

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

VANESSA KAMILA DE MELLO GRIZAFIS

**POTENCIAL AMILÁSICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA POLPA
DA BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas*)**

PONTA GROSSA
2020

VANESSA KAMILA DE MELLO GRIZAFIS

**POTENCIAL AMILÁSICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA POLPA
DA BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas*)**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Mestrado em Bioenergia, Área de Concentração: Biocombustíveis.

Orientador: Prof. Pedro Henrique Weirich Neto.

PONTA GROSSA

2020

G872 Grizafis, Vanessa Kamila de Mello
Potencial amilásico de fungos filamentosos isolados da polpa de batata-doce
(*Ipomoea batatas*) / Vanessa Kamila de Mello Grizafis. Ponta Grossa, 2020.
67 f.

Dissertação (Mestrado em Bioenergia - Área de Concentração:
Biocombustíveis), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Weirich Neto.

1. Amido. 2. Amilase. 3. Hidrólise. 4. Etanol. 5. Microrganismos. I. Weirich
Neto, Pedro Henrique. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Biocombustíveis. III.T.

CDD: 630



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

TERMO

TERMO DE APROVAÇÃO

VANESSA KAMILA DE MELLO GRIZAFIS

"POTENCIAL AMILÁSICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA POLPA DA BATATA DOCE (*Ipomoea batatas*)"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre
no Programa de Pós-Graduação em Bioenergia da Universidade Estadual de
Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Weirich Neto
UEPG/PR

Prof.^a Dr.^a Sandra Regina Masetto Antunes
UEPG/PR

Prof.^a Dr.^a Edilaine Maurícia Gelinski
Grabicoski
Consultora Independente em Fitopatologia

Ponta Grossa, 14 de maio de 2020



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Regina Masetto Antunes, Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia - Mestrado**, em 28/07/2020, às 15:34, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Henrique Weirich Neto, Professor(a)**, em 28/07/2020, às 16:41, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **EDILAINE MAURICIA GELINSKI GRABICOSKI, Usuário Externo**, em 29/07/2020, às 16:34, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **0258472** e o código CRC **5C46C8CF**.

20.000022173-5

0258472v5

Aos meus avós João (in memoriam), Leonyr (in memoriam) e Iria (in memoriam);

Aos meus pais, Nilson e Adeli;

A minha filha amada, luz da minha vida, Ysis.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Há quem propague a ideia de que Ciência e Religião não devem se misturar, porém não é o que percebo em vários agradecimentos de teses e dissertações, é como se uma força sobrenatural nos conduzisse mesmo. Já dizia Albert Einstein: “Todo aquele que está seriamente comprometido com o cultivo da ciência, chega a convencer-se de que, em todas as leis do universo, manifesta-se um espírito infinitamente superior ao homem, diante do qual nós, com nossos poderes, devemos nos sentir humildes”. Portanto, gostaria de iniciar meus agradecimentos a Deus, porque N'Ele vivemos, nos movemos e existimos (Atos 17:28).

À minha família, meus pais, minhas irmãs: Nilcéia Karine de Mello Wrobel e Denilce Kariene de Mello, meus cunhados: Alex Ricardo Wrobel e John Lennon de Jesus de Mello, por todo apoio e cuidado com a minha filha, nos momentos em que tive que me ausentar, durante as disciplinas do mestrado, não se conquista nada sozinho.

Ao meu esposo, Edérison Luiz Grizafis, por ser tão companheiro e incentivador, por ser mãe e pai da Ysis por vários momentos durante o curso, não somente quando precisei viajar para realizar as disciplinas, mas também durante os momentos em que eu precisei realizar os experimentos, realizar as atividades propostas pelos professores e também nos momentos da escrita da dissertação, amo você, obrigada por tudo.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Bioenergia, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Henrique Weirich Neto, pela confiança depositada em meu trabalho, pela autonomia que me proporcionou para desenvolver a pesquisa da melhor maneira possível, por todas as correções na dissertação que visaram o meu crescimento enquanto pesquisadora e por todos os ensinamentos que me proporcionou; gratidão.

Ao Prof. Dr. Jaime Alberti Gomes que com muita competência nos proporcionou vários momentos de aprendizado sobre a batata-doce e com o qual pude realizar meu estágio em Docência no Ensino Superior.

A minha querida Prof^a. Dr^a Sônia Alvim Veiga Pileggi, minha mãe científica, que me recebeu de braços abertos durante a graduação e da mesma maneira, me acolheu durante as pesquisas do mestrado, assim como o Prof. Dr. Marcos Pileggi serei eternamente grata.

A Prof^a. Dr^a Adriana Knob, pelas dicas durante a execução da pesquisa, mesmo distante, contribuiu muito para todo meu aprendizado e para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Salah Din Mahmud Hasan pelas orientações na execução do experimento final da dissertação, não teria sido possível a realização sem seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Eder Carlos Ferreira de Souza, pelas orientações e ensinamentos com relação a análise química dos experimentos.

A todos os colegas do mestrado, em especial as minhas amigas Mariane, Kauana e Glaucia, por todo apoio emocional durante as viagens, vocês foram anjos

enviadas pelo Senhor para acalmar o coração de uma mãe. Aos meninos, Gabriel, Wallace e Edson pela hospedagem e transporte em Guarapuava, vocês são sensacionais.

A MSc. Natali Calderari pelo auxílio nas fotografias.

Aos técnicos e todos os alunos do Laboratório de Mecanização Agrícola, que tanto se dedicam aos projetos de pesquisa e extensão, ao plantio e colheita da batata-doce, sem vocês, não teria sido possível o início desta pesquisa.

Aos técnicos Mauricio e Jana e a aluna de iniciação científica Brenda do Laboratório de Microbiologia, por todo apoio durante a realização dos experimentos e preparo dos materiais.

A Prof^a. Dr^a Mara Cristina de Almeida Matiello, do Laboratório de Genética Evolutiva, pelas orientações na realização das fotografias do microcultivo no Microscópio de Epifluorescência.

Ao técnico do Laboratório de Química, Valdeci, pela ajuda com os reagentes e pelos ensinamentos e apoio com relação às soluções necessárias para a realização dos experimentos.

Aos alunos e técnicos do Clabmu, em especial a Cris e a Geovana, pelo auxílio no espectrofotômetro UV-VIS e por cederem um espaço no laboratório durante a realização dos experimentos finais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos do curso de mestrado.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

“O papel do infinitamente pequeno é infinitamente grande”

Louis Pasteur

RESUMO

A batata-doce é uma cultura rústica, de ampla adaptação e com grande conteúdo de amido, sendo assim com inúmeras aptidões. Para transformação da batata-doce em biocombustível, alguns processos são necessários. O sucesso da produção de etanol a partir da batata-doce depende da transformação do amido em açúcares fermentescíveis. O processo de conversão mais utilizado é a hidrólise enzimática, a qual utiliza enzimas comercialmente disponíveis. Porém, este processo pode ser realizado através de enzimas secretadas por fungos filamentosos. Neste trabalho foi avaliado o potencial amilásico de fungos filamentosos que colonizam naturalmente a batata-doce. Estes foram isolados, testados quanto à produção enzimática e identificados morfológicamente. Foram isolados 51 fungos da polpa das batatas-doces Beauregard e BRS-Amélia. Deste total, 27 linhagens apresentaram capacidade de hidrólise do amido através da fermentação em estado sólido. Destes, seis revelaram índice enzimático $\geq 2,0$ e foram identificados como *Aspergillus* sp e *Penicilium* sp. O extrato bruto do gênero *Aspergillus* sp., mostrou os maiores resultados na conversão em glicose. Este fato indica o potencial destas linhagens na produção de amilase, importante enzima para a produção de etanol.

Palavras-chave: amido, amilase, hidrólise, etanol, microrganismos

ABSTRACT

The sweet potato is a rustic culture, widely adapted and with a high starch content, thus having innumerable aptitudes. For the transformation of sweet potatoes into biofuel, some processes are necessary. The success of ethanol production from sweet potatoes depends on the transformation of starch in fermentable sugars. The most used conversion process is enzymatic hydrolysis, which uses commercially available enzymes. However, this process can be carried out through enzymes secreted by filamentous fungi. In this work, filamentous fungi that naturally colonized sweet potatoes were studied. These were isolated, tested for enzymatic activity and identified by microculture. 51 fungi from the pulp of sweet potatoes Beauregard and BRS-Amélia were isolated, 27 of them showing the ability to hydrolyze starch. Of these, six showed an enzyme index ≥ 2.0 and were identified as *Aspergillus* sp and *Penicilium* sp. The crude extract of the genus *Aspergillus* sp., showed the greatest results in the conversion to glucose. This fact indicates the potential of these fungi in the production of amylase, an important enzyme for the production of ethanol.

Keywords: starch; amylase; hydrolysis; ethanol; microorganisms

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRAFICO 1 -	Matriz Energética Mundial, Ano Base, 2016.....	17
GRAFICO 2 -	Matriz Energética Brasileira, Ano Base, 2017.....	18
FIGURA 1 -	Estrutura do amido com as moléculas amilose e amilopectina.....	26
FIGURA 2 -	Fluxograma da produção de etanol de batata-doce.....	29
FIGURA 3 -	Reação de redução do etanol na fermentação alcoólica.....	30
FIGURA 4 -	Processos fermentativos realizados por microrganismos para a produção de enzimas microbianas (FES, FSm, FSeq).....	32
FIGURA 5 -	Colonização natural da polpa de batata-doce Beauregard, antes e após exposição ao ar atmosférico (15/09 a 10/10/2018, Ponta Grossa, PR).....	38
FIGURA 6 -	Placa de Petri com micélio de fungo BRGD 08 10^{-5} (incubado a 28 °C por 5 dias em agar+amido) e placa com aplicação de 1 mL de lugol (5% iodo), identificando halo (mais claro) de hidrólise, indicando exsudação de amilase pelo fungo presente.....	40
FIGURA 7 -	Lâmina de microcultivo do fungo BRGD 07 10^{-3} preparada em meio de cultura BDA, a 28 °C, 5 dias.....	42
FIGURA 8 -	Reagente ADNS após a redução ácido 3,5-dinitrosalicílico para ácido 3-amino,5-nitrosalicílico.....	44
FIGURA 9 -	Diversidade de fungos filamentosos isolados das batatas-doces (meio BDDA, 5 dias, 28°C).....	45
FIGURA 10 -	Halo de hidrólise do fungo BRGD 08 10^{-5} , evidenciado com lugol, caracterizando degradação do amido (meio agar+amido, após 5 dias, à 28°C em estufa BDO).....	46
FIGURA 11 -	Exemplo da morfologia dos conidióforos de <i>Aspergillus</i> sp. (A) <i>Penicillium</i> sp. (B), encontrados naturalmente nas batatas-doces Beauregard e BRS-Amélia identificados como produtores de Amilase (microscópio de epifluorescência Olympus BX41), 40x de aumento.....	50
FIGURA 12 -	Características morfológicas da colônia de <i>Aspergillus</i> sp (A) e <i>Penicillium</i> sp. (B) em meio BDA, após 5 dias de cultivo, à 28°C em câmara de incubação tipo	

BDO.....	51
----------	----

GRAFICO 3 - Curva analítica para método enzimático de detecção de glicose em espectrofotômetro (UV-VIS Varian 50 Conc, 540 nm de comprimento de onda.....	53
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Produtividade nacional e rendimento anual de diversas fontes de carboidratos e etanol.....	26
TABELA 2 -	Diâmetro de colônia e índice enzimático de 26 linhagens isoladas em batata-doce, genótipo Beauregard.....	47
TABELA 3 -	Diâmetro de colônia e índice enzimático de 25 linhagens isoladas em batata-doce, BRS-Amélia.....	48
TABELA 4 -	Diâmetro do halo e índice enzimático dos ensaios de bioprospecção e de confirmação dos isolados de fungos com índice $\geq$ a 2,0.....	49
TABELA 5 -	Absorbância observada (extrato bruto do isolado + amido após 5 min de incubação + ADNS) e glicose calculada conforme curva analítica determinada da atividade enzimática da fermentação submersa (espectrofotômetro UV-VIS Varian 50 Conc – 540 nm).....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 ETANOL	19
3.2 BATATA-DOCE	22
3.3 HIDRÓLISE DO AMIDO	27
3.4 FUNGOS FILAMENTOSOS E A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	30
3.5 ENZIMAS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	37
4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMILÁSICA	39
4.3 CÁLCULO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO	40
4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	41
4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DOS FUNGOS SELECIONADOS	42
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
5.1 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	45
5.2 BIOPROSPECÇÃO	46
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	49
5.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DOS FUNGOS E QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE	52
6 CONCLUSÕES	56
REFERENCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios deste século é o desenvolvimento de fontes energéticas limpas, obtidas a partir de fontes renováveis viáveis aos meios de produção, acessíveis em relação aos custos e que não comprometam os ecossistemas, bem como a saúde humana.

No Brasil, tem sido crescente a expansão de uso de biomassa visando produção de etanol e biodiesel, com finalidade de substituir ainda que parcialmente os derivados de petróleo. Este, reconhecidamente como, ambientalmente problemático e com reservas finitas. Pelo potencial brasileiro quanto à produção de biomassa, a pesquisa continuada para a diversificação da matriz energética brasileira se torna de grande importância.

O etanol (álcool etílico) é um dos principais alcoóis existentes. Além da utilização como combustível, ele possui outras finalidades como no ramo farmacêutico e para diversos outros processos industriais. No âmbito do etanol, o Brasil é referência, sendo o segundo maior produtor mundial através da cana de açúcar, porém, outras fontes podem ser exploradas, sendo a batata-doce um exemplo.

A batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) é hortaliça tuberosa, subterrânea, rústica e de ampla adaptação. Possui em sua composição açúcares simples como sacarose, glicose, frutose e maltose, o sucesso da produção de etanol pode se dar pelo grande conteúdo de amido. Porém para utilização deste tipo de molécula existe a necessidade da sua transformação em açúcares. Denominada de hidrólise, esta transformação consiste em ataque enzimático ou químico (ácido), visando diminuir a molécula de amido.

As amilases estão entre as enzimas com maior importância biotecnológica e podem ser obtidas de diversas fontes. Os fungos filamentosos são conhecidos por sua capacidade de produção enzimática e se destacam por secretarem enzimas diretamente no meio, não necessitando de ruptura citoplasmática. Uma grande variedade de microrganismos produz glicoamilases, enzima capaz de hidrolisar amido.

Existem dois métodos principais para a obtenção enzimática de fungos filamentosos: a fermentação submersa (FSm) e a fermentação em estado sólido (FES). A FES é rota tecnológica interessante para reaproveitar resíduos da agroindústria, podendo gerar produtos de alto valor agregado bem como otimizar

processo. A FSm é utilizada na maioria dos processos industriais para produção de enzimas microbianas.

A utilização de extratos brutos obtido nesses processos, em substituição a enzimas comerciais purificadas, podem mitigar custos de produção.

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram selecionar e identificar fungos com potencial para produção de amilase e caracterizar enzimáticamente os extratos brutos produzidos pelos melhores microrganismos isolados da batata-doce.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de enzimas por fungos degradadores de amido, obtidos na batata-doce, por diferentes rotas biotecnológicas.

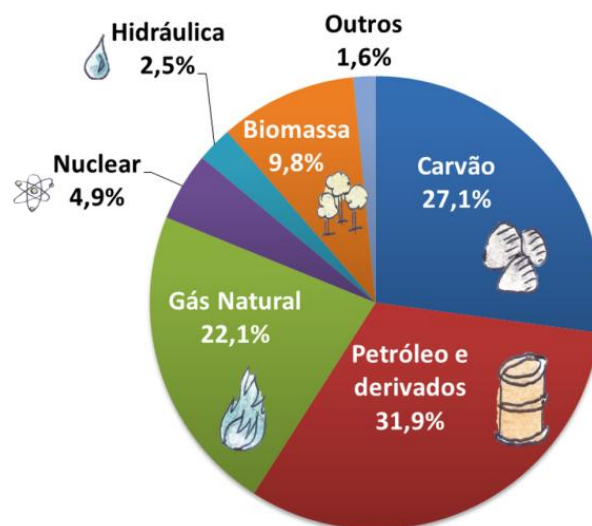
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar linhagens de fungos da polpa da batata-doce;
- b) Avaliar a produção de amilases de linhagens de fungos através da Fermentação em Estado Sólido;
- c) Identificar e caracterizar morfológicamente fungos produtores de amilases;
- d) Obter o extrato bruto de linhagens de fungos através da Fermentação Submersa;
- e) Quantificar a glicose gerada a partir da ação dos extratos brutos no amido.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Decorrente do crescimento econômico e tecnológico, a procura por fontes energéticas, é desafio mundial. As atividades humanas consomem cerca de 13 bilhões de toneladas equivalentes de petróleo (tep) por ano. Isto corresponde a uma potência de $15 \cdot 10^{12}$ watts (GOLDEMBERG, 2017). Mundialmente, a matriz energética é composta, principalmente, por fontes não renováveis, como carvão, petróleo e gás natural (Gráfico1) (AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA - IEA, 2018).

GRÁFICO 1 - Matriz energética mundial, ano base 2016



Fonte: IEA (2018)

A elevação nos índices de emissões de gases de efeito estufa, creditados à utilização de combustíveis fósseis, segundo a maioria dos cientistas, tem causado aumento da temperatura global e consequentes eventos climáticos extremos. Esta situação tem mostrado a importância sobre o debate a respeito do uso de energias fósseis e a necessidade de se investir em energias renováveis (OLIVEIRA et al., 2016).

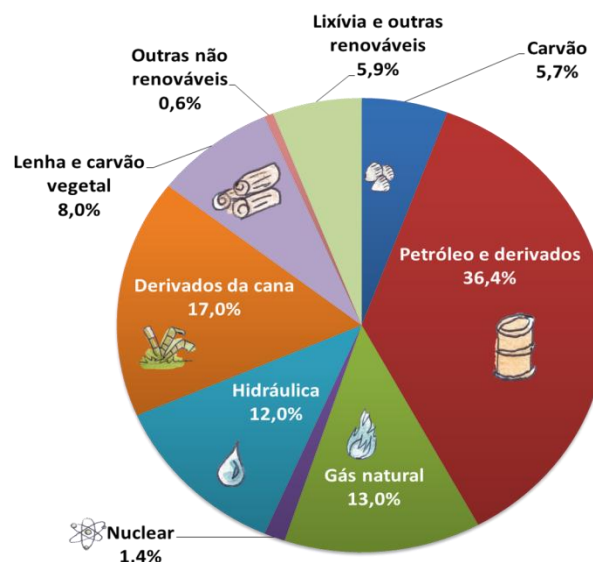
A forte tendência na produção de produtos renováveis se deve ao fato de que a maioria dos países menos desenvolvidos estão localizados entre os trópicos, onde teoricamente a produtividade da agricultura pode ser o dobro do que em latitudes temperadas; beneficiando diretamente estudos em bioenergia (COSTA, 2010).

No Brasil, tem sido crescente a expansão de uso de biomassa visando produção de etanol e biodiesel, com finalidade de substituir ainda que parcialmente os derivados de petróleo. Cana-de-açúcar, milho e outras gramíneas perenes, eucaliptos e outras espécies lenhosas, óleos animais e resíduos agrícolas, são algumas opções que, em conjunto, contribuem como matéria-prima (SOUZA, 2015).

O Brasil já é líder mundial na geração elétrica a partir de fontes renováveis, além de possuir matriz diversificada, com importante participação de energias alternativas, sendo a biomassa, provinda da prática agrícola, de fundamental importância. O potencial do biocombustível no Brasil fortifica a sua posição como influência global (RODRIGUES, 2017).

A hidroeletricidade tem sido a principal fonte de geração do sistema elétrico brasileiro, representando 65% da capacidade instalada de seu parque gerador, e 80% da geração total em 2017 (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA - EPE, 2018). Todavia, a bioenergia supera a energia hidrelétrica, quando somadas todas as capacidades instaladas de energia primária gerada a partir de biomassa (biocombustíveis sólidos, líquidos e gasosos) (Gráfico 2) (PEDROSO, 2018).

GRÁFICO 2 - Matriz Energética Brasileira, Ano Base 2017



Fonte: EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (2018)

O Brasil apresenta alto potencial de exploração de biomassa de culturas anuais para a produção de energia (PIERRI, 2016). No que tange o comércio internacional do principal biocombustível brasileiro, o etanol, os maiores parceiros do Brasil são:

Estados Unidos, União Europeia e Japão (COSTA, 2017). O Brasil é o segundo maior produtor mundial, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, o qual produz etanol de milho (ASSOCIAÇÃO DE COMBUSTÍVEIS RENOVÁVEIS - RFA, 2018).

Em 2018, as emissões de CO₂ do Brasil recuaram 4,9% (410,6 Mt), atingindo o menor nível desde o recorde de 2014, de 484,6 Mt. A Oferta Interna de Energia (OIE) foi de 288,4 milhões de tep (toneladas equivalentes de petróleo) em 2018, mostrando um recuo de 1,7% em relação à 2017, e recuo de 5,6% em relação a 2014, ano recorde da OIE (305,6 Mtep) (BRASIL, 2019).

No BRICs (Brasil, Rússia, Índia e China), por exemplo, o carvão mineral é responsável por 50% da matriz energética, seguido do petróleo, responsável por 20% de toda a energia consumida nos quatro países. O Brasil é responsável pela produção de 7,2% da energia renovável mundial (BRASIL, 2019).

Para produzir biocombustíveis, economicamente interessantes, a partir da biomassa, a ciência das plantas e da química dos carboidratos são essenciais (DUTTA, 2014). Apesar dos reconhecidos benefícios ambientais dos biocombustíveis, muitas são as preocupações em relação aos impactos sobre a biodiversidade, sobre os recursos hídricos e sobre a produção de alimentos (RIBEIRO, 2016). Assim, a prevenção ao avanço irrestrito das áreas cultivadas com culturas de bioenergia, deve ser considerada. Assegurar a proteção do ambiente e da biodiversidade, bem como garantir a cadeia produtiva de biocombustíveis no País, são temas em constante discussão no âmbito das energias renováveis (COSTA, 2010).

Dessa forma, torna-se interessante a pesquisa continuada para a diversificação da matriz energética brasileira, uma vez que o país possui grande potencial. Exemplo seria a cultura da batata-doce, normalmente relegada a segundo plano, essa pode ser opção para a produção de etanol em várias regiões do Brasil, por ser uma planta rústica, de fácil manuseio e com grande diversidade genética (BLANK, 2017).

3.1 ETANOL

O etanol (álcool etílico) é um dos principais alcoóis existentes, possui fórmula química C₂H₅OH, representando uma das alternativas para a substituição dos derivados do petróleo (SANTOS, 2013). O bioetanol é um biocombustível

proveniente da fermentação e da destilação, podendo ser produzido a partir de várias matérias-primas biológicas açucaradas ou amiláceas (COSTA, 2010). A sua importância como biocombustível se deve principalmente por ser produzido a partir de produtos agrícolas, renováveis, proporcionando menores quantidades de CO₂ na atmosfera (ZANARDI, 2016).

O etanol combustível pode ser produzido a partir de diversas fontes vegetais, como milho, mandioca, beterraba e sorgo, mas, em climas tropicais, a cana-de-açúcar é a que oferece mais vantagens energéticas e econômicas (AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO - ANP, 2018). De acordo com a matéria-prima o bioetanol pode ser classificado como de primeira, segunda, terceira ou quarta geração (MARTINS, 2019).

Pode ser sintetizado a partir de matérias-primas sacaríneas, principalmente da cana-de-açúcar (primeira geração), ou de materiais amiláceos e da biomassa lignocelulósica, que seria o etanol de segunda geração (SCHIRMER et al., 2017). O etanol de terceira e quarta geração são produzidos a partir de biomassa modificada estruturalmente (MARTINS, 2019).

Na década de 1970, duas crises deram origem à produção de etanol no Brasil. A crise do petróleo e a crise na indústria canavieira do açúcar. Assim o Governo Federal, em 1975, criou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), o qual tinha como objetivo aumentar a produção de etanol e reduzir a importação de petróleo (GILIO, 2016).

No período de 1979 a 1985, o programa evolui e passou a promover o uso do etanol combustível em automóveis, elevando significativamente a participação deste na matriz energética do país, substituindo assim o uso de parte da gasolina (PEREIRA, 2016).

O Brasil destaca-se como maior produtor mundial de bioetanol a partir cana-de-açúcar (MASSON, 2015). Esse combustível está inserido no mercado nacional como etanol anidro (AEAC) e etanol etílico hidratado combustível (AEHC) (RIBEIRO, 2016). Para manter esse perfil, justifica-se o estudo e domínio da tecnologia que inclua novas matrizes (espécies vegetais) energéticas com a eficiência de produção e rendimento em álcool (EMPRAPA, 2012).

Os Estados Unidos produzem etanol combustível a partir de hidrólise do amido do milho (LOPES, 2018). A mandioca, que também possui alto conteúdo de amido, é uma das culturas agrícolas utilizadas na Tailândia (LOMTHONG, 2016). Na

fécula de mandioca, aproximadamente 19 % dos grânulos de amido se constituem em amilose e 81 % de amilopectina (VILHALVA, 2013). Na China, a batata-doce é a principal cultura para obtenção de bioetanol (PENG, 2013). Os tubérculos de batata andina (*Solanum tuberosus* L.) representam alternativa para a produção de bioetanol em algumas regiões da Europa (TASIC, 2009).

A indústria do etanol à base de amido tem se mostrado comercialmente viável, ao longo dos anos. Nestes houve melhora significativa na eficiência das leveduras, enzimas e na qualidade e quantidade de biomassa (SCHWEINBERGER et al., 2016). A produção de etanol a partir de culturas amiláceas é pouco difundida no Brasil.

A cana-de-açúcar é o mais produtivo insumo para a produção de etanol, isso dá ao Brasil grande vantagem, visto que a produtividade média de geração de etanol por hectare de cana é em média 7500 litros (RODRIGUES, 2017). A oferta mundial de etanol de cana-de-açúcar está em expansão, e outras nações estão despertando para esse combustível renovável de menor custo, enquanto os Estados Unidos estão aumentando a produção de etanol de milho, com custo mais elevado (GUEVARA, 2017).

Do ponto de vista ambiental, a utilização de etanol como alternativa à gasolina se torna um fator interessante, tendo em vista a redução na extração de petróleo e na emissão de poluentes na atmosfera (RIBEIRO, 2016). Em 2019, a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) confirmou recorde na produção brasileira de etanol de cana-de-açúcar, com 33,14 bilhões de litros. Aumento de 21,7% ou 5,9 bilhões de litros em relação a 2018 (CONAB, 2019).

Na safra 2019/20, a área total de cana-de-açúcar a ser colhida está estimada em 8.384,4 mil hectares. São Paulo é o Estado com maior produção nacional. A estimativa de produção de etanol total de cana-de-açúcar é 30,3 bilhões de litros e a estimativa de etanol total de milho é 1,35 bilhão de litros, representando um acréscimo de 70,3% em relação ao exercício anterior (CONAB, 2019). A partir deste dado, pode-se salientar que a cultura do milho tem se tornado parte da matriz energética nacional, cooperando para a sua diversidade.

Algumas cultivares de batata-doce podem apresentar índices duas vezes maiores do que a cana-de-açúcar no que se refere à produção de etanol (SILVEIRA, 2008). Enquanto 1 hectare de cana-de-açúcar gera 90 toneladas de biomassa, podendo chegar a 7 mil litros de etanol, 1 hectare de batata-doce rende de 30 a 40

toneladas de biomassa, gerando de 6 a 10,467 litros de etanol (SILVEIRA, 2008; RÓS, 2017). Uma tonelada de cana-de-açúcar gera de 67 a 89 litros de etanol e uma tonelada de batata-doce chega a produzir 130 litros de etanol (RÓS, 2017).

A segurança alimentar e a segurança energética são temáticas importantes na contribuição da agricultura familiar para o desenvolvimento rural á partir da agroenergia, uma vez que a produção de batata-doce pelo pequeno agricultor é uma alternativa viável, somando-se à rusticidade do plantio desta biomassa e o seu grande potencial biotecnológico (LUDTKE, 2015). A diversificação da matriz energética nacional além de representar uma grande importância para o desenvolvimento sustentável do País, representa geração de emprego e renda também aos produtores pertencentes à agricultura familiar (SILVEIRA, 2007).

3.2 BATATA-DOCE

A batata-doce é uma hortaliça tuberosa de fácil cultivo, rústica, de ampla adaptação, com alta tolerância a estresse hídrico, tudo isso resultando em baixo custo de produção (FIGUEIREDO, 2012), pela produtividade e pelo conteúdo de amido apresenta grande potencial para desenvolvimento tecnológico. Sob condições ideais de cultivo, a colheita pode começar com 90 dias após o plantio (BLANK, 2017).

Recebe o nome científico de *Ipomoea batatas* (L) Lam; é uma espécie dicotiledônea e pertence à família das *Convolvulaceae*, apresentando grande variedade genotípica e fenotípica; com 50 gêneros e mais de 1000 espécies (SANTOS, 2015). A espécie *Ipomoea batatas* é originária de regiões tropicais de baixa altitude na América do Sul (FILGUEIRA, 2007; SILVA, 2013). A batata-doce foi domesticada há cerca de 5000 anos na América Tropical (AUSTIN, 1988; YEN, 1982).

Na época das viagens de Colombo, a batata-doce era extensamente cultivada nas Américas Central e do Sul e em algumas ilhas do Pacífico (RAVEN, 2011). Posteriormente a Colombo, a batata-doce passou a ser largamente comercializada e tornou-se cultura importante na África e na Ásia.

A intervenção humana na domesticação da batata-doce e a posterior seleção artificial, bem como a ocorrência de mutações e hibridações naturais, resultaram na

geração de ampla variabilidade de caracteres qualitativos e quantitativos (WOOLFE, 1992).

É cultivada em 111 países, aproximadamente 90% da produção é obtida na Ásia, apenas 5% na África e 5% no restante do mundo (LOW, 2009). Apenas 2% da produção estão em países industrializados como os Estados Unidos e Japão (WOOLFE, 1992).

A China representa 65,3% da produção mundial de batata-doce (FAO, 2018). Mais de 105 milhões de toneladas de batata-doce são colhidas no mundo a cada ano (CHI-RUEI et al., 2017). Mundialmente, a batata-doce é classificada na sétima posição de consumo, ao lado do arroz, trigo, milho e mandioca (CAMPBELL et al., 2017).

O Brasil é o principal produtor de batata-doce da América do Sul (FAO, 2018), com uma produção anual de 3 milhões de toneladas, sendo que os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Bahia e Paraná apresentam maior produção, com cerca de 10 toneladas por hectare (OLIVEIRA, 2016). Essa cultura é produzida em pequena e larga escala nas mais diferentes regiões do país e com graus de tecnologia bastante diversificados. É disseminada na maioria das regiões brasileiras, pois apresenta ampla adaptação edafoclimática (MIRANDA, 1995). Em 2017 foram cultivados 54.123 hectares com produção de 776.285 toneladas de batata-doce no Brasil, deste total, 23,07 toneladas por hectare foram produzidas no Paraná (NEUNFELD, 2019).

Possui grande aceitação popular, pode ser empregada na alimentação humana, animal e como matéria-prima nas indústrias de alimentos, tecidos, papel, cosméticos e combustíveis (MIRANDA et al., 1984 e CARDOSO et al., 2005). A batata-doce pode ser consumida cozida, assada ou frita, ou como ingrediente de pães e bolos (SILVA et al., 2002).

A batata-doce encontra-se entre os 12 produtos considerados fundamentais como fonte básica de alimentos para populações de baixo poder aquisitivo. Por ser a mais utilizada e apresentar maior teor de proteína ocupa o primeiro lugar entre as principais culturas alimentares do terceiro mundo (CAVALCANTE, 2017).

É uma planta herbácea, a grande maioria apresenta caule prostrado, com ramificações, pode atingir seis metros de comprimento, possui folhas com pecíolos longos, de tamanho, cor e pilosidade distintos. A casca e a polpa podem apresentar colorações variáveis de roxo, salmão, amarelo, creme ou branco (HUAMÁN, 1991).

A coloração roxa deve-se a presença de antocianina. O sistema radicular é amplo e complexo. Existe raiz de dois tipos: a raiz absorvente, responsável pela absorção de água e extração de nutrientes do solo; e a de reserva ou tuberosa, parte de interesse econômico (MIRANDA, 1995).

As raízes tuberosas de batata-doce apresentam periderme (casca externa) protetiva, córtex (casca interna) e polpa (FOLQUER, 1978). Assim, a batata-doce explora maior volume de solo, absorvendo água em camadas mais profundas do que a maioria das hortaliças. As raízes podem apresentar o formato redondo, oblongo, fusiforme ou alongado. O desenvolvimento das raízes tuberosas é beneficiado por temperatura noturna amena e por fotoperíodo curto (FILGUEIRA, 2007).

Tanto as raízes como as ramas podem ser destinadas à alimentação animal, principalmente de bovinos e suínos, seja *in natura* ou conservadas. As ramas *in natura* ou conservadas e resíduos do processamento; raspas e pedaços não aproveitados de batatas processadas, também podem ser utilizadas na alimentação animal (FIGUEIREDO et al., 2012).

A batata-doce pode produzir sementes botânicas, porém são raramente observadas no campo, pois as raízes geralmente são colhidas antes do florescimento da planta. A propagação é vegetativa, por meio de ramas novas, obtidas em viveiros, onde são plantadas as batatas-sementes selecionadas, inteiras ou em metades, ou ainda por sementeiras protegidas e depois replantadas no campo. Em função de sua rusticidade e adaptação, é uma cultura que se enquadra perfeitamente no sistema de agricultura familiar (SILVEIRA, 2008).

A composição química da batata-doce pode variar com a cultivar, condições climáticas, época da colheita, tratos culturais, duração e condições de armazenamento (SILVA et al., 2002). A raiz tuberosa acumula reservas ricas em carboidratos e vitamina A, são boas reservas de vitaminas do Complexo B, além de poderem apresentar vitamina C, antocianinas, retinol, tiamina, riboflavina, niacina e ácido ascórbico (CEREDA, 2002). Sais minerais também podem ser encontrados como: cálcio, fósforo, ferro, sódio e potássio. Possui alto valor nutritivo pelo seu conteúdo de carboidratos, com teores que variam de 13,4 a 29,2%, principalmente amido, 4,8 a 7,8% de açúcares solúveis, 2,0 a 2,9% de proteínas e 0,3 a 0,8% de gorduras (SOARES et al., 2002) e grande versatilidade sensorial: cores de polpa, sabor e textura (VIZZOTTO et al., 2018).

Sendo assim a composição única da batata-doce contribui com diversos benefícios para a saúde, como os efeitos antioxidante, hepatoprotetor, anti-inflamatório, antitumoral, antidiabético, antimicrobiano, anti-obesidade, anti-envelhecimento (SUNAN et al., 2016).

O sucesso da produção de etanol a partir da batata-doce depende da conversão do amido em açúcares fermentescíveis, através da hidrólise enzimática. Embora o amido seja o componente de maior interesse, a batata-doce possui, também, em sua composição açúcares simples como sacarose, glicose e maltose, tornando-a ainda mais atrativa para a produção de etanol (DEWAN et al., 2013).

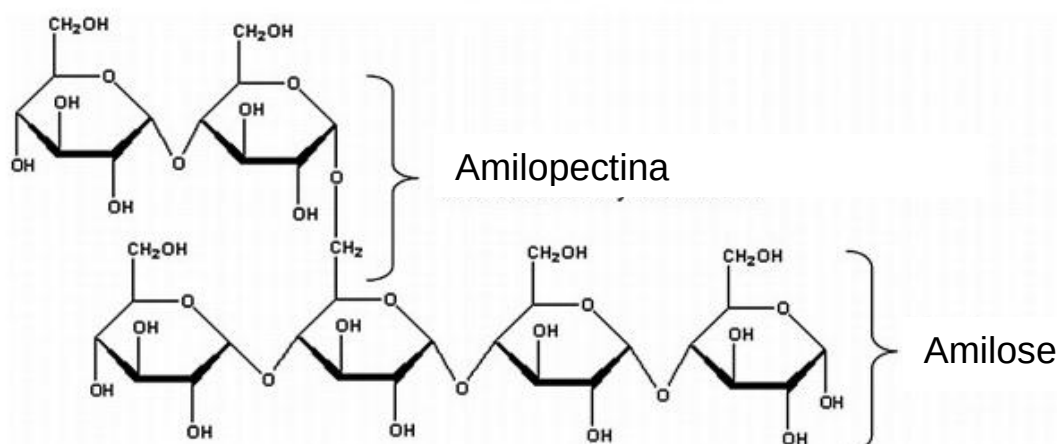
Para o uso industrial na produção de etanol, as variedades de batata-doce podem ser colhidas posteriormente, uma vez que o interesse principal é obter grandes quantidades de matéria seca e altos níveis de carboidratos, o que resulta em maiores rendimentos de etanol combustível (BLANK, 2017).

As batatas-doces desenvolvidas para a produção de bioenergia devem ser selecionadas com base no teor de amido e na produtividade agrícola (DUVERNAY et al., 2013). O álcool de batata-doce apresenta excelente qualidade com graduação de 94 a 98 °GL podendo ser utilizado na indústria alimentícia, na produção de biocombustível veicular e também na produção de cosméticos, devido à alta qualidade do etanol extraído (LOPES, 2018; CAMARGO, 2013).

O amido é constituído basicamente por dois compostos, a amilose e a amilopectina, os quais se encontram distribuídos em regiões cristalinas e amorfas alternadas (Figura 1).

O amido de batata-doce é considerado mais complexo do que os amidos de cereais, tornando a hidrólise mais difícil (LAREO et al., 2013). O teor de amido nas raízes de batata-doce, em base úmida, varia de 20 a 30% (SRICHUWONG, 2012).

Figura 1 - Estrutura do amido com as moléculas amilose e amilopectina



Fonte: Masina et al. (2017)

Uma vantagem para o uso da batata-doce é o rendimento em etanol através do teor de amido por unidade de área em comparação com o milho (Tabela 1) (DUVERNAY et al., 2013). A partir de algumas variedades industriais de batata-doce é possível obter um rendimento de 4500-6500 litros de etanol por hectare, comparando a 2600-3800 litros obtidos através do milho (DUVERNAY et al., 2013; PEREIRA et al., 2015).

Tabela 1 - Produtividade nacional e rendimento anual de diversas fontes de carboidratos e etanol

Fontes de Carboidratos	Produtividade de matéria-prima (t/ha/ano)	Teor de Carboidrato (%)	Rendimento de álcool	
			Litros de etanol / toneladas de matéria-prima	Litros / hectare
Cana-de-açúcar	75	14	94	7046
Sorgo sacarino-colmo	80	12	81	6442
Milho	5	80	537	2684
Batata-doce	12	31	208	2496
Mandioca	14	25	168	2349
Sorgo - grão	3	65	436	1308

Fonte: Taborda (2015)

As batatas-doces melhoradas para a produção de bioenergia são selecionadas com base no teor de amido e na produtividade agrícola embora possam, ainda, ser utilizadas na alimentação humana e animal (DUVERNAY et al., 2013; SANTANA, 2013; TABORDA et al., 2015; VIEIRA et al., 2015). Assim o estudo

de tecnologias que visem realizar a hidrólise do amido de batata-doce, torna-se de suma importância.

Em estudos com vários genótipos de batata-doce para consumo humano, produção de etanol e alimentação animal, observou-se que oito clones eram viáveis para uso na produção de etanol. Neste caso o custo de produção de álcool de batata-doce seria menor do que o produto da cana-de-açúcar (GONÇALVES NETO et al., 2011).

3.3 HIDRÓLISE DO AMIDO

Existem duas rotas principais que normalmente são empregadas para a obtenção de etanol de culturas amiláceas. A rota enzimática, onde são utilizadas enzimas, e a rota química, onde são utilizados ácidos inorgânicos (PEREIRA, 2016).

A hidrólise ácida é um método direto e rápido (OLIVEIRA, 2016). Uma das vantagens para a utilização da hidrólise ácida seria o menor tempo de conversão (WANG e COPELAND, 2015) e a obtenção de quantidades consideráveis de açúcares, a partir de biomassas complexas (PEREIRA, 2015). Alguns dos ácidos mais utilizados para a produção de etanol, através da hidrólise ácida, são ácido sulfúrico (H_2SO_4) e ácido clorídrico (HCl), embora a utilização dos ácidos fosfórico (H_3PO_4) e nítrico (HNO_3) têm apresentado melhores resultados econômicos em relação à hidrólise com o HCl e à hidrólise enzimática (OLIVEIRA, 2016).

Ainda que o tempo de conversão seja mais curto, a hidrólise ácida tem como desvantagens a necessidade da neutralização no final do processo. A fim de não inibir a posterior fermentação, a corrosão de equipamentos e a geração de açúcares não fermentáveis o subproduto da reação deve ser neutralizado (CEREDA, 2002).

A utilização da hidrólise enzimática apresenta como vantagens, o controle da hidrólise, com menor risco de contaminação devido à temperatura elevada e ao pH e as condições são mais simples, permitindo o reaproveitamento do co-produto além da maior produtividade em etanol mediante menor perda de amido residual no processo (SILVEIRA, 2007; CAMARGO, 2013). Oferece potencial de redução de custos em longo prazo, sendo possível atingir rendimentos próximos dos estequiométricos em condições menos críticas de temperatura, pressão e agressividade química (PEREIRA, 2015).

A obtenção de etanol de batata-doce obedece à linha semelhante à da mandioca, tendo início com a lavagem das raízes, fragmentação, aquecimento, sacarificação, fermentação e destilação. A sacarificação (hidrólise) é, atualmente, passo decisivo para o uso biotecnológico da biomassa (HORTA, 2018). Além disso, as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sendo desnecessário processo de remoção das mesmas ao final do processo (ZAVAREZE, 2009).

Entre as propriedades mais importantes da catálise enzimática está sua especificidade, muito maior do que a da catálise química, quanto à reação e quanto ao substrato, sendo outra vantagem da hidrólise enzimática (TORRES et al., 2012).

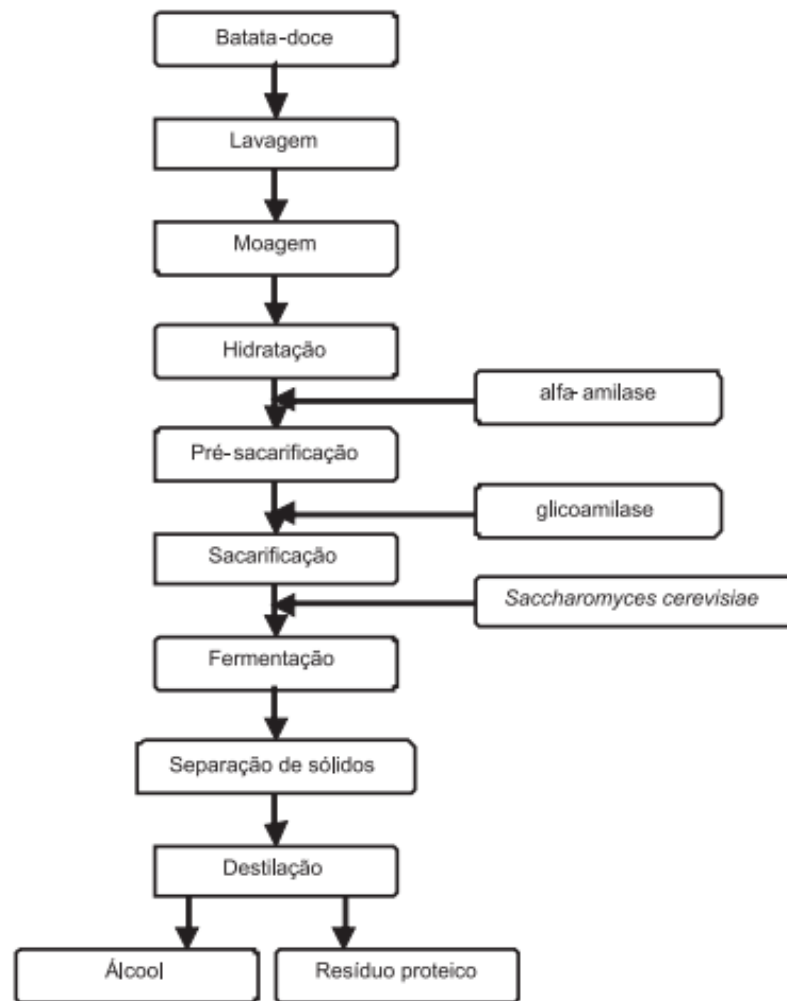
O processo de sacarificação do amido é forma alternativa de produzir etanol diretamente de matérias-primas amiláceas, neste caso pode-se mitigar custos (IZMIRLIOGLU, 2016). Geralmente, isso ocorre em duas etapas enzimáticas: hidrólise, usando a α -amilase ($\sim 86-96^{\circ}\text{C}$) e sacarificação, por adição de amiloglucosidase (AMG) ($\sim 50-60^{\circ}\text{C}$) (FERRARI, 2013), (Figura 2).

Existem diferentes fatores que podem influenciar o rendimento da hidrólise enzimática, dentre os quais se pode destacar o pH, temperatura, teor de sólido, relação enzima-substrato, entre outros (HORTA, 2018).

O desenvolvimento de processos de hidrólise enzimática que sejam viáveis economicamente está relacionado com a quantidade de materiais amiláceos disponíveis na natureza. As batatas-doces produzem amilases, e estas enzimas presentes naturalmente, podem ser usadas para viabilizar a hidrólise (SCHWEINBERGER et al., 2016). Enzimas amilolíticas, amido sintase e enzima de ramificação de amido, foram isoladas, fracionadas e purificadas a partir de tubérculos de batata inglesa (*Solanum tuberosum*) em grande escala e com altos rendimentos (RUPENDRA, 2010).

O processo enzimático necessário para a produção de bioetanol a partir de matérias-primas à base de amido é oneroso (PEREIRA et al., 2017). Assim, é de suma importância o estudo de alternativas que visem minimizar os custos de produção do etanol a partir de matérias-primas amiláceas. Embora o processo de sacarificação possa ser conduzido com enzimas comerciais, o estudo de microrganismos produtores de enzimas pode ser uma alternativa e se faz necessário (IZMIRLIOGLU, 2016).

Figura 2. Fluxograma da produção de etanol de batata-doce

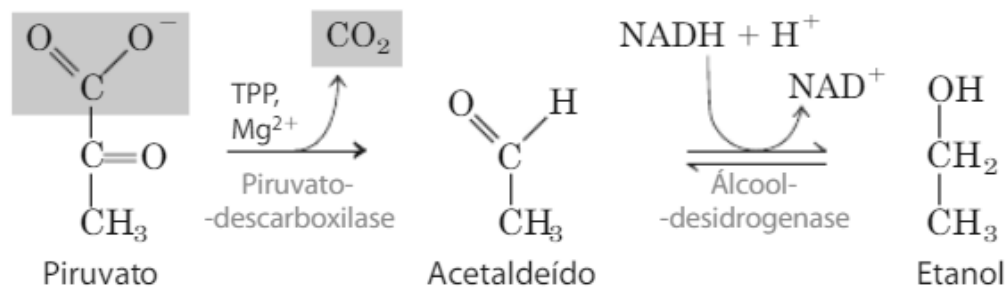


Fonte: Pavlak et al. (2011)

Após o processo de pré-sacarificação e sacarificação ocorre a fermentação com a utilização de leveduras específicas. A fermentação do hidrolisado de batata-doce (mosto) durante a produção de biocombustível é um processo biológico no qual o açúcar (hexose) é convertido em etanol pela ação de diferentes leveduras (PAVLAK, 2011).

Durante o processo de fermentação, ocorre a degradação de moléculas de açúcar, por microrganismos denominados leveduras. A glicose é convertida em piruvato pela glicólise e o piruvato é convertido em etanol e CO₂ (LEHNINGER, 2002). Primeiramente o piruvato é descarboxilado em uma reação irreversível catalisada pela enzima piruvato-descarboxilase. Posteriormente, o acetaldeído é reduzido a etanol através da ação da álcool-desidrogenase, com o NADH, fornecendo poder redutor (Figura 3) (MARTINEZ, 2016).

Figura 3. Reação de redução do etanol na fermentação alcoólica



Fonte: Lehninger (2002)

As leveduras mais utilizadas no processo são da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (THATOI, 2014). Estas são comumente classificadas em alta fermentação (tipo *ale*) e baixa fermentação (tipo *lager*), as leveduras de alta fermentação emergem para a superfície, carregadas pelas bolhas de CO_2 , já as leveduras de baixa fermentação se depositam no fundo da dorna no final do processo fermentativo (PEREIRA et al., 2017).

Os principais parâmetros que influenciam no processo de fermentação alcoólica são o pH, a temperatura, os açúcares redutores totais, a concentração celular da levedura e o tipo de reator (RIBEIRO, 2016). Klomklieng e Prateepasen (2011) produziram etanol a partir de 15% p/v de melaço usando *Saccharomices cerevisiae* M30, produzindo 15,6% do biocombustível. A levedura *Kluyveromyces marxianus* DMKU-KS07 também é frequentemente usada para converter açúcares fermentáveis (glicose, maltose) em etanol em altas temperaturas (LOMTHONG, 2016). A via fermentativa é a mais utilizada no mundo, o Brasil domina a tecnologia de produção de etanol por via fermentativa (ZANARDI, 2016).

3.4 FUNGOS FILAMENTOSOS E A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Os fungos filamentosos são conhecidos por sua capacidade de produção enzimática e se destacam por secretarem enzimas diretamente no meio de cultura, não necessitando de ruptura citoplasmática para liberação (STROPARO, 2012). Glucoamilases, celulasas, lipases, glicose-oxidases, pectinases, amilases e proteases são apenas alguns exemplos da gama de enzimas produzidas por estes microrganismos (MARTINS, 2019; ALMEIDA et al., 2017).

Vários organismos secretam coquetéis de “enzimas livres”, em que várias proteínas se difundem independentemente umas das outras e trabalham sinergicamente para degradar biomassa (DUTTA, 2014). Uma grande variedade de microrganismos produz glucoamilases para hidrolisar amido (MARQUES et al., 2013).

Os fungos do gênero *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. constituem um grupo de microrganismos que são capazes de sintetizar metabólitos. A maioria das espécies destes gêneros são denominados “bolores”, geralmente saprófitas e comumente encontrados na matéria orgânica. Porém muitas vezes *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. provocam podridões em frutas, bulbos e tubérculos (SILVEIRA, 1981).

Após a descoberta de que certos microrganismos podem produzir enzimas, pode-se desenvolver processos técnicos para a produção de enzimas microbianas em escala comercial (SPIER, 2005). A maioria das enzimas comerciais são de origem fúngica (DUTTA, 2014).

A partir da bioprospecção pode-se realizar a busca sistemática por organismos, genes e enzimas que tenham potencial econômico e, eventualmente, levam ao desenvolvimento de um produto, extraindo valor econômico da biodiversidade. (SACCARO JÚNIOR, 2011).

Um dos processos biotecnológicos para avaliar a produção de enzimas através de microrganismos é a fermentação. Pode-se descrever a fermentação, do ponto de vista bioquímico, como um processo metabólico de obtenção de energia a partir de compostos orgânicos (BOURDICHON, 2012). Os microrganismos mais utilizados são bactérias e fungos leveduriformes, embora fungos filamentosos ocupem importantes nichos específicos nesta área (TAKAHASHI, 2017).

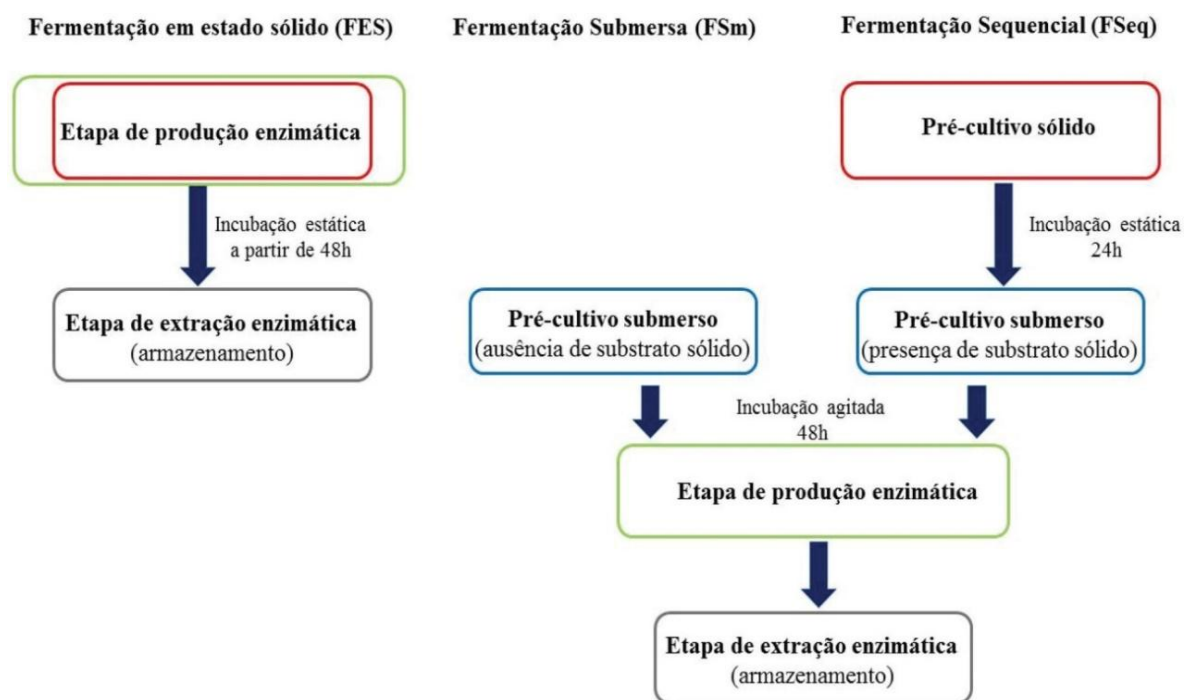
Existem dois métodos principais para a obtenção enzimática por fungos filamentosos: a fermentação submersa (FSm) e a fermentação em estado sólido (FES) (PIROTA, 2015; RODRIGUES, 2016). A FSm é utilizada na maioria dos processos industriais para produção de enzimas microbianas (FLORENCIO et al., 2017).

A FES também é empregada na produção de diversos tipos de enzimas. Este processo, além de geralmente ser mais eficiente que a FSm, permite a utilização de diferentes resíduos agroindustriais como substrato para o crescimento microbiano, os quais muitas vezes são descartados (ARAUJO, 2018). As condições de cultivo são mais parecidas com o habitat natural dos fungos filamentosos, e dessa forma os

fungos estão mais adaptados para crescer e excretar maior quantidade de enzimas (MELO SANTOS, 2008). Na FES, a produção de enzimática por fungos filamentosos é afetada pela linhagem fúngica, pH, temperatura e meio de cultura (CUNHA et al., 2016).

Desenvolvido na tentativa de unir as vantagens dos processos de cultivos convencionais (FES e FSm), a fermentação sequencial (FSeq) é baseada na preparação do pré-cultivo no estado sólido com posterior transição para o estado submerso (Figura 2) (FLORENCIO et al., 2017).

Figura 4 - Processos fermentativos realizados por microrganismos para a produção de enzimas microbianas (FES, FSm, FSeq)



Fonte: Florencio et al. (2017)

A morfologia de crescimento fúngico difere de acordo com as condições de cultivo. As principais vantagens para o uso de microrganismos na produção de enzimas amiláceas é que se pode utilizar resíduos industriais, sendo um meio econômico na produção enzimática e de fácil manipulação dos microrganismos para se obter enzimas com as características desejadas (MOGES, 2019).

Em uma tentativa de mitigar os custos de produção, extratos brutos de microrganismos podem ser usados em substituição a enzimas purificadas (PEREIRA, 2017).

3.5 ENZIMAS

Enzimas são proteínas que catalizam reações químicas, pelas quais moléculas são degradadas, a energia química é conservada e transformada e os compostos biológicos são sintetizados a partir de moléculas precursoras simples (LEHNINGER, 2002). Devido á característica de especificidade das enzimas, cada substrato possui uma enzima respectiva. No caso do amido, são as amilases as responsáveis pela sua quebra (SOARES, 2010).

As enzimas foram descobertas no século XIX, aparentemente por Louis Pasteur (1822-1895). Após estudos, Pasteur concluiu que a fermentação de açúcar em álcool pelas leveduras é catalisada pelas enzimas, as quais ele chamou de “fermentos”. Ocorrem em todos os organismos desde os procariotos mais simples, aos eucariotos mais evoluídos. São substâncias complexas formadas por polímeros de aminoácidos. Embora a maioria das enzimas sejam endocelulares, algumas são exocelulares e são excretadas para fora da célula viva, como por exemplo, as amilases fúngicas (SPIER, 2005).

A aplicação de enzimas (intracelulares e extracelulares) em uma biomassa correta pode ser boa alternativa para a produção de biocombustíveis (DUTTA, 2014).

As enzimas amiláceas podem ser utilizadas de diversas formas, são amplamente empregadas na indústria têxtil, na fabricação de bebidas fermentadas e na obtenção de açúcares (ALMEIDA et al., 2017). As amilases estão entre as enzimas com maior importância biotecnológica e podem ser obtidas de diversas fontes, sendo o fungo *Aspergillus niger*, um dos principais produtores (SOARES et al., 2010).

As enzimas amiláceas, importantes no grupo de glicídios hidrolisados, podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, as β -amilases e as glucoamilases. A ação da α – amilase sobre a amilose consiste no ataque aleatório e rápido do substrato, resultando em maltose e maltotriose em seguida uma etapa mais lenta permite a formação de glicose e maltose (GUANDALINI, 2007).

O fungo *Aspergillus* sp. é responsável por cerca de 30% da produção mundial de enzimas amiláceas, ocupando o segundo lugar, logo após as enzimas proteolíticas, as quais clivam ligações peptídicas, gerando peptídeos menores e aminoácidos livres (SOUZA; MAGALHÃES, 2010). As amilases microbianas são

produzidas por microrganismos como fungos e bactérias, são muito utilizadas pelo setor industrial, por apresentarem bom custo-benefício e por serem produzidas rapidamente pelos microrganismos, grande variedade catalítica e fácil manipulação genética e ambiental (ROCHA, 2010).

Cerca de 110 fungos foram isolados do solo na Floresta Wof Washa, no norte de Shoa-Etiópia, e testados com relação à produção de amilase, destes, 25% foram considerados produtores da enzima, sendo que dos isolados que apresentaram halo de hidrólise, nove foram considerados promissores, o isolado 46, destacou-se na produção enzimática e foi identificado como *Penicillium* sp. (MOGES, 2019).

O estudo de três espécies de *Trichoderma* spp. mostrou que estes apresentam conjunto de 80 proteínas e destas 19 estão envolvidas na produção e secreção enzimática. Para maior compreensão da ação dessas proteínas, a avaliação molecular de linhagens fúngicas com potencial enzimático torna-se interessante para melhor entender a relação entre as enzimas (HORTA, 2018).

O extrato bruto do fungo *Aspergillus niger*, contendo amilase, obtido utilizando casca de batata-doce como biomassa para a hidrólise, mostrou-se eficiente em hidrolisar o amido, alcançando níveis consideráveis, com 78,33% de conversão em glicose (PEREIRA, 2015). Enquanto que, 95% de 150 g L⁻¹ de farinha de mandioca foram hidrolisadas utilizando um coquetel enzimático produzido por *Penicillium* sp. a 50°C por 72 horas com produtividade de 1,98 g L⁻¹ h⁻¹ (HAI-JUAN, 2010).

As enzimas ramificadas são enzimas ativas em carboidratos pertencentes à família da α -amilase. Esta família compreende hidrolases, transglicosilases e isomerases tais como α -amilases, α -glucosidase e pululanase (SHUPENG, 2014). Um gene (*TcGBE*) que codifica uma enzima ramificada de glicogênio de *Thermomonospora curvata* foi expresso em *Escherichia coli*, purificado e analisado bioquimicamente. A enzima mostrou maior especificidade para amilase com uma atividade específica de 90,28 U mg⁻¹. Esta enzima recombinante pode atuar no amido de milho, possuindo especificidade ao substrato, sendo que a atividade enzimática foi menor no amido de batata e no de trigo (QIN FAN, 2016).

A hidrólise do amido bruto de mandioca, usando a glicoamilase de *Aspergillus awamori* expressa em *Saccharomyces cerevisiae* foi verificada. O teste de atividade de glicoamilase em placa mostrou que *S. cerevisiae* recombinante é capaz de degradar o amido de mandioca sem a necessidade de pré-tratamento ácido ou

cozimento. A levedura recombinante foi capaz de formar $2,7 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa, aproveitando 90% do amido (MARQUES et al., 2013).

A bactéria filamentosa termofílica *Laceyella sacchari* LP175, isolada do solo da Tailândia, é uma cepa potente que demonstrou alta eficiência na produção de enzimas degradantes do amido de mandioca. A concentração máxima de glicose liberada, $141,6 \text{ g L}^{-1}$, equivalente a 60% de sacarificação de amido, foi encontrada utilizando enzimas amilolíticas (LOMTHONG, 2016).

Para avaliar os extratos brutos de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* cultivados em processos de fermentação submersa e sequencial foram realizadas análises proteômicas. O processo sequencial para o cultivo de *A. niger* proporcionou de 3 a 8 vezes mais atividades de xilanase e β -glucosidase, respectivamente, do que atividades correspondentes do processo submerso (FLORENCIO et al., 2016).

Vários fatores e suas combinações afetam o processo de produção enzimática (substratos, inibidores, faixa de pH, temperatura, etc.), e podem gerar diferentes enzimas (HORTA, 2018).

As enzimas envolvidas na desconstrução de polissacarídeos estão agrupadas na base de dados “Carbohydrate-active enzymes database” (CAZy) baseadas na comparação das sequências de aminoácidos, estruturas 3D e mecanismos catalíticos (FLORENCIO et al., 2017). O banco de dados de enzimas CAZy foi lançado em 1999 para fornecer acesso online e constante atualização à classificação da família das Cazymes (LOMBARD, 2014).

Para caracterizar extratos brutos produzidos por *Trichoderma spp.*, Horta, (2018) utilizou a espectrometria de massa, sendo identificadas um total de 397 proteínas. Os perfis das proteínas identificadas foram comparadas com o objetivo de detectar similaridade entre as amostras de cada espécie e assim classificadas como CAZyme.

A concentração de enzimas é fator fundamental na hidrólise de derivados amiláceos e interfere substancialmente no processo. Encontrar a concentração ideal para o processo caracteriza hidrólise eficiente (TORRES, 2012). A contribuição dos custos de enzimas para a economia na produção de biocombustíveis é um tópico muito debatido (KLEIN-MARCUSCHAMER, 2011).

Para garantir viabilidade do processo de conversão de amido em etanol, é fundamental reduzir o custo de enzimas utilizadas na etapa de hidrólise da biomassa (PIROTA et al., 2015). De acordo com o fabricante Novozymes (2018) a enzima

Liquozyme Supra 2.2X custa R\$ 55,97 o kg e a enzima AMG 300mL chega a custar R\$ 43,39 o litro, ambas são recomendadas nas etapas de pré-sacarificação e sacarificação de matérias-primas amiláceas, sendo que 1 mL de cada enzima é utilizada em 1 kg de batata-doce na conversão do amido em etanol.

Na produção do etanol lignocelulósico, as enzimas microbianas também são importantes, pois conseguem romper a parede celular complexa de determinados vegetais. Um dos grupos mais importantes de enzimas na degradação de biomassa lignocelulósica, são as celulasas, um complexo enzimático cujas enzimas atuam sinergicamente na transformação da celulose em monômeros e dímeros de glicose (MARTINS, 2020)

A produção e ação de coquetéis enzimáticos foram verificadas em *Aspergillus phoenicis* utilizando diferentes fontes de carbono como indutores para investigar o potencial hidrolítico dos sistemas enzimáticos produzidos, sendo que a amilase foi a mais evidente, seguida de pectinase e xilanase (BENASSI, 2012).

A fabricação de coquetéis enzimáticos é uma maneira para tornar a geração de etanol economicamente interessante em escala industrial. Intensificar os estudos que visem aperfeiçoar a rota enzimática se torna de suma importância, uma vez que, as enzimas encarecem a produção de etanol.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados fungos que colonizaram naturalmente o tubérculo da cultura da batata-doce, no Laboratório de Mecanização Agrícola da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Lama/UEPG). Foram utilizados oito genótipos de batatas-doces. Destes, cinco eram genótipos comerciais: variedades Rubissol, BRS-Cuia, BRS-Amélia, Beauregard e Brazlândia e três genótipos não identificados, denominados BD-14, BD-15 e BD-16. Os genótipos não identificados fazem parte do banco genético do Lama/UEPG e foram coletadas junto a agricultores camponeses na meso região Oriental do Estado do Paraná, Brasil.

Os genótipos foram cortados ao meio, sem assepsia e mantidas em exposição ambiente em bancada, com luminosidade natural, próximo a janela, entre os dias 15 de setembro de 2018 a 10 de outubro de 2018.

Os genótipos de batata-doce que apresentaram acentuado crescimento de microrganismos foram selecionados para o isolamento das linhagens de fungos presentes, e posterior ensaio de fermentação em estado sólido.

4.1 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

A partir da polpa da batata-doce “contaminada” (Figura 5), foi preparado inóculo para diluição. Foi realizada raspagem das estruturas fúngicas com auxílio de estilete e transferida para tubo de ensaio (primeiro - concentração 10^{-1}), contendo 5 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e 2 gotas de tween 80 e surfactante (utilizado para facilitar a excreção de enzimas para o meio de cultivo) (TEODORO, 2018). Todos os tubos de ensaio foram previamente autoclavados.

O tubo de ensaio foi submetido à agitação, agitador vortex, por 1 minuto. Após este procedimento, foram retirados 100 μ L desta solução, e transferidos para novo tubo de ensaio alcançando a concentração 10^{-2} (TORTORA, 2012). As concentrações variaram de 10^{-1} a 10^{-5} e seguiram o mesmo procedimento de diluições dos tubos de ensaio com concentração 10^{-1} e 10^{-2} . Após a diluição seriada, foram retirados dos tubos, com concentração 10^{-3} e 10^{-5} , 100 μ L de solução, sendo esta transferida e semeada por espalhamento em placa de Petri com meio de cultura BDDA (água de batata-doce) (TAVARES, 2013). Para o preparo do meio BDDA, foram descascadas e cortadas, em finas fatias, 250 g de batata-doce. Estas foram

cozidas, em 800 mL de água destilada, em micro-ondas por 15 min. Depois de filtrado o caldo, adicionou-se 20 g de dextrose e 15 g de ágar, sendo o volume completado com água destilada até 1 L. Após homogeneização, o meio de cultura foi esterilizado em autoclave por 15 minutos, a 121 °C (1atm).

Figura 5 - Colonização natural da polpa de batata-doce cultivar Beauregard, antes (esquerda) e após (direita) ao período de incubação de 25 dias em bancada, com luminosidade natural, próximo à janela, à temperatura ambiente, (15/09 a 10/10/2018, Ponta Grossa, PR)



Fonte: A autora

A técnica de isolamento dos microrganismos por meio de diluição seriada permite, além da mensuração do número de microrganismos, o isolamento de amostras com concentrações iniciais muito elevadas. Quando a concentração de microrganismos inoculados em placa de Petri é elevada, tende a sobreposição de linhagens durante o crescimento, impossibilitando o isolamento (COSTA, 2017).

As placas de Petri com o inóculo inicial (inóculo provindo dos tubos de ensaio com concentrações 10^{-3} e 10^{-5}) foram incubadas em câmara de incubação do tipo BOD (Biological Oxygen Demand) a 28 °C. Foi observado o crescimento das linhagens e os microrganismos presentes foram isolados diariamente e inoculados em tubo de ensaio com 4 mL de meio de cultura BDGA inclinado.

A nomenclatura utilizada foi BRGD para fungos isolados da batata-doce Beauregard e AM para fungos isolados da batata-doce BRS-Amélia, seguido de numeração por ordem de isolamento e da concentração onde estavam incubados, ficando, por exemplo BRGD 01 10^{-3} ou AM 02 10^{-5} . Após a individualização, as

linhagens foram mantidas em estoque a 4°C, no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Foram adotados dois métodos de manutenção dos microrganismos, o da água destilada estéril (CASTELLANI, 1939) e o método de estoque de repique contínuo em tubo de ensaio com meio de cultura inclinado (COSTA e FERREIRA, 1991). O método da água destilada estéril é simples e econômico. Neste, discos de meio de cultura, 5 mm de diâmetro, contendo o micélio do fungo previamente crescido, são imersos em tubos de microcentrífuga com 800 µL de água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939).

O repique contínuo, também chamado de método clássico ou de repicagem periódica, é uma das mais antigas técnicas de conservação (DELLARETTI, 2014). Por ser método simples, caracteriza-se como técnica tradicional de manutenção de culturas em laboratório, sendo bastante utilizada para se manter viabilidade de microrganismos (ROMEIRO, 2006). Consiste na transferência, de maneira asséptica, de pequena porção do micélio, de um tubo de ensaio para novos tubos, contendo meio de cultura estéril e apropriado (APARECIDO, 2012).

Os repiques das culturas foram realizados de 15 em 15 dias, sendo incubados em estufa do tipo BOD (Biological Oxygen Demand) a 28 °C, por sete dias e posteriormente armazenadas a 4 °C.

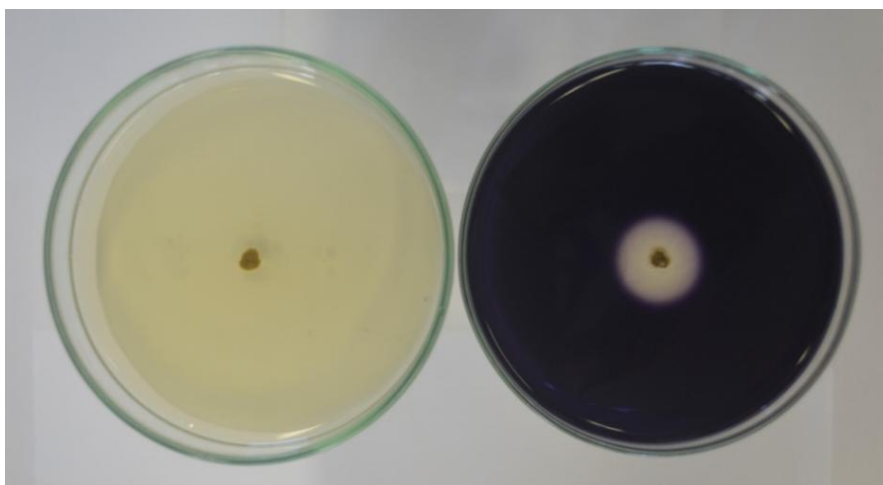
4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE AMILÁSICA

Para avaliação da produção enzimática, por meio da fermentação em estado sólido, foi verificada a presença de halos de hidrólise (BARATTO, 2011; HANKIN E ANAGNOSTAKIS, 1975; COELHO, 2018).

Os conídios das linhagens isoladas foram cultivados em meio BDA – Batata – Dextrose-Ágar (250 g de batata, 20 g de dextrose e 15 g de ágar), a 28 °C, por cinco dias. Com o auxílio de furador de rolhas, foram retirados cilindros de ágar de 5 mm de diâmetro, das colônias em crescimento. Estes foram transferidos para o centro da placa de Petri, contendo 25 mL de meio de cultura ágar+amido (extrato de levedura 10 g, peptona de caseína 20 g, amido solúvel 10 g, ágar 20 g, 1L água destilada, pH 6,8) (FARIA SILVA, 2017) e incubadas a 28 °C, por cinco dias, em estufa BOD (COELHO, 2018). Após o crescimento micelial, conforme o microrganismo, pode ou não haver excreção de enzima amilase. Visando determinação desta, após período

de incubação, 1 mL de solução de lugol foi aplicada sobre colônia fúngica e meio de cultivo. Sendo assim, a hidrólise do amido, ocasionada pela ação da enzima amilase, pode ser visualizada pela descoloração do meio em torno da colônia, região na qual o iodo não se liga a molécula de amido, pois já houve quebra da molécula (Figura 6) (BARATTO, 2011).

Figura 6 – Placa de Petri com micélio de fungo BRGD 08 10^{-5} (incubado à 28 °C por 5 dias em agar+amido) e placa com aplicação de 1 mL de lugol (5% iodo), identificando halo (mais claro) de hidrólise, indicando exsudação de amilase pelo fungo presente



Fonte: A autora

4.3 CÁLCULO DO ÍNDICE ENZIMÁTICO

A razão entre o diâmetro do halo de hidrólise do substrato e o diâmetro da colônia expressa o índice enzimático (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975), através dele pode-se estimar potencial de produção enzimática. Foram realizadas 5 medições em 5 placas. As medidas foram de dois eixos ortogonais (diâmetros) da colônia e posteriormente de dois eixos (diâmetros) do halo, calculando-se média entre eles, para tanto se utilizou um paquímetro.

Os fungos que apresentaram índice enzimático $\geq 2,0$ foram considerados promissores para a produção de amilase (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975). No caso em estudo, estes foram selecionados e novamente testados. Os fungos que apresentaram valores menores, porém próximos a 2,0 foram testados novamente.

Essa seleção, também conhecida por screening, indica a presença de determinada substância pela detecção de alguma atividade específica, tal como a detecção de atividade enzimática via reação colorimétrica (ZHANG et al., 2006).

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

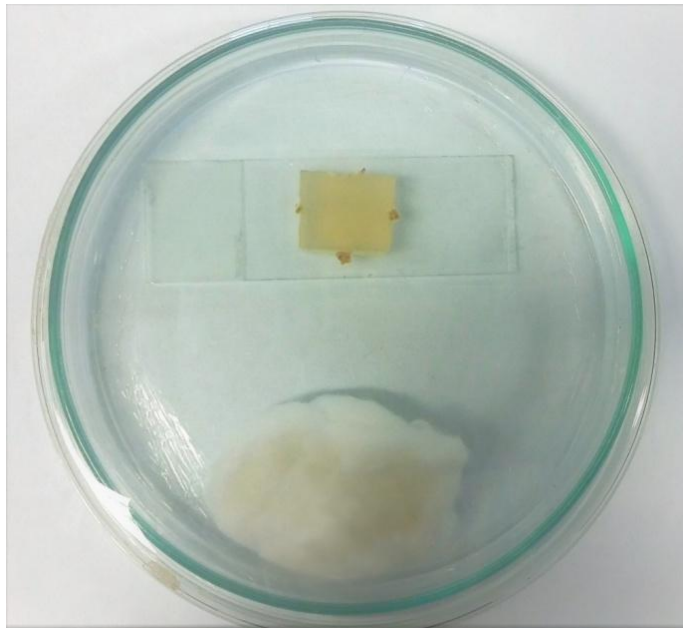
Os fungos promissores foram identificados por meio de observação macroscópica das colônias (caracterização morfológica) e realização de microcultivos (identificação microscópica) (KERN e BLEVINS, 1999).

Para caracterização morfológica utilizou-se meio de cultura BDA. As placas foram incubadas a 28 °C, em estufa BOD e acompanhadas por sete dias. A caracterização morfológica dos fungos baseou-se no aspecto visual, caracterizando-se forma, cor e velocidade de crescimento (MOGES, 2019).

As lâminas de microcultivo foram preparadas em meio de cultura BDA, a 28°C. No interior de placa de Petri esterilizada, contendo lâmina para microscopia, foi colocado cubo de meio BDA de aproximadamente 1,5 cm de aresta, sendo inoculado o micélio em cada um dos quatro lados do cubo e coberto com lamínula esterilizada (Figura 7). O ensaio de identificação microscópica foi realizado em triplicata (KERN e BLEVINS, 1999). A umidade foi mantida com o auxílio de algodão embebido em água destilada esterilizada, e a placa vedada com filme de PVC, formando uma câmara úmida.

Em 5 e 10 dias de cultivo foram retiradas as lamínulas e montadas as lâminas de microscopia com corante lactofenol azul de algodão. Essas foram observadas em microscópio óptico e posteriormente em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 e fotografadas, em 40x de aumento, com câmera Olympus DP-71 de 12 megapixels. A identificação dos gêneros dos fungos baseou-se em chave de classificação e na comparação com bibliografia ilustrada (SILVEIRA, 1981; BARNETT, 1986; LARONE, 1987).

Figura 7 - Lâmina de microcultivo do fungo BRGD 07 10^{-3} preparada em meio de cultura BDA



Fonte: A autora

4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DOS FUNGOS SELECIONADOS

Para a obtenção dos extratos brutos, primeiramente, propagou-se micélio dos fungos de interesse em placas de Petri contendo meio BDA, por 7 dias, em câmara de incubação tipo BOD, a 28 °C. Após este período, 3 cilindros de ágar de 5 mm de diâmetro, obtidos com auxílio de furador de rolhas, foram inocuados em frasco do tipo erlenmeyer, com 150 mL de meio mínimo (amido solúvel 10 g; NaNO_3 6 g; KH_2PO_4 1,5 g; KCl 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; FeSO_4 0,01 g; ZnSO_4 0,01 g; água destilada 1 L; pH 6,8), previamente autoclavado (PEREIRA, 2012).

Para a fermentação submersa, os fungos foram incubados em mesa orbital do tipo Shaker, em 150 rpm, à 28 °C, por 5 dias (TAVARES, 2012). Após o crescimento em meio líquido, cerca de 50 mL do extrato bruto fúngico foram filtrados em funil de vidro e papel filtro, previamente autoclavados. O extrato fúngico foi transferido para tubos de polipropileno de centrífuga do tipo Falcon®. Desta forma, o filtrado obtido, livre de células e micélio, foi utilizado como solução enzimática (STROPARO, 2012). Depois de filtrado, o extrato foi mantido a -16 °C para manter as propriedades enzimáticas, até ser utilizado para as próximas análises.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE

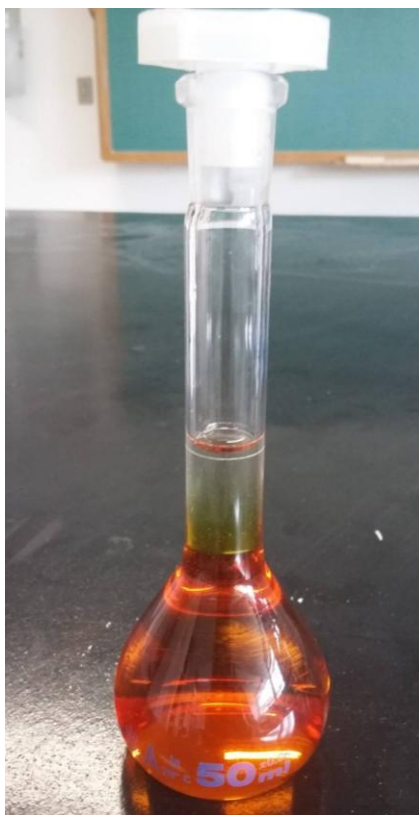
O ensaio para a quantificação de glicose foi iniciado misturando-se 50 μL do extrato bruto do fungo selecionado a ser testado e 50 μL de amido solúvel a 1% em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} e pH 6,0. A solução foi incubada em banho maria, 60 °C por 5 minutos, interrompida pela adição de 100 μL de ADNS (Ácido Dinitro-3,5-Salicílico) e fervida por 5 minutos (VASCONCELOS, 2013).

Após resfriamento, 1 mL de água destilada foi adicionada a solução. Posteriormente a homogeneização, a intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro UV-VIS Varian 50 Conc, a 540 nm de comprimento de onda, no módulo Simple Reads. O branco, para este ensaio, foi constituído pelo extrato bruto + solução de amido + reagente ADNS, no tempo zero da reação (ALMEIDA et al., 2017).

O método ADNS segue protocolo sugerido por Vasconcelos (2013). A utilização do reagente ADNS se baseia na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico para ácido 3-amino,5-nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. O reagente ADNS possui cor amarelada, após o aquecimento se torna avermelhado de acordo com a concentração de açúcares redutores presentes na solução, o que permite leitura em espectrofotômetro a 540nm (ANDRADE, 2016). Este método foi proposto originalmente por Miller (1959) e pode ser utilizado para analisar resultados obtidos de Fermentação Submersa.

Para o cálculo dos valores de açúcares redutores na solução após ação dos extratos brutos dos fungos promissores (5 minutos) foi determinada uma curva padrão analítica. Para a confecção desta curva utilizou-se soluções com concentrações variando de 0,1 g L^{-1} a 0,9 g L^{-1} de glicose (intervalo de 0,1 g L^{-1}). Incubaram-se 100 μL de cada solução, juntamente com 100 μL do reagente ADNS, a 60 °C por 5 minutos e, na sequência, resfriadas em banho de gelo. Após resfriamento, 1 mL de água destilada foi adicionada a cada solução (glicose+ADNS) e realizou-se leitura da intensidade da cor em espectrofotômetro UV-VIS Varian 50 Conc, a 540 nm de comprimento de onda, no módulo Simple Reads (VASCONSELOS, 2013), o branco foi constituído por água destilada.

Figura 8 – Reagente ADNS após a redução ácido 3,5-dinitrosalicílico para ácido 3-amino,5-nitrosalicílico.



Fonte: A autora

Por meio da equação obtida com a curva analítica e da leitura das absorvâncias obtidas das soluções com os extratos de fungos promissores, calculou-se a glicose presente. Valores estes, indicadores do potencial do fungo selecionado para hidrólise de amido.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Dos oito genótipos de batatas-doces, que foram cortadas e incubadas por 25 dias, em local fechado, duas apresentaram crescimento fúngico expressivo: BRS-Amélia e Beauregard (25 dias, com temperaturas: média das mínimas = 13,6 °C, média das máximas = 24,4 °C e média diária de 19,2 °C) (SIMEPAR, 2020). Dessa forma, utilizaram-se os microrganismos que se desenvolveram nestes dois genótipos para as análises de produção enzimática.

Foram isoladas 51 linhagens de fungos, sendo 26 linhagens da Beauregard e 25 linhagens da BRS-Amélia (exemplos Figura 9). Para a denominação dos mesmos adotou-se, como nomenclatura para os fungos isolados da batata-doce Beauregard, as letras BRGD e para os fungos isolados da BRS-Amélia; as iniciais AM. Nos dois casos adotou-se numeração arábica em sequência cronológica conforme isolamento. Sendo assim o microrganismo identificado como 01 na cultivar Beauregard não é necessariamente é o mesmo identificado como 01 na cultivar BRS-Amélia.

Figura 9 - Diversidade de fungos filamentosos isolados das batatas-doces (meio BDDA, 5 dias, 28 °C)



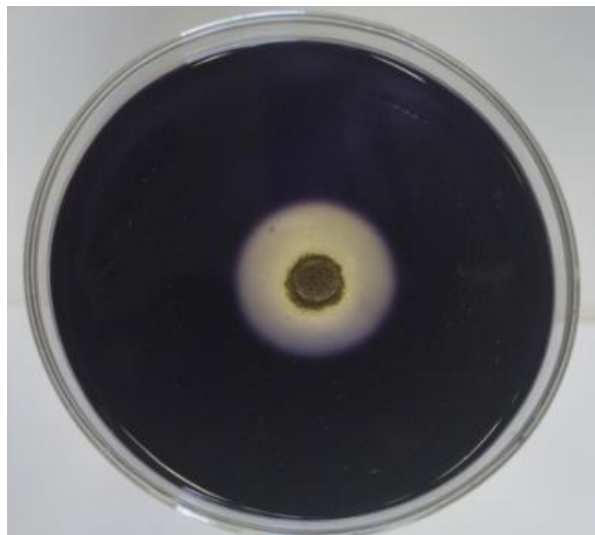
Fonte: A autora

Microrganismos isolados da própria matéria-prima, que será empregada como substrato na fermentação, representam alternativa promissora, uma vez que estes microrganismos estão mais adaptados à composição química da fonte nutricional e, portanto, mais hábeis para metabolizar o substrato (TEIXEIRA, 2017).

5.2 BIOPROSPECÇÃO

Através da bioprospecção selecionaram-se linhagens de fungos promissores quanto à produção de amilase. Esta atividade pode ser observada pela presença do halo de hidrólise em meio de cultura com amido (com aplicação de lugol). Os carboidratos na presença de lugol (5% iodo) podem sofrer reações de complexação, com a formação de compostos coloridos variando do azul intenso ao vermelho-violácea (LOUREIRO, 2019). Este complexo iodo/amido ocorre através da prisão do iodo nas cadeias lineares em forma helicoidal da amilose, sendo assim, onde se mantém a colocação azul, existe a presença de amido e onde não há evidencia de iodo, provavelmente ocorreu à quebra desta molécula, evidenciando o halo de hidrólise, com a presença de açúcares redutores (REMIÃO, 2003). Esse fato demonstra que os fungos foram capazes de secretar enzimas que hidrolisam amido (SOARES, 2010) (Figura 10).

Figura 10 - Halo de hidrólise produzida pelo fungo BRGD 08 10^{-5} , evidenciado com lugol, caracterizando degradação do amido (meio agar+amido, após 5 dias, à 28°C em estufa BOD)



Fonte: A autora

Das 26 linhagens que colonizaram naturalmente e foram isoladas da batata-doce Beauregard, 18 apresentaram halo enzimático em meio ágar + amido após aplicação de lugol, indicando hidrólise de amido pelos mesmos (Fotografia 3). Dos

citados, três apresentaram índice enzimático $\geq 2,0$, sendo promissores conforme Hankin e Anagnostakis (1975) (Tabela 2).

Com relação às 25 linhagens isoladas da batata-doce BRS-Amélia, nove fungos formaram halo de hidrólise e 16 fungos não mostraram produção de enzimas capazes de hidrólise do amido. Dos que se identificaram halos, três apresentaram índice enzimático $\geq 2,0$ (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975) (Tabela 2).

Tabela 2 – Diâmetro de colônia (cm) e índice enzimático de 18 fungos isolados da batata-doce, genótipo Beauregard

Isolado	diâmetro médio da colônia (cm)	índice enzimático médio
BRGD01 10^{-3} *	1,9	1,68
BRGD04 10^{-3}	2,1	1,42
BRGD05 10^{-3}	1,8	1,60
BRGD07 10^{-3}	1,5	2,00
BRGD10 10^{-3}	1,6	1,70
BRGD11 10^{-3}	1,7	1,90
BRGD12 10^{-3}	1,7	1,94
BRGD08 10^{-3}	1,1	1,50
BRGD01 10^{-5}	1,1	1,60
BRGD02 10^{-5}	1,1	1,50
BRGD04 10^{-5}	1,6	2,00
BRGD05 10^{-5}	1,0	1,80
BRGD06 10^{-5}	1,1	1,50
BRGD07 10^{-5}	1,8	1,60
BRGD08 10^{-5}	1,0	3,00
BRGD09 10^{-5}	1,7	1,90
BRGD10 10^{-5}	1,2	1,50
BRGD11 10^{-5}	2,1	1,40

*BRGD - cultivar Beauregard; 01 - identificação do microrganismo; 10^{-3} - concentração de microrganismo conforme diluição seriada

Fonte: A autora

Os microrganismos não possuem capacidade de assimilar diretamente moléculas complexas como o amido, dessa forma sintetizam enzimas específicas,

como as amilases, que degradam substrato mais complexo, no caso de interesse o amido, em moléculas mais simples (BASTOS-NETO, 2012). As amilases convertem o amido em açúcares fermentescíveis, garantindo crescimento e desenvolvimento do próprio organismo (SPIER, 2005).

Os halos de degradação enzimática dos fungos isolados da batata-doce Beauregard variaram de 1,42 a 3,00 cm e o maior produtor foi o isolado BRGD 08 10^{-5} .

Os halos de degradação enzimática dos fungos isolados da batata-doce BRS-Amélia variaram de 1,40 cm para 3,00 cm e o maior produtor foi o isolado AM 05 10^{-5} (Tabela 3).

Tabela 3 – Diâmetro de colônia (cm) e índice enzimático de 25 fungos isolados da batata-doce, genótipo BRS - Amélia

Isolado	diâmetro médio da colônia (cm)	índice enzimático médio
AM 13 10^{-3} *	2,5	1,6
AM 19 10^{-3}	2,1	1,4
AM 25 10^{-3}	2,7	1,5
AM 16 10^{-3}	1,3	1,7
AM 14 10^{-3}	1,9	1,9
AM 21 10^{-3}	1,7	1,8
AM 05 10^{-5}	1,6	3,0
AM 04 10^{-3}	1,0	2,0
AM 08 10^{-5}	1,6	2,0

*AM - cultivar BRS-Amélia; 13 - identificação do microrganismo; 10^{-3} - concentração de microrganismo conforme diluição seriada

Fonte: A autora

Os isolados que apresentaram índices enzimáticos $\geq 2,0$ (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975) foram selecionados e submetidos ao teste de confirmação (Tabela 4).

Os isolados que apresentaram valores, inferiores, porém próximos à 2,0, também foram novamente testados. Neste último caso, nenhuma das seis linhagens testadas, apresentou índice enzimático médio $\geq 2,0$. Os resultados destes testes, além de permitir verificar o diâmetro do halo de hidrólise, servem para prever o

rendimento da enzima como um auxílio para o processo de seleção de microrganismos capazes de degradar polissacarídeos (FARIA SILVA et al., 2017).

Tabela 4 – Diâmetro do halo e índice enzimático dos ensaios de bioprospecção e de confirmação dos isolados de fungos que apresentaram índice $\geq 2,0$

Isolado	diâmetro médio do halo (cm)	índice enzimático médio bioprospecção	índice enzimático médio confirmação
*BRGD 04 10^{-5}	3,2	2,0	2,2
BRGD 08 10^{-5}	3,0	3,0	2,2
BRGD 07 10^{-3}	3,0	2,0	2,1
AM 04 10^{-3}	2,0	2,0	2,3
AM 05 10^{-5}	4,8	3,0	2,3
AM 08 10^{-5}	3,2	2,0	2,3

*AM, BRGD - cultivar BRS-Amélia e Beauregard, respectivamente; 04 - identificação do microrganismo; 10^{-3} - concentração de microrganismo conforme diluição seriada

Fonte: A autora

5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

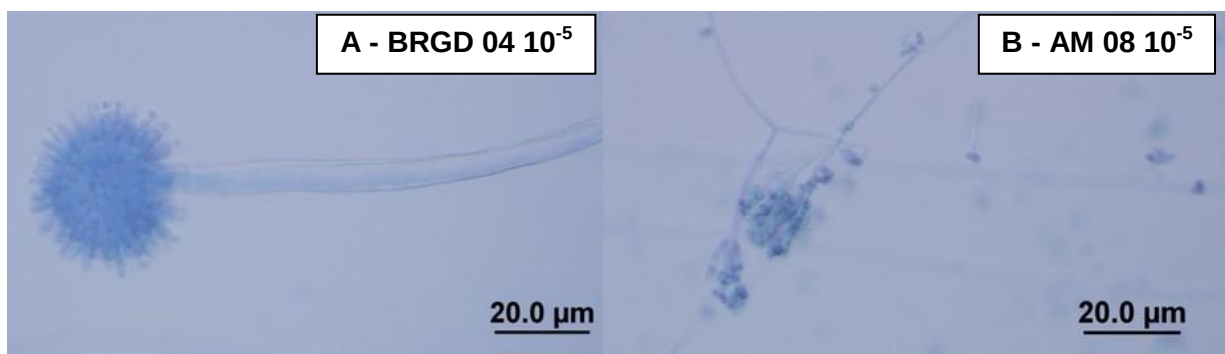
A identificação dos fungos filamentosos pode ser realizada por taxonomia clássica e por biologia molecular. No caso da taxonomia clássica, utilizam-se características morfológicas macroscópicas (superfície e o reverso da colônia, aspecto da borda, diâmetro, cor dos conídios e micélios etc.), microscópicas (forma e cor da hifa, presença ou não de septos, tipo e arranjo dos esporos, etc.) e velocidade de crescimento (TAKAHASHI, 2017).

Os isolados promissores BRGD 04 10^{-5} ; BRGD 08 10^{-5} ; BRGD 07 10^{-3} ; AM 04 10^{-3} e AM 05 10^{-5} foram classificados como pertencentes ao gênero *Aspergillus* sp. e AM 08 10^{-5} como pertencente ao gênero *Penicillium* sp. Porém não foram identificadas as espécies (Figura 11). Ambos os gêneros já foram descritos como produtores da enzima amilase (PIROTA, 2015; RODRIGUES, 2015).

Ambos os gêneros fúngicos pertencem ao filo *Ascomycota*, classe *Eurotiomycetes*, ordem *Eurotiales* e à Família *Trichocomaceae* (MONTEIRO, 2012). A Família *Trichocomaceae* compreende grande número de fungos, é conhecida por impactar as atividades humanas. São fungos mesofílicos, que crescem dentro da

faixa de temperatura de 25 a 37 °C, e desenvolvem-se bem em meio de cultivo abundante em nitrogênio orgânico, e produzem grande quantidade de glucoamilase (ALMEIDA et al., 2017). A maioria das espécies dessas famílias são conhecidas popularmente como bolores e são geralmente encontrados colonizando vários tipos de biomassas.

Figura 11 - Morfologia dos conidióforos de *Aspergillus* sp. (A) e *Penicillium* sp. (B), encontrados naturalmente nas batatas-doces Beauregard e BRS-Amélia identificados como produtores de amilase (microscópio de epifluorescência Olympus BX41, 40x de aumento)



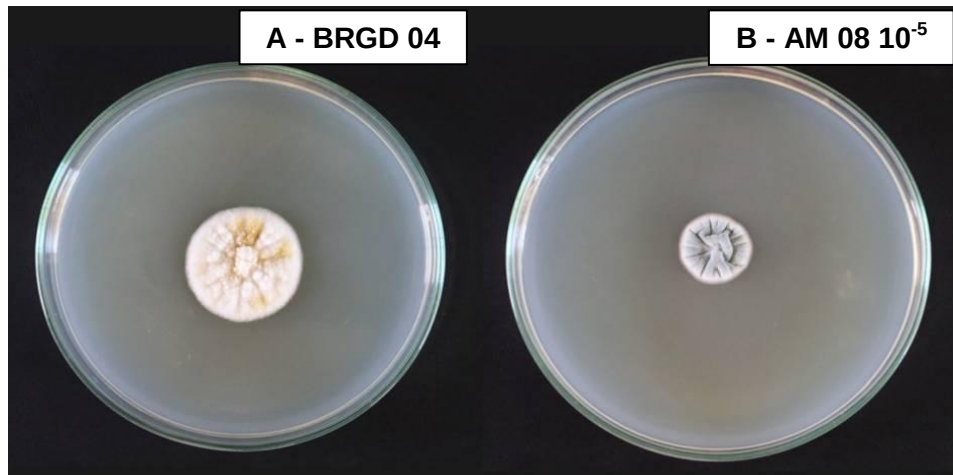
Fonte: A autora

Muitas espécies de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. são parasitas e provocam vários tipos de danos (decomposição prematura) em frutas, bulbos e tubérculos. Além disso, muitas espécies destas famílias têm aplicação nas indústrias de fermentações, uma vez que podem excretar no meio de cultura, compostos de interesse biotecnológico (SILVEIRA, 1981).

Apresentam micélio bem desenvolvido (Figura 12), tipicamente septado, com células uninucleadas, reproduzindo-se sexualmente por esporos originados no interior de conídios (LARONE, 1987). Os conidióforos de *Aspergillus* sp. apresentam conidióforos verticais, com terminação globosa, simples, conídios unicelulares, geralmente com cores variadas (BARNETT, 1986).

O *Penicillium* sp. apresenta conidióforos decorrentes de micélio único, ramificados próximo ao ápice, terminando em um grupo de conídios, com cores vivas e células unicelulares maciças, principalmente globosas ou ovóides, além de hifas septadas (1,5-5 μm de diâmetro), conidióforos ramificados ou não ramificados. Toda a estrutura morfológica de *Penicillium* sp. pode ser comparada com a aparência de uma escova (BARNETT, 1986; LARONE, 1987).

Figura 12 - Características morfológicas da colônia de *Aspergillus* sp (A) e *Penicillium* sp. (B) em meio BDA, após 5 dias de cultivo, à 28°C em câmara de incubação tipo BDO



Fonte: A autora

Os resultados apresentados corroboram com Moges (2019). O autor isolou 108 fungos filamentosos do solo de floresta na Etiópia. A triagem dos isolados resultou que 25% dos isolados apresentavam potencial para produção de amilase. Destes nove apresentaram índice enzimático elevado e destes, três apresentaram atividades apreciáveis de amilase em cultura líquida. O melhor produtor de enzimas foi identificado como *Penicillium* sp., por apresentar coloração verde escura, com borda amarelada. O reverso da colônia era amarelo claro e as características microscópicas mostraram hifas septadas e o conidióforo que se originava de um único septo. Este isolado apresentou atividade enzimática à temperatura de 5 °C.

De 25 fungos filamentosos isolados a partir de amostra de material em decomposição coletados da Mata Atlântica Brasileira, dois isolados foram identificados como maiores produtores de amilases: *Aspergillus brasiliensis* e *Rhizopus oryzae* (ALMEIDA et al., 2017).

A partir do óleo das escumas de esgoto sanitário e de caixas de gordura, foram isolados 100 fungos filamentosos, dos quais 67 apresentaram potencial para a produção de lipases (RODRIGUES et al., 2012). Foram identificados isolados, ao nível de gênero, como pertencentes à *Aspergillus* sp., *Beauveria* sp., *Botrytis* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Rhizomucor* sp. e *Verticillium* sp. Os autores ainda selecionaram

através do índice enzimático (HANKIN E ANAGNOSTAKIS, 1975), os fungos *Penicillium* sp F002 e *Rhizomucor* sp. F018, em função dos melhores resultados obtidos quanto à atividade lipásica. Sendo assim fungo pertencente ao gênero *Penicillium* sp. apresenta potencial para a produção de enzimas hidrolases.

As hidrolases englobam um grupo de enzimas que catalisam a quebra de ligações covalentes com água; entre elas estão às proteases, amilases, lipases, pectinases, celulases e catalases. Essas enzimas apresentam ampla utilização biotecnológica (GUSMÃO, 2014).

Esses trabalhos corroboram com os resultados apresentados neste trabalho, uma vez que confirmam que os fungos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. apresentam potencial para produção enzimática, dentre elas as amilases, as quais são importantes enzimas aplicadas para a produção de etanol combustível.

5.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DOS FUNGOS E QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE

Conforme equação da reta (Equação 1) obtida pela curva analítica (Gráfico 3) e leitura das absorbâncias obtidas das reações de hidrólise do amido solúvel, realizadas pelos extratos brutos dos isolados em teste, calculou-se o açúcar presente na solução após incubação (extrato do isolado promissor + amido solúvel).

$$y = 0,0073 + 0,1351x \dots\dots\dots \text{(equação 1)}$$

onde:

y - absorbância indica pelo espectrofotômetro UV-VIS Varian 50 Conc, a 540 nm de comprimento de onda;

x - concentração de glicose (g L^{-1})

Ao analisar os extratos bruto, obtidos dos fungos promissores, para a hidrólise do amido, os ensaios de atividade enzimática demonstraram que no tempo de 5 minutos de fermentação, a solução de amido fermentada com extrato bruto do fungo AM 04 10^{-3} , identificado como *Aspergillus* sp., apresentou os maiores quantitativos de açúcares redutores (Tabela 4). As leituras de absorbância da fermentação submersa confirmaram que os isolados AM 04 10^{-3} , AM 05 10^{-5} e BRGD 04 10^{-5} possuem potencial para o processo de hidrólise de amido (Tabela 5).

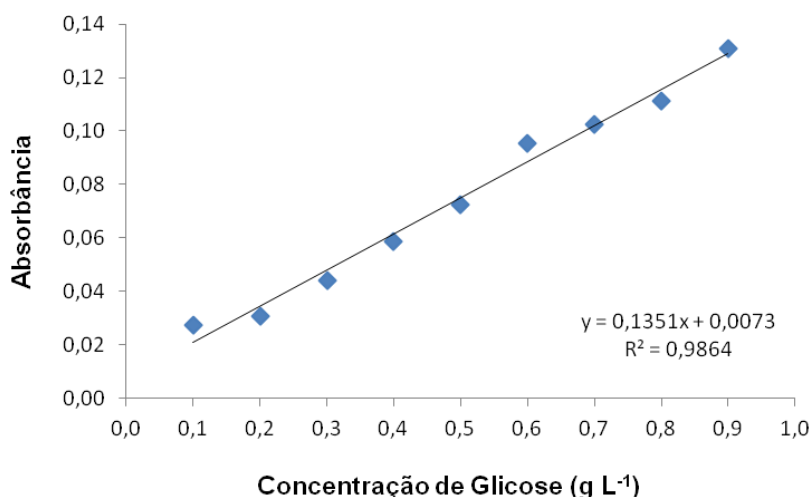


Gráfico 3. Curva padrão analítica para método enzimático de detecção de glicose em espectrofotômetro (UV-VIS Varian 50 Conc, 540 nm de comprimento de onda)

A secreção de amilases por *Aspergillus* sp. em meios de cultura contendo amido como única fonte de carbono tem sido descrita por vários autores (PEREIRA, 2017; IZMIRLIOGLU, 2016; PENG, 2013; TAKAHASHI, 2017).

Tabela 5 – Absorbância observada (extrato bruto do isolado + amido após 5 min de incubação + ADNS) e glicose calculada conforme curva analítica determinada da atividade enzimática da fermentação submersa (espectrofotômetro UV-VIS Varian 50 Conc - 540 nm)

Isolado	Absorbância observada	Glicose (g L ⁻¹)
BRGD 04 10 ⁻⁵ (<i>Aspergillus</i> sp.)	0,1706	1,20
BRGD 08 10 ⁻⁵ (<i>Aspergillus</i> sp.)	0,1202	0,81
BRGD 07 10 ⁻³ (<i>Aspergillus</i> sp.)	0,1003	0,67
AM 04 10 ⁻³ (<i>Aspergillus</i> sp.)	0,2173	1,56
AM 05 10 ⁻⁵ (<i>Aspergillus</i> sp.)	0,1974	1,40
AM 08 10 ⁻⁵ (<i>Penicillium</i> sp.)	0,0208	0,02

*AM, BRGD - cultivar BRS-Amélia e Beauregard, respectivamente; 04 - identificação do microrganismo; 10⁻⁵ - concentração de microrganismo conforme diluição seriada

As enzimas de origem microbiana possuem inúmeras vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como o menor custo de produção, a

possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer amplo espectro de características físico-químicas (ROVEDA, 2010).

O extrato bruto obtido de cada fungo pode conter gama de enzimas, a qual pode ser denominada coquetel enzimático e somente a purificação do extrato enzimático pode demonstrar exatamente quais enzimas o fungo sintetizou. A transformação do amido através do extrato enzimático produz açúcares redutores, sabe-se que a enzima α -amilase pode gerar mistura de glicose, maltose e dextrinas. Dessa forma, ensaios com cromatografia podem evidenciar qual açúcar foi produzido (FLORENCIO, 2017).

A purificação enzimática embora de alto custo, promove a remoção de contaminantes, que podem causar interferência no desempenho e na seletividade enzimática, influenciando na caracterização bioquímica, necessária para a identificação da enzima específica (SALOMÃO, 2017). Por outro lado, a aplicação de coquetéis enzimáticos, onde se tem diversas enzimas atuando em sinergia, contribui para a otimização do processo de sacarificação e desponta como possibilidade para minimizar os custos da produção de etanol, pela via enzimática (RUPENDRA, 2010).

A atividade enzimática de processos fermentativos pode variar de acordo com o isolado fúngico e com relação ao tempo de fermentação (GUSMÃO, 2014). Sendo assim estudos de tempo de fermentação podem ser realizados. Estes seriam início de otimização do processo com os fungos já selecionados.

As características físico-químicas das enzimas produzidas também podem diferir, visto que diferentes microrganismos e linhagens se comportam de maneira variada frente à mesma condição de incubação, podendo produzir enzimas com propriedades diversas (STROPARO, 2012).

Com utilização, concomitantemente, de fécula de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar como biomassa para produção enzimática, já foi observado níveis consideráveis de α -amilase e amiloglucosidase obtidas de *Aspergillus niger* (SPIER, 2005).

Em estudos, utilizando como biomassa bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz e cascas de soja, em fermentação em estado sólido, observou-se que o *Aspergillus niger* degradou 56% da casca de soja, aumentando à acessibilidade das enzimas celulolíticas. Estes resultados demonstram que *Aspergillus niger* é um microrganismo potencialmente valioso para a produção de enzimas celulolíticas e amiláceas, podendo ser utilizado na degradação da biomassa (OLIVEIRA, 2020).

Deve-se salientar que os extratos fúngicos podem conter outros componentes, que no caso do consumo humano causam risco potencial para a saúde, a exemplo pode-se citar as aflatoxinas. Estas micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, sendo várias espécies do gênero *Aspergillus* sp. as principais produtoras (DOMENICO et al., 2015). Aplicando-se a técnica de cromatografia em camada delgada em extratos fúngicos é possível detectar a presença de aflatoxinas (BRAGA et al., 2017).

Os resultados deste estudo demonstram que *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. são fungos filamentosos que podem sintetizar enzimas amiláceas, portanto podem ter aplicação biotecnológica, em função do seu potencial de hidrólise. Com isso pode-se verificar que as enzimas produzidas pelos fungos selecionados para a fermentação submersa foram capazes de converter amido em glicose.

6 CONCLUSÕES

Dos dois genótipos de batata-doce (batatas-doces Beauregard e BRS-Amélia) apresentaram crescimento de microrganismos, sendo isolados destas 51 linhagens de fungos.

Deste total, 27 linhagens apresentaram capacidade de hidrólise do amido através da fermentação em estado sólido. Destes, seis revelaram índice enzimático $\geq 2,0$ e foram identificados como *Aspergillus* sp e *Penicilium* sp.

O extrato bruto do gênero *Aspergillus* sp., mostrou os maiores resultados na conversão em glicose.

REFERÊNCIAS

- AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO (ANP). **A história do petróleo no Brasil**. Disponível em: <anp.gov.br/institucional/a-historia-do-petroleo>. Acesso em: 30/07/2018.
- ALMEIDA, P. Z. (et al.). Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. **Biota Neotropical**, v. 17, n. 3, p. 1-9, 2017.
- APARECIDO, C. C. (et al.). Divulgação técnica: Preservação de micro-organismos a -80°C. **Biológico**, v. 74, n. 1. p. 23-29, 2012.
- ARAUJO, A. S.; MARTINS, E. S. Produção de α -amilases por *Rhizomucor miehei* e *Syncephalastrum racemosum* em diferentes condições fermentativas. **Nucleus**, v. 15, n. 2, p. 583-592, 2018.
- AUSTIN, D. F. The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potatoes and related wild species. In P. Gregory (ed.) **Exploration, Maintenance and Utilization of Sweet Potato Genetic Resources**. CIP: Lima, Peru, p. 27- 60. 1988.
- BARATTO, C. M. (et al.). Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, v. 11, n. 2, p. 15-28, 2011.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4ª ed. New York: Macmillan, 1986.
- BENASSI, V. M. (et.al.). Production and action *Aspergillus phoenicis* enzymatic pool using different carbon sources. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15. n. 3, p. 253-260, 2012.
- BLANK, A. F. (et.al.). Performance of sweet potato clones for starch and ethanol in three regions of the state of Sergipe, Brazil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 33, n. 1, p. 66-75, 2017.
- BOURDICHON, F. (et al.). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 87–97, 2012.
- BRAGA, C. M. S. R. (et al.). Detecção presuntiva de aflatoxinas em amendoins comercializados na cidade do Recife, PE, Brasil. **Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 29, n. 2, p. 141 – 146, 2017.
- BRASIL. Ministério da Economia, Indústria, Comércio Exterior e Serviços – MDIC. **Energia**. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/legislacao/9-assuntos/categ-comercio-exterior/599-energia>>. Acesso em: 02/12/2019.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Resenha Energética Brasileira: exercício de 2018**. Disponível em:

<<http://www.mme.gov.br/documents/36208/948169/Resenha+Energ%C3%A9tica+Brasil+edi%C3%A7%C3%A3o+2019+v3.pdf/92ed2633-e412-d064-6ae1-eefac950168b>>. Acesso em: 05/12/2019.

CAMPBELL, C. (et al.). Value-added probiotic development by high-solid fermentation of sweet potato with *Saccharomyces boulardii*. **Food Science & Nutrition**, v. 5, n. 3, p. 633-638, 2017.

CARDOSO A. D.; VIANA A. E. S.; RAMOS P. A. S.; MATSUMOTO S. N.; AMARAL C. L. F.; SEDIYAMA T.; MORAIS O. M. Avaliação de clones de batata-doce em Vitória da Conquista. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 911-914, 2005.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 6. p. 225-226, 1939.

CAVALCANTE, R. R. (et al.). Características produtivas de genótipos de batata-doce em função de doses de fósforo em solos de terra firme no município de Careiro, AM. **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 11, n. 6, p. 17-23, 2017.

CAZy. **Carbohydrate-active enzymes database**. Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. Acesso em: 12/10/2019.

CEREDA, M. P.; **Agricultura: Tuberosas amiláceas Latino Americanas**, São Paulo: Cargill, v.2, p. 449-503, 2002.

CHAVES NETO, J. R. (et al.). Avaliação de diferentes métodos de preservação do fungo *Phoma dimorpha*. **Colloquium Agrarie**, v. 15, n. 4, p. 1-10, 2019.

CHI-RUEI, H. (et al.). The utilization of sweet potato vines as carbon sources for fermenting bio-butanol. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 79, p. 7-13, 2017.

COELHO, G. D. (et al.). Potencial de Fungos da Caatinga para a Produção de Enzimas Amilolíticas. **Revista Saúde e Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 286-297, 2018.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar / Safra 2018/19**, v. 5, n. 4 - Quarto levantamento, 2019.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COSTA, M. R. **Estudo comparativo das hidrólises ácida e enzimática de matérias primas amiláceas visando à obtenção de etanol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Maceió, 2010.

COSTA, M. S. (et al.). Isolamento de microrganismos de interesse biotecnológico oriundos de áreas contaminadas com agroquímico. **Revista de Investigação Biomédica**, São Luís, v. 9, n. 1, p. 17-23, 2017.

CUNHA, J. R. B. (et al.). Cultivo de *Penicillium* spp. em resíduos da colheita de soja para produção de celulase, protease e amilase. **Revista Ceres**, v. 63, n. 5, p.597-604, 2016.

DEWAN, A. (et al.). Saccharification and fermentation of waste sweet potato for bioethanol production. **Journal of Food Process Engineering**. v. 36, n. 6, p.739-747, 2013.

DOMENICO, A. S. D. (et al.). Análise de trilha da contaminação por aflotoxinas em grãos de milho armazenados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 6, p. 441- 449, 2015.

DUTTA, S. (et.al.). Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. **Green Chemistry**, v.16, p. 4615–4626, 2014.

DUVERNAY, W. H.; CHINN, M. S.; YENCHO, G. C. Hydrolysis and fermentation of sweet potatoes for production of fermentable sugar and ethanol. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 527-537, 2013.

EMBRAPA. **Sistema Embrapa de produção agroindustrial de sorgo sacarino para bioetanol sistema BRS1G** – Tecnologia qualidade Embrapa, Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balanço Energético Nacional 2018: Ano base 2017 / Empresa de Pesquisa Energética**. – Rio de Janeiro: EPE, 2018.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Matriz Energética e Elétrica**. Disponível em:<<http://epe.gov.br/pt/abcdenergia/matriz-energetica-e-eletrica>>. Acesso em: 22/09/2018.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical Databases**. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 14 março de 2018.

FERRARI, M. D.; GUIGOU, M.; LAREO, C. Energy consumption evaluation of fuel bioethanol production from sweet potato. **Bioresource Technology**, v. 136, p.377-384, 2013.

FIGUEIREDO J. A.; ANDRADE JUNIOR V. C.; PEREIRA R. C.; RIBEIRO K. G.; VIANA D. J. S.; NEIVA I. P. Avaliação de silagens de ramas de batata-doce. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 4, p.708-712, 2012.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de Olericultura. Agroecologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3 ed. Viçosa, MG: ED. UFV, 2007.

FLORENCIO, C. (et al.). Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas da hidrólise da biomassa lignocelulósica. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1082-1093, 2017.

FOLQUER, F. **La batata (camote): estudio de la planta y su produccion comercial**. San Jose: IICA,151p. 1978.

GILIO, L.; CASTRO, N. R. Avaliação de aspectos limitantes ao crescimento do etanol e o setor sucroenergético no Brasil. **Revista Eletrônica de Energia**, v.6, n.1, p. 58-74, 2016.

GOLDEMBERG, J. Atualidade e Perspectivas no uso de biomassa para geração de energia. **Revista Virtual de Química**, vol. 9, n. 1, p. 15-28, 2017.

GOMES, M, S. (et al.). Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p.1577-1581, 2008.

GONÇALVES-NETO, A, C. (et al.). Aptidões de genótipos de batata-doce para consumo humano, produção de etanol e alimentação animal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 11, p. 1513-1520, 2011.

GUANDALINI, N. C. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium ansioptiae* utilizando resíduos amiláceos como substrato.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. 2007.

GUEVARA, A. J. de H. (et al.). Avaliação da Sustentabilidade da Produção Brasileira de Etanol: Um modelo em Dinâmica de Sistemas. **Brazilian Business Review**. v. 14, n.4, p.435-447, 2017.

GUSMÃO, R. O. (et al.). Produção de enzimas por *Aspergillus* spp. sob fermentação em estado sólido em casca de café. **Scientia Plena**, v. 10, n. 11, p. 1-11, 2014.

HAI-JUAN, L. (et al.). Production of raw cassava starch-degrading enzyme by *Penicillium* and its use in conversion of raw cassava flour to ethanol. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n.6, p. 733-742, 2011.

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

HORTA, M. A. C. (et al.). Network of proteins, enzymes and genes linked to biomass degradation shared by *Trichoderma* species. **Scientific Reports**. v. 8, número do artigo: 1341, p. 1-11, 2018.

HUAMÁN, Z. **Descriptores for Sweet Potato**. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy, 1991.

IEA DADOS E ESTATÍSTICA. **Matriz energética mundial 2016**. Disponível em: <<https://www.iea.org/data-and-statistics>>. Acesso em 22/09/2018.

IZMIRLIOGLU, G.; DEMIRCI, A. Improved simultaneous saccharification and fermentation of bioethanol from industrial potato waste with co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* by medium optimization. **Fuel**, v.185, p.684-691, 2016.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia Médica**. 2ª. edição. São Paulo: Editora Premier, p. 256, 1999.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D. (et al). The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 9, n. 4, p. 1083-1087, 2012.

KLOMLIENG, W.; PRATEEPASEN, A. Using low-power ultrasonic for enhancing *Saccharomyces cerevisiae* M30 productivity for ethanol produced from molasses. **International proceedings of chemical, biological & environmental engineering: IPCBEE**, v.9, p 234-239, 2011.

LAREO, C. (et al). Evaluation of sweet potato for fuel bioethanol production: hydrolysis and fermentation, **Springer Plus**, v. 2, número do artigo: 493, p. 2-11, 2013.

LARONE, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. 2ª ed. New York: Elsevier, 1987.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. Sarvier, 3ªed, São Paulo, 2002.

LEITÃO, V. O. (et al.). Growth and expression of relevant metabolic genes of *Clostridium thermocellum* cultured on lignocellulosic residues. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 825-834, 2017.

LOMBARD, V. (et.al.). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, ed. D1, p.490-495, 2014.

LOMTHONG, T. (et.al.). Poly (L-lactide)-degrading enzyme production by *Laceyella sacchari* LP175 under Solid State Fermentation using low cost agricultural crops and its hydrolysis of poly (L-lactide) film. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 12, 2018.

LOMTHONG, T. (et.al.). Production of raw starch degrading enzyme by the thermophilic filamentous bacterium *Laceyella sacchari* LP175 and its application for ethanol production from dried cassava chips. **Journal Starch-Stare**, v. 68, ed. 11-12, p. 1264-1274, 2016.

LOPES, A. C. (et.al.). Alcohol production from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) genotypes in fermentative medium. **Acta Agronómica**, v. 67, n. 2, p. 231-237, 2018.

LOW, J. (et.al.). **Sweet potato in Sub-Saharan Africa**, In: Loebenstein G., Thottappilly G. (eds) The sweet potato, Springer, Dordrecht. cap. 16, p.359-390, 2009.

LUDTKE, R. C. (et.al.). **Agricultura Familiar e Agroenergia: Uma reflexão a partir da sociedade de risco e da perspectiva orientada ao ator**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional), UNISC, Santa Cruz do Sul-RS, 2015.

MARQUES, D. R. (et.al.). Enzymatic hydrolysis of raw cassava starch and bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* CENPK2 expressing a gluciamylase from *Aspergillus awamori*. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.2, n. 4, p. 22-29, 2013.

MARTINS, E. H. **Potencial de obtenção de açúcares fermentescíveis a partir do farelo de canola empregando-se as β -glicosidases produzidas por *Penicillium glabrum***. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO. Guarapuava-PR. 2019.

MARTINS, M. E. M.; MARTINS, E. S.; MARTINS, H. L. Production and characterization of a thermostable β -glucosidase from *Myceliophthora heterothallica*. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 1, p. 212-222, 2020.

MASINA, N. (et al.). A review of the chemical modification techniques of starch, **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1226 –1236, 2017.

MASSON, I. S. (et al.). Produção de bioetanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p.1695-1700, 2015.

MELO SANTOS, S. F. (et al.). Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1973-1978, 2008.

MENEGUELLI, A. Z. (et al.). Caracterização enzimática da amilase, **Revista Saberes da Unijipa**, Ji-Paraná, v. 15, n. 3, p. 61-70, 2019.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagente for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428. 1959.

MIRANDA, J. E. C.; CARRIJO, O. A.; SOUZA, A. F. **A Cultura da batata-doce**. Embrapa-CNPq, Plantar, v.30, 1995.

MIRANDA, J. E. C.; FRANÇA, F. H.; CARRIJO, O. A.; SOUZA, A. F.; AGUILAR, J. A. E. **Cultivo da batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)**. Brasília: EMPRAPA-CNPq, 1984.

MOGES, M. (et al.). Isolation and characterization of amylase enzyme from selected fungal strains of Wof Washa Forest of North Shoa, Ethiopia. **Scientific Journal of Biology & Life Sciences**. v.1, n. 2, p. 1-10, 2019.

NEUNFELD, T. H. Caracteres agrônômicos, de pós-colheita e análise sensorial de acessos de batata-doce. Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, 2019.

NOVOZYMES. Disponível em: <<https://www.novozymes.com/pt>>. Acesso em: 12/07/2018.

OLIVEIRA ADAMI, A. C.; BACCHI, M. D. Evolution of participation of renewable energy sources in the energy matrix of the countries of South America. **Revista Espacios**, vol. 37. n.19. p. 1, 2016.

OLIVEIRA, D. **Otimização no processo de hidrólise ácida dos tubérculos da erva daninha *Cyperus esculentus* visando à obtenção de etanol**. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO. Guarapuava, PR, 2016.

OLIVEIRA, F. de. (et al.). Effect of agro-industrial residues mixtures on the production of endoglucanase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Acta Scientiarum Technology**, v. 42, e41358, p. 1-9, 2020.

PANDEY, A. (et al.). Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.31, n. 2, p. 135-152, 2000.

PEDROSO, L. L. A. (et al.). Current and future demands for biomass and renewable energy in Brazil and worldwide. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 4, n. 5, Edição Especial, p. 1980-1996, 2018.

PENG, Z. (et al.). Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 128, p.835-838, 2013.

PEREIRA, C. R. (et.al.). Enzymatic conversion of sweet potato granular starch into fermentable sugars: Feasibility of sweet potato peel as alternative substrate for α -amylase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p.231-238, 2017.

PEREIRA, C. R. **Produção de amilase por *Aspergillus niger*: potencial de aplicação na hidrólise do amido granular da batata-doce**. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual do Centro Oeste, UNICENTRO. Guarapuava-PR. 2015.

PEREIRA, S. C. L. (et al.). Estudo da Produção de Álcool Utilizando como Matéria-Prima a *Cyperus esculentus* (Tiririca). **Revista Virtual de Química**, v.8, n. 5, 2016.

PEREIRA, V. M. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulasas por *Aspergillus sulphureus***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras, 2012.

PIERRI, L. de. (et.al.). Sazonalidade e potencial energético da biomassa residual agrícola na região dos Campos Gerais do Paraná. **Revista Ceres**, v. 63, n. 2, Viçosa, 2016.

PIROTA, R. D. P. B. (et al.). Caracterização de fungos isolados da região Amazônica quanto ao potencial para produção das enzimas envolvidas na conversão da biomassa vegetal. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p.1606-1612, 2015.

QIN FAN (et.al.). A glycogen branching enzyme from *Thermomonospora curvata*: Characterization and its action on maize starch. **Starch/Stärke**, v. 68, edição 3-4, p.355-364, 2016.

RAVEN, P. H., **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

REMIÃO, J. O. R. **Bioquímica: guia de aulas práticas**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

RFA - Renewable Fuel Association. **World Fuel Ethanol Production-2018**. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/world/>>. Acesso em 5 de janeiro de 2019.

RIBEIRO N. V. (et.al.). Assessing Sugarcane Expansion in the Cerrado Biome through a Dynamic Modeling of the Landscape. **Revista Brasileira de Cartografia**, v. 68, n. 1, p. 1-14, 2016.

RODRIGUES, C. (et.al.). Isolamento e seleção de fungos produtores de lipase com base na atividade lipásica e no potencial hidrolítico sobre óleo comestível de soja e espuma de caixa de gordura. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 507-518, 2016.

RODRIGUES, O. C. S.; ABREU, Y. V. Características da posse e uso de terras relacionadas às culturas agrícolas destinadas à produção de agroenergia no Brasil (Biodiesel e Etanol). **Revista Desafios**, v. 3, n. Especial, p. 1-10, 2017.

RUPENDRA, M. (et.al.). Large-scale isolation, fractionation, and purification of soluble starch-synthesizing enzymes: starch synthase and branching enzyme from potato tubers. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 11, p. 1555-1563, 2010.

SACCARO JUNIOR, N. L. **Desafios da Bioprospecção no Brasil**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília, 2011.

SANTANA, W. R. (et al.). Identificação agronômica de genótipos de batata-doce em banco de germoplasma para fins industriais de etanol carburante. **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 7, n. 1, p.31-34, 2013.

SANTOS, E. G. dos. **Produção de álcool a partir de batata-doce com variações nas condições de fermentação**. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Centro Oeste, UNICENTRO. Guarapuava-PR. 2015.

SANTOS, R. A. **Estudo cinético de fermentação etanólica do hidrolisado de farinha de mandioca utilizando complementação nutricional do mosto**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia, Maceió, 2013.

SCHIRMER, W. N.; RIBEIRO, C. B. Panorama dos combustíveis e biocombustíveis no Brasil e as emissões gasosas decorrentes do uso da gasolina/etanol. **Biofix Scientific Journal**, v. 2, n. 2, p.16-22, 2017.

SCHWEINBERGER, C. M. (et al.). Ethanol production from sweet potato: The effect of ripening, comparison of two heating methods, and cost analysis. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 94, n. 4, p.716-724, 2016.

SHUPENG, W. (et al.). Gene cloning, functional expression and characterisation os a novel glycogen branching enzyme from *Rhizomucor miehei* and its application in wheat breadmaking. **Food Chemistry**, v. 159, p. 85-94, 2014.

SILVA, G, M, H. da. Produção de amilase e protease obtidas por *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* através da fermentação em estado sólido. **Revista Saúde e Ciência online**, v. 7, n. 2, p.486-502, 2018.

SILVA, G. S. P. **Concentração de amido e estimativa de rendimento de álcool em batata-doce cultivada com diferentes fontes e doses de potássio**. Dissertação (Mestrado em Bioenergia). Universidade Estadual do Centro-Oeste - Unicentro, 2013.

SILVA, J. B. C., LOPES, C. A., MAGALHÃES, J. S. **Agricultura: Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**, v. 2, cap. 22, p 448-505. 2002.

SILVEIRA, M. A. Batata-Doce: uma Nova Alternativa para a Produção de Etanol. Instituto Evaldo Lodi. Núcleo Central – Brasília. **Álcool combustível**, (Série Indústria em Perspectiva), 163 p., 2008.

SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Ed. Interamericana,1981.

SIMEPAR - **Sistema de tecnologia e monitoramento ambiental do Paraná**. Disponível em: <<http://www.simepar.br/prognozweb/simepar>>. Acesso em: 14/01/2020.

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

SOLA, M. C. (et al.). Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p.1398-1418, 2012.

SOUZA, G. M. (et al.). **Bioenergy & Sustainability**: Bridging the Gaps. Scope, 2015.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industry: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850-861, 2010.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidade por fermentação no estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, 2005.

SRICHUWONGM, S. (et al.). Sweet potato having a low temperature-gelatinizing starch as a promising feedstock for bioethanol production. **Biomass & Bioenergy**, v. 39, Edição Especial: Biorrefinaria, p. 120-127, 2012.

STROPARO, E. C. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

SUNAN, W., SHAOPING N.; FAN, Z. Chemical constituents and health effects of sweet potato. **Food Research International**, v. 89, n. 1, p. 90-116, 2016.

TABORDA, L. W.; JAHN, S. L.; LOVATO, A.; EVANGELISTA, M. L. S. Evaluation of the technical and economic feasibility of ethanol production in a pilot plant using sweet potatoes. **Custos e @gronegócio on line**, v. 11, n. 1. p. 245-262, 2015.

TAKAHASHI, J. A. (et al.). Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. **Revista Virtual de Química**, v. 09, n. 6, 2017.

TASIC, M. B. (et al.). The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, edição: 2, p. 208-211, 2009.

TAVARES, J. C. do N. (et al.). **Resíduos regionais na elaboração de meios para crescimento micelial de cogumelos amazônicos**. II Congresso de Iniciação Científica PIBIC/CNPq e PAIC/FAPEAM, Manaus, 2013.

TAVARES, A. C. D. (et al.). Extracellular Enzymes of Anamorphic Fungi Isolated from *Morinda citrifolia* L. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2012.

TEIXEIRA, I. A. L. (et al.). Isolamento e seleção de bactérias produtoras de amilase e pectinase sob fermentação submersa. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 11, n. 1, p. 2227-2244, 2017.

TEODORO, T. S. (et al.). Influência do Tween 80 na produção de lacases de *Pleurotus sajor-caju* e eficiência do caldo enzimático bruto na remoção de bisfenol – A. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, n. 1, p. 1-10, 2018.

THATOI, H. (et al.). Bioethanol production from tuber crops using fermentation technology: a review. **International Journal of Sustainable Energy**, v. 35, n. 5, p. 443-468, 2014.

TORRES, L. M. (et al.). Amylolytic enzymes concentration in the starch hydrolysis of ginger. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1327-1332, 2012.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**, 10^a ed, Porto Alegre, Artmed, 2012.

VASCONSELOS, N. M. de. (et al.). **Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

VIEIRA, A. D. (et al.). Avaliação agronômica de clones de batata doce com potencial para produção de etanol. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**, v. 8, n.1, p.69-74, 2015.

VIEIRA, D. A. (et al.). A review of the chemical modification techniques of starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1226 –1236, 2017.

VILHALVA, D. A. A. (et.al.). Produção de aguardente a partir de resíduo de fecularia de mandioca. **Interciência**, v. 38, n. 11, p. 808-813, 2013.

VIZZOTTO, M. (et al.) Composição mineral em genótipos de batata-doce de polpas coloridas e adequação de consumo para grupos de risco. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, e2016175, 2018.

WANG, S.; COPELAND, L. Effect of Acid Hydrolysis on Starch Structure and Functionality: A Review. **Journal Critical reviews in food science and nutrition**, v.55, 8^a ed., p. 1081-1097, 2015.

WOOLFE J. A. **Sweet potato: an untapped food resource**. Cambridge: Cambridge University Press, 643p. 1992.

YEN, D. E. **Sweet potato in historical perspective**. In: R. L. Villareal and T. D. Griggs (Eds.). Sweet Potato: Proceedings of the First International Symposium. AVRDC, Tainan, p. 17-30. 1982.

ZANARDI, M. S.; JUNIOR, E. F. C. Tecnologia e perspectiva da produção de etanol no Brasil. **Revista Liberato**, v. 17, n. 27, p. 01-118, 2016.

ZAVAREZE, E. R. (et al.). Funcionalidade de hidrolisados proteicos de cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, v.32, n.7, p. 1739-1743, 2009.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.