



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



FABIANE CRUZ BEZERRA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMILASE DE UM NOVO ISOLADO DE
Aspergillus sp. EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

CAMPO GRANDE, MS

2022

FABIANE CRUZ BEZERRA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMILASE DE UM NOVO ISOLADO DE
Aspergillus sp. EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Douglas Chodi Masui

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana
Fonseca Zanoelo

CAMPO GRANDE, MS

2022

FOLHA DE APROVAÇÃO

FABIANE CRUZ BEZERRA

Produção e caracterização da amilase de um novo isolado de *Aspergillus* sp. em fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências (INBIO) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Douglas Chodi Masui (Orientador)

Instituto de Biociências - INBIO

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Prof^a. Dr^a. Fabiana Fonseca Zanoelo (Co-Orientadora)

Instituto de Biociências - INBIO

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Prof. Dr. Roberto Ruller

Instituto de Biociências - INBIO

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

M^a. Aline Pereira de Almeida

Instituto de Biociências - INBIO

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Campo Grande, MS

16 de novembro de 2022

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela dedicação, confiança, incentivo, por sempre me apoiarem em minhas decisões e que batalharam muito para que eu pudesse chegar até aqui;

Às minhas irmãs, pelo carinho, incentivo e por sempre me apoiarem em todos os momentos e decisões;

À M^a. Aline Pereira de Almeida e à mestranda Camila Langer Marciano do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PGG-PMBqBM/INBIO/UFMS) pela amizade, dedicação e por toda ajuda teórica e prática dos experimentos realizados;

Ao meu orientador Prof. Dr. Douglas Chodi Masui pela amizade, orientação e ensinamentos;

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Fabiana Fonseca Zanoelo pela amizade, instrução e apoio;

Ao Prof. Dr. Roberto Ruller pela amizade, colaboração e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho;

À técnica Dr^a Clarice Rossato Marchetti da Micoteca/INBIO/UFMS pela identificação do microrganismo e ensinamentos;

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos (LBq-UFMS) pela amizade e ajuda prática no laboratório;

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e a todos seus funcionários, alunos e professores pela estrutura acadêmica e pessoal.

RESUMO

A hidrólise de polissacarídeos amiláceos depende de um grupo de enzimas que pertencem ao complexo amilolítico. O cultivo de fungos filamentosos através de fermentação em estado sólido (FES), principalmente aqueles que utilizam resíduos agroindustriais, possibilita a produção de amilases com potencial de aplicações na indústria. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de amilases pelo fungo *Aspergillus* sp. em FES utilizando diferentes fontes de carbono, incluindo resíduos agroindustriais, bem como realizar a caracterização bioquímica da enzima bruta. Foram testados diferentes substratos como fonte de carbono para a produção de amilase pelo microrganismo, assim como diferentes suplementações com fontes de nitrogênio e carbono. As temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C e os tempos de cultivo de 1 até 10 dias também foram avaliados. Observou-se que a maior produção de amilases foi em meio contendo quirera de arroz suplementado com 1% (p/p) de torta de óleo de amêndoa quando cultivado a 25 °C por 2 dias, com $14,45 \pm 0,45$ U.g⁻¹. Posteriormente foi realizada a caracterização bioquímica da enzima, avaliando o efeito e a estabilidade ao pH e temperatura, além do efeito de sais e agentes químicos. A enzima apresentou atividade máxima em pH 5,0 e manteve sua estabilidade na faixa de pH de 4,0 a 5,5. A temperatura ótima da enzima ocorreu a 50 °C, com termoestabilidade enzimática a 40 °C por 4 h. A presença dos íons metálicos Mn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ e Ni²⁺ foram capazes de aumentar a atividade da enzima em $66,79 \pm 5,09$, $55,78 \pm 1,05$, $18,58 \pm 2,76$ e $26,98 \pm 5,54$ %, respectivamente. Assim, pode-se concluir que a amilase produzida por *Aspergillus* sp., por exibir produção enzimática em um meio de baixo custo e apresentar características bioquímicas promissoras, é propícia para possíveis aplicações industriais.

Palavras-chave: amilase; *Aspergillus* sp.; fermentação em estado sólido – FES; caracterização bioquímica.

ABSTRACT

The hydrolysis of starchy polysaccharides depends on a group of enzymes that belong to the amylolytic complex. The cultivation of filamentous fungi through solid-state fermentation (SSF), especially those that use agro-industrial residues, enables the production of enzymes with potential applications in industry. In this context, the objective of this work was to optimize the production of amylases by the fungus *Aspergillus* sp. in SSF using different carbon sources, including agro-industrial residues, as well as performing the biochemical characterization of the crude enzyme. Different substrates were tested as a carbon source to produce amylase by the microorganism, as well as different supplementation with nitrogen and carbon sources. The temperatures of 25, 30, 35 and 40 °C and cultivation times of 1 to 10 days were also evaluated. It was observed that the highest production of amylases was in medium containing broken rice supplemented with 1% (w/w) of almond oil cake when cultivated at 25 °C for 2 days, with 14.45 ± 0.45 U.g⁻¹. Subsequently, the biochemical characterization of the enzyme was carried out, evaluating the effect and stability at pH and temperature, in addition to the effect of salts and chemical agents. The enzyme showed maximum activity at pH 5.0 and maintained its stability in the pH range from 4.0 to 5.5. The optimum temperature of the enzyme occurred at 50 °C, with enzymatic thermostability at 40 °C for 4 h. The presence of metal ions Mn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ and Ni²⁺ were able to increase the enzyme activity by 66.79 ± 5.09 , 55.78 ± 1.05 , 18.58 ± 2.76 and 26.98 ± 5.54 %, respectively. Thus, it can be concluded that the amylase produced by *Aspergillus* sp., by exhibiting enzyme production in a low-cost medium and presenting promising biochemical characteristics, is suitable for possible industrial applications.

Keywords: amylase; *Aspergillus* sp.; solid-state fermentation – SSF; biochemical characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do amido.....	15
Figura 2 – Estrutura da amilopectina e amilose demonstrando os locais de hidrólise e seu resultado pelos diferentes tipos de amilases.....	18
Figura 3 - Representação esquemática do crescimento de fungos filamentosos em substratos sólidos.....	20
Figura 4 - Aplicações industriais das amilases.....	22
Figura 5 - Linhagem de <i>Aspergillus</i> sp. em placa de petri.....	24
Figura 6 - Meios de cultivo em fermentação em estado sólido.....	26
Figura 7 - Efeito do aumento da torta de óleo de amêndoa (TOA) na produção de amilase por <i>Aspergillus</i> sp. em quirera de arroz a 30 °C por 4 dias.....	32
Figura 8 – Efeito da temperatura na produção de amilase por <i>Aspergillus</i> sp. em quirera de arroz e 1% torta de óleo de amêndoa por 4 dias.	32
Figura 9 - Efeito do tempo na produção de amilase por <i>Aspergillus</i> sp. em quirera de arroz e 1% torta de óleo de amêndoa a 25 °C.	33
Figura 10 - Efeito do pH na atividade e estabilidade da amilase.....	34
Figura 11 - Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da amilase.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes substratos testados como fonte de carbono para a produção de amilase por <i>Aspergillus</i> sp. em FES a 30 °C por 4 dias.	30
Tabela 2 – Determinação da suplementação com fonte de nitrogênio para a produção de amilase por <i>Aspergillus</i> sp. em quirera de arroz a 30 °C por 4 dias.	30
Tabela 3 - Determinação da suplementação com fonte de carbono para a produção de amilase por <i>Aspergillus</i> sp. em quirera de arroz a 30 °C por 4 dias.	31
Tabela 4 - Efeito de sais e agentes químicos na atividade da amilase.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

CAZy	Enzima ativa de carboidratos
CMB	Módulo de ligação a carboidratos
EC	Comissão de enzimas
DE	Dextrina
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FES	Fermentação em estado sólido
FSbm	Fermentação submersa
GH	Glicosil hidrolases
GH13	Glicosil hidrolases da família 13
GH14	Glicosil hidrolases da família 14
GH15	Glicosil hidrolases da família 15
HFCS	Xarope de milho com alto teor de frutose
h	hora
min	minuto
OFAT	Um fator por vez
SBD	Sítios de ligação ao amido
SDS	Dodecil sulfato de sódio
sp	Espécie
U totais	Unidades totais

LISTA DE SIMBOLOS E UNIDADES

μm	Micrômetro
nm	Nanômetro
α	Alfa
β	Beta
Kgf/cm^2	Quilograma-força por centímetro quadrado
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
mL	Mililitro
% p/p	Percentual peso por peso
g	Gramma
xg	Força centrífuga relativa
μL	Microlitro
mmol.L^{-1}	Milimol por litro
% m/v	Percentual massa por volume
μmol	Micromol
U.g^{-1}	Unidades por grama
U.mL^{-1}	Unidades por mililitro
mg.mL^{-1}	Miligramma por mililitro
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO	14
2.1 Estrutura do amido	14
2.2 Degradação e hidrólise enzimática do amido	16
2.3 Amilases envolvidas na hidrólise de polissacarídeos amiláceos	16
2.3.1 α -amilase	17
2.3.2 β -amilase	17
2.3.3 Glucoamilase	18
2.4 Cultivo de microrganismos em fermentação em estado sólido (FES)	19
2.5 Aplicações biotecnológicas das amilases	20
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Microrganismo	24
4.2 Manutenção de repiques	24
4.3 Otimização da produção da amilase em fermentação em estado sólido (FES)	25
4.4 Preparação do extrato bruto	26
4.5 Atividade enzimática da amilase	26
4.6 Dosagem de proteínas	27
4.7 Caracterização bioquímica da amilase	27
4.7.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática	27
4.7.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática	27
4.7.3 Efeito de sais e agentes químicos na atividade enzimática	28
4.8 Análise dos dados	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Otimização da produção da amilase em fermentação em estado sólido (FES)	29
5.2 Caracterização bioquímica da amilase extracelular	33
5.2.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática	33
5.2.2 Efeito da temperatura de incubação na atividade e estabilidade enzimática ...	36
5.2.3 Efeito de sais e agentes químicos na atividade enzimática	38

6 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

Todas as atividades humanas, sejam elas em escala industrial ou individual, geram resíduos e subprodutos, com as mais diversas características em termos de quantidade e qualidade, bem como, potencial poluidor, de recuperação e de reaproveitamento (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013). Dentre as principais fontes de resíduos e subprodutos destaca-se o setor agroindustrial. O Brasil possui sua economia baseada no agronegócio, com uma grande área cultivável de grãos, cereais e frutas, o que, gera quantias consideráveis de resíduos como cascas, farelos e bagaços. Com isto, a aplicação de alternativas para o uso e aproveitamento desses subprodutos agrícolas tornam-se necessárias para minimizar os impactos ao meio ambiente (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2019; ALMEIDA, 2021).

O emprego de processos biotecnológicos demonstram ser uma destas alternativas, pois utilizam resíduos agroindustriais como matéria-prima de baixo custo. Dessa forma, são obtidos compostos de alto valor agregado para utilização em diversos setores da indústria, como a de alimentos, farmacêutica e têxtil (LAUFENBER; KUNZ; NYSTROEM, 2003; ALVES *et al.*, 2019). A fermentação em estado sólido (FES) é uma das metodologias em que se pode utilizar, dentre outras fontes, resíduos agroindustriais para a produção de enzimas (COUTO; SANROMÁN, 2006; WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013). A FES destaca-se por ser um processo simples e de baixo custo, além de ser ecologicamente correto (PANDEY, 2003; GE; VASCO-CORREA; LI, 2017).

Os fungos filamentosos são os microrganismos mais adaptados para a FES, visto que são capazes de secretarem enzimas extracelularmente e de crescer em baixos níveis de água, são de fácil cultivo e seu crescimento, através de hifas, permite uma maior penetração entre os substratos sólidos (GUIMARÃES *et al.*, 2006; WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013; GOPINATH *et al.*, 2017).

As amilases são enzimas extracelulares responsáveis pela hidrólise do amido e liberação de oligossacarídeos compostos de unidades de glicose, que podem ser obtidas a partir de bactérias, fungos e leveduras (WINDISH; MHATRE, 1965; GOPINATH *et al.*, 2017). O amido, considerado o substrato natural para as amilases, é um dos polissacarídeos mais importantes da natureza encontrado em cereais, raízes, sementes e tubérculos (BELLO-PEREZ *et al.*, 2020; CRIPWELL; VAN ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2020). Em razão da ampla disponibilidade de amido na natureza, as

amilases podem ser produzidas a partir de fontes vegetais baratas tornando suas aplicações mais abundantes em termos de custo (GOPINATH *et al.*, 2017). As amilases são muito utilizadas em processos industriais de grande escala, como por exemplo na indústria de detergentes, na produção de etanol e na indústria alimentícia (FAR *et al.*, 2020). Além disso, as amilases estão entre os compostos de alto valor agregado mais importantes para a biotecnologia atual e representam mais de 25% do mercado global de enzimas (MANIVANNAN; MADHAVI; BRUVANESWARI, 2015; GOPINATH *et al.*, 2017).

Neste contexto, há inúmeros estudos demonstrando o potencial biotecnológico da produção de amilases por diversas espécies do gênero *Aspergillus* em FES empregando o uso de resíduos agroindustriais como bagaço de malte, casca de mandioca, casca e farelo de arroz, casca de maracujá e farelo de trigo (SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2007; ROCHA, 2010; DA CRUZ *et al.*, 2011; ARAÚJO, 2018; LIMA, 2019). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a produção e a caracterização bioquímica da amilase produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus* sp. em fermentação em estado sólido (FES) utilizando resíduos agroindustriais.

2 REVISÃO

2.1 Estrutura do amido

O amido é um homopolissacarídeo de glicose sintetizado via fotossíntese nos cloroplastos das plantas (BELLO-PEREZ *et al.*, 2018). Está entre os principais polissacarídeos encontrados na natureza, mas ao contrário da quitina e da celulose, que são moléculas estruturais, o amido é um carboidrato de armazenamento de reserva energética e está presente em cereais (milho, arroz, trigo), sementes, tubérculos e raízes (batata, batata-doce, mandioca) (IUGA; MIRONEASA, 2019; NELSON; COX, 2019).

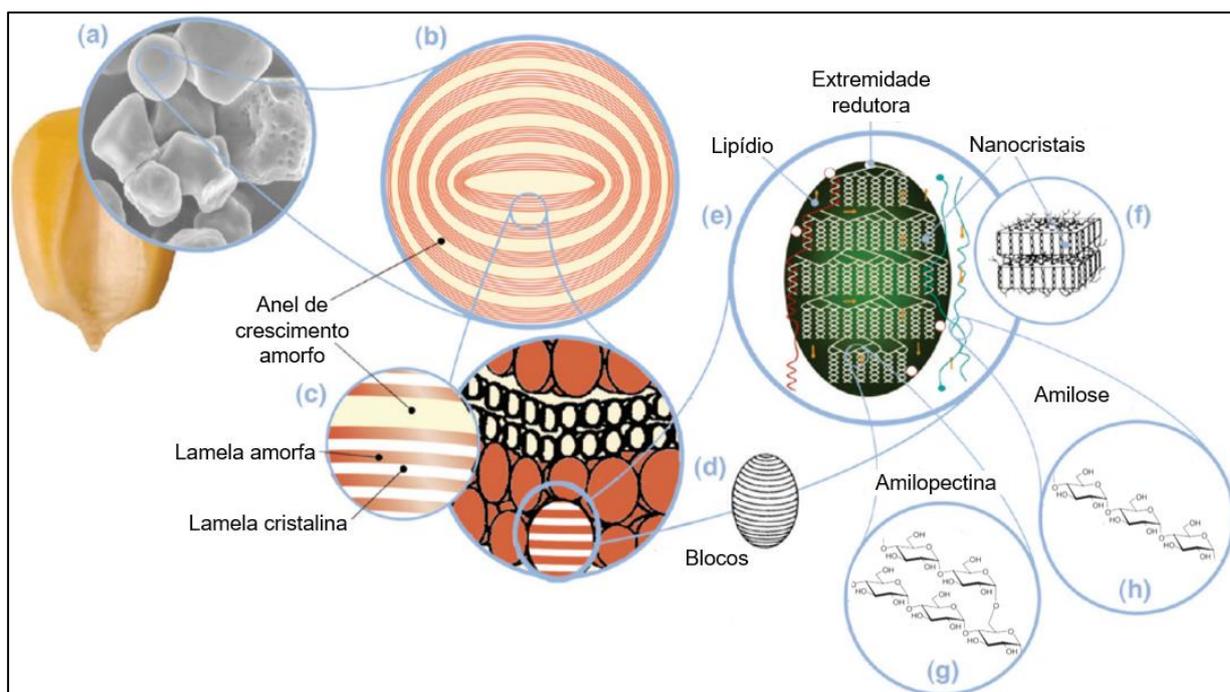
A molécula de amido é armazenada na forma de um grânulo composto por dois componentes principais: amilose e amilopectina (Figura 1). A amilose é um polímero linear, constituído de unidades repetitivas de monômeros de α -D-glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4. Em contraste, a amilopectina é um polímero extremamente ramificado, em que as moléculas de α -D-glicose estão unidas por ligações glicosídicas

α -1,4 na cadeia principal e por ligações glicosídicas α -1,6 nas ramificações (BOŽIĆ *et al.*, 2017; FAR *et al.*, 2020).

No grânulo de amido, a amilose forma a lamela amorfa, e a amilopectina forma a lamela cristalina, com seus pontos de ramificação na lamela amorfa. A presença de lamelas amorfas e cristalinas no grânulo de amido confere a este polímero uma característica semicristalina (BELLO-PEREZ *et al.*, 2018; CRIPWELL; VAN ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2020).

Entretanto, as propriedades funcionais do amido estão relacionadas às frações de amilose (25-30%) e amilopectina (70-75%), que variam de acordo com a fonte botânica do amido e, portanto, determinam a resistência à hidrólise enzimática e a seu nível de digestibilidade (IUGA; MIRONEASA, 2019; BELLO-PEREZ *et al.*, 2020; FAR *et al.*, 2020).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do amido.



O esquema em multiescala representa os principais componentes que formam a estrutura do amido. (a) grânulos de amido de milho normal (30 μ m), (b) anéis de crescimento amorfo e semicristalinos (120-500 nm), (c) lamelas amorfas e cristalinas (9 nm), detalhes ampliados do crescimento semicristalino do anel, (d) blocos (20-50 nm) constituindo uma unidade dos anéis de crescimento, (e) dupla hélice de amilopectina formando as lamelas cristalinas dos blocos, (f) nanocristais: outra representação das lamelas cristalinas chamadas nanocristais de amido quando separadas por hidrólise ácida, (g) estrutura molecular da amilopectina e (h) estrutura molecular da amilose (0,1-1 nm). Fonte: Adaptado de Le Corre; Bras; Dufresne (2010).

2.2 Degradação e hidrólise enzimática do amido

Em seu estado nativo, o amido é designado como amido bruto ou não modificado (granular), e possui uma estrutura semicristalina e densamente compactada que resiste a hidrólise enzimática (XU; YAN; FENG, 2016; CRIPWELL; VAN ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2020). No entanto, no processo denominado de gelatinização, em que o amido é aquecido em solução aquosa acima de uma temperatura específica ($> 50\text{ }^{\circ}\text{C}$), as ligações de hidrogênio da estrutura cristalina são rompidas resultando em absorção de água e posterior inchaço dos grânulos (DENARDIN; SILVA, 2009; SCHIRMER; JEKLE; BECKER, 2015). À medida que os grânulos de amido continuam se expandindo, ocorre a lixiviação da amilose da fase granular para a fase aquosa, tornando o amido solúvel e de fácil hidrólise. Quando a temperatura diminui as moléculas de amido se rearranjam, resultando em uma estrutura ordenada pelo processo retrogradação (JEKLE; BECKER, 2015).

O amido é hidrolisado em carboidratos mais simples, denominados dextrinas (DE), representando os fragmentos de ligações glicosídicas que foram hidrolisadas (CRIPWELL; VAN ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2020). Isso ocorre através da ação de um complexo enzimático conhecido como enzimas amilolíticas que geralmente atuam por meio dos sítios de ligação ao amido (SBDs). Os SBDs fazem parte do módulo de ligação a carboidratos (CBM) e quando ativados exercem diversas funções como, controlar a concentração de substrato sítio catalítico, liberar oligossacarídeos, interagir com as paredes celulares, melhorar a processabilidade e regulação alostérica (BOŽIĆ *et al*, 2017).

2.3 Amilases envolvidas na hidrólise de polissacarídeos amiláceos

As amilases são enzimas catalíticas capazes de atuar como transferases (EC 2), hidrolases (EC 3) e isomerases (EC 5) (GANGADHARAN; JOSE; NAMPOOTHIRI, 2020). Devido a ação de hidrólise nas ligações glicosídicas do amido, as amilases podem ser denominadas glicosil hidrolases (GHs) (GOPINATH *et al.*, 2017). Além disso, são encontradas predominantemente na família 13 das glicosil hidrolases, com vários exemplos ocorrendo nas famílias GH14 e GH15 (CRIPWELL; VAN ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2020).

As amilases podem ser divididas principalmente em endoamilases (como as α -amilases) e exoamilases (como as β -amilases e glucoamilases) (Figura 2). As endoamilases hidrolisam as ligações da parte interna da cadeia produzindo oligossacarídeos menores. Enquanto as exoamilases liberam glicose ou maltose a partir da extremidade não redutora da cadeia (GOPINATH *et al.*, 2017)

2.3.1 α -amilase

As α -amilases (1,4- α -D-glucano glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) são endoamilases que hidrolisam as ligações α -1,4 glicosídicas internas do amido produzindo glicose, maltose e maltooligossacarídeos de cadeia curta, como maltotriose, maltotetose e maltopentose (SUNDARRAM; MURTHY, 2014; GANGADHARAN; JOSE; NAMPOOTHIRI, 2020; PAUL *et al.*, 2020). Geralmente, as α -amilases são metaloenzimas, que requerem a presença íons de cálcio (Ca^{2+}) para se estabilizar e manter sua atividade e conformação estrutural (SABOURY, 2002).

A α -amilase apresenta uma forma de barril $(\alpha/\beta)_8$ com dois resíduos de aminoácidos (glutamato e aspartato) para clivar a ligação glicosídica, não sendo capaz de quebrar as ligações glicosídicas terminais (PAUL *et al.*, 2021). Além disso, segundo o banco de dados de enzimas ativa para carboidratos (CAZy), as α -amilases estão classificadas dentro das famílias 13, 57 e 126 das glicosil hidrolases, e, em mais de vinte subfamílias da GH13 (DRULA *et al.*, 2022).

2.3.2 β -amilase

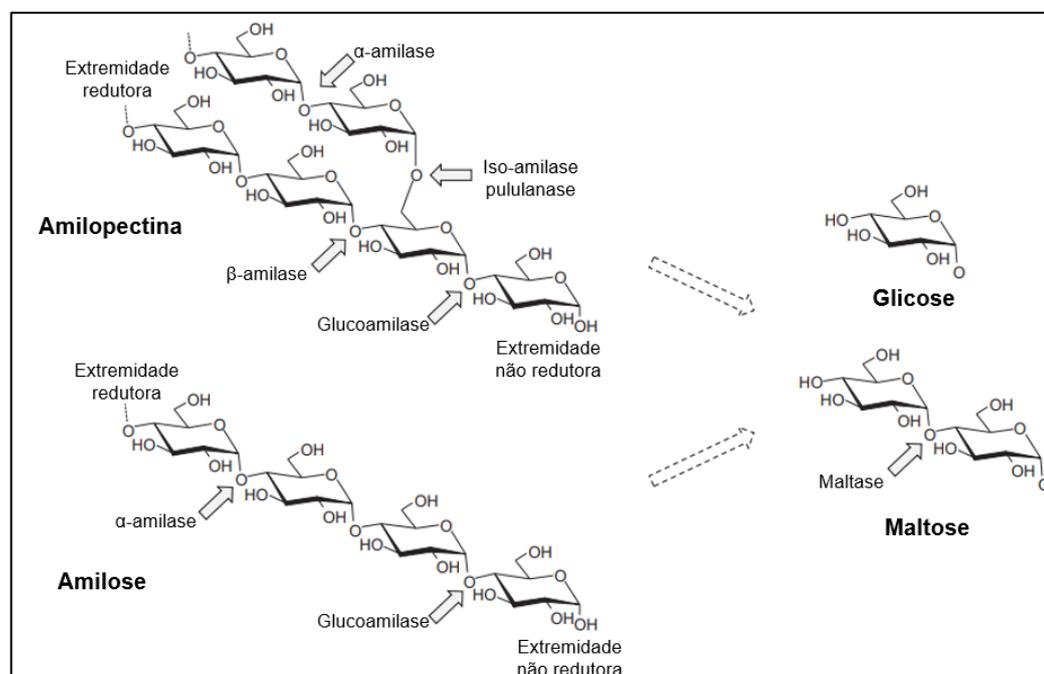
As β -amilases (1,4- α -D glucano maltohidrolase, EC 3.2.1.2) são exoamilases que atuam na extremidade não redutora do amido, hidrolisando as ligações glicosídicas α -1,4 e liberando a forma β -anomérica da maltose. Entretanto, a β -amilase é incapaz de clivar as ligações ramificadas da molécula de amilopectina fazendo com que a hidrólise do amido seja incompleta e as unidades de dextrina se mantenham (SUNDARRAM; MURTHY, 2014; AGRAWAL; DWEVEDI; KAYASTHA, 2019). Esta enzima pertence à família GH 14 e sua estrutura compreende um domínio em forma de barril $(\beta/\alpha)_8$ (VAIDYA *et al.*, 2015). As β -amilases são obtidas de algumas cepas bacterianas como *Bacillus cereus*, e fungos como *Aspergillus* sp., além de ser encontrada em várias plantas como batata-doce (*Ipomoea batatas*), soja (*Glycine max*) e cevada (*Hordeum vulgare* L.). Bem como, está presente durante o

amadurecimento das frutas. Esta amilase decompõe o amido em maltose resultando na doçura da fruta madura (SUNDARRAM; MURTHY, 2014; AGRAWAL; DWEVEDI; KAYASTHA, 2019).

2.3.3 Glucoamilase

As glucoamilases (1,4- α -D glucano glucosidase, EC 3.2.1.3) (GA) fazem parte da família 15 das glicosil hidrolases (GH15) (DRULA *et al.*, 2022). São exoamilases que liberam moléculas de D-glicose na conformação β a partir da hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 da extremidade não redutora do amido (SAUER; SIGURSKJOLD; CHRISTENSEN, 2000). As glucoamilases de origem fúngica possuem dois domínios, um domínio catalítico e um domínio de ligação ao amido, sendo este último importante na hidrólise do amido em seu estado nativo. Ambos os domínios estão unidos por um ligante polipeptídico O-glicosilado encontrado no terminal N (NOROUZIAN *et al.*, 2006). Esta enzima também pode ser chamada de sacarificante, pois é capaz de hidrolisar completamente o amido se incubada a longo tempo (KARIM; TASNIM, 2018).

Figura 2 – Estrutura da amilopectina e amilose demonstrando os locais de hidrólise e seu resultado pelos diferentes tipos de amilases.



No esquema acima está representado a estrutura molecular da amilopectina e amilose. A junção de várias unidades de glicose forma a amilose e a amilopectina contendo as extremidades redutora e não redutora. As setas indicam o local de hidrólise enzimática por diferentes tipos de amilases. As setas tracejadas indicam os possíveis produtos da hidrólise do amido. Fonte: Adaptado de Cripwell; Van zyl; Viljoen-bloom (2020).

2.4 Cultivo de microrganismos em fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como um processo de fermentação envolvendo materiais de matriz sólida (substrato). Na FES, o teor de água ligada a tal substrato está em um nível que possibilita o crescimento e metabolismo do microrganismo, porém não ultrapassa a capacidade máxima de ligação da água com a matriz sólida. Isto significa que, na FES, os substratos sólidos são apenas umedecidos, com ausência de água livre entre as moléculas (PANDEY, 2003; WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013; GE; VASCO-CORREA; LI, 2017).

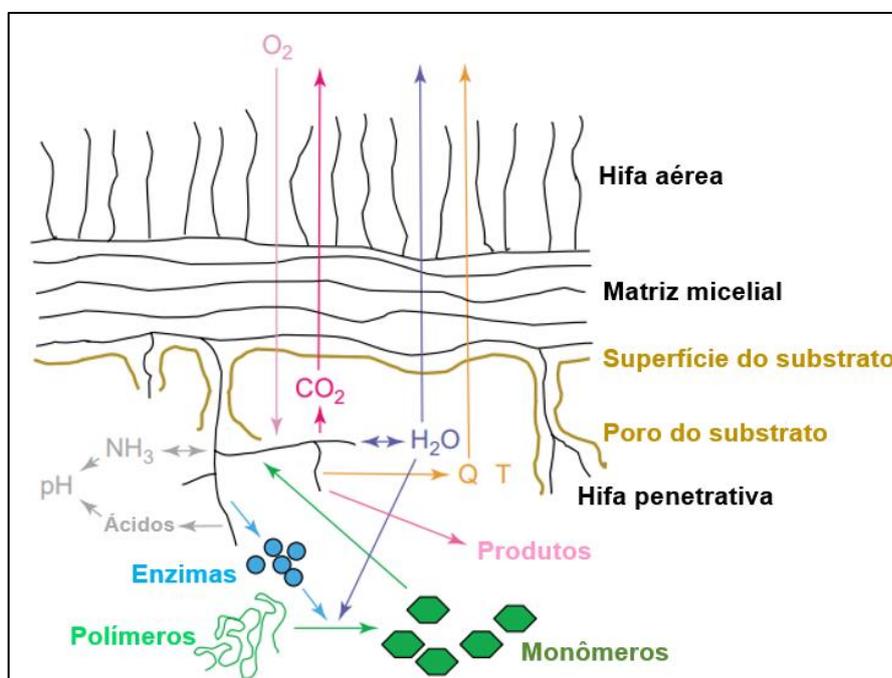
Os fungos filamentosos são os microrganismos mais promissores utilizados na FES em razão da variedade de produtos oriundos de seu metabolismo, como as enzimas (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013; GOPINATH *et al.*, 2017). As hifas penetram o substrato e secretam enzimas no meio circundante que hidrolisam (decompõe) os polissacarídeos vegetais, como o amido (Figura 3). Os produtos da degradação destes polissacarídeos são monômeros, como a glicose e oligômeros, que posteriormente podem ser absorvidos pelas hifas do fungo (MEYER *et al.*, 2020). Além disso, devido ao seu crescimento através de hifas, os fungos são capazes de se aderirem facilmente aos substratos sólidos favorecendo o processo de hidrólise (COUTO; SANROMÁN, 2006; WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013; GOPINATH *et al.*, 2017).

A FES tem ganhado destaque na produção de enzimas microbianas em razão das diversas vantagens econômicas em relação à fermentação submersa (FSbm) (MANIVANNAN; MADHAVI; BRUVANESWARI, 2015). Entre as vantagens da FES, destaca-se o baixo teor de umidade do meio e o uso de equipamentos mais simples (FAR *et al.*, 2020). Ademais, a FES possibilita o uso de resíduos provenientes da agroindústria como substrato, gerando menos efluentes e resolvendo o problema do descarte de resíduos sólidos (PANDEY, 2003; COUTO; SANROMÁN, 2006).

A principal desvantagem deste processo são os diversos parâmetros de cultivo que podem afetar a produção de enzimas como temperatura, pH, umidade e tempo de fermentação (GUPTA *et al.*, 2003; SUNDARRAM; MURTHY, 2014; FAR *et al.*, 2020). Entretanto, esse tipo de cultivo é amplamente utilizado para a obtenção de diversos produtos de valor agregado como metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo antibióticos, alcalóides, biopesticidas e diversas enzimas (PANDEY,

2003) como amilases, celulasas e endo-xilanases (ALIYAH *et al.*, 2017; SHRUTHI *et al.*, 2018; ALMEIDA, 2021).

Figura 3 - Representação esquemática do crescimento de fungos filamentosos em substratos sólidos.



O esquema em microescala representa alguns dos processos que ocorrem durante a fermentação em estado sólido (FES). Após a esporulação, as hifas fúngicas se desenvolvem em um tapete micelial (preto), que se espalha sobre a superfície das partículas que compõe o substrato sólido (marrom). Do tapete micelial, as hifas penetram no substrato crescendo em poros cheios de líquido. As enzimas hidrolíticas (azul) produzidas pelo micélio difundem-se para a matriz sólida e catalisam a degradação das macromoléculas em unidades menores (verde). Os monômeros serão absorvidos pelo fungo para servir como nutrientes. Fonte: Adaptado de Hölker & Lenz (2005).

2.5 Aplicações biotecnológicas das amilases

As amilases estão entre as enzimas mais importantes para a biotecnologia industrial, representando 25-33% do mercado global de enzimas (MOSJOV, 2012; MANIVANNAN; MADHAVI; BRUVANESWARI, 2015). Isso ocorre em razão dessas enzimas apresentarem inúmeras aplicações que vão desde a indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, e produção de etanol à indústria de panificação e de papel e celulose (Figura 4) (GOPINATH *et al.*, 2017; FAR *et al.*, 2020).

Na indústria alimentícia, a produção de xaropes de milho com alto teor de frutose (HFCS) representam a maior aplicação das amilases no mercado de bebidas e refrigerantes (CRIPWELL; VAN ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2020). Para isso, uma α -amilase termoestável é usada para hidrolisar o amido de milho em cadeias curtas de dextrinas e oligossacarídeos. Em seguida, uma glucoamilase quebra as dextrinas e

os oligossacarídeos no açúcar glicose. O produto dessas duas enzimas é o xarope de milho, também chamado de xarope de glicose. Uma terceira enzima denominada glicose isomerase (D-glicose cetoisomerase ou D-xilose cetolisomerase) é utilizada no processo para converter a glicose em frutose (PARKER; SALAS; NWOSU, 2010). Devido a sua alta propriedade adoçante, os xaropes de milho são utilizados em larga escala na indústria de bebidas como adoçantes para refrigerantes (GUPTA *et al.*, 2003).

A produção de etanol de primeira geração a partir da hidrólise do amido representa a segunda maior aplicação industrial das amilases (CRIPWELL; VAN ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2020). Para a produção de etanol, o amido é o substrato mais utilizado devido ao seu baixo preço e matéria-prima facilmente disponível (FAR *et al.*, 2012). A bioconversão do amido em etanol envolve o processo de gelatinização e liquefação, onde o mesmo será disperso em solução aquosa, aquecido e parcialmente hidrolisado. Seguida pela etapa de sacarificação, onde o amido é hidrolisado por amilases para gerar açúcares fermentescíveis que serão consumidos por leveduras para a produção de etanol (LÄUFER, 2017; FAR *et al.*, 2020)

Na indústria de panificação, as amilases são adicionadas à massa no processo de fabricação. A adição da amilase permite a hidrólise do amido em dextrinas, que posteriormente serão fermentadas pela levedura. Isso prolonga a fase de fermentação, reduzindo a viscosidade da massa e melhorando a textura e o volume do pão (GUPTA *et al.*, 2003; SUNDARAM; MURTHY, 2014; FAR *et al.*, 2020)

Por fim, a indústria têxtil e de papel e celulose utilizam as amilases para melhorar a produção e a qualidade de seus produtos (CRIPWELL; VAN ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2020). Na primeira, o amido é utilizado para facilitar a tecelagem dos fios. No entanto, essa camada de amido deve ser removida dos tecidos pelo processo de desengomagem. As amilases são aplicadas ao tecido para remover o amido convertendo-o em dextrinas solúveis sem danificar as fibras do fio (GUPTA *et al.*, 2003). Na fabricação do papel, as amilases são incorporadas ao processo para aumentar a rigidez e a resistência do papel, e, ao mesmo tempo proporcionar um melhor acabamento ao produto (HUSSAIN *et al.*, 2013; FAR *et al.*, 2020)

Figura 4 - Aplicações industriais das amilases.



A figura indica a variedade de aplicações que as amilases possuem na indústria, desde alimentícia até papel e celulose. Fonte: Adaptado de Cripwell; Van zyl; Viljoen-bloom (2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi produzir e realizar a caracterização bioquímica da amilase extracelular do fungo *Aspergillus* sp. obtida a partir da fermentação em estado sólido (FES) utilizando resíduos agroindustriais.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir por fermentação em estado sólido (FES) a amilase do fungo *Aspergillus* sp.;
- Otimizar a produção de amilase utilizando diferentes fontes de carbono provenientes ou não de resíduos agroindustriais;
- Caracterizar bioquimicamente o conteúdo extracelular de amilase de *Aspergillus* sp.;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho é um fungo filamentosso mesofílico pertencente ao gênero *Aspergillus* (Figura 5). O microrganismo foi coletado no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil (20° 26' 34" S 54° 38' 47" W), e está depositado no acervo da Unidade Técnica Micoteca/INBIO/UFMS, localizada no Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). O fungo foi identificado morfológicamente por características micro e macroscópicas pela técnica Dr^a. Clarice Rossato Marchetti, da Unidade técnica Micoteca/INBIO/UFMS.

Figura 5 - Linhagem de *Aspergillus* sp. em placa de petri.



Fonte: O autor (2022).

4.2 Manutenção de repiques

A linhagem de *Aspergillus* sp. foi mantida através de repiques contínuos preparados em tubos de ensaio inclinados contendo o meio sólido de cultura Batata Dextrose e Agar 3,9% (Oxoid, GBR), previamente esterilizados em autoclave por 25 min, a 1,5 Kgf/cm². Em seguida, o microrganismo foi incubado em estufa por 4 dias a 30 °C. Após o tempo de incubação, a cultura foi utilizada para a produção enzimática ou armazenada em refrigerador com repiques mensais.

4.3 Otimização da produção da amilase em fermentação em estado sólido (FES)

Para a obtenção do inóculo em FES foi utilizado o repique realizado conforme o item 4.2. A suspensão de esporos do fungo foi realizada pela raspagem da superfície do meio de cultura no tubo de ensaio adicionando água destilada anteriormente autoclavada 1,5 Kgf/cm² por 25 min. A inoculação do microrganismo no meio de cultivo FES foi obtida pela transferência de 2 mL desta suspensão na fonte de carbono.

A produção da amilase seguiu a metodologia de análise de um fator por vez (OFAT), a qual foi empregada para determinar os testes de padronização para a melhor fonte de carbono e a melhor fonte suplementar de nitrogênio e carbono na concentração 1% (p/p), respectivamente. Foram utilizados como fonte de carbono para o cultivo microbiano para a produção de amilase: amido, casca de arroz, casca de arroz triturada, casca de macaúba, cevada, farelo de trigo, farinha de arroz, farinha de polpa de macaúba, folhas trituradas de ora-pro-nóbis, fubá, palha de milho triturada, quirera de arroz, quirera de milho, sabugo de milho triturado e torta de óleo de amêndoa. A fonte de carbono que exibiu a melhor expressão enzimática foi escolhida para a avaliação de outros parâmetros, sempre adotando a melhor condição de cada experimento nos ensaios seguintes.

Para a suplementação com 1% (p/p) de fonte de nitrogênio foram testados: caseína, extrato de levedura, peptona e ureia. Para a suplementação com 1% (p/p) de fonte de carbono foram testados: amido, cevada, farelo de trigo, folhas trituradas ora-pro-nóbis, palha de milho triturada, sabugo de milho triturado, e torta de óleo de amêndoa. Inicialmente os meios de cultivo foram mantidos durante 4 dias a 30 °C.

Após determinar a melhor fonte de carbono e as melhores fontes suplementares de nitrogênio e carbono para a otimização da produção de amilase por OFAT, as variáveis independentes temperatura e tempo de cultivo foram analisadas. Foram avaliadas as temperaturas de 25, 30, 35 e 40 °C e os tempos de cultivo de 1 até 10 dias.

Os experimentos foram realizados em duplicata, em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de substrato e 10 mL de água destilada (Figura 6) autoclavados a 1,5 Kgf/cm², por 25 min, e 2 mL de inóculo.

Figura 6 - Meios de cultivo em fermentação em estado sólido.



Os meios de cultivo demonstrados contêm, da esquerda para a direita, quirera de arroz, sabugo de milho triturado, fubá, palha de milho triturada, quirera de milho e amido. Fonte: O autor (2021).

4.4 Preparação do extrato bruto

Após o período de crescimento, foram adicionados 30 mL de água destilada gelada nos meios de cultivo em FES sendo mantidos em agitação por 30 min. Em seguida, todo o conteúdo foi filtrado em peneira sintética e centrifugado por 10 min, a 10.000xg, a 4 °C. O conteúdo sedimentado foi descartado e o sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto e utilizado para testes de atividade enzimática.

4.5 Atividade enzimática da amilase

A atividade amilásica obtida do extrato bruto por FES de *Aspergillus* sp. foi determinada através da liberação de açúcares redutores pelo método descrito por Miller (1959). Todas as reações foram realizadas em microplacas de 96 poços com 200 μ L. A atividade amilolítica foi realizada descontinuadamente, a 40 °C, em meio reacional contendo 50 μ L tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 5,0, contendo 1 % amido (m/v) e 40 μ L água destilada. A reação foi iniciada pela adição de 10 μ L de extrato bruto contendo amilase. Após 10 min, a reação foi interrompida com a adição de 100 μ L de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e a mistura foi fervida por 10 min. Após fervura, uma alíquota de 100 μ L foi retirada para leitura em microplaca a 540 nm em espectrofotômetro Spectramax 384 Plus (Molecular Devices, EUA). Controles contendo extrato bruto com amilase inativa por fervura e controles sem a presença da enzima foram usados para se estimar a hidrólise espontânea do substrato (amido).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi determinada como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 μmol de açúcar redutor por minuto, utilizando glicose (Sigma-aldrich, EUA) como padrão. Uma unidade de atividade específica ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) foi definida como a relação entre o número de unidades de atividade por massa de proteínas totais (mg), presente no meio reacional.

Para medidas de comparação de produção enzimática em FES, uma unidade de atividade enzimática por grama de biomassa ($1,0 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) foi definida como a relação entre o número de unidades de atividade (1,0 U) por quantidade de biomassa total em gramas (g).

4.6 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas totais ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi determinada pelo método descrito por Read & Northcote (1981), utilizando albumina bovina sérica como padrão.

4.7 Caracterização bioquímica da amilase

4.7.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática

O efeito do pH sobre a atividade amilolítica de *Aspergillus* sp. foi estabelecido pela incubação individual de 10 μL do extrato bruto em 40 μL de tampão glicina-citrato-fosfato (RULLER *et al.*, 2014) em diferentes valores de pH (entre 3,0- 10,0), e 50 μL de água destilada, durante 10 min, a 40 °C.

A estabilidade ao pH da enzima obtida de *Aspergillus* sp. foi realizada através da incubação de 100 μL do extrato enzimático bruto em 900 μL de tampão glicina-citrato-fosfato em diferentes valores de pH, durante 24 h, em temperatura ambiente. Uma alíquota de 10 μL foi usada para atividade enzimática e seguinte análise de açúcares redutores totais liberados de acordo com o item 4.5. Os resultados foram apresentados na forma de atividade relativa (%), considerando o pH com maior valor de atividade enzimática como 100%.

4.7.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática

O efeito da temperatura sobre a atividade da amilase de *Aspergillus* sp. foi realizado pela incubação individual de 10 μL do extrato bruto em 50 μL de tampão

acetato de sódio 50 mmol.L^{-1} , pH 5,0, contendo 0,5 % amido (m/v), e 40 μL de água destilada, durante 10 min nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70 °C, respectivamente.

A termoestabilidade da amilase foi analisada pela pré-incubação, em banho maria, de 100 μL do extrato bruto em 900 μL de tampão acetato de sódio 100 mmol.L^{-1} , pH 5,0, em intervalos de tempo entre 0 e 24 h e nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C, respectivamente. Uma alíquota de 10 μL foi utilizada para atividade enzimática e posterior análise de açúcares redutores totais liberados de acordo com o item 4.5. Os resultados também foram apresentados na forma de atividade relativa (%), considerando a temperatura com maior atividade enzimática como 100%.

4.7.3 Efeito de sais e agentes químicos na atividade enzimática

O efeito de diferentes sais (NaCl , HgCl_2 , FeCl_3 , KCl , CoCl_2 , ZnCl_2 , LiCl , SrCl_2 , MnCl_2 , MgSO_4 , CaCl_2 , CuSO_4 , AgNO_3 , NiSO_4), solvente orgânico etanol 50%, composto quelante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) e do agente redutor β -mercaptoetanol foram avaliados pela adição de 5 e 10 mmol.L^{-1} destes aditivos nas reações enzimáticas em microplaca. Os resultados foram apresentados na forma de atividade relativa (%), considerando como 100% o grupo reacional sem a presença de sais e/ou agentes químicos.

4.8 Análise dos dados

Todos os resultados obtidos das atividades amilolíticas foram realizados em triplicata (N=3) utilizando diferentes extratos de *Aspergillus* sp. em FES, sendo que os dados e valores calculados estão apresentados como média e desvio padrão (DP). Além disso, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett no programa Graphpad Prism 8 (Graphpad Software, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização da produção da amilase em fermentação em estado sólido (FES)

Entre as 15 fontes de carbono avaliadas, a melhor para a produção de amilase por *Aspergillus* sp., sob fermentação em estado sólido (FES) foi a quirera de arroz, atingindo $7,74 \pm 1,57$ U.g⁻¹ em 4 dias de incubação a 30 °C. Seguido de ora-pro-nóbis ($3,72 \pm 0,04$ U.g⁻¹), quirera de milho ($2,03 \pm 0,35$ U.g⁻¹), farelo de trigo ($1,31 \pm 0,02$ U.g⁻¹) e farinha de arroz ($1,03 \pm 0,04$ U.g⁻¹), respectivamente. O cultivo do microrganismo em diferentes substratos, como casca de arroz, cevada, fubá e sabugo de milho resultou em uma quantidade de enzima produzida relativamente baixa (Tabela 1).

Diversos estudos demonstram que a fonte de carbono é um dos principais fatores que afetam a produção de amilase (GUPTA *et al.*, 2003; SUNDARRAM; MURTHY, 2014; FAR *et al.*, 2020). Com isso, substratos amiláceos e subprodutos agroindustriais estão sendo cada vez mais investigados como potenciais fontes de carbono para a produção de amilases, como os resíduos obtidos da extração de óleo de *Croton linearifolius* (velame pimenta), resíduos de arroz, bagaço de mandioca, farelo de trigo e entre outros (SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2007; ROCHA, 2010; LUZ, 2018).

O arroz (*Oryza sativa*) é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, sendo caracterizado como principal alimento para mais da metade da população mundial (WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008). O processo de beneficiamento do arroz gera uma série de resíduos, ou subprodutos. Sendo os principais resíduos desse processo a casca do arroz, o farelo e os grãos quebrados (quirera) (LORENZETT; NEUHAUS; SCHWAB, 2012). A quirera de arroz é formada por fragmentos de grãos que se rompem durante o processo de beneficiamento. São resultantes da aplicação de força mecânica aos grãos, provocando sua divisão em pedaços pequenos. Podendo ser ainda, resultante de grãos fissurados originados por condições externas não mecânicas durante o descasque do arroz (BAIOCCHI, 2011). O arroz é constituído principalmente por amido, fornecendo também proteínas, minerais, baixo teor de lipídios e vitaminas do complexo B (WALTER; MARCHEZAN; AVILA, 2008). Esses nutrientes favorecem o crescimento dos microrganismos e a produção de amilases (CRIPWELL; VAN ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2020).

Tabela 1 - Diferentes substratos testados como fonte de carbono para a produção de amilase por *Aspergillus* sp. em FES a 30 °C por 4 dias.

Fonte de carbono	U.g ⁻¹	U.mL ⁻¹	Proteína total (mg.mL ⁻¹)
Amido	0,21 ± 0,04	3,58 ± 0,079	0,34
Casca de arroz	0,36 ± 0,01	11,62 ± 0,62	0,18
Casca de arroz triturada	0,36 ± 0,02	12,08 ± 0,77	0,26
Casca de macaúba	0 ± 0,01	0 ± 0,31	0,11
Cevada	0,66 ± 0,09	10,54 ± 0,22	0,88
Farelo de trigo	1,31 ± 0,02	21,90 ± 0,37	0,90
Farinha de arroz	1,03 ± 0,04	16,66 ± 0,16	0,68
Farinha de polpa de macaúba	0,73 ± 0,05	12,28 ± 0,89	0,52
Fubá	0,22 ± 0,02	5,21 ± 0,94	0,22
Ora-pro-nóbis	3,72 ± 0,04	56,47 ± 0,71	1,06
Palha de milho	0,72 ± 0,08	12,13 ± 0,13	0,13
Quirera de arroz	7,74 ± 1,57	181,10 ± 0,20	0,63
Quirera de milho	2,03 ± 0,35	25,69 ± 1,39	0,30
Sabugo de milho	0,30 ± 0,02	5,51 ± 0,40	0,14
Torta de óleo de amêndoa	0,62 ± 0,09	10,49 ± 0,15	0,93

Os dados representam as médias ± DP (n = 3).

A adição de 1% (p/p) de diferentes fontes suplementares de nitrogênio à melhor fonte de carbono não resultou em aumento da produção de amilase por *Aspergillus* sp. (Tabela 2). Sivaramakrishnan *et al.* (2007) também relataram ausência de melhoria na produção enzimática com a adição de fontes de nitrogênio para *Aspergillus oryzae*. Além da diminuição no rendimento enzimático com a presença de fontes de nitrogênio orgânicas (como extrato de levedura e peptona) que resultaram em um efeito adverso na síntese da amilase (SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2007). Para Ramachandran *et al.* (2004) a adição de 1% (p/p) de nitrato de amônio ao meio contendo farelo de trigo e torta de óleo de amendoim na proporção de 1:1 aumentou a produção de α-amilase por *A. oryzae*.

Tabela 2 – Determinação da suplementação com fonte de nitrogênio para a produção de amilase por *Aspergillus* sp. em quirera de arroz a 30 °C por 4 dias.

Suplemento 1% (p/p)	U.g ⁻¹	AR (%)	U.mL ⁻¹
Controle	8,71 ± 0,66	100 ± 6,90	176,22 ± 7,64
Caseína	2,47 ± 0,45	20,64 ± 0,91	31,12 ± 0,79
Extrato de levedura	4,29 ± 0,28	46,00 ± 3,03	58,18 ± 0,78
Peptona	2,61 ± 0,09	26,53 ± 3,44	44,74 ± 0,97
Ureia	0,33 ± 0,02	3,61 ± 0,24	3,38 ± 0,29

Controle: Meio contendo somente quirera de arroz. AR (%): Atividade relativa. Os dados representam as médias ± DP (n = 3).

No entanto, a suplementação com 1% (p/p) da fonte de carbono torta de óleo de amêndoa ($14,05 \pm 1,37 \text{ U.g}^{-1}$) exibiu uma melhoria de 38% na quantidade de enzima produzida quando adicionada ao meio contendo 5 g de quirera de arroz. Enquanto o farelo de trigo ($12,37 \pm 1,91 \text{ U.g}^{-1}$) aumentou em 23% a produção enzimática e o amido ($11,16 \pm 0,86 \text{ U.g}^{-1}$) por volta de 21% (Tabela 3).

Tabela 3 - Determinação da suplementação com fonte de carbono para a produção de amilase por *Aspergillus* sp. em quirera de arroz a 30 °C por 4 dias.

Suplemento 1% (p/p)	U.g ⁻¹	AR (%)	U.mL ⁻¹
Controle	9,31 ± 0,95	100 ± 5,85	170,82 ± 6,08
Amido	11,16 ± 0,86	121,25 ± 0,91	241,27 ± 0,84
Cevada	10,46 ± 0,01	89,67 ± 1,37	176,21 ± 0,28
Farelo de trigo	12,37 ± 1,91	123,35 ± 1,03	242,63 ± 2,46
Ora-pro-nóbis	10,70 ± 0,21	104,42 ± 4,82	198,39 ± 0,23
Palha de milho	9,09 ± 0,39	73,81 ± 1,68	144,63 ± 0,94
Sabugo de milho	8,35 ± 0,21	70,41 ± 1,78	116,99 ± 0,52
Torta de óleo de amêndoa	14,05 ± 1,37	138,31 ± 2,38	249,90 ± 1,21

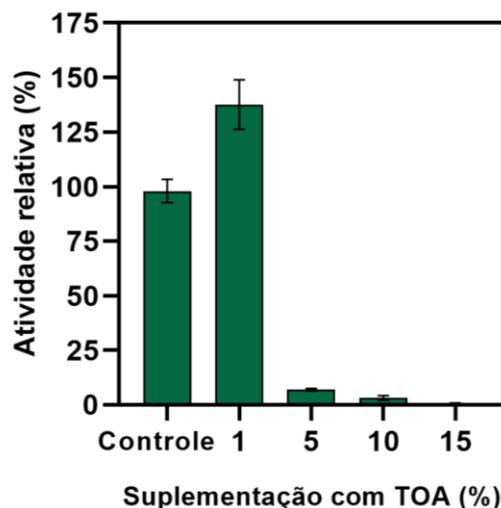
Controle: Meio contendo somente quirera de arroz. AR (%): Atividade relativa. Os dados representam as médias ± DP (n = 3).

A torta de óleo de amêndoa é um resíduo fibroso gerado após a prensagem do fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata*) para a produção de óleo a partir da amêndoa, podendo ser usada na produção de ração animal, biocombustíveis, e na indústria química e de alimentos (BOLINA *et al.*, 2015). As tortas de óleos estão sendo cada vez mais investigadas como substratos e suplementos para a produção de amilase, pois são resíduos ou subprodutos de outros processos industriais (SUNDARRAM; MURTHY, 2014). Ramachandran *et al.* (2004) obtiveram resultados significativos, para a produção de α -amilase pelo fungo *Aspergillus oryzae*, avaliando a fermentação de substratos mistos utilizando farelo de trigo e torta de óleo de amendoim na proporção de 1:1. Balakrishnan *et al.* (2021) avaliaram a produção de α -amilase por *A. oryzae* testando as tortas de óleo de amendoim, coco e gergelim, e concluíram que a torta de óleo de amendoim foi o substrato mais adequado para a máxima produção enzimática.

Com o objetivo de melhorar ainda mais a produção de amilase, foi realizado um aumento da porcentagem (p/p) de torta de óleo de amêndoa no meio de cultivo contendo 5 g de quirera de arroz. Entretanto, ao aumentar para 5% (p/p) de suplementação houve uma diminuição de 95% da produção enzimática (Figura 7).

Isso pode estar relacionado com algum componente da própria macaúba, que, em elevadas quantidades pode inibir a produção de amilases.

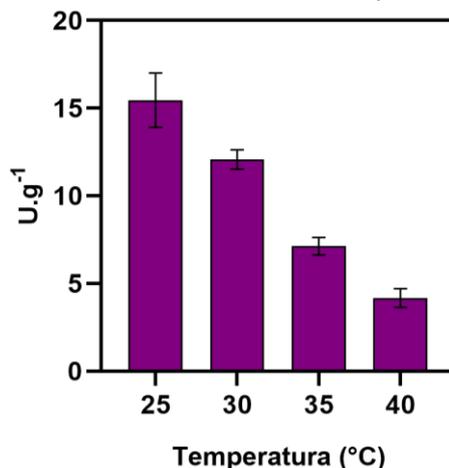
Figura 7 - Efeito do aumento da torta de óleo de amêndoa (TOA) na produção de amilase por *Aspergillus* sp. em quirera de arroz a 30 °C por 4 dias.



Controle: Meio contendo somente quirera de arroz. A atividade de $9,03 \pm 1,35 \text{ U.g}^{-1}$ foi considerada como 100%.

Em relação a temperatura de produção, observou-se que o maior rendimento ocorreu em meio composto de quirera de arroz e 1% (p/p) de torta de óleo de amêndoa a 25 °C ($15,06 \pm 2,14 \text{ U.g}^{-1}$) (Figura 8). A partir de 35 °C a quantidade de enzima produzida começou a diminuir, atingindo $7,22 \pm 0,29 \text{ U.g}^{-1}$ e, chegando a $4,38 \pm 0,13 \text{ U.g}^{-1}$ a 40 °C. A influência da temperatura na produção de amilase está relacionada ao crescimento do microrganismo, sendo que a maioria dos estudos de produção de amilase foi feita com fungos mesófilicos na faixa de temperatura de 25 a 37 °C (GUPTA *et al.*, 2003).

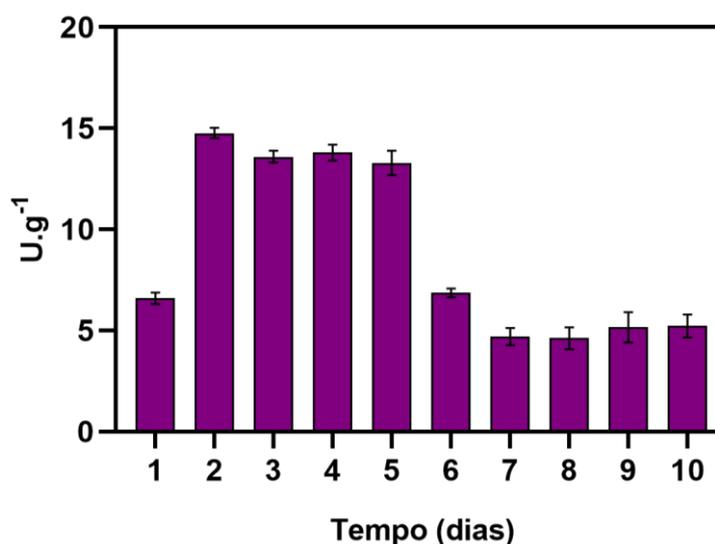
Figura 8 – Efeito da temperatura na produção de amilase por *Aspergillus* sp. em quirera de arroz e 1% torta de óleo de amêndoa por 4 dias.



Ademais, o tempo de cultivo foi avaliado entre 1 a 10 dias. Foi observado que os maiores rendimentos ocorreram entre 2 e 5 dias, ($14,45 \pm 0,45 \text{ U.g}^{-1}$ a $13,07 \pm 0,49 \text{ U.g}^{-1}$) (Figura 9). Logo, foi considerado como ótimo a produção em 2 dias por se tratar do menor tempo de incubação, ao qual representa um baixo custo final na produção.

No tempo de 6 dias foi observado uma diminuição na produção da enzima ($6,86 \pm 0,21 \text{ U.g}^{-1}$), atingindo somente $4,71 \pm 0,15 \text{ U.g}^{-1}$ no tempo de 10 dias. Este fato pode estar relacionado ao esgotamento de nutrientes provenientes do substrato ou ao acúmulo de outros metabólitos, inibindo o crescimento do microrganismo e a síntese da enzima de interesse (BASSETO, 2017; ARAÚJO, 2018).

Figura 9 - Efeito do tempo na produção de amilase por *Aspergillus* sp. em quirera de arroz e 1% torta de óleo de amêndoa a 25 °C.



5.2 Caracterização bioquímica da amilase extracelular

5.2.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática

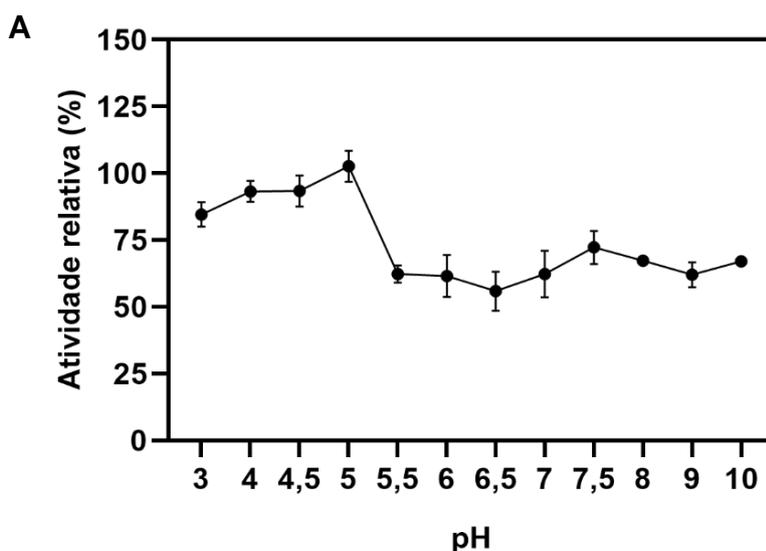
A figura 10A mostra o efeito dos diferentes valores de pH sobre a atividade amilolítica presente no extrato bruto obtido por FES utilizando quirera de arroz suplementada com 1% (p/p) de torta de óleo de amêndoa. Pode-se observar que, independentemente do valor de pH, a atividade da enzima manteve-se elevada em todos os valores de pH estudados. Além disso, foi observado que a amilase obteve o máximo de atividade amilolítica em pH 5,0. Nos valores de pH abaixo de 5,0 (pH ótimo), verificou-se que a enzima exibiu atividade de 84, 87 e 89 % nos valores pH 3,0, 4,0 e 4,5, respectivamente. Para os valores de pH superiores a 5,0, foi observado uma

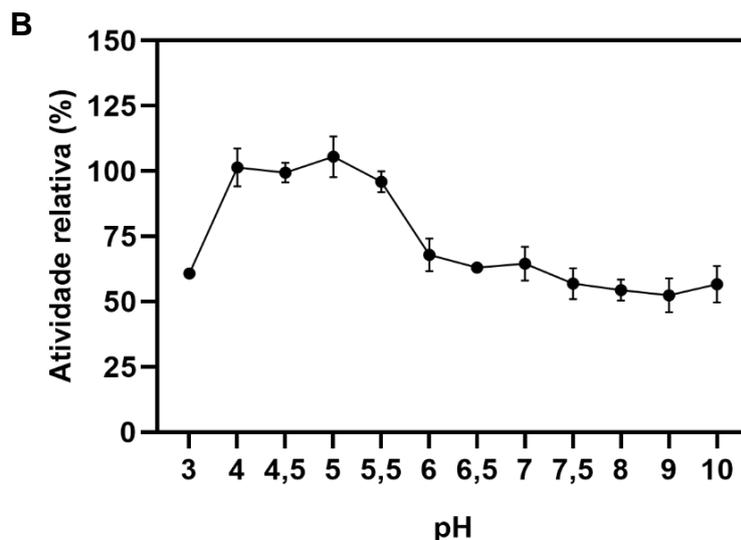
queda de 30% de atividade amilolítica para o pH 5,5, mantendo cerca de 65 a 70% de sua atividade na faixa de 6,0-10,0 (Figura 10A).

O pH ideal encontrado está dentro do que foi observado para outros tipos de amilases produzidas por fungos, como demonstrado no estudo de Luz (2018) avaliando o efeito do pH nos valores de 3,0 a 7,0 sobre a atividade da α -amilase obtida pela FES de *Aspergillus niger*. Para Luz (2018) os dados indicaram que os valores de pH abaixo de 5,0 e acima de 6,0 resultaram na redução da atividade enzimática. Rodrigues (2022) variou o pH entre 4,0 a 8,0, utilizando o extrato bruto obtido pela FES de *A. niger*. O pH ótimo encontrado para a enzima foi de 5,0, ocorrendo uma queda na atividade enzimática com o aumento do pH após o valor máximo (RODRIGUES, 2022).

Conforme mostrado na Figura 10B, a amilase foi estável na faixa de pH de 4,0 a 5,5, mantendo 100% de sua atividade inicial por 24 h. A atividade enzimática diminuiu cerca 30% em pH 6,0. E manteve em torno de 60% de sua atividade inicial na faixa de pH de 6,0 – 10,0. De acordo com Gupta *et al.* (2003), as α -amilases microbianas são estáveis em um ampla faixa de pH de 4,0 – 11,0. Corroborando com Pereira (2014), que obteve a maior atividade enzimática em pH 5,0 no estudo da estabilidade em diferentes valores de pH (3,0 – 10,0) para a amilase produzida por *Aspergillus oryzae*.

Figura 10 - Efeito do pH na atividade e estabilidade da amilase.





(A) pH ótimo. (B) Estabilidade ao pH por 24 h. A atividade de $950,66 \pm 6,05 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ foi considerada como 100%.

Os ensaios de efeito e estabilidade ao pH são importantes para estabelecer as possíveis condições de aplicação industrial que as enzimas possuem. Desta forma, em certos casos é essencial escolher uma enzima com uma faixa de pH o mais amplo possível (HUSSAIN *et al.*, 2013). Enzimas que atuam em pH ácido possuem atividade máxima em valores de pH menores que 3. Quando estáveis, essas enzimas apresentam inúmeras aplicações, particularmente na produção de xaropes de açúcar a partir de amido (MESBAH, 2022). A produção de xaropes de oligossacarídeos a partir do amido envolve três etapas: gelatinização, liquefação com α -amilase e uma última etapa com glucoamilase. No entanto, para se adequar ao pH ideal da enzima necessária para a liquefação, o pH da pasta de amido é aumentado de seu pH nativo (3,2- 4,5) para 5,8 – 6,2. A utilização de amilases que atuam em pH ácido anulará a necessidade de neutralizar a pasta de amido antes da liquefação, reduzindo assim o tempo e o custo da produção de oligossacarídeos a partir do amido (SHARMA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2016; MESBAH, 2022).

Por outro lado, enzimas que atuam em pH alcalino possuem atividade máxima em valores de pH maiores que 9,0 (MESBAH, 2022). Amilases alcalinas normalmente são colocadas em detergentes como aditivos, contribuindo para uma melhoria da lavagem. Os detergentes para uso em máquinas de lavar roupa e lava louças apresentam valores de pH extremamente alcalinos. Dessa forma, as enzimas utilizadas como aditivos apresentam atividade e estabilidade em detergentes alcalinos. Além disso, as amilases alcalinas são resistentes ao efeito de agentes quelantes,

como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e geralmente são estáveis durante o armazenamento a longo prazo e na presença de agentes clareadores (FUJINAMI; FUJISAWA, 2010; MESBAH, 2022).

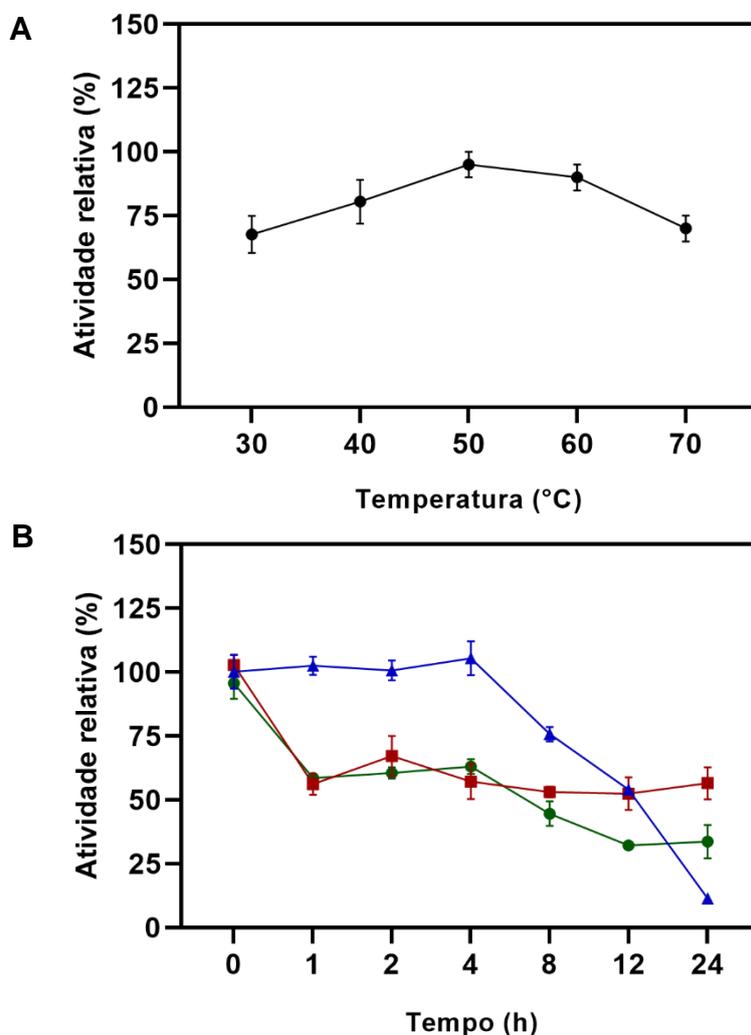
5.2.2 Efeito da temperatura de incubação na atividade e estabilidade enzimática

Para o efeito da temperatura, observou-se que a atividade ótima da amilase de *Aspergillus* sp. ocorreu a 50 °C (Figura 11A). Para as temperaturas de 60 e 70 °C a enzima apresentou atividade de 90 e 70 %, respectivamente. Em adição, na temperatura de 30 °C a enzima mostrou atividade de 67 % e cerca de 80 % na temperatura de 40 °C. Resultados semelhantes foram encontrados por Farid & Shata (2011), no qual foi verificado que a atividade da amilase produzida por *A. oryzae* LS1 aumentou gradualmente com o aumento da temperatura até 55 °C, com declínio de atividade após essa temperatura. Para Sahnoun *et al.* (2012) avaliando a efeito da temperatura (37- 77 °C) na atividade de duas α -amilases isoladas de *A. oryzae* S2, relataram que ambas as enzimas apresentaram uma temperatura ótima de 50 °C, restando 80% de suas atividades na faixa de temperatura de 40 a 55°C. A queda na atividade enzimática pode estar relacionada a uma possível desnaturação proteica, o que pode comprometer a utilização da enzima nestas temperaturas (RODRIGUES, 2022).

No estudo da termoestabilidade enzimática os resultados demonstraram que, a 40 °C a amilase foi estável durante as primeiras 4 h. Após esse tempo a enzima mostrou um decréscimo gradativo de atividade, quase chegando à inatividade após 24 h e apresentando $t_{1/2}$ = 12 h. Na temperatura de 50 °C foi observado uma diminuição gradativa de atividade até 1 h. Em intervalos de tempo acima de 1 h a enzima manteve aproximadamente 50 % de sua atividade durante todo o tempo de ensaio, com $t_{1/2}$ = 1 h. Quando incubada a 60 °C , a amilase de *Aspergillus* sp. também apresentou uma queda contínua de sua atividade até 1 h. Retendo cerca de 55 % de sua atividade até 4 h, e exibindo uma segunda queda de atividade entre 4 a 8 h, mantendo 30 % de sua atividade entre 12 até 24 h, com $t_{1/2}$ = 8 h. Com isso, apesar da atividade ótima da amilase ocorrer a 50 °C é visto que a enzima não possui estabilidade por muito tempo nesta temperatura. Todavia, a temperatura de 40 °C é a melhor para os ensaios cinéticos e pode ser importante do ponto de vista em se usar temperaturas menores,

que são cruciais em termos de gastos de energia elétrica, seja para aquecimento ou refrigeração, para sua aplicação industrial.

Figura 11 - Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da amilase.



A) Temperatura ótima. (B) Termoestabilidade enzimática, durante 24 h. (▲) 40 °C; (■) 50 °C; (●) 60 °C. A atividade de $955,63 \pm 13,13 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ foi considerada como 100%.

Para Alva *et al.* (2007), os estudos da termoestabilidade da amilase isolada de *Aspergillus* sp. JGI 12 indicam uma diminuição geral na estabilidade da enzima com o tempo de 0 a 50 min em todas as temperaturas avaliadas (25 – 60 °C). A amilase de *Aspergillus* sp. JGI 12 mostrou a maior estabilidade a 25 °C e menor estabilidade a 60 °C. No entanto, mesmo a 60 °C a enzima reteve 60 % de sua atividade por 50 min (Alva *et al.*, 2007). No trabalho de Pereira (2014), as amilases produzidas por *A. oryzae* após 60 min de incubação do extrato enzimático mostraram atividade enzimática de 94%, 50% e 0% nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C, respectivamente.

De acordo com Hussain *et al.* (2013) aumentos na temperatura podem levar a um aumento na atividade catalítica da enzima durante a reação, mas também podem acelerar a desnaturação induzida por temperaturas mais altas. Assim como a resistência ao pH, o efeito da temperatura e a termoestabilidade enzimática fornecem informações relevantes para a aplicação industrial, na qual espera-se que a enzima mantenha sua atividade por um longo período de operação (HUSSAIN *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2010).

5.2.3 Efeito de sais e agentes químicos na atividade enzimática

Em relação ao efeito de sais e de agentes químicos verificou-se que a atividade enzimática não apresentou alterações significativas na presença de Fe^{3+} , K^+ e β -mercaptoetanol na concentração de 5 mmol.L^{-1} (Tabela 4). Em adição, a atividade enzimática foi estimulada significativamente por Ca^{2+} em cerca de $18,58 \pm 2,76 \%$, corroborando com Varalakshmi *et al.* (2008). Para ele, a atividade da α -amilase de *A. niger* JG1 24 foi potencializada por cálcio na concentração de 10 mmol.L^{-1} (VALARAKSHMI *et al.*, 2008). A afinidade das α -amilases por Ca^{2+} é muito maior do que para outros íons devido à presença deste íon na estrutura da enzima (GUPTA *et al.*, 2003; FAR *et al.*, 2020). No entanto, há relatos em que a α -amilase de *A. oryzae* EI 212 foi inativada na presença de Ca^{2+} , mas reteve sua atividade após o ensaio com EDTA (GUPTA *et al.*, 2003). Além disso, a atividade enzimática também foi estimulada por Mn^{2+} ($66,79 \pm 5,09 \%$), Mg^{2+} ($55,78 \pm 1,05 \%$) e Ni^{2+} ($26,98 \pm 5,54 \%$). Para Agrawal *et al.* (2019) os íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} apresentaram efeitos positivos na atividade da β -amilase. No caso do Mn^{2+} na concentração de 5 mmol.L^{-1} houve um incremento de 57% na atividade enzimática (AGRAWAL *et al.*, 2019), o que corrobora com este trabalho.

Em contrapartida, observou-se que os íons de metais pesados Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , e os agentes químicos SDS, EDTA e etanol 50% exerceram a inibição da atividade enzimática, em ambas as concentrações. O mesmo foi constatado por Agrawal *et al.* (2019) para os íons Cu^{2+} e Ag^+ , considerados inibidores potentes mesmo em baixas concentrações. Ademais, o efeito inibitório de Hg^{2+} e Cu^{2+} também foram relatados por Patel *et al.* (2005) para a α -amilase de *A. niger*.

Tabela 4 - Efeito de sais e agentes químicos na atividade da amilase.

Aditivo	Atividade relativa (%)	
	5 mmol.L ⁻¹	10 mmol.L ⁻¹
Controle	103,81 ± 4,0	103,81 ± 4,0
NaCl	53,35 ± 9,0*	33,52 ± 2,28
HgCl ₂	0*	0*
FeCl ₃	87,97 ± 9,76	66,71 ± 8,68*
KCl	116,17 ± 14,35	48,01 ± 6,27*
CoCl ₂	63,31 ± 7,98*	22,32 ± 2,90*
ZnCl ₂	79,96 ± 9,97*	55,56 ± 7,20*
LiCl	60,53 ± 5,03*	63,80 ± 2,35*
SrCl ₂	65,18 ± 9,18*	43,64 ± 6,17*
MnCl ₂	166,79 ± 5,09*	141,24 ± 3,47*
MgSO ₄	155,78 ± 1,05*	46,31 ± 9,27*
CaCl ₂	118,58 ± 2,76*	25,61 ± 6,76*
CuSO ₄	54,21 ± 12,05*	14,63 ± 7,50*
AgNO ₃	0*	0*
NiSO ₄	126,98 ± 5,54*	48,60 ± 1,51*
SDS	68,41 ± 1,55*	52,46 ± 9,96*
EDTA	61,87 ± 7,27*	31,76 ± 7,24*
β-mercaptoetanol	94,68 ± 8,90	45,44 ± 9,95*
Etanol 50%	49,18 ± 5,59*	38,45 ± 13,12*

Os dados representam as médias ± DP (n = 3). Controle: atividade na ausência de aditivos. A atividade de 940,23 ± 8,08 U.mg⁻¹ foi considerada como 100%. (*) Diferença significativa pelo teste de Dunnett (p < 0,05).

6 CONCLUSÃO

As amilases produzidas por microrganismos possuem uma importante relevância nos diferentes setores industriais. As amilases representam mais de ¼ do mercado enzimas, sendo um grupo relevante de catalisadores biológicos utilizados em diferentes aplicações biotecnológicas.

O presente estudo mostrou que, por intermédio da utilização dos resíduos agroindustriais, quirera de arroz e torta de óleo de amêndoa, foi obtido por meio do cultivo em fermentação em estado sólido (FES) do fungo *Aspergillus* sp., uma amilase com elevada atividade extracelular produzida na temperatura de 25 °C e no tempo de cultivo de 2 dias.

A caracterização das propriedades cinéticas da amilase de *Aspergillus* sp. mostrou que a enzima possui máxima atividade em pH 5,0 e, tanto em valores de pH mais ácidos (até pH 3,0) quanto valores de pH alcalino (até pH 10,0), a enzima apresentou atividade superior a 50 %. Além disso, a enzima manteve sua atividade amilolítica quando incubada previamente entre pH de 4,0 até 5,5. Quando incubada em valores de pH igual a 3,0 ou em valores de pH de 6,0 a 10,0, a amilase de *Aspergillus* sp. manteve sua atividade acima de 50 % em relação a atividade controle. Essa propriedade pode ser crucial para aplicações biotecnológicas dessa enzima em condições amplas de variação de pH. A amilase de *Aspergillus* sp. exibiu máxima atividade na temperatura de 50 °C, e apresentou atividade amilolítica acima de 60 % nas temperaturas de 30, 40, 60 e 70 °C. A enzima manteve-se estável a temperatura de 40 °C por 4 h, com $t_{1/2} = 12$ h. Já nas temperaturas de 50 até 60 °C, a amilase ainda reteve cerca de 50 % de sua atividade até 4 h. As características físico-químicas apresentadas são interessantes para a utilização em processos industriais, pois a amilase de *Aspergillus* sp. atua em condições amplas de pH e temperatura em valores além de sua atividade ótima. Além disso, a enzima teve sua atividade amilolítica estimulada pela presença de 5 mmol.L⁻¹ de Mn²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺ e Ca²⁺.

Assim, pode-se concluir que a amilase produzida por *Aspergillus* sp., por exibir produção enzimática em um meio de baixo custo e apresentar características bioquímicas promissoras, é propícia para possíveis aplicações industriais. Com isso, os resultados deste trabalho são animadores e dão suporte tanto do ponto de vista em conhecer as propriedades bioquímicas da enzima em estado purificado, quanto

no potencial biotecnológico da enzima na hidrólise das diferentes fontes de amido provenientes da agroindústria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, D. C.; DWEVEDI, A.; KAYASTHA, A. M. Biochemical and thermodynamic characterization of de novo synthesized β -amylase from fenugreek. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 786- 797, 2019.

ALMEIDA, A. P. **Produção, purificação, caracterização e avaliação do potencial biotecnológico da endo-xilanase do fungo termófilo *Humicola brevis* var. *thermoidea***. 102 f. Dissertação (Bioquímica e Biologia Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2021.

ALVA, S.; ANUPAMA, J.; SAVLA, J.; CHIU, Y. Y.; VYSHALI, P.; SHRUTI, M.; YOGEEETHA, B. S.; BHAVYA, D.; PURVI, J.; RUCHI, K.; KUMUDINI, B. S.; VARALAKSHMI, K. N. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 576 -581, 2007.

ALVES, Y. L.; ROCHA, F. T. B.; COSTA, R. M. P. B.; PORTO, A. L. F. **Produção de enzimas por *Aspergillus* spp. através de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais como substrato**. Anais I Congresso Internacional de Meio Ambiente e Sociedade – CONIMAS e III Congresso Internacional da Diversidade do Semiárido – CONIDIS. Campina Grande: Realize Editora, 2019.

ALIYAH, A.; ALAMSYAH, G.; RAMADHANI, R.; HERMANSYAH, H. Production of α -Amylase and β -Glucosidase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation method on biomass waste substrates from rice husk, bagasse and corn cob. **Energy Procedia**, v. 136, p. 418- 423, 2017.

ARAÚJO, L. A. **Cinética da produção de amilases produzido por *Aspergillus* sp. FSDE16 em bagaço de malte**. 34 f. Trabalho Final de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

BAIOCCHI, M. L. M. **Aproveitamento de subproduto do beneficiamento de arroz: Desenvolvimento de farinha modificada como alternativa para a indústria de panificação**. 103 f. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

BALAKRISHNAN, M.; JEEVARATHINAM, G.; KUMAR, K. S.; MUNIRAJ, I.; UTHANDI, S. Optimization and scale-up of α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes. **BMC Biotechnology**, v. 21, n. 1; p. 1- 11, 2021.

BASSETO, E. N. **Produção de amilase por *Penicillium* sp. a partir de cultivo em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais**. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biotecnologia) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, 2017.

BELLO-PEREZ, L. A.; FLORES-SILVA, P. C.; AGAMA-ACEVEDO, E.; TOVAR, J. Starch digestibility: Past, present, and future. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 14, p. 5009-5016, 2020.

BOLINA, I. C. A.; CONTIGLI, C.; SANTOS, M. H.; CREN, E. C. Caracterização centesimal e quantificação das fibras alimentares das tortas da polpa e amêndoa de macaúba. *In*: Anais do Simpósio Latino-Americano de Ciências de Alimentos, Anais eletrônicos, Campinas, Galoá, 2015. Disponível em:<<https://proceedings.science/slaca/slaca-2015/papers/caracterizacao-centesimal-e-quantificacao-das-fibras-alimentares-das-tortas-da-polpa-e-amendoa-de-macauba?lang=pt-br>>. Acesso em: 22 set. 2022.

BOŽIĆ, N.; LONČAR, N.; SLAVIĆ, M. Š.; VUJČIĆ, Z. Raw starch degrading α -amylases: an unsolved riddle. **Amylase**, v. 1, n. 1, p. 12- 25, 2017.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291- 302, 2006.

CRIPWELL, R. A.; VAN ZYL, W. H.; VILJOEN-BLOOM, M. Fungal Biotechnology: Fungal Amylases and Their Applications. **Journal: Encyclopedia of Mycology**, p. 326-336, 2021.

DA CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; DE SANTANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção de Alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em Resíduos de Cascas de Mandioca. **Journal of Health Sciences**, v. 13, n. 4, p. 245-249, 2011.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, p. 945- 954, 2009.

DRULA, E.; GARRON, M. L.; DOGAN, S.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B.; TERRAPON, N. The Carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 1, p. D571- D577, 2022.

FAR, B. E.; AHMADI, Y.; KHOSROUSHAHI, A. Y.; DILMAGHANI, A. Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 10, n. 3, p. 350-358, 2020.

FARID, M. A. F.; SHATA, H. M. A. H. Amylase production from *Aspergillus oryzae* LS1 by solid-state fermentation and its use for the hydrolysis of wheat flour. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 267- 274, 2011.

FUJINAMI, S.; FUJISAWA, M. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes – past, present and future. **Environmental Technology**, v. 31, n. 8-9, p. 845- 856, 2010.

GANGADHARAN, D.; JOSE, A.; NAMPOOTHIRI, K. M. Recapitulation of stability diversity of microbial α -amylases. **Amylase**, v. 4, n. 1, p. 11- 23, 2020.

GE, X.; VASCO-CORREA, J.; LI, Y. Solid-State Fermentation Bioreactors and Fundamentals. *In*: LARROCHE, C.; SANROMAN, M. A.; DU, G.; PANDEY, A. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Bioprocess, Bioreactors and Controls**. 1^a Ed. Elsevier, 2017. p. 381- 402.

GOPINATH, S.; ANBU, P.; ARSHAD, M.; LAKSHMIPRIYA, T.; VOON, C. H.; HASHIM, U.; CHINNI, S. Biotechnological Process in Microbial Amylase Production. **BioMed Research International**, v. 2017, p.1-9, 2017.

GUIMARÃES, L. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; JUNIOR, A. B.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 474-480, 2006.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599- 1616, 2003.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301 – 306, 2005.

HUSSAIN, I.; SIDDIQUE, F.; MAHMOOD, M. S.; AHMED, S. I. A Review of the Microbiological Aspect of α -amylase Production. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 15, n. 5, p. 1029- 1034, 2013.

IUGA, M.; MIRONEASA, S. A review of the hydrothermal treatments impact on starch based systems properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 22, p. 3890- 3915, 2020.

KARIM, K. M. R.; TASNIM, T. Fungal glucoamylase production and characterization: A review. **Bioresearch Communications- (BRC)**, v. 4, n. 2, p. 591- 605, 2018.

LAUFENBER, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167- 198, 2003.

LÄUFER, A. Starch biorefinery enzymes. *In*: WAGEMANN, K.; TIPPKÖTTER, N. Biorefineries. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 166. Springer, 2017.

LE CORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Starch Nanoparticles: A Review. **Biomacromolecules**, v.11, n. 5, p. 1139- 1153, 2010.

LIMA, R. C. F. **Produção da enzima α -amilase por *Aspergillus niger* em fermentação no estado sólido utilizando bagaço de malte de cevada**. 99 f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2019.

LORENZETT, D.B.; NEUHAUS, M. ; SCHWAB, N. T. Gestão de resíduos e a indústria de beneficiamento de arroz. **Revista Gestão Industrial**, v. 8, n. 1, p. 219- 232, 2012.

LUZ, J. A. **Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido utilizando *Aspergillus niger*, a partir de Resíduos de *Croton linearifolius***. 81 f. Dissertação (Ciências Ambientais) – Centro de Ensino, Pesquisa e Extensão Socioambiental, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2018.

MANIVANNAN, S.; MADHAVI, P.; BHUVANESWARI, S. Production and Optimization of α -Amylase from *Aspergillus flavus* under Solid State Fermentation. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 7, n. 3, p. 298- 303, 2015.

MESBAH, N. Industrial biotechnology based on enzymes from extreme environments. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 1- 16, 2022.

MEYER, V.; BASENKO, E. Y.; BENZ, J. P.; BRAUS, G. H.; CADDICK, M. X.; CSUKAI, M.; DE VRIES, R. P.; ENDY, D.; FRISVAD, J. C.; GUNDE-CIMERMAN, N.; HAARMANN, T.; HADAR, Y.; HANSEN, K.; JOHNSON, R. I.; KELLER, N. P.; KRAŠEVEC, N.; MORTENSEN, U. H.; PEREZ, R.; RAM, A. F. J.; RECORD, E.; ROSS, P.; SHAPAVAL, V.; STEINIGER, C.; VAN DEN BRINK, H.; VAN MUNSTER, J.; YARDEN, O.; WÖSTEN, H. A. B. Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1- 23, 2020.

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

MOSJOV, K. Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review. **International Journal of Management IT and Engineering (IJMIE)**, v. 2, n. 10, p. 583-609, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7ªed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2019.

NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J. M.; YOUNG, M. M. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 1, p. 80-85, 2006.

OH, S. M.; LEE, B. H.; SEO, D. H.; CHOI, H. W.; KIM, B. Y.; BAIK, M. Y. Starch nanoparticles prepared by enzymatic hydrolysis and self-assembly of short-chain glucans. **Food and Biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 585- 598, 2020.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, p.81-84, 2003.

PARKER, K.; SALAS, M.; NWOSU, V. C. High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 5, n. 5, p. 71- 78, 2010.

PATEL, A. K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; RAMACHANDRAN, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Partial purification and characterization of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* using spent-brewing grains. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 336- 341, 2005.

PAUL, J.; GUPTA, N.; BELIYA, E.; TIWARI, S.; JADHAV, S. K. Aspects and recent trends in microbial α -amylase: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 8, p. 2649- 2698, 2021.

PEREIRA, J. L. **Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus oryzae* através de fermentação no estado sólido**. 57 f. Monografia de Conclusão de Curso (Farmácia) – Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2014.

PINTO, E. S. M.; DORN, M.; FELTES, B. C. The tale of a versatile enzyme: Alpha-amylase evolution, structure, and potential biotechnological applications for the bioremediation of n-alkanes. **Chemosphere**, v. 250, p. 1- 18, 2020.

RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A. K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; CHANDRAN, S.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Alpha amylase from a Fungal Culture Grown on Oil Cakes and Its Properties. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 309- 317, 2004.

RAY, R. R. β -amylases from various fungal strains. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 51, n. 1-2, p. 85- 85, 2004.

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Analytical Biochemistry**, v. 116, n. 1, p. 53-64, 1981.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. 161 f. Dissertação (Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2010.

RODRIGUES, E. M. G. Produção de amilase por fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Aspergillus niger* e determinação do pH e temperatura ótimos na atividade enzimática. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v. 12, n. 1, p. 08- 20, 2022.

RULLER, R.; ALPONTI, J.; DALIBERTO, L. A.; ZANPHORLIN, L. M.; MACHADO, C. B.; WARD, R. J. Concomitant adaptation of a GH11 xylanase by directed evolution to create an alkali-tolerant/ thermophilic enzyme. **Protein Engineering, Design & Selection**, v. 27, n. 8, p. 255- 262, 2014.

SABOURY, A. A. Stability, activity and binding properties study of α -amylase upon interaction with Ca^{2+} and Co^{2+} . **Biologia- Section Cellular and Molecular Biology**, v. 57, n. 11, p. 221- 228, 2002.

SAUER, J.; SIGURSKJOLD, B. W.; CHRISTENSEN, U. Glucoamylase: Structure/function relationships, and protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n.2, p. 275- 293, 2000.

SCHIRMER, M.; JEKLE, M.; BECKER, T. Starch gelatinization and its complexity for analysis. **Starch-Stärke**, v. 67, n. 1-2, p. 30- 41, 2015.

SCHOLANT, A. F. **Processo enzimático de liquefação e a sacarificação da farinha de grãos do arroz cultivar BRS-AG**. 70 f. Dissertação (Engenharia Química) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2020.

SHARMA, A.; PARASHAR, D.; SATYANARAYANA, T. Acidophilic microbes: biology and applications. **Biotechnology of Extremophiles**, p. 215- 241, 2016.

SHRUTHI, K.; YADAV, P. S.; PRASAD, B. V. S.; CHANDRA, M. S. Cellulase production by *Aspergillus unguis* in solid state fermentation. **Journal of Forestry Research**, v. 30, n. 1, p. 205- 212, 2019.

SIVARAMAKRISHNAN, S.; GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 66, p. 621-626, 2007.

SOUZA, R. L. A.; OLIVEIRA, L. S.C.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Characterization of polygalacturonase produced by solid-state fermentation using the residue of passion fruit as substrate. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 9, p. 987- 992, 2010.

SUGANTHI, R.; BENAZIR, J. F.; SANTHI, R.; RAMESH KUMAR, V.; ANJANA HARI, N. M.; NIDHIYA, K. A.; KAVITHA, G.; LAKSHMI, R. Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. **International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)**, v. 3, n. 2, p. 1756- 1763, 2011.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T. P. K. α -Amylase Production and Applications: A Review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 166-175, 2014.

VAIDYA, S.; SRIVASTAVA, P. K.; PRAGYARATHORE; PANDEY, A. K. Amylases: a prospective enzyme in the field of biotechnology. **Journal of Applied Biosciences**, v. 41, n. 1, p. 1- 18, 2015.

VARALAKSHMI, K. N.; KUMUDINI, B.S.; NANDINI, B. N.; SOLOMON, J.; SUHAS, R.; MAHESH, B.; KAVITHA, A. P. Production and Characterization of α -Amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 Isolated in Bangalore. **Polish Journal of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 29- 36, 2008.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; AVILA, L. A. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1184- 1192, 2008.

WINDISH, W. W.; MHATRE, N. S. Microbial amylases. **Advances in Applied Microbiology**, v. 7, p. 273- 304, 1965.

WOICIECHOWSKI, A. L.; CARVALHO, J. C.; SPIER, M. R.; YAMAGUISHI, C. T.; GHIGGI, V.; SOCCOL, C. R. Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. *In*: PASTORE, G. M; BICAS, J. L.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R. Biotecnologia de Alimentos. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2013. p. 143- 171.

XU, Q. S.; YAN, Y. S.; FENG, J. X. Efficient hydrolysis of raw starch and ethanol fermentation: a novel raw starch-digesting glucoamylase from *Penicillium oxalicum*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1- 18, 2016.