

Artigo Científico

Potencial proteolítico e amilolítico de fungos da fase termofílica de compostagem

Resumo

O tratamento do resíduo do rumem bovino através da compostagem pode proporcionar na fase termofílica a obtenção de enzimas com potencial proteolítico e amilolítico. Diante disso, objetivou-se com este trabalho realizar a triagem de fungos com potencial amilolítico e proteolítico isolados na fase termofílica do processo de compostagem de resíduo ruminal bovino. Para determinação representativa da quantidade e diversidade de microrganismos presentes durante a fase termofílica do processo de compostagem foram coletadas amostras (500 g) de composto em vários pontos das seis leiras de compostagem aos sete dias do início do processo. Após o crescimento, os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo os meios específicos para produção de amilase e protease. Os cultivos foram mantidos por cinco dias à 30 °C. Avaliou-se o diâmetro dos halos de hidrólise e das colônias, e o Índice Enzimático (IE). Os fungos 1T0500, 1T2506 e 1T3502 destacaram-se para a produção de enzima amilase, enquanto para a produção da enzima protease, os fungos que apresentaram alto índice enzimáticos foram 1T1501 (IE= 4,57) e 1T2506 (IE= 3,06). Fungos isolados da fase termofílica do processo de compostagem apresentam-se satisfatórios para produção de enzimas proteolíticas e amilolíticas.

Palavras chave: resíduo ruminal bovino, biomassa microbiana, enzimas hidrolíticas.

Proteolytic and amylolytic potential of fungi from the thermophilic phase of composting

Abstract

Thermophilic microorganisms have proteins that are thermostable and resistant to denaturation and proteolysis. Therefore, the objective of this work was the screening of fungi with amylolytic and proteolytic potential isolated in the thermophilic phase of the composting process of bovine ruminal residue. Samples (500 g) of compost were collected at several points of the six composting strips seven days after the beginning of the process to determine the amount and diversity of microorganisms present during the thermophilic phase of the composting process. After growth, the fungi were inoculated into Petri dishes containing the specific media for amylase and protease production. Cultures were maintained for five days at 30 °C. The diameter of the hydrolysis and colony halos and the Enzyme Index (EI) were evaluated. The fungi 1Q0500, 1Q2506 and 1Q3502 stood out for amylase enzyme production, while for protease enzyme production, the fungi that presented high enzymatic indexes were 1Q1501 (EI = 4.57) and 1Q2506 (EI = 3.06). Fungi isolated from the thermophilic phase of the composting process are satisfactory for proteolytic and amylolytic enzymes production.

Keywords: bovine ruminal residue, microbial biomass, hydrolytic enzymes.

Potencial proteolítico y amilolítico de hongos de la fase termofílica del compostaje

Resumen

El tratamiento de los residuos del rumen bovino mediante compostaje puede proporcionar enzimas con potencial proteolítico y amilolítico en la fase termofílica. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue

1 - Doutor em Produção Vegetal, departamento de Produção Vegetal, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO, Chácara 69-72 - Rua Badejos, Lote 7, s/n - Jardim Cervilha, Gurupi - TO, 77404-970. Email: freitas@uft.edu.br

2 - Professora substituta do curso de Agronomia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO. Email: larissaurzedo@hotmail.com

3 - Professor do curso de Agronomia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO. rrs2002@uft.edu.br

4 - Professora substituta do curso Engenharia Biotecnológica e Bioprocessos, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO. mail: rncrose@hotmail.com

5 - Doutor em Produção Vegetal, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO. Email: antoniocarlos.uft@hotmail.com

llevar a cabo el cribado de hongos con potencial amilolítico y proteolítico aislado en la fase termofílica del proceso de compostaje de los residuos ruminales bovinos. Para la determinación representativa de la cantidad y diversidad de microorganismos presentes durante la fase termofílica del proceso de compostaje, se recolectaron muestras (500 g) de compost en varios puntos en las seis filas de compost siete días después del inicio del proceso. Después del crecimiento, los hongos se inocularon en placas de Petri que contenían los medios específicos para la producción de amilasa y proteasa. Los cultivos se mantuvieron durante cinco días a 30 °C. Se evaluaron el diámetro de los halos y colonias de hidrólisis y el índice de enzimas (EI). Los hongos 1T0500, 1T2506 y 1T3502 se destacaron por la producción de la enzima amilasa, mientras que por la producción de la enzima proteasa, los hongos que presentaron un alto índice enzimático fueron 1T1501 (IE = 4.57) y 1T2506 (IE = 3.06). Los hongos aislados de la fase termofílica del proceso de compostaje son satisfactorios para la producción de enzimas proteolíticas y amilolíticas.

Palabras clave: residuo ruminal bovino, biomasa microbiana, enzimas hidrolíticas.

Introdução

O interesse na utilização adequada e eficiente dos resíduos agroindustriais tem sido crescente, justificado pelo potencial contaminante dessas matérias-primas quando mal gerenciadas. Dentre algumas dessas fontes, o resíduo ruminal bovino destaca-se pela ampla disponibilidade em regiões onde a bovinocultura é consolidada, como no estado do Tocantins, que abateu 1.017.264 cabeças em 2018 (MAPA, 2018).

Por ser fonte de matéria orgânica, esses resíduos são passíveis de aproveitamento para uso na agricultura, o que os torna uma opção sustentável, pela adequação sanitária e ambiental, além da viabilidade econômica, desde que o resíduo atenda padrões mínimos de qualidade (PIERRE e ARAUJO, 2017). Dessa forma, a transformação do resíduo ocorre na sua maioria por processo de compostagem, que é controlado por fatores abióticos e bióticos.

Durante a decomposição desses materiais, a matéria orgânica passa pelas fases mesofílica, termofílica e de maturação do composto, realizadas principalmente pela ação de bactérias e fungos, sendo os microrganismos do reino Fungi os mais importantes durante a fase termofílica da compostagem aeróbica (BIALOBRZEWSKI et al., 2015), pois são responsáveis pela degradação de resíduos mais complexos, assim como pela eliminação de organismos patogênicos não esporulados (SILVA et al., 2009).

De acordo Kelly et al. (1994) e Holst et al. (1997), esses microrganismos termofílicos apresentam mecanismos muito especializados de adaptação e proliferação sob altas temperaturas, diferentemente de organismos que crescem em ambientes temperados, aeróbicos ou não, onde a taxa metabólica é amplamente limitada pela temperatura.

Estudos sobre esses agentes biológicos demonstraram que resíduos de bovinos possuem proteínas que são termoestáveis e resistentes à desnaturação e proteólise (KUMAR e NUSSINOV, 2001). As amilases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais com aplicações em diferentes indústrias, responsáveis por 25 a 33% da produção mundial de enzimas, ocupando segundo lugar logo após as proteases (BERNARDES et al., 2014; CARVALHO et al., 2008; NGUYEN et al., 2002).

As amilases termoestáveis são produzidas por pequeno número de organismos mesofílicos são termorresistentes e possuem características importantes como estabilidade à temperatura e ao pH (CARVALHO et al., 2008); enquanto as proteases apresentam grande variedade em contraste com elevada especificidade de ação tem atraído atenção mundial devido à possibilidade de sua exploração para aplicações fisiológicas e biotecnológicas (DELATORRE et al., 2010).

Diante disso, objetivou-se com presente trabalho realizar a triagem de fungos com potencial amilolítico e proteolítico isolados na fase termofílica do processo de compostagem de resíduo ruminal bovino.

Materiais e métodos

O trabalho foi realizado na Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus de Gurupi (11°44'44,16" S e 49°03'04,17" W, 278 m de altitude), sendo executado em duas fases:

Fase 1 - Pilhas de compostagem produzidas a partir de resíduo ruminal bovino (RRB) enriquecido com farinha de carne e osso (FCO) foram distribuídas em galpão com cobertura de aço zincado com dimensões de 7,0 x 20,0 m (L x C). A composição desses resíduos está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição do resíduo ruminal bovino e da farinha de carne e osso.

RRB	Unidade	Valor
Matéria seca		883,8
Matéria orgânica		816,6
Cinzas		183,4
Proteína bruta	g kg ⁻¹	138,6
Extrato estéril		270,0
Fibra em DN*		783,6
Fibra em DA*		418,6
Hemicelulose		365,0
FCO	Unidade	Valor
N		70,0
P		140,0
K		6,90
Na		49,10
Mg	g kg ⁻¹	2,90
Ca		128,40
Zn		0,80
Cu		0,0
Fe		3,20
Al		1,50

*DN: detergente neutro, DA: detergente ácido.

O tamanho inicial das pilhas foi respectivamente 242 x 125 x 72 cm (C x L x A). Durante o período de compostagem foram realizadas leituras diárias das temperaturas e semanalmente realizados revolvimentos

e umedecimento das pilhas (Figura 1a). Imediatamente, antes dos revolvimentos foram realizadas as amostragens para determinação da umidade (Figura 1b).

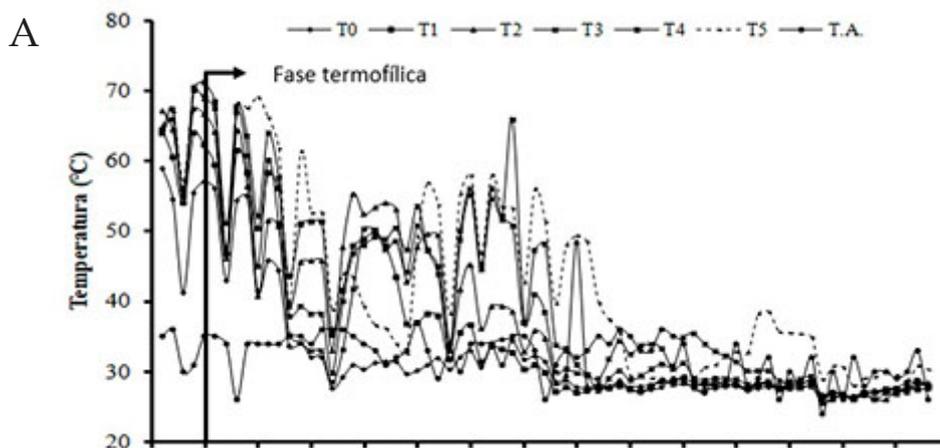


Figura 1A. Dinâmica da temperatura durante o período de compostagem

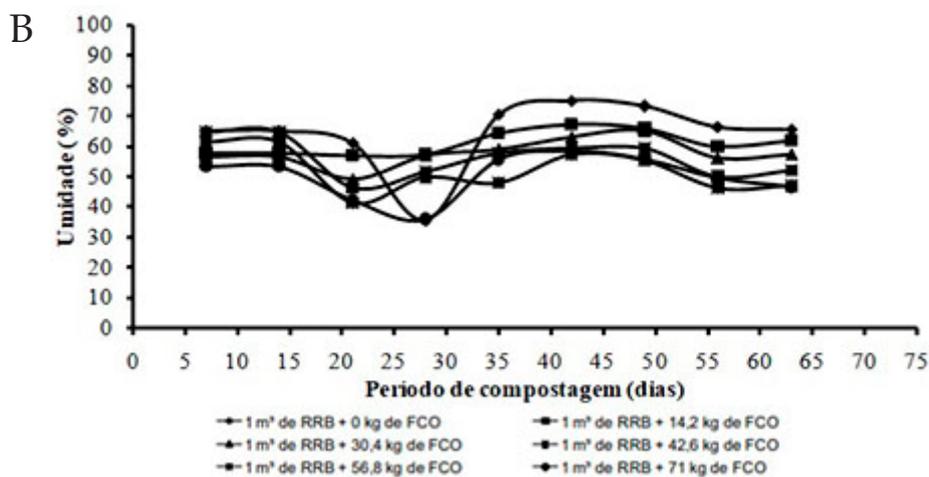


Figura 1B. umidade durante o período de compostagem

O experimento foi em delineamento de blocos casualizados com os tratamentos resultantes da mistura de $1,0 \text{ m}^3$ de RRB com seis doses de FCO (0; 14,2; 30,4; 42,6; 56,8 e 71 kg), identificados como: T1- RRB + 0 kg de FCO (testemunha); T2- RRB + 14,2 kg de FCO; T3- RRB + 30,4 kg de FCO; T4- RRB + 42,6 kg de FCO; T5- RRB + 56,8 kg de FCO; T6- RRB + 71 kg de FCO.

Fase 2 - O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia/Análise de Alimentos e Purificação dos Bioprodutos (LABAP), nas dependências da Incubadora de Empresas de Base Biotecnológica da UFT.

Coleta das amostras

Para determinação representativa da quantidade e diversidade de microrganismos presentes durante a fase termofílica do processo de compostagem, foram coletadas amostras contendo 500 g de composto em vários pontos das leiras de compostagem aos sete do início do processo. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia (MICRO BIO) e LABAP, ambos nas dependências da UFT/ Gurupi, para procedimento do isolamento ou dependendo das condições, armazenadas a 4°C .

Isolamento e preservação dos microrganismos

A metodologia de isolamento seguiu o proposto por Clark (1965) com poucas modificações. Consistiu em adicionar 10 g do composto orgânico em 90 mL de solução salina peptonada estéril [0,85% (p/v) de cloreto de sódio e 0,1% (p/v) de peptona

bacteriológica] (SILVA e JUNQUEIRA, 2001). Essa primeira diluição foi agitada em “shaker”, durante 15 minutos a 127 rpm. Posteriormente, sucessivas diluições seriadas foram realizadas e 100 μL de amostra foi espalhada na superfície de placas de Petri com meio de cultura. O meio utilizado para o crescimento dos fungos foi: Ágar batata dextrose (BDA) [(em g L^{-1}) 42 g] acrescido de antibiótico cloranfenicol 0,1%.

As placas inoculadas foram incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ em estufa por até cinco dias. Após o período de incubação, as colônias crescidas nas placas, foram caracterizadas de acordo com sua morfologia. A purificação dos fungos, após surgirem as colônias, as mesmas foram separadas com base no aspecto do micélio, cor dos esporos e em outras características do anverso e reverso das colônias. Estas colônias foram novamente inoculadas, através de estrias, em meio de seleção até a obtenção de culturas puras. Foi realizada a contagem total dos morfotipos encontrados, identificando de acordo com o tipo de diluição (YARROW, 1998). Após a obtenção de colônias puras, os fungos foram preservados seguindo o método de CASTELLANI (1967). Todas as placas foram guardadas em geladeira, a temperatura de aproximadamente 4°C .

Reativação dos isolados

Os isolados de fungos, foram reativados em meio Agar dextrose batata, e incubados à 30°C , por 5 dias. Os fungos foram inoculados diretamente no centro da superfície da placa de Petri com auxílio de palitos de madeira estéreis. Após o crescimento os

fungos foram inoculados em placas de Petri contendo os meios específicos para produção amilase e protease. Os cultivos foram mantidos por 5 dias à 30 °C.

A atividade amilolítica foi avaliada em meio de Vogel modificado (VOGEL, 1956). Foi preparada uma solução de elementos traços (Solução A) contendo (g/L): C₆H₈O₇·H₂O, 50; ZnSO₄·7H₂O, 50; Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O, 10; CuSO₄·5H₂O, 2,5; MnSO₄·H₂O, 0,05; H₃BO₃, 0,05; Na₂MoO₄·2H₂O, 0,05. Foi preparada uma solução salina (solução B) contendo (g/L): Na₃C₆H₅O₇·5H₂O, 150; KH₂PO₄, 250; NH₄NO₃, 100; MgSO₄·7H₂O, 10; CaCl₂·2H₂O, 5, solução de biotina (0,1 mg/mL), solução A, 5 mL, clorofórmio 0,2 mL. As soluções foram mantidas à 4 °C até sua utilização. O meio utilizado consistia em uma diluição de 50 vezes da solução B, adicionado de 0,2% de extrato de levedura, 1% da respectiva fonte de carbono (amido), 1,5% de ágar, o pH final foi ajustado para 6,0.

A atividade proteolítica foi avaliada em meio Agar nutriente ajustado a pH 6,0. Separadamente foi preparado solução de gelatina 8% em água destilada, na qual, foi esterilizada separadamente e adicionada

ao Agar nutriente na hora de verter (5 ml para cada 100 ml de Agar nutriente).

A produção das enzimas foi evidenciada através da observação de halos de hidrólise, após tratamentos específicos para cada substrato. Para amilase, utilizou-se solução de iodo 0,1% (GONZÁLEZ et al., 2004). Para protease, foi utilizada solução saturada de sulfato de amônio 76% (YARROW, 1998).

O diâmetro dos halos de hidrólise e das colônias foi aferido com auxílio de paquímetro digital. Foi avaliado o Índice Enzimático (IE), representado pela relação entre a média de diâmetro dos halos de degradação pela média de diâmetro da colônia, segundo HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1977).

Resultados e discussão

Para os fungos avaliados na produção de enzima amilase, constatou-se que 88% destes obtiveram resultados positivos para a produção de halo, sendo que do total avaliado, 48% apresentaram apenas presença do halo e 12% não produziram halo constatando que não houve produção de enzima para estes (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade amilolítica de fungos filamentosos isolados da compostagem de resíduos ruminal bovino, cultivados em meios sintéticos por cinco dias a 30 °C.

Identificação*	Amilase		
	Øc	Øh	I.E.
1 TO 500	2,7	7,1	2,63
1 TO 501	2,7	2,9	1,07
1 TO 502	Presença	Presença	Presença
1 TO 503	2,3	2,7	1,170,8
1 TO 505	Presença	Presença	Presença
1 TO 500.1	Presença	Presença	Presença
1 T1 501	0,8	1,0	1,25
1 T1 500.1	Presença	Presença	Presença
1 T2 500	1,7	2,6	1,53
1 T2 501	1,3	2,5	1,92
1 T2 503	Presença	Presença	Presença
1 T2 504	Presença	Presença	Presença
1 T2 505	Presença	Presença	Presença
1 T2 506	1,7	3,6	2,12
1 T2 507	Presença	Presença	Presença
1 T3 500	1,4	2,2	1,57
1 T3 501	2,7	2,7	1,0
1 T3 502	0,8	1,9	2,38

Continua...

Continua...

Identificação*	Øc	Øh	I.E.
1 T3 503	Presença	Presença	Presença
1 T3 504	Presença	Presença	Presença
1 T3 506	Ausência	Ausência	Ausência
1 T4 500	Presença	Presença	Presença
1 T4 501	Ausência	Ausência	Ausência
1 T4 500.1	Presença	Presença	Presença
1 T5 501	Ausência	Ausência	Presença

*representa a coleta, T0 a T5 os tratamentos e, a partir de 500 a numeração (identificação) do fungo. Øc = diâmetro da colônia (mm); Øh = diâmetro do halo (mm); Ie = índice enzimático; (-) = não produziu halo.

Entre os fungos avaliados para a produção de enzima amilase, foi calculado o IE de 40% desses isolados, destacando-se os fungos 1T0500 (IE= 2,63), 1T2506 (IE=2,12) e 1T3502 (IE= 2,38) por seus valores potenciais de índice enzimático. Verificou-se ainda o fungo 1T2501 (IE=1,92), apresentou um potencial intermediário para produção de enzima amilolítica. Alguns autores (LEALEM e GASHE, 1994; STAMFORD et al., 1998), recomendam para avaliação do potencial enzimático dos fungos, o índice enzimático ≥ 2 . Assim os isolados que exibiram os maiores valores de IE nos meios de crescimento, são os que possuem maior atividade enzimática extracelular.

Avaliando 40 isolados fúngicos quanto a produção de enzimas microbianas (Xilanase, glicose-oxidase, fosfatase alcalina, fitase, pectinase

e amilase), GUIMARÃES et al. (2006) constataram que 57,5% desses fungos apresentaram potencial enzimático, ressaltando níveis significativos de amilases produzidas. Já SENA et al. (2006), avaliando fungos secretores de hidrolases em diferentes enzimas (amilase, protease, celulasas e pectina) no semi-árido baiano, não encontraram produção de amilase para nenhum dos isolados testados.

Para a produção da enzima protease, dos 25 isolados avaliados, 64% apresentaram degradação do meio e posterior produção de halo, já 36% dos isolados avaliados não apresentaram atividade enzimática em protease (Tabela 3). Desse modo, destacaram-se os fungos 1T1501 (IE= 4,57) e 1T2506 (IE= 3,06) por apresentarem índice enzimáticos ≥ 2 .

Tabela 3. Atividade proteolítica de fungos filamentosos isolados da compostagem de resíduos ruminal bovino, cultivados em meios sintéticos por cinco dias a 30 °C.

Protease			
Identificação*	Øc	Øh	I.E.
1 TO 500	Presença	Ausência	Ausência
1 TO 501	2,5	3,5	1,4
1 TO 502	3,1	3,6	1,16
1 TO 503	3,3	4,1	1,24
1 TO 505	3,2	4,0	1,25
1 TO 500.1	Presença	Ausência	Ausência
1 T1 501	0,875	4,0	4,57
1 T1 500.1	1,7	3,1	1,82
1 T2 500	2,0	2,5	1,25
1 T2 501	Presença	Ausência	Ausência
1 T2 503	Presença	Ausência	Ausência
1 T2 504	Presença	Ausência	Ausência

Continua...

Continua...

Identificação*	Øc	Øh	I.E.
1 T2 505	4,5	5,1	1,13
1 T2 506	1,5	4,6	3,06
1 T2 507	1,8	2,7	1,5
1 T3 500	1,5	1,9	1,27
1 T3 501	Presença	Ausência	Ausência
1 T3 502	Presença	Ausência	Ausência
1 T3 503	1,2	3,8	1,81
1 T3 504	Presença	Ausência	Ausência
1 T3 506	Presença	Ausência	Ausência
1 T4 500	2,1	3,8	1,81
1 T4 501	0,8	0,9	1,13
1 T4 500.1	2,1	3,8	1,81
1 T5 501	1,1	2,1	1,91

*representa a coleta, T0 a T5 os tratamentos e, a partir de 500 a numeração (identificação) do fungo. Øc = diâmetro da colônia (mm); Øh = diâmetro do halo (mm); Ie = índice enzimático; (-) = não produziu halo.

Já os fungos 1T5501 (IE=1,91) e 1T3503 (IE= 1,83) apresentaram valores intermediários à produção da enzima protease. O isolado 1T2506 obteve dados satisfatórios tanto para amilase (IE= 2,12) quanto para protease (IE= 3,06) caracterizando-se como produtor potencial para as duas enzimas em meio sólido.

Avaliando fungos secretores de hidrolases em diferentes enzimas (amilase, protease, celulasas e pectina) no semiárido baiano, SENA et al. (2006) obtiveram resultados positivos em 60% dos isolados para produção de enzima protease. Por fim, ressaltou-se neste estudo que no teste de produção de protease foram obtidas as

maiores atividades enzimáticas dos fungos testados.

Conclusões

O isolado 1T2506 obteve valores satisfatórios tanto para amilase (IE= 2,12) quanto para protease (IE= 3,06) caracterizando-se como produtor potencial para as duas enzimas.

Fungos isolados da fase termofílica do processo de compostagem do resíduo ruminal bovino, apresentaram dados satisfatórios para produção de enzimas proteolíticas e amilolíticas.

Referências

- BERNARDES, AV; MARTINS, ES; MATA, JF; FERREIRA, OE. Utilização de subprodutos agroindustriais para produção de α -amilase por *Rhizomucor miehei*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n.2, p.1439-1451, 2014. <http://doi.org.10.3895/S1981-36862014000200012>
- BIALOBRZEWSKI, I; MIKŠ-KRAJNIK, M; DACH, J; MARKOWSKI, M; CZEKAŁA, W; GŁUCHOWSKA, K. Model of the sewage sludge-straw composting process integrating different heat generation capacities of mesophilic and thermophilic microorganisms. **Waste Management**, v. 43, n.3, p.72-83, 2015. <https://doi.org.10.1016/j.wasman.2015.05.036>
- CARVALHO, RV; CORRÊA, TLR; SILVA, JCM.; VIANA, AP; MARTINS, MLL. 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**, v.28, n.2, p.380-386, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000200017>

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, p.181-184, 1967.

- CLARK, FE. Agar-plate method for total microbial count. In: BLACK, CA; EVANS, DD; WHITE, JL; ENSMINGER, LE; CLARK, FE; DINAUER, RC; (Eds.). **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties**. (Pp. 1460-1466). New York: Madson, 1965.
- DELATORRE, AB; LADEIRA, SA; ANDRADE, MVV; BARBOSA, JB; MARTINS, MLL. Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis de importância comercial. **Perspectivas On line**, v.4, n.16, p.132-145, 2010 https://www.seer.perspectivasonline.com.br/index.php/revista_antiga/article/view/470/386
- GONZÁLEZ, JÁ; GALLARDO, CS; POMBAR, A; REGO, P; RODRÍGUEZ, LA. Determination of enzymatic activities in ecotypic *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. **Electronic Journal of Environmental Agriculture Food Chemistry**, v.3, n.5, p.743-750, 2004.
- GUIMARÃES, LHS; NOGUEIRA, SCP; MICHELIN, M; RIZZATTI, ACS; SANDRIM, VC; ZANOELO, FF; AQUINO, ACMM; JUNIOR, AB; POLIZELI, MLTM. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.4, p.474-480, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000400014>
- HANKIN, L; ANAGNOSTAKIS, SG. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycology**, v.67, p.597-607, 1975. <http://dx.doi.org/10.2307/3758395>
- HOLST, O; MANELIUS, A; KRAHE, M; MARKI, H; RAVEN, N; SHARP, R. Thermophiles and fermentation technology. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.118, n.3, p.415-422, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(97\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(97)00002-9)
- KELLY, RM; PEEPLES, TL; HALIO, SB; RINKER, KD; DUFFAUD, GD. Extremely thermophilic microorganisms. Metabolic strategies, genetic characteristics and biotechnological potential. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.745, p.409- 425, 1994.
- KUMAR, S; NUSSINOV, R. How do Thermophilic proteins deal with heat. **Celular and molecular life Science**, v.58, n.9, p.1216-1233, 2001. <https://doi.org/10.1007/PL00000935>
- LEALEM, F; GASHE, BA. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, n.3, p.348-352, 1994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb03084.x>
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Quantidade de Abate Estadual por Ano/Espécie - Bovinos, 2018. http://sigsif.agricultura.gov.br/sigsif_cons/lap_abate_estaduais_cons?p_select=SIM&p_ano=2018&p_id_especie=9. Acesso em: 25 de mar 2019.
- NGUYEN, QD; REZESSY-SZABÓ, JM; CLAEYSSENS, M; STALS, I; HOSCHKE, A. Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, n.3, p.345-352, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00128-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00128-X)
- PIERRE, FC; ARAUJO, SMF. Tratamento de resíduos em frigorífico de bovino corte. **Tekhne e Logos**, v.8, n.4, p.81-93, 2017. <http://www.fatecbt.edu.br/seer/index.php/tl/article/view/499>
- SENA, AR; KOBLITZ, MGB; GÓES NETO, A; UETANABARO, APT. Seleção de fungos do semiárido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, n.35, p.91-98, 2006. http://www2.uefs.br/sitientibus/pdf/35/selecao_de_fungos_do_semi-arido_baiano.pdf
- SILVA, CF; AZEVEDO, RS; BRAGA, C; SILVA, R; DIAS, ES; e SCHWAN, RF Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, n.3, p.590-600, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822009000300023>
- SILVA, N; JUNQUEIRA, VCAJ. Métodos de análise microbiológica de alimentos. 2nd. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos. 2001.
- STAMFORD, TLM; ARAÚJO, JM; STAMFORD, NP. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, p.382-385, 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611998000400004>.
- VOGEL, HJA. Convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, n.1, p.42-47, 1956.
- YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, CP; FELL, JW; (Eds) **The yeasts - a taxonomic study** (4th Pp. 77-100), 1998. Elsevier: Science Publisher.