

## 74928 - A COMPOSTAGEM: PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS

*Jaqueline Siqueira Nunes<sup>1</sup>; Renato França de Araújo Delgado<sup>2</sup>; Iracema de Azevedo Monte Paiva<sup>3</sup>; Caio de Azevedo Lima<sup>1</sup>; Glauciane Danusa Coelho<sup>4</sup>.*

<sup>1</sup> Graduandos do curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé-PB, Brasil,

email: jaquelinenunes\_16@hotmail.com; caioazevedolima11@gmail.com

<sup>2</sup> Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé-PB, Brasil. email: renato\_delgao82@hotmail.com

<sup>3</sup> Graduanda do *Curso Superior* de Tecnologia em *Agroecologia*, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé-PB, Brasil, email: iracemapaiava1997@gmail.com

<sup>4</sup> Professora Adjunta, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé-PB, Brasil, email: glauciane.coelho.pb@gmail.com

**RESUMO:** A compostagem é um processo de decomposição da matéria orgânica e que ocorre devido à produção de enzimas extracelulares provenientes de microrganismos presentes no sistema. Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo o isolamento de fungos com capacidade de produzir enzimas amilolíticas com vistas para futuras aplicações biotecnológicas. Amostras utilizadas para isolamento fúngico foram provenientes de um tanque de compostagem. Os fungos obtidos a partir da fase termofílica da compostagem foram avaliados para a produção de enzimas amilolíticas pelo método de difusão em gel de ágar, em placas de Petri, tendo amido como substrato. Na fase termofílica foram obtidos 7 isolados fúngicos, sendo que os maiores índices enzimáticos foram verificados para os isolados 1, 4 e 7 com valores de 12,5; 11,4 e 12,8, respectivamente. Os fungos isolados em sistema de compostagem produziram enzimas amilolíticas e mostraram-se promissores para a produção destas enzimas em bioprocessos.

**Palavras-chave:** amilase, aplicação biotecnológica, fungos, enzimas microbianas.

## COMPOSTING: PROSPECTION OF MICROORGANISMS PRODUCER OF AMYLOLYTIC ENZYMES

**ABSTRACT:** Composting is a process of decomposition of organic matter and occurs as result of the production of extracellular enzymes from microorganisms present in the system. In this sense, this work had as objective the isolation of fungi with capacity to produce amylolytic enzymes with a view to future biotechnological applications. Samples for fungal isolation came from a composting tank. The fungi obtained from the thermophilic phase of the composting were evaluated for the production of amylolytic enzymes by the agar gel diffusion method in Petri dishes, with starch as substrate. In the thermophilic phase 7 fungal isolates were obtained, and the highest enzymatic indices were verified for isolates 1, 4 and 7 with values of 12.5; 11.4 and 12.8, respectively. The fungi isolated on the composting system produced amylolytic enzymes and were shown to be promising for the production these enzymes in bioprocess.

**Key words:** amylase, biotechnological application, fungi, microbial enzymes.

### 1. INTRODUÇÃO

#### Compostagem

A compostagem é definida como uma técnica aplicada no controle da decomposição de materiais orgânicos para a obtenção, em um curto tempo, do material estável, rico em húmus e nutriente mineral; com atributos físicos, químicos e biológicos superiores àqueles encontrados na(s) matéria(s) prima(s) (1). Sendo também considerada como uma técnica controlada de decomposição microbiana, de oxidação e de oxigenação de uma mistura heterogênea de materiais orgânicos, sendo caracterizada por uma fase inicial e rápida de fitotoxicidade (2). Em seguida ocorre uma fase de bioestabilização, e finalmente a terceira fase, ocorrendo a humificação ou maturação, acompanhada da mineralização de determinados componentes da matéria orgânica, como N, P, Ca e Mg, que passam da forma orgânica para a inorgânica, ficando disponíveis às plantas (3).

Sendo assim, a compostagem é um processo biológico, aeróbio e controlado de transformação de resíduos orgânicos em substâncias húmicas por meio de microrganismos tais como fungos e bactérias (4; 5). Se a compostagem for corretamente manejada pode proporcionar ótimas condições na obtenção da estabilização dos

componentes poluentes, o que possibilita que os resíduos orgânicos retornem ao solo como um fertilizante natural, livre de bactérias patogênicas, vírus e parasitas (6;3).

As fases da compostagem podem ser classificadas de acordo com a variação da temperatura em (7;8):

- **Mesofílica** predominam as temperaturas moderadas, até 40°C, e com duração média de dois a cinco dias.
- **Termofílica:** quando o composto atinge a temperatura máxima (>40°C), sendo assim degradado mais rapidamente. Esta fase geralmente tem a duração de poucos dias a vários meses, de acordo com as características do material a ser compostado.
- **Resfriamento:** nessa fase ocorre a queda da temperatura para valores da temperatura ambiente.
- **Maturação:** fase em que há estabilização e que produz um composto maturado, altamente estabilizado e humificado, livre de toxicidade.

Fatores que interferem no processo de compostagem:

### Temperatura

Muitos pesquisadores consideram a temperatura como sendo o mais importante indicador da eficácia do processo de compostagem, visto que a temperatura está relacionada com a atividade metabólica dos microrganismos, que é diretamente afetada pela aeração (9), teor de umidade (10; 11; 12), granulometria (13; 14; 15) e disponibilidade de nutrientes (16; 17).

A variação de temperatura define grupos de microrganismos que podem ser classificados em: *criofílicos*, que tem crescimento ótimo à temperatura próxima de 25°C; *mesofílicos*, com crescimento ótimo entre 30 e 45°C; e *termofílicos*: com crescimento ótimo em temperaturas acima de 50°C (3). Ainda, a literatura apresenta que em temperaturas superiores a 70°C a atividade microbiana torna-se reduzida. E temperaturas em torno de 80°C resultam na paralisação do processo e risco de combustão espontânea do material compostado (2). O que reforça a necessidade de aeração do sistema de compostagem para redução da temperatura.

### Umidade

A umidade é um parâmetro de grande importância a ser controlado, uma vez que é a água que promove o transporte de nutrientes dissolvidos, indispensáveis para as atividades metabólicas e fisiológicas dos microrganismos (3). O valor de umidade varia de acordo com as condições do material compostado, com o tamanho das partículas e

com o estágio de decomposição no qual a compostagem já se encontra. Entretanto, é sugerido que o valor esteja entre 40-70% (2). Teores de umidade inferiores a 40% devem ser evitados, pois podem fazer com que a atividade biológica seja reduzida, retardando o desenvolvimento do processo (18). Assim, se umidade estiver ficando baixa, é necessário que faça irrigação do sistema, de preferência no período do revolvimento para que a água seja distribuída por igual (19). Por outra via, quando o teor de umidade dos resíduos da compostagem estiver muito alto irá dificultar a realização da compostagem, pois o excesso de umidade faz com que os poros sejam preenchidos com água e (18; 20).

### **Aeração**

A aeração de um sistema de compostagem é responsável por aumentar a porosidade do meio, que sofre compactação natural devido ao próprio peso; diminuir o teor de umidade dos resíduos; expor as camadas externas às temperaturas mais elevadas e também eliminar o calor excessivo, controlando a temperatura do processo. Sendo que na presença de oxigênio há ausência de maus odores e o tempo de degradação é menor (2; 21)

Os revolvimentos precisam ser feitos obrigatoriamente quando a temperatura estiver muito elevada (acima do 70°C), quando a umidade estiver acima de 55-60% ou quando há presença de moscas e maus odores (2; 20; 19). Em condições de aparente normalidade (de temperatura e umidade) é recomendado fazer o revolvimento para que se introduza ar rico em oxigênio e se libere o ar saturado de gás carbônico. Ainda, deve-se ressaltar que as partes da composteira que devem merecer maior atenção durante o revolvimento são as mais externas, que são expostas ao sol e ao vento, e ficam mais frias e mais ressecadas (2).

### **Relação C/N**

A relação entre carbono e nitrogênio é usada para avaliar os níveis de maturação de materiais orgânicos (18). Para o processo da compostagem, alguns autores sugerem que no início do processo a relação C/N esteja no entorno de 30/1, ou seja, trinta partes de carbono para uma de nitrogênio. Os valores entre 26/1 e 35/1 são considerados como favoráveis (2).

Nas etapas da compostagem, o carbono é fonte de energia para os microrganismos heterotróficos que degradam o composto, já o nitrogênio é um elemento importante para a síntese de proteínas e crescimento das colônias (22).

Durante o processo de compostagem é notada a redução da relação C/N por meio da oxidação da matéria orgânica pelos microrganismos (23). O tempo necessário para estabilização ou a maturação dos resíduos orgânicos está relacionado com C/N inicial dos materiais usados como substratos. O produto final da compostagem necessita ser analisado para efeito de qualidade do composto (24). No final do processo a relação C/N deve decair chegando próxima a 10/1, indicando, assim, que o material foi compostado (20).

### **Granulometria**

O tamanho das partículas dos resíduos é de grande importância no processo para reger o movimento de gases e líquidos (2). A granulometria ideal para a montagem da compostagem deve ser entre 1 e 5 cm (25). Porém, (18) afirmam que misturar diversos tipos de resíduos orgânicos é a melhor maneira para tentar corrigir o tamanho das partículas, beneficiando a homogeneização da massa em compostagem e obtendo uma melhor porosidade.

### **Microrganismos**

Material orgânico é o habitat de vários microrganismos, sendo que eles utilizam minerais, compostos orgânicos, água e oxigênio para crescimento e atividades metabólicas (26). Os fundamentais organismos presentes na compostagem são bactérias e fungos, no entanto, podem aparecer outros organismos como algas, protozoários, nematóides, vermes, insetos e larvas, mas isto depende especialmente das características do material a ser usado. Os microrganismos geralmente já são encontrados nos resíduos utilizados, dessa forma, o processo de compostagem precisa de um ambiente com condições favoráveis de umidade, nutrientes e oxigênio, degradação e estabilização da matéria orgânica (2).

No processo da compostagem existe uma série de predominância de microrganismos variando conforme as características do composto, como o teor de umidade, a disponibilidade de oxigênio, a temperatura relação C/N e pH (3).

### **Resíduos orgânicos**

A composição do material usado na mistura da compostagem é muito importante. Material que possui hidratos de carbono, lipídios e proteínas são fontes ideais de carbono e de energia para os microrganismos. Por outro lado, material que têm em

grande parte da composição a celulose e a lignina e possui pouco nitrogênio são degradados muito lentamente (27).

Dentre o material rico em carbono pode-se destacar o material lenhosos, como a casca de árvores, as aparas de madeira, a serragem, as podas dos jardins, folhas das árvores, palhas e fenos, e papel. Entre os compostos nitrogenados podem-se ser citadas as folhas verdes, estrumes de animais, urinas, solo, restos de vegetais hortícolas, erva, entre outros (28).

### **Amido e enzimas amilolíticas**

#### **Amido**

O amido é o maior polissacarídeo de reserva das plantas e o segundo mais abundante depois da celulose (29). Esse polímero é aplicado em vários processos industriais, incluindo a produção de material biológico para alimentos, emulsão estabilizante e agente substituto de óleo (30). Os derivados do amido também podem ser aplicados em diversos setores tais como fluídos de perfuração de petróleo, adesivos, papel e revestimentos de algodão, ou gelificantes, emulsionantes e agentes de aumento de viscosidade em produtos alimentares. Alguns produtos são gerados por meio de hidrólise, como maltodextrinas, xaropes de frutose elevada, tais como xarope de milho em escala industrial. Sendo que para a aplicação do amido em produtos alimentícios, este é especialmente processado por aquecimento da mistura ou homogeneização de amilose e amilopectina (31). Os xaropes de glicose, que são derivados de milho ou amido de trigo, viraram a matéria-prima básica para a indústria de bioetanol (32 e 33).

A amilose é constituída por cadeias lineares helicoidais compostas de glicose unidas por ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4. Já a amilopectina é constituída por uma estrutura ramificada, com cadeias de resíduos de glicose em ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4, das quais partem ramificações com ligações  $\alpha$ -1,6 (34).

A hidrólise enzimática do amido é realizada em duas fases: a liquefação e a sacarificação. Na liquefação, os grânulos de amido são dispersos em solução aquosa, aquecidos (gomificação) e hidrolisados parcial e irreversivelmente, com a ajuda da  $\alpha$ -amilase. Após o processo de liquefação, a solução de maltodextrina é hidrolisada em glicose por meio de uma enzima desramificante, que pode ser uma endoenzima (isoamilase e pululanase) ou exoenzima ( $\beta$ -amilase e glicoamilase). Elas atuam sobre as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 da amilopectina. O resultado dessa etapa é a sacarificação (35).

A atividade e a estabilidade na maioria das amilases usadas nas indústrias atualmente estão em declínio, pelo fato que as enzimas precisam suportar um pH baixo no processamento do amido, no entanto o processo de liquefação de amido funciona a um pH restrito de cerca de 6,5. Assim, a identificação e exploração microbiana de amilases termoestáveis e acidófilas são de grande demanda (36).

Entretanto, a maneira convencional de processamento de amido necessita de um elevado fornecimento de energia, aumentando o preço dos produtos à base dessa molécula. Sendo assim, estão sendo feitos esforços para a produção de enzimas amilolíticas capazes de atuar em materiais com pH ácido, e a temperatura moderada muito abaixo da temperatura de gelatinização, tornando o processamento do amido mais econômico para as indústrias (37 e 33).

### **Enzimas Amilolíticas**

As amilases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 da molécula de amido. Essas enzimas são usadas pelas plantas para degradar o amido de algumas raízes; Os animais usam as amilases para a digestão do amido e os microrganismos utilizam-nas para converter o amido em fonte de carbono (38). Sendo que essas enzimas atuam como endoenzima ou exoenzima específicas para a quebra do amido em compostos relacionados por meio da hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4) e/ou  $\alpha$ -(1,6) (39).

De acordo com o tipo de hidrólise, as amilases podem ser classificadas como  $\alpha$ -amilases e  $\beta$ -amilases dependendo das ligações em que atuam nos substratos (Figura 3). Elas hidrolisam os polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de *D*-glicose, ou seja, causam a quebra do amido a açúcares redutores. Como visto na literatura a glicoamilase e a  $\alpha$ -amilase são as enzimas mais importantes empregadas no processamento de amido (40;41; 42; 43; 44; 45; 46; 47).

Anteriormente, hidrólise do amido era feita por meio da via química com alta temperatura. Essa técnica está sendo substituída pela hidrólise enzimática em mais de 75% dos processos (48; 49), pois esse método é um dos mais simples para produção de carboidratos com propriedades funcionais especiais (50).

### **Aplicações biotecnológicas das amilases**

As amilases podem ser aplicadas em vários processos biotecnológicos e industriais, que constituem importante complexo enzimático, totalizando de 25 a 33% da

produção mundial de enzimas. Dessa forma, as amilases ocupam o segundo lugar logo após as proteases (51; 52; 53; 46; 54; 55; 56).

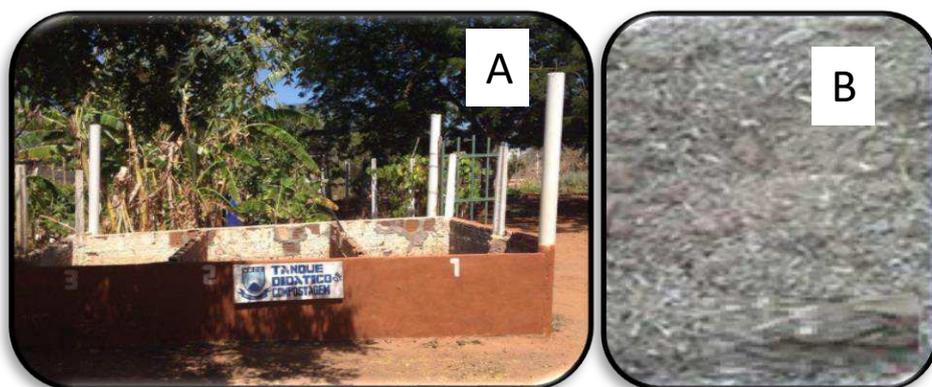
A produção de hidrolisados de amido obtendo-se glicose e frutose é um mercado com ótimo retorno para aplicação dessas enzimas. O amido é convertido em xaropes de milho com alto teor de frutose e, devido a alta capacidade adoçante, é bastante usado como adoçante na indústria de refrigerantes (52).

Esses dados justificam a importância da prospecção de microrganismos capazes de produzir enzimas amilolíticas. Nesse contexto, esse trabalho teve objetivo de usar a compostagem como fonte de microrganismos com potencial para a produção de enzimas com capacidade de degradação do amido visando futuras aplicações industriais.

## 2. Metodologia

As coletas foram realizadas a partir do 10º dia após a montagem da composteira e foram repetidas a cada 15 dias, durante todo o processo de compostagem. No momento da coleta foi feita a aferição da temperatura em seis pontos do tanque de compostagem. As amostras foram retiradas de cinco pontos do tanque de compostagem. As amostras foram misturadas e utilizadas para plaqueamento e isolamento de fungos, bem como para a determinação da umidade da composteira. Na figura 1 são apresentadas as imagens do local de coleta.

O material coletado foi colocado em sacolas plásticas e conduzido até o Laboratório de Microbiologia na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), no campus Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA), na cidade de Sumé, onde todos os experimentos foram realizados.



**Figura 1.** Tanque de compostagem em que foram coletadas as amostras (A) e aspecto do composto (B). Fonte: Dados da pesquisa

## **Plaqueamento**

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

## **Isolamento**

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

Verificação da produção de amilases e determinação do índice enzimático (IE)

A produção de enzimas amilolíticas foi verificada por meio do método de difusão em gel de ágar, em placas de Petri, tendo o amido a 1% como substrato. Após 72 h de incubação a 30°C as placas foram reveladas com adição de 2 mL de solução de iodo. A atividade amilolítica foi caracterizada por meio da formação de halos de degradação do substrato (fonte de carbono). Os ensaios foram realizados em triplicata. O halo de degradação do substrato, bem como o halo de crescimento fúngico, foram medidos com auxílio de régua milimetrada.

Os isolados fúngicos que apresentaram halo de degradação em torno da colônia tiveram a produção da atividade fúngica avaliada pelo cálculo do índice enzimático (IE), dado pela relação do diâmetro médio do halo de degradação do substrato pelo diâmetro médio da colônia (57).

## **3. Resultados e discurso**

### **Coletas, plaqueamento e isolamento**

O processo de compostagem durou cerca de noventa e três dias. Ao final das sete coletas foram obtidos 36 isolados fúngicos. A tabela 1 apresenta o número de isolados obtidos em cada coleta.

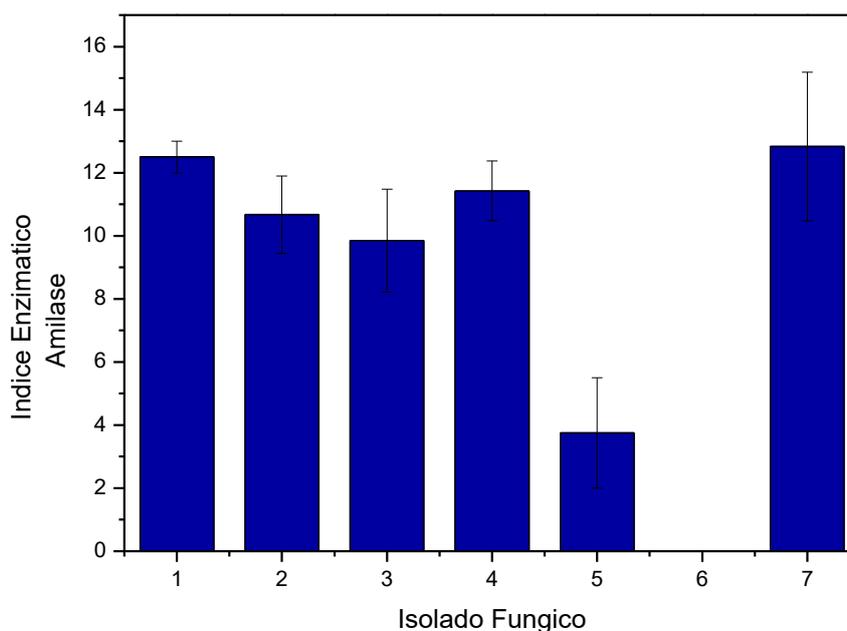
**Tabela 1** - Números de isolados fúngicos obtidos em cada coleta.

COLETAS	ISOLADOS OBTIDOS
01	04
02	05
03	07
04	06
05	04
06	05
07	05
Total	36

Fonte: Dados da pesquisa.

### Detecção da atividade enzimática da amilase

Com exceção do isolado fúngico nº 6, todos os demais isolados fúngicos avaliados apresentaram atividade amilolítica nas condições avaliadas. Sendo que os maiores valores de IE foram verificados para os isolados fúngicos nº1, 4 e 7 com valores de 12,5; 11,42 e 12,83, respectivamente.



**Figura 2** - Índices enzimáticos (IE) para a atividade amilolítica obtida para os fungos isolados durante a fase hemofílica da compostagem, com temperatura média de 44 °C ± 2. Fonte: Dados da pesquisa.

Os altos valores de desvio padrão verificados na Figura 2 devem - se a dificuldade da enzima em se difundir no gel de ágar, o que pode ser afetado pela temperatura de incubação, uma vez que esta pode deixar o meio mais ou menos fluido, facilitando ou dificultando difusão da enzima pelo meio (58).

#### **4. Conclusões**

A compostagem de resíduos lignocelulósicos, além de representar uma forma sustentável de gerenciamento de resíduos sólidos orgânicos, é também uma fonte de microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial como é o caso das amilases.

Os isolados fúngicos obtidos nessa pesquisa apresentam potencial de aplicação em processos biotecnológicos.

#### **REFERÊNCIAS**

- (1) DIAS, DIVANITA CÂNDIDA DA SILVA. Estratégias para gerenciamento de resíduos sólidos urbanos no município de Piracanjuba-Go. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Goiás - Goiânia – GO, 2009.
- (2) KIEHL, Edmar José. Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto. 4.ed. Piracicaba: E. J. Kiehl, 2004, 173p.
- (3) KIEHL, Edmar José. Fertilizantes Orgânicos. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1985, 492p
- (4) KUBITZA, F.; CAMPOS, J. L. O aproveitamento dos subprodutos do processamento de pescado. Panorama da Aquicultura, Rio de Janeiro, v. 16, n. 94, p. 23-29, 2006
- (5) INÁCIO, C. T.; MILLER, P. R. M. Compostagem: ciência e prática para a gestão de resíduos orgânicos. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009.
- (6) HAY, J. C. Pathogen destruction and biosolids composting. Biocycle, Emmaus, v. 37, n. 6, p. 67-76, 1996
- (7) BERNAL, M. P.; ALBURQUERQUE, J. A.; MORAL, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. Bioresource Technology, v.100, p.5444-5453, 2009.
- (8) TRAUTMANN, N.; OLYNCIW, E. Compost Microorganisms. In: CORNELL Composting, Science & Engineering, 2005.
- (9) LI, X.; ZHANG, R.; PANG, Y. Characteristics of dairy manure composting with rice straw. Bioresource Technology, v.99, p.359-367, 2008.

- (10) PETRIC, I.; SESTAN, A.; SESTAN, I. Influence of initial moisture content on the composting of poultry manure with wheat straw. *Biosystems Engineering*, v.104, p.125-134, 2009.
- (11) KUMAR, M.; OU, Y-L.; LIN, J-G. Co-composting of green waste and food waste at low C/N ratio. *Waste Management*, v.30, n.4, p.602-609, 2010
- (12) KARADAG, D.; ÖZKAYA, B.; ÖLMEZ, E.; NISSILA, M. E.; ÇAKMAKÇI, M.; YILDIZ, S.; PUHAKKA, J. A. Profiling of bacterial community in a full-scale aerobic composting plant. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.77, p.85-90, 2013.
- (13) BERNAL, M. P.; ALBURQUERQUE, J. A.; MORAL, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology*, v.100, p.5444-5453, 2009.
- (14) BERNHART, M.; FASINA, O. O. Moisture effect on the storage, handling and flow properties of poultry litter. *Waste Management*, v.29, p.1392-1398, 2009.
- (15) RUGGIERI, L.; GEA, T.; ARTOLA, A.; SANCHEZ, A. A study on air filled porosity evolution in sludge composting. *International Journal of Environment and Waste Management*, v.9, n.1, p.56-58, 2012.
- (16) PIOTROWSKA-CYPLIK, A.; CHZANOWSKI, L.; CYPLIK, P.; DACH, J.; OLEJNIK, A.; STANINSKA, J.; CZARNY, J.; LEWICKI, A.; MARECIK, R.; POWIERSKA-CZARNY, J. Composting of oiled bleaching earth: Fatty acids degradation, phytotoxicity and mutagenicity changes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.78, p.49-57, 2013.
- (17) VALENTE, B. S.. Tecnologias aeróbias no tratamento de resíduos da produção animal: compostagem e vermicompostagem. 2013. 102f. Tese de Doutorado em Ciências (Produção Animal) - Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- (18) VALENTE, B. S.; XAVIER, E.G.; MORSELLI, T. B. G. A.; JAHNKE, D. S.; BRUM, B. de S. Jr.; CABRERA, B. R.; MORAES, P de O. e LOPES, D. C. N. Fatores que afetam o desenvolvimento da compostagem de resíduos orgânicos. *Archivos de Zootecnia*. v.58. p.60-76, 2009.
- (19) MASSUKADO, L.M. Desenvolvimento do processo de compostagem em unidade descentralizada e proposta de software livre para o gerenciamento municipal dos resíduos sólidos domiciliares. 2008. 204 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- (20) BARREIRA, L. P. Avaliação das usinas de compostagem do estado de São Paulo em função da qualidade dos compostos e processos de produção. 2005. 204f. Tese (Doutorado em Saúde Ambiental) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- (21) FERNANDES, F.; SILVA, S. M. C. P. Manual prático para compostagem de biossólidos. Rio de Janeiro: ABES, 79p. 1999.
- (22) SHARMA, V. K.; CANDITELLI, M.; FORTUNA, F.; CORNACCHIA, C. Processing of urban and agroindustrial residues by anaerobic composting: review. *Energy Conversion and Management*. v.38, p.453-478, 1997.

- (23) ZHANG, Y.; HE, Y. Co-compostig solid swine manure with pine sawdust as organic substrate. *Bioresource Technology.*, v.97, p.2024-2031, 2006.
- (24) MOREL, J.L.; COLIN, F.; GERMON, J.C.; GODIN, P.; JUSTE, C. Methods for evaluation of the maturity of municipal refuse compost. In: Gasser, J.K. *Composting of agricultural and other wastes*. Elsevier: Londres, p.56-72, 1985
- (25) BIDONE, F.R.A.; POVINELLI, J. *Conceitos básicos de resíduos sólidos*. São Carlos: EDUSP, 109p. 1999.
- (26) FIALHO, L.L. *Caracterização da matéria orgânica em processo de compostagem por métodos convencionais e espectroscópicos*. 2007. 170f. Tese (Doutorado em Ciências – Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Carlos. 2007.
- (27) BATISTA, J.G.F., BATISTA, E.R.B. *Compostagem: Utilização em horticultura*. Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, Açores, 2007, 252 p.
- (28) BRITO, L.M.C.M. (2005) *Manual de Compostagem*. Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, Instituto Superior de Viana do Castelo. Disponível em <<http://www.ci.esapl.pt/mbrito/compostagem>>. Acesso em 13 de Abr de 2017.
- (29) VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hiperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 65, p.1-43, 2001.
- (30) SYNOWWIECKI, J. *Industrial Enzymes: The use os starch processing enzymes in the food industry*. Gdansk: Springer. p. 19-33, 2007.
- (31) VAN DER MAAREL, M.J.E.C., LEEMHUIS, H. Starch modification with microbial alpha-glucanotransferase enzymes. *Veendam: Carbohydrate Polymers.* v. 93, p. 116–121, 2013.
- (32) BAI, Y.; WANG, J.; ZHANG, Z.; SHI, P.; LUO, H.; HUANG, H.; LUO, C.; YAO, B. A novel family 9  $\beta$ -1,3(4)-glucanase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 with potential applications in the brewing industry. *Verlag: Applied Microbiology Biotechnology*, v.87, p.251-259, 2010.
- (33) ROY, J.K.; BORAH, A.; MAHANTA, C.L.; MUKHERJEE, A.K. Cloning and overexpression of raw starch digesting  $\alpha$ -amylase gene from *Bacillus subtilis* strain AS01a in *Escherichia coli* and application of the purified recombinant  $\alpha$ -amylase (AmyBS-I) in raw starch digestion and baking industry. *Assam: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.97, p.118–129, 2013.
- (34) LASZLO, H.; BASSO, L. M.; COELHO, C. M. L. *Química de Alimentos*, Nobel, São Paulo, p.98, 1986.
- (35) VAN DER MAAREL, M.J.E.C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J.C.M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, I. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*, v.94, p. 137-155, 2002.
- (36) EMTENANI, S.; ASODEHA, A.; EMTENANI, S. Gene cloning and characterization of a thermostable organic-tolerant  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *Mashhad: International Journal of Biological Macromolecules.* v.72, p.290–298, 2015.

- (37) ASOODEH, A.; CHAMANI, J.; LAGZIAN, M. A novel thermostable, acidophilic  $\alpha$ -amylase from a new thermophilic *Bacillus* sp. Ferdowsicous isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. Mashhad: International Journal of Biological Macromolecules, v.46, p. 289-297, 2010.
- (38) PEIXOTO S.C., JORGE J.A., TEREZI H.F., POLIZELI M.L.T.M., Rhizopusmicrosporus var. rhizopodiformis: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases, International Microbiology, 2003, 6,269-273.
- (39) BRENDA Database: The Comprehensive Enzyme Information System. Disponível em: < . <http://www.brenda-enzymes.org/>>. Acesso em: 05 abr. 2017.
- (40) PANDEY, A; WEBB, C; SOCCOL, C.R; LARROCHE, C. Enzyme technology. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005. p.760.
- (41) TANGPHATSORNRUANG, S.; NACONSIE, M.; THAMMARONGTHAM, C.; NARANGAJAVANA, J. Isolation and characterization of an alpha-amylase gene in cassava (*Manihot esculenta*). Plant Physiology Biochemistry, v 43, n. 9, p. 821-827, 2005.
- (42) CARVALHO, R.V. et al. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 28(2): 380-386, abr.-jun. 2008.
- (43) FERREIRA-NOZAWA, M.S.; REZENDE, J.L.; GUIMARÃES, L.H.S.; TEREZI, H.F.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Mycelial glucoamylases produced by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* strains 15.1 and 15.8: purification and biochemical characterization. Brazilian Journal of Microbiology, v.39, p. 344-352, 2008.
- (44) PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; SANDRIM, V.C.; GUIMARÃES, L.H.S.; JORGE, J.A.; TEREZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Evidence of thermostable amyolytic activity from *Rhizopus microsporus* var. rhizopodiformis using wheat bran and corncob as alternative carbon source, Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 31, p. 329-334, 2008.
- (45) RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C. Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. Bioresource Technology, v. 99, n. 8, p. 3044-3050, 2008.
- (46) SOUZA, P.M.; MAGALHÃES, P.O. Application of microbial alfa-amylase in industry – a review. Brazilian Journal of Microbiology, v. 41, n. 1, p. 850-861, 2010.
- (47) HASHEM, M.; DARWISH, S.M.I. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. Biomass & Bioenergy, Saudi Arabia, p. 953-959. 2010.
- (48) KANDRA, L.  $\alpha$ -amylases of medical and industrial importance. Journal of Molecular Structure, v. 666-667, p. 487- 498, 2003.
- (49) WANG, S.; LIANG, Y.; LIANG, T. Purification and characterization of a novel alkali-stable  $\alpha$ - amylase from *Chryseobacterium taeaneense* TKU001, and application in antioxidant and prebiotic. Process Biochemistry, v. 46, p. 745–750, 2011.

- (50) MOORE, G.R.P.; DO CANTO, L.R.; AMANTE, E.R. Cassava and corn starch in maltodextrin production. *Química nova*, v. 28, n.4, p. 596-600, 2005.
- (51) NGUYEN, Q.D.; REZESSY-SZABÓ, J.M.; CLAEYSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, Á. Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enz. Microbial Technol.* v. 31, p. 345-352, 2002.
- (52) GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 11, p. 1599-1616, 2003.
- (53) EIJSINK, V.G.H., VAAJE-KOLSTAD, G., VARUM, K.M., HORN, S.J. Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. *Trends Biotechnol*, 26: 228-235. 2008.
- (54) BORGIO, J.F. Immobilization of microbial (wild and mutant strains) amylase on coconut fiber and alginate matrix for enhanced activity. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 01, n. 03, p. 255-264, 2011.
- (55) MARKET RESEARCH NEWS. In: Report - Global Industrial Enzymes Market: An Analysis. 2011.
- (56) KUMAR, V.; SAHAI, V.; BISARIA, V.S. Production of amylase and chlamydospores by *Piriformospora indica*, a root endophytic fungus. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, p. 124-128, 2012..
- (57) HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. *Mycologia*, 67:597- 607. 1975.
- (58) GIONGO JL. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp*; 2006; 81p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS.