M.J.E.C., LEEMHUIS, H. Starch modification with microbial alpha-glucanotransferase enzymes. Veendam: **Carbohydrate Polymers**. v. 93, p. 116–121, 2013.

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

VARGA, J. et al. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 627–640, 2004.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hiperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 65, p.1-43, 2001.

WANG, S.; LIANG, Y.; LIANG, T. Purification and characterization of a novel alkali-stable α -amylase from *Chryseobacterium taeanense* TKU001, and application in antioxidant and prebiotic. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 745–750, 2011.

ZHANG, Y.; HE, Y. Co-compostig solid swine manure with pine sawdust as organic substrate. **Bioresource Technology**, v.97, p.2024-2031, 2006.