



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



JOÃO VICTOR SOUZA RIBEIRO

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE UMA AMILASE PRODUZIDA PELO FUNGO
TERMOFÍLICO *Rasamsonia composticola***

**CAMPO GRANDE/MS
NOVEMBRO/2022**

JOÃO VICTOR SOUZA RIBEIRO

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
UMA AMILASE PRODUZIDA PELO FUNGO TERMOFÍLICO**

Rasamsonia composticola

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Mato Grosso do Sul (UFMS), como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.**

**Orientador (a): Prof^o. Dra. Fabiana Fonseca
Zanoelo**

**Campo Grande/MS
Novembro/2022**

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOÃO VICTOR SOUZA RIBEIRO

Produção, purificação e caracterização bioquímica de uma amilase produzida pelo fungo termofílico *Rasamsonia composticola*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

18 de Novembro de 2022

Comissão Examinadora:

Profª Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo (Orientadora)

Instituto de Biociências - INBIO

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Msc. Isabela Pavão Vargas

Instituto de Biociências - INBIO

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Msc. Rodrigo Mattos Silva Galeano

Instituto de Biociências - INBIO

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família por sempre estar me apoiando e dando suporte na construção de minha carreira, fazendo o que fosse possível para eu obter o conhecimento, sou muito grato pela presença deles nessa minha caminhada.

Agradeço a Deus, por estar comigo nesta caminhada.

A Jéssica, minha companheira árdua de toda essa jornada que foi a nossa graduação, presente nos meus piores e melhores momentos, além dos conhecimentos da que ganhei faculdade, pude ter a oportunidade de ganhar uma amiga como você.

Aos meus amigos Andreza, Bruna, Leal, Rodrigo e Romário, por estarem sempre presentes nos momentos de distração, me apoiando nos meus estudos e ensinamentos passados.

A minha orientadora Fabiana Fonseca Zanoelo por ter me proporcionado essa pesquisa, a qual conseguiu concretizar a área que queria seguir. Agradeço por toda atenção, paciência, compreensão, ensinamentos e acolhimento que foram agregados a mim nesses anos de orientação, serei eternamente grato, muito obrigado,

A Prof Gi, por sempre estar solucionando minhas dúvidas, pelas oportunidades de estudos que a senhora me proporcionou, e por sempre estar acolhendo a gente no laboratório.

Agradeço a Nel, Isa Pavão, Aline Almeida pelos ensinamentos de trabalhar com os fungos, a me ensinar técnicas usadas para obtenção desse trabalho.

Aos meus amigos de graduação Júlia, Lucas, por sempre estar me ajudando, e fazendo companhia.

Ao pessoal do laboratório de bioquímica, os quais passei a conviver muitos momentos, muito obrigado.

A UFMS pelo apoio, infraestrutura e oportunidade de realizar uma faculdade, que abriu as portas do meu conhecimento, muito obrigado.

“A educação tem raízes amargas,
mas os seus frutos são doces”.

Aristóteles

RESUMO

Amilases ou enzimas complexo amilolítico fazem parte uma classe de enzimas responsáveis por hidrolisar ligações glicosídicas do amido, e podem ser classificadas como: α -amilase, β -amilase e glucoamilase. Estas enzimas são utilizadas em diversos setores industriais, com destaque na indústria alimentícia. Os fungos filamentosos se destacam na produção de amilases, utilizando substratos agroindustriais como fonte de carbono. Este trabalho teve como objetivo otimizar a produção, purificação e caracterização bioquímica de uma amilase produzida pelo fungo termofílico *Rasamsonia composticola*. Para a produção de amilase, foi realizado o cultivo em fermentação em estado semi-sólido (FES) utilizando resíduos agroindustriais de baixo custo. Também foram avaliados parâmetros como fontes de carbono, misturas das fontes de carbono, nitrogênio e efeito da temperatura no crescimento, na produção enzimática e tempo de cultivo. A purificação da amilase foi realizada em duas etapas cromatográficas: troca iônica (DEAE- Fractogel) seguida de cromatografia hidrofóbica (Phenyl-Sepharose). A enzima foi caracterizada bioquimicamente, quanto ao efeito do pH, temperatura, íons e substratos. Dentre os resíduos utilizados, a mistura de casca de maracujá e casca extrusada de laranja em FES (1:1) foi melhor (3,87 U/mL para a produção da amilase). A melhor fonte de nitrogênio para a produção de amilase foi a peptona (1%). A temperatura e tempo de cultivo mais adequado para a produção de amilases foram de 40°C e 96 horas. A amilase foi purificada 18 vezes com um rendimento de 69%. O pH e temperatura ótimos foram 4,6 e 55°C, respectivamente. A enzima hidrolisou amido (100%) e xilana (59%). Foi ativada na presença de CaCl_2 (264%) e inibida por HgCl_2 , CuSO_4 e EDTA. Sugerimos que se trata de uma glucoamilase (E.C. 3.2.1.3.) com as características obtidas. O fungo termofílico *Rasamsonia composticola* produziu amilase a partir de resíduos agroindustriais de baixo custo, e a purificação e caracterização demonstram potencial da enzima para um futuro uso biotecnológico.

Palavras-chaves: Amilase, *Rasamsonia composticola*, fungo termofílico, caracterização bioquímica .

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
2. Objetivos.....	19
3. Metodologia.....	20
3.1. Manutenção das culturas.....	20
3.2. Produção do Complexo Amilolítico do fungo <i>Rasamsonia composticola</i> em Fermentação em Estados Sólida (FES).....	20
3.3. Efeito da mistura de fonte de carbono na produção de amilase em Fermentação em Estado-Semi-Sólido (FES).....	21
3.4. Efeito da fonte de nitrogênio na produção de amilase.....	21
3.5. Efeito da temperatura e tempo no crescimento e produção da amilase.....	22
3.6. Determinação da atividade amilolítica.....	22
3.7. Quantificação de proteínas.....	22
3.8. Purificação da Amilase de <i>Rasamsonia composticola</i>	22
3.9. Caracterização bioquímica da amilase semi-purificada.....	23
3.9.1. Efeito da temperatura na atividade amilolítica.....	23
3.9.2. Efeito do pH na atividade amilolítica.....	23
3.9.3. Efeito do substrato na atividade amilolítica.....	23
3.9.4. Efeito de íons e EDTA na atividade enzimática.....	23
3.10. Classificação da amilase.....	24
3.11. Análise de dados.....	24
4. Resultados e Discussão.....	25
4.1. Produção do Complexo Amilolítico do fungo <i>Rasamsonia composticola</i> em Fermentação em Estados Sólida (FES).....	25

4.2. Efeito da mistura de fonte de carbono na produção de amilase em Fermentação em Estado-Semi-Sólido (FES).....	26
4.3. Efeito da fonte de nitrogênio na produção de amilase.....	26
4.4. Efeito da temperatura no crescimento e produção da amilase...	27
4.5. Efeito do tempo no crescimento e produção da amilase.....	28
4.6. Purificação da Amilase de <i>Rasamsonia composticola</i>	29
4.7. Caracterização bioquímica da amilase semi-purificada.....	32
4.7.1. Efeito da temperatura na atividade amilolítica.....	32
4.7.2. Efeito do pH na atividade amilolítica.....	33
4.7.3. Efeito do substrato na atividade amilolítica.....	34
4.7.4. Efeito de íons e EDTA na atividade enzimática.....	34
4.8. Determinação da enzima por método descrito por Xia.....	35
5. Conclusão.....	37
6. Referências Bibliográficas.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos polímeros de amido, amilose e amilopectina. Fonte: Robyt, 1998.....	15
Figura 2. Esquema com diferentes tipos de amilases e suas ações na degradação do polímero de amido. Fonte modificada: Antranikian, 2002.....	16
Figura 3. Efeito da temperatura no crescimento e produção de amilase de <i>Rasamsonia composticola</i>	28
Figura 4. Efeito do tempo de cultivo na produção de amilase de <i>Rasamsonia composticola</i>	29
Figura 8. Perfil Cromatográfico da Amilase de <i>Rasamsonia composticola</i>	31
Figura 9. Efeito da temperatura na atividade da amilase de <i>Rasamsonia composticola</i>	32
Figura 10. Efeito do pH na atividade amilolítica de <i>Rasamsonia composticola</i>	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito das fontes de carbono para a produção da amilase <i>Rasamsonia composticola</i>	25
Tabela 2. Efeito da mistura de carbono na produção de amilase de <i>Rasamsonia composticola</i>	26
Tabela 3. Efeito da fonte de nitrogênio na produção da amilase de <i>Rasamsonia composticola</i>	27
Tabela 4. Purificação da amilase extracelular de <i>Rasamsonia composticola</i> ..	31
Tabela 5. Efeito de substratos na atividade enzimática de <i>Rasamsonia composticola</i>	34
Tabela 6. Efeito de íons e EDTA na atividade enzimática de <i>Rasamsonia composticola</i>	35
Tabela 7. Determinação de classe de amilase de <i>R. composticola</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA	Batata, dextrose e ágar
BSA	Soro albumina bovina
CAZy	Enzima ativa de carboidratos
DEAE	Dietilaminoetil
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FES	Fermentação em estado sólido
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSm	Fermentação submersa
GH	Hidrolases glicosídeos
GH13	Hidrolases glicosídeos da família 13
GH14	Hidrolases glicosídeos da família 14
GH15	Hidrolases glicosídeos da família 15
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
h	hora
min	minuto
OFAT	<i>One-factor-at-a-time</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
Tris	Hidroximetil Aminometano
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
RPM	Rotações por Minutos

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

nm	Nanômetro
α	Alfa
β	Beta
°C	Grau Celsius
mL	Mililitro
% p/p	Percentual peso por peso
g	Gramma
$\times g$	Força centrífuga relativa
μL	Microlitro
L	Litro
mg/mL	Miligramma por mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
% m/v	Percentual massa por volume
μL	Microlitro
μmol	Micromol
U totais	Unidades totais
U.g^{-1}	Unidades por grama
U.mL^{-1}	Unidades por mililitro

1. INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos são microrganismos heterotróficos que apresentam notável diversidade no que se refere à morfologia, bioquímica e fisiologia, cuja importância para processos biotecnológicos é atualmente indiscutível. Possuem células relativamente simples e de fácil manipulação laboratorial, se comparadas com culturas de células vegetais ou animais (Dumont, *et al.* 2020). Estes microrganismos podem possuir habilidades para adaptação a ambientes extremos, nos quais fatores como pH, temperatura e pressão atmosférica ultrapassam valores considerados como padrão para a maioria dos seres vivos (Wikandari, *et al.* 2022).

Os fungos termofílicos são aqueles que conseguem sobreviver e se desenvolver em temperaturas elevadas, e a maioria apresenta máximo de crescimento entre 50 a 60°C (Berikten, 2021). Muitas espécies de fungos termofílicos conhecidas atualmente, foram isoladas de diferentes ambientes naturais, como solo, matéria orgânica em decomposição, compostagens, de plantas ou animais. O predomínio destes organismos nesses materiais deve-se principalmente às temperaturas elevadas, bem como a umidade, condições aeróbias e suplemento de carboidratos e nitrogênio presentes nessa massa orgânica (Wikandari, 2022). Estes diferentes “habitats” e a competição com outros microrganismos, é devido à diversidade metabólica dos fungos filamentosos. Tal diversidade faz com que esses microrganismos tenham grande potencial para produção de uma extensa faixa de metabólitos primários e secundários de pesos moleculares baixos, e também enzimas hidrolíticas intra e extracelulares (Xu, 2022; Mur, *et al.* 2021).

Os fungos são capazes de produzir enzimas utilizando resíduos agroindustriais como farelo de trigo, casca de maracujá e laranja, palha de milho, o que é vantajoso devido ao baixo custo, um menor gasto de energia e uma alta produtividade de enzimas (Guimarães, 2022; Paul e Gupta, 2021). As enzimas fúngicas são utilizadas em diversos setores industriais, como a degradação de poluentes, recuperação de bioprodutos, na indústria farmacêutica, de alimentos e

produção de biocombustíveis (Barakat, *et al.* 2022). Ademais, há vantagens de serem usadas enzimas fúngicas pela redução no uso de água e por ser um bioproduto não tóxico (Malik, *et al.* 2021).

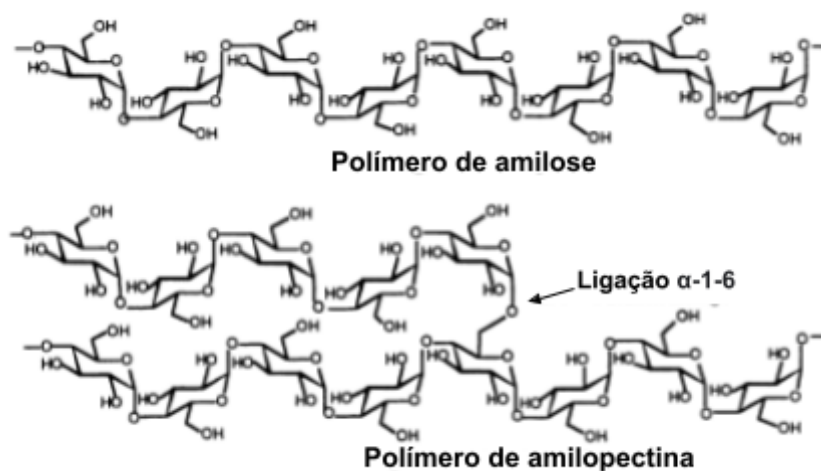
Os fungos termofílicos são importantes no setor industrial por serem capazes de produzir enzimas termoestáveis que podem ser utilizadas nas indústrias por exemplo na hidrólise de amido e na bioconversão da matéria orgânica (Yurdugul, 2022). Entre os fungos termofílicos, os que se destacam na produção de enzimas termoestáveis, pode-se citar, *Humicola brevis* var. *thermoidea*, *Scytalidium thermophilum*, *Thermomyces lanuginosa*, *Talaromyces emersonii* e *Rhizopus oryzae* (Mesbah, 2022; Masui *et al.*, 2012; Norouzian *et al.*, 2006; Zanoelo, *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2002).

O fungo *Rasamsonia composticola* foi recentemente descrito na literatura e apresenta características promissoras a serem exploradas. O gênero *Rasamsonia* é composto por seis espécies, na qual cinco destas foram transferidas do gênero *Talaromyces* ou *Geosmithia* (Houbraken, *et al.* 2012), e também foi definido como um organismo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 2014. O fungo tem sido estudado pelo nosso grupo de pesquisa e se mostrado promissor na produção de enzimas, como as xilanases (Franco, 2018), beta-glucosidases (Vargas, 2019) e amilases, portanto foi o escolhido para a realização deste trabalho.

1.1 Amido e Enzimas do Complexo Amilolítico

O amido é produzido por espécies vegetais como um carboidrato de reserva, e assim sendo uma importante fonte de carboidrato para outras espécies heterotróficas (Busi, *et al.* 2021). Em sua estrutura o amido possui cadeias de amilose e amilopectina sendo assim um homopolissacarídeo (Figura 1). A amilose é uma cadeia linear formada por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4. Já a amilopectina é um polímero ramificado formado por unidades de D-glicose unidas em α -1,4 e α -1,6 (Paul e Gupta, 2021). O amido é encontrado em cereais (como trigo e milho), em folhas e tubérculos (como bananas) e alguns legumes (Chi, *et al.* 2022).

Figura 1. Estrutura dos polímeros de amido, amilose e amilopectina.



Fonte modificada: Robyt, 1998.

A degradação do amido ocorre pela ação das enzimas do complexo amilolítico, também conhecidas como amilases. As amilases são classificadas como hidrolases pela comissão de enzimas (E.C 3.2.1.-), (<https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>), pertencentes, a família de hidrolases de glicosídeos (GH) (<http://www.cazy.org>). As amilases podem ser encontradas geralmente nas famílias GH13, GH14 e GH15 (Paul e Gupta, 2021). Sua ação consiste na transferência de prótons de um aminoácido ácido para o oxigênio glicosídico, seguido por um ataque da molécula de água desprotonada, e recebendo assistência de outro aminoácido (Polaina, *et al.* 2011). Essas enzimas podem ser divididas em quatro grupos principais, conforme sua ação: endoamilases (como as α -amilases) , exoamilase (β -amilases e glucoamilases), desramificadoras e transferases (Figura 2) (Castro, *et al.* 2011; Gangadharan, *et al.* 2020).

Uma das mais conhecidas é o grupo das α -amilase (1,4- α -D-glucano glucanohidrolase, EC 3.2.1.1), um exemplo de endoamilase, pertencente à família GH13. Elas catalisa a hidrólise de maneira aleatória dentro de uma molécula de amido, clivando as ligações α -1,4 glicosídicas internas do amido liberando glicose, maltose e oligossacarídeos de cadeia curta, como maltotriose, maltotetraose e malto pentose (Paul e Gupta, *et al.* 2021).

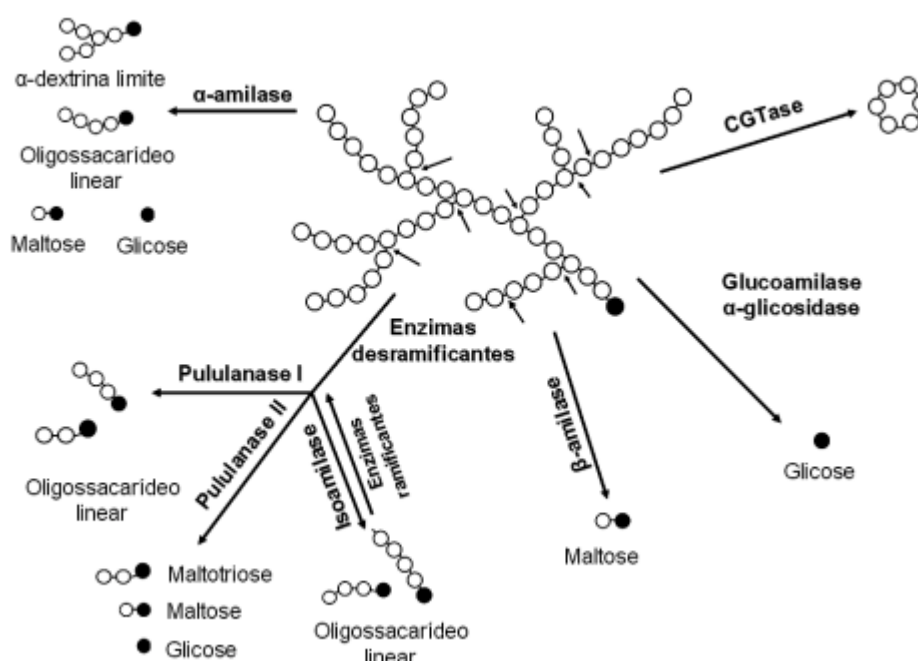
As β -amilases (1,4- α -D glucano maltohidrolase, EC 3.2.1.2) são exoamilases que atuam na extremidade não redutora do amido, hidrolisando as ligações glicosídicas α -1,4, liberando maltose como produto (Paul e Gupta, 2021).

As glucoamilases (1,4- α -D glucano glucohidrolase, EC 3.2.1.3), pertencem a família GH15 com domínios catalíticos em forma de barris (α/α) (<http://www.cazy.org>). São exoenzimas que clivam as ligações α -1,4 e α -1,6 das extremidades não redutoras de polímeros de amilose e amilopectinas da molécula de amido, liberando produtos de β -D-glucose, por essas características promovem a hidrólise quase completa do amido (Li, *et al.* 2021).

As amilases desramificadoras, conhecidas como pululanases, promovem a hidrólise da ligação α -1,6 desramificando a cadeia da amilopectina (Liu, Zheng e Song, 2019). Por fim, as transferases são responsáveis pela conversão do amido em ciclodextrinas, o qual transfere um grupo glicosil do amido para um aceptor que contém hidroxila da mesma dextrina formando glicoconjugados. Uma das transferases mais conhecidas é a ciclodextrina glucanotransferase (CGTase) (Rasti, 2021).

Além disso, a maioria das amilases são metaloproteínas, pois requerem a presença de cátions como o Cálcio (Ca^{+2}) e Manganês (Mn^{+2}) para sua atividade, estabilidade e manutenção da conformação estrutural (Janeček, *et al.* 2020; Polizeli, *et al.* 2017).

Figura 2. Esquema com diferentes tipos de amilases e suas ações na degradação do polímero de amido



Fonte modificada: Bertoldo e Antranikian, 2002.

1.2 Amilases e aplicações biotecnológicas

As amilases estão entre as enzimas mais importantes para a indústria, representando 25 a 30% do mercado global de enzimas (Cripwell, *et al.* 2021). O interesse por essas enzimas nas indústrias vem aumentando consideravelmente devido à enorme variedade de aplicações nos diversos setores (Dumont, *et al.* 2020). Pode-se citar alguns exemplos, como o uso de amilases para diminuir a turbidez e clarificar sucos de frutas, produção de edulcorantes para refrigerantes a partir do amido, produção de biocombustíveis (bioetanol), na lavagem têxtil (Mondal, *et al.* 2022; Rossel, *et al.* 2022; Busi, *et al.* 2021).

Usualmente, a glucoamilase é produzida em fermentação de estado sólido (FES), um processo com baixo custo com menor uso de água, reduzindo o uso de energia, baixa contaminação por bactérias e com uma alta produtividade (Karim, 2018). Ademais, a suplementação com uma fonte de nitrogênio à fermentação, pode

influenciar a produção da enzima, aumentando mais ainda sua produtividade (Karim, *et al.* 2018).

Além disso, na aplicação é necessário um grau de pureza para alguns processos biotecnológicos, como na panificação com o uso de α -amilase, na produção de xarope com o uso de glucoamilase, para uma ação mais específica da enzima (Mondal, *et al.* 2022; Paul, *et al.* 2022). A cromatografia empregada segue as características físico-químicas das enzimas, a fonte de carbono que a enzima foi produzida, e a tecnologia da coluna de purificação. Esse processo é uma das etapas de maior custo nos processos biotecnológicos (Pavezzi, 2006).

Portanto, sabe-se que as enzimas podem ser produzidas utilizando diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono, logo surge uma maneira de realizar um pré-tratamento desses resíduos, pois o descarte inadequado desses substratos colaboram para poluição ambiental com a emissão de gases poluentes que acarretam inúmeras preocupações ambientais. Esses resíduos podem ser pré-tratados por hidrólises químicas, físicas e biológicas. Destacando-se a hidrólise biológica, pois é um das alternativas mais sustentáveis para o meio-ambiente com a produção de enzimas do tipo hidrolases (Paul, 2022; Pamidipati, 2017). A amilase, responsável por clivar o polissacarídeo de amido na presença de água, está incluída no grupo de hidrolases, tendo como ação refinar inúmeros produtos, e por isso possui grande importância industrial. Por conseguinte, sua produção se torna viável com o pré-tratamento dessas fontes de carbono alternativas e possível aplicação da enzima num futuro biotecnológico (Bušić, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho consistiu em otimizar a produção de uma amilase produzida pelo fungo termofílico *Rasamsonia composticola* utilizando resíduos agroindustriais. Além disto, realizar a purificação e caracterização bioquímica da enzima.

2.2 Objetivo Específico

- Produção do complexo amilolítico do fungo *Rasamsonia comosticola* em Fermentação em Estados Sólida (FES) e Fermentação em Submersa (FSm);
- Efeito da mistura de fonte de carbono na produção de amilase em Fermentação em Estado-Semi-Sólido (FES);
- Efeito de divers fontes de carbono, nitrogênio na produção de amilase;
- Efeito da temperatura e tempo no crescimento e produção da amilase;
- Purificação da Amilase de *Rasamsonia composticola*;
- Caracterização bioquímica da amilase semi-purificada.

3. METODOLOGIA

3.1 Manutenção do Microrganismo

O fungo *Rasamsonia composticola* foi mantido através de repiques periódicos em tubos de ensaio contendo meio sólido de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), e incubados em estufa a 50 °C por um período de 7 a 10 dias. Após o crescimento, os fungos foram armazenados em geladeira à 4 °C, podendo ser utilizados por um período de até 30 dias.

O preparo do meio BDA se deu com 200 g de batata sem casca e em cubos, 13g de Ágar Ágar, 20g de dextrose e 1000 mL de água destilada. A batata foi cozida, depois filtrada e amassada em gaze, e com o sumo resultante foi adicionado a dextrose, ágar e completado o volume até 1000 mL. O material foi autoclavado por 20 minutos a 1,5 kgf/cm².

3.2 Produção do Complexo Amilolítico do fungo *Rasamsonia composticola* em Fermentação em Estados Sólida (FES)

Foram testadas sete fontes de carbono em FES como: farelo de trigo, palha de milho, casca de maracujá, casca extrusada de laranja, farelo de arroz, bagaço de cana e bagaço de cana explodido.

A produção da amilase seguiu a metodologia *one-factor-at-a-time* (OFAT), a qual foi empregada para determinar um teste por vez a fim da padronização para a melhor fonte de carbono, misturas de fonte de carbono e nitrogênio, tempo e temperatura para produção da amilase.

Em um erlenmeyer de 125 mL foram colocados 2,5 g do substrato esterilizado e 10 ml de água destilada para manutenção da umidade. O material foi devidamente autoclavado por 20-30 min a 127 °C. Os conídios foram obtidos a partir de uma suspensão aquosa, acrescentando-se 10 mL de água destilada estéril no tubo de ensaio raspando-se a superfície da cultura com uma pipeta. O volume de 5 mL dessa suspensão contendo aproximadamente 10⁸ conídios foram utilizados para inóculo. Os frascos foram mantidos em estufa bacteriológica à 50 °C, com controle de umidade, por um período de 96 horas.

Para extração da solução enzimática bruta foram acrescentados 20 mL de água destilada gelada ao substrato fermentado e mantidos por 30 minutos, sob

agitação moderada aproximadamente 100 rpm. O meio foi filtrado em papel filtro, com auxílio de uma bomba à vácuo, seguido de centrifugação a 10000 x g, por 20 minutos a 4°C. O pellet foi descartado e sobrenadante utilizado como solução enzimática bruta para dosagens enzimáticas.

3.3 Efeito da mistura de fonte de carbono na produção de amilase em Fermentação em Estado-Semi-Sólido (FES)

Foi avaliado a influência das misturas de fontes de carbono (1:1) em FES. As fontes de carbono utilizadas foram: casca extrusada de laranja, farelo de trigo e palha de milho, tendo um controle apenas com casca de maracujá pois foi o melhor para produção de amilase. O material foi incubado por 96 horas à 50 °C. Após esse período o material filtrado para a obtenção do extrato bruto extracelular, conforme descrito no item 3.2.

3.4 Efeito da fonte de nitrogênio na produção de amilase

Uma vez definido a melhor fonte de Carbono e tipo de fermentação, variáveis como fonte de Nitrogênio, temperatura e tempo de crescimento foram avaliadas.

Foram testadas fontes inorgânicas de nitrogênio como uréia e sulfato de amônio, e orgânicas, como peptona e extrato de levedura em FES, utilizando casca de maracujá e casca extrusada de laranja (1:1), como fonte de carbono, tendo um controle apenas com casca de maracujá. O crescimento ocorreu em 96 horas a 50°C, conforme descrito no item 3.2

3.5 Efeito da temperatura e tempo no crescimento e produção da amilase

O experimento foi realizado em FES, utilizando casca de maracujá e casca extrusada de laranja (1:1) como fonte de carbono. Os frascos foram colocados para crescimento em diferentes temperaturas: 40 °C; 50 °C e 55 °C por 96 horas. A produção de amilase foi avaliada em diferentes tempos de cultivo de 24h á 168h em FES conforme descrito no item 3.2.

3.6 Determinação da atividade amilolítica

A atividade amilolítica foi determinada utilizando o método de dosagem de açúcares redutores (Miller, 1959). O meio reacional era composto por 50 µL de tampão McIlvaine pH 5,0 (McIlvaine, 1921), contendo 1% de amido, 25 µL de H₂O

e 25 µL da solução enzimática. A solução foi incubada por 10 minutos a 50 °C, e interrompida com a adição de 100 µL de ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS), seguido de aquecimento em banho fervente.

Em seguida, uma alíquota de 100 µL foi colocada em microplaca para leitura a 540 nm utilizando-se leitor de microplacas SpectraMax 384 *Plus Molecular Devices* (CA-USA). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 umol de açúcar redutor por minuto, a partir de uma curva de glicose como padrão.

3.7 Quantificação de proteínas

A concentração de proteína (mg.mL⁻¹) durante os estudos realizados foi utilizado o método descrito por Lowry (1951) utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

3.8 Purificação da Amilase de *Rasamsonia composticola*

Após padronização das melhores condições para produção da amilase, a enzima foi submetida ao processo de purificação com 310 mL de extrato bruto.

A amostra foi concentrada em liofilizador, e ressuspenso com tampão Tris-HCL 50 mM em pH 8,0 e aplicado 40mL em cromatografia de troca iônica DEAE-Fractogel (Merck) (1,5 x 5 cm), pré-equilibrada com o mesmo tampão da amostra e eluída com um gradiente de 2 M de NaCl. Frações de 1 mL foram coletadas por meio do Coletor de Frações da Bio Rad 2110, e submetidas a leitura de proteína em espectrofotômetro a 280 nm e dosagem enzimática.

Os tubos com maior atividade de amilase foram reunidos e dialisados contra água. Para aplicação numa próxima coluna cromatográfica a amostra foi equilibrada em tampão Tris-HCL 50mM pH 8,0 com 2 Molar de NaCl, e aplicada em cromatografia de interação hidrofóbica *Phenyl Sepharose (cross linked, G&E)* (1 x 9,8 cm), eluída com o mesmo tampão. As frações de 1mL/tubo foram coletadas, seguindo-se leitura de proteína em espectrofotômetro a 280 nm e dosagem de atividade enzimática. Os tubos com maior atividade foram reunidos e dialisados contra água, e utilizados nos experimentos de caracterização bioquímica.

3.9 Caracterização bioquímica da amilase semi-purificada

3.9.1. Efeito da temperatura na atividade amilolítica

A fim de encontrar a temperatura ótima da enzima foram analisadas temperaturas de 45°C a 70°C, com uma variação de 5°C, conforme descrito no item 3.7. Os resultados obtidos foram expressos em atividade relativa, considerando-se 100 % a temperatura com maior atividade enzimática.

3.9.2 Efeito do pH na atividade amilolítica

Para a determinação do pH ótimo da enzima, foram analisados os pH de 3.0 ao 8.0 utilizando tampão Mcllvaine e 1% de amido, conforme descrito no item 3.7. Os resultados obtidos foram expressos em atividade relativa, considerando-se 100 % o pH com maior atividade enzimática.

3.9.2 Efeito de substratos na atividade enzimática

A atividade da amilase foi mensurada utilizando-se substratos: Avicel, Carboximetilcelulose (CMC), Sacarose, Xilana e Pectina. A metodologia utilizada foi de dosagem de açúcares redutores de Miller (1959) como descrito no item 3.6.

3.9.3 Efeito de íons e EDTA na atividade enzimática

A atividade da amilase semi-purificada foi avaliada na presença de íons nas concentrações de 1 e 5 mM, nas condições ótimas de ensaio, conforme padronizadas nos itens 3.9.1 e 3.9.2. Os íons analisados foram Cu^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} , K^{+2} , Mg^{+2} , Al^{+2} , Zn^{+2} , NH^{+4} , Hg^{+2} e ação quelante do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) também foi analisada nas mesmas concentrações.

Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo o controle 100% sem adição de sais e/ou EDTA.

3.10 Classificação da amilase

Para a determinação da classe da amilase foi utilizado o método descrito por Xiao(2006), o qual se compara a atividade amilolítica em método de iodo (Fuwa, 1954) baseado no desenvolvimento da cor pelas ligações de iodo em polímeros de amido, e em método DNS descrito no item 3.6. Para a α -amilase a atividade enzimática no método de iodo é cinco vezes maior do que no método de DNS, já a glucoamilase possui valor equivalente em ambos os ensaios.

3.11 Análise dos Dados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados representam a média e desvio padrão. As estatísticas e confecção dos gráficos foram realizadas pelo software GraphPad Prism 8.0.2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção do Complexo Amilolítico do fungo *Rasamsonia composticola* em Fermentação em Estados Sólida (FES)

Os resultados a seguir demonstram que o fungo *Rasamsonia composticola* secreta amilase em fontes de carbono de baixo custo. A tabela 1 apresenta a produção de amilase pelo fungo termofílico em diferentes resíduos agrícolas (farelo de trigo , palha de milho , casca de maracujá , casca extrusada de laranja , bagaço de cana , farelo de arroz e bagaço explodido de cana. Neste experimento o crescimento foi realizado em triplicata, e os valores expressos em U/mL.

Pode-se observar que as melhores fontes de carbono para a produção de amilase foram casca de maracujá (12,26 U/mL), seguido de palha de milho (8,85 U/mL), casca extrusada de laranja (7,51 U/mL), farelo de trigo (6,91 U/mL). Abdulaal (2018) utilizou a fonte de carbono da casca de laranja e obteve bons resultados na produção de enzimas do complexo amilolítico por *Trichoderma pseudokoningii*. A casca de maracujá, produziu a maior quantidade da enzima, contudo esse substrato possui grande quantidade de açúcar redutor, interferindo no resultado final da dosagem por DNS. Substratos com baixa concentração de glicose favorecem a produção de glucoamilase, logo a alta concentração de glicose do substrato inibe a secreção de glucoamilase (Karim, 2018).

Tabela 1. Efeito das fontes de carbono para a produção da amilase *Rasamsonia composticola*.

Fonte de carbono	U/mL
Farelo de trigo	6,91±3,63
Palha de milho	8,85±3,60
Casca de Maracujá	12,26±4,58
Casca extrusada de laranja	7,51±3,96
Bagaço de Cana	2,94±0,63
Farelo de arroz	1,98±0,35

4.2 Efeito da mistura de fontes de carbono na produção de amilase

Para esse experimento foram realizadas misturas de casca de maracujá , palha de milho , casca extrusada de laranja e farelo de trigo . Na tabela 2 podemos observar a produção de amilase em relação ao efeito da mistura de fontes de carbono na produção de amilase.

Foi observado um aumento na produção da amilase na mistura de casca de maracujá com casca extrusada de laranja com 3,87 U/mL. A casca de laranja por apresentar um pH ácido, pode representar uma boa fonte de carbono para produção da amilase fúngica, já que os mesmos possuem preferência para pH mais baixos, enquanto a casca de maracujá pode fornecer oligoelementos suficientes para produção enzimática (Okoth, 2000; Dakhmouche, 2006). Alguns substratos não conseguem fornecer todos os nutrientes, logo a suplementação com outras fontes de carbono auxiliam a nutrição do fungo logo seu crescimento e a produção dessas enzimas (Paul e Gupta, 2021).

Tabela 2. Efeito da mistura de carbono na produção de amilase de *Rasamsonia composticola*.

Fonte de carbono	U/ml
Controle	2,55±0,70
Casca de Maracujá + Palha de milho	1,86±0,68
Casca de Maracujá + Cascas Extrusada de Laranja	3,87±0,42
Casca de Maracujá + Farelo de Trigo	1,58±1,4

4.3 Efeito das Fontes de Nitrogênio na produção enzimática

Foram testadas quatro fontes de nitrogênio, sendo elas duas inorgânicas (ureia e amônio) e as outras duas orgânicas (peptona e extrato de levedura) em FES com casca de maracujá e casca extrusada de laranja (1:1). Na tabela 3 estão apresentadas a atividade enzimática de amilase com o efeito de diversas fontes de nitrogênio. O controle sem nitrogênio apresentou 2,85 U/mL, na presença de amônia e ureia se obteve atividade de 2,6 U/mL e 2,7 U/mL respectivamente, enquanto que na presença de peptona o incremento em sua atividade foi observado com de 4,21 U/mL.

Como observado, a peptona, uma fonte de nitrogênio orgânica, influenciou na produção de amilase pelo fungo. Diversos, outros estudos revelaram uma certa

preferência pelos microrganismos por fontes de nitrogênio orgânicas, que foram melhores para o crescimento de microrganismos e a produção de enzimas (Goyal; Gupta; Soni, 2005). A utilização de fontes orgânicas se beneficia a enzima para seu uso em processos biotecnológicos, por serem não tóxicas para sua utilização (Karim, 2019)

Tabela 3. Efeito da fonte de nitrogênio na produção da amilase de *Rasamsonia composticola*.

Fonte de nitrogênio	U/mL
Controle	2,85±1,44
Sulfato de amônio	2,6±0,04
Ureia	2,7±0,6
Peptona	4,21±0,7
Extrato de levedura	0,71±0,3

4.4 Efeito da temperatura no crescimento e produção enzimática

Foram testadas três temperaturas para o crescimento e produção da amilase, em fermentação de estado semi-sólido. Na figura 3 pode-se observar a produção de amilase pelo *Rasamsonia composticola*.

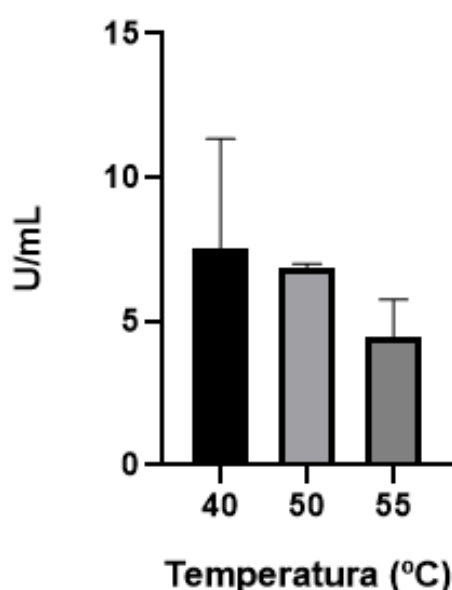
Observa-se uma melhor produtividade de amilase em 40 °C (7,55 U/mL), seguido de 50 °C (6,87 U/mL), e uma redução na atividade a 55 °C (4,44 U/mL). Os fungos termofílicos, apresentam como principal característica, o crescimento e produção de enzimas em altas temperaturas. Os resultados obtidos corroboram a classificação de *Rasamsonia composticola*, como um fungo termofílico (Berikten, 2021).

A temperatura influencia diretamente na produção de enzimas o qual em altas temperaturas há sua desnaturação, no entanto a enzima produzida pelo fungo *Rasamsonia composticola*, se demonstra promissora em sua produção em temperaturas elevadas demonstrando sua estabilidade a esse fator (Karim, 2018)

Na literatura se encontram trabalhos como de Nahar (2008) com uma temperatura de 45 °C para sua produção de amilase a partir do fungo *Rhizopus*. O fungo *Humicola lanuginosa* e *Streptomyces erumpens* tem sua produção ótima de amilase em 50 °C (Kumari, *et al.* 2019). Outros fungos como *Aspergillus oryzae* produção na temperatura de 60 °C (Parbat e Shingai, 2011).

Uma das principais características que se procuram para aplicação biotecnológica da amilase é sua termoestabilidade, logo a enzima apresentou seu crescimento em temperaturas elevadas demonstrando sua estabilidade (Kumari, *et al.* 2019).

Figura 3. Efeito da temperatura no crescimento e produção de amilase de *Rasamsonia composticola*.

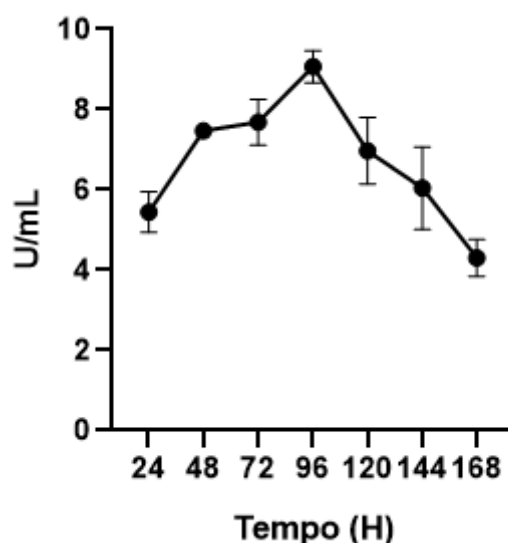


4.5 Efeito do tempo de cultivo na produção de amilase

Foi analisada a produção da amilase extracelular a cada 24h. É observado uma maior produção até 96h após esse tempo começa a diminuição da atividade. Na figura 7 observa-se o gráfico com o tempo ótimo de cultivo em 96 horas (15,21 U/ml).

Bhatti(2007) e Ramadas (1996) observaram a produção de amilase a partir do quarto dia de crescimento em *Aspergillus niger* e *Fusarium solani*. Esse decréscimo da produção é devido a deficiência de nutrientes e assim são formadas proteases que degradam a enzima como fonte de nutrientes (Feroza, 1998).

Figura 4. Efeito do tempo de cultivo na produção de amilase de *Rasamsonia composticola*.



4.6 Purificação da amilase de *Rasamsonia composticola*

Após a padronização das melhores condições para produção de amilase do fungo termofílico *Rasamsonia composticola*, deu-se início ao processo de purificação enzimática. A quantidade de meio utilizado foi escalonada a fim de se obter uma maior quantidade de enzima ao final do processo fermentativo. A amostra obtida foi então filtrada, centrifugada e o sobrenadante liofilizado para aplicação nas colunas cromatográficas DEAE-Fractogel Phenyl-Sepharose (figura 8 A e B). O resumo das etapas de purificação pode ser observado na tabela 4.

Ao aplicar o extrato bruto contendo 142 mg/mL de proteínas na coluna DEAE-Fractogel foi obtido 1 pico de atividade enzimática, antes do gradiente, e dois picos de proteína, um antes e outro após o gradiente. O processo garante uma boa separação dos contaminantes. O pico com atividade de amilase foi dialisado contra água, e realizado a aplicação na coluna hidrofóbica Phenyl-Sepharose, a qual foi obtido 1 pico de atividade amilolítica, após a diálise do material houve a realização da determinação da atividade na qual se demonstrou perda do rendimento da enzima. O valor de purificação foi obtido pela razão de proteínas totais de cada etapa e a proteínas totais do extrato bruto aplicado na Phenyl-sepharose. O rendimento foi obtido pela razão da atividade total de uma etapa e da atividade total

do extrato bruto aplicado na primeira coluna. A amilase de *Rasamsonia composticola* após suas etapas de purificação exibiu uma purificação em 18 vezes com um rendimento de 69%, como demonstra sua tabela de purificação (tabela 04).

Nouadri (2010) purificou uma amilase de *Penicillium camemberti*, em coluna de troca iônica (DEAE-Sepharose), obteve-se um perfil cromatográfico com apenas um pico de proteína e de atividade amilolítica.

Trabalhos de purificação de enzimas amilolíticas produzidas pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* de Hoschke (2002) apresentou a purificação de uma glucoamilase em 8 vezes com um rendimento de 60%. Polizeli et al, (2008) obteve uma purificação de 81 vezes com rendimento de 51% em glucoamilase de *Scytalidium thermophilum* em apenas um passo cromatográfico de coluna troca iônica. A α -amilase purificada de *Trichoderma pseudokoningii* produzida em substrato de casca de laranja, foi purificada em 15 vezes com um rendimento de 18%, em cromatografia de DEAE-Sepharose e Sephacryl S-200 (Abdulaal, 2018)

Figura 8. Perfil Cromatográfico da Amilase de *Rasamsonia composticola* em (A) DEAE-Fractogel (B) Phenyl-Sepharose. (■) Absorbância a 280 nm e (▲)Atividade enzimática (U/mL), (—) Eluente. cromatográficas em DEAE-Sepharose e Sephacryl S-200 (Abdulaal, 2018).

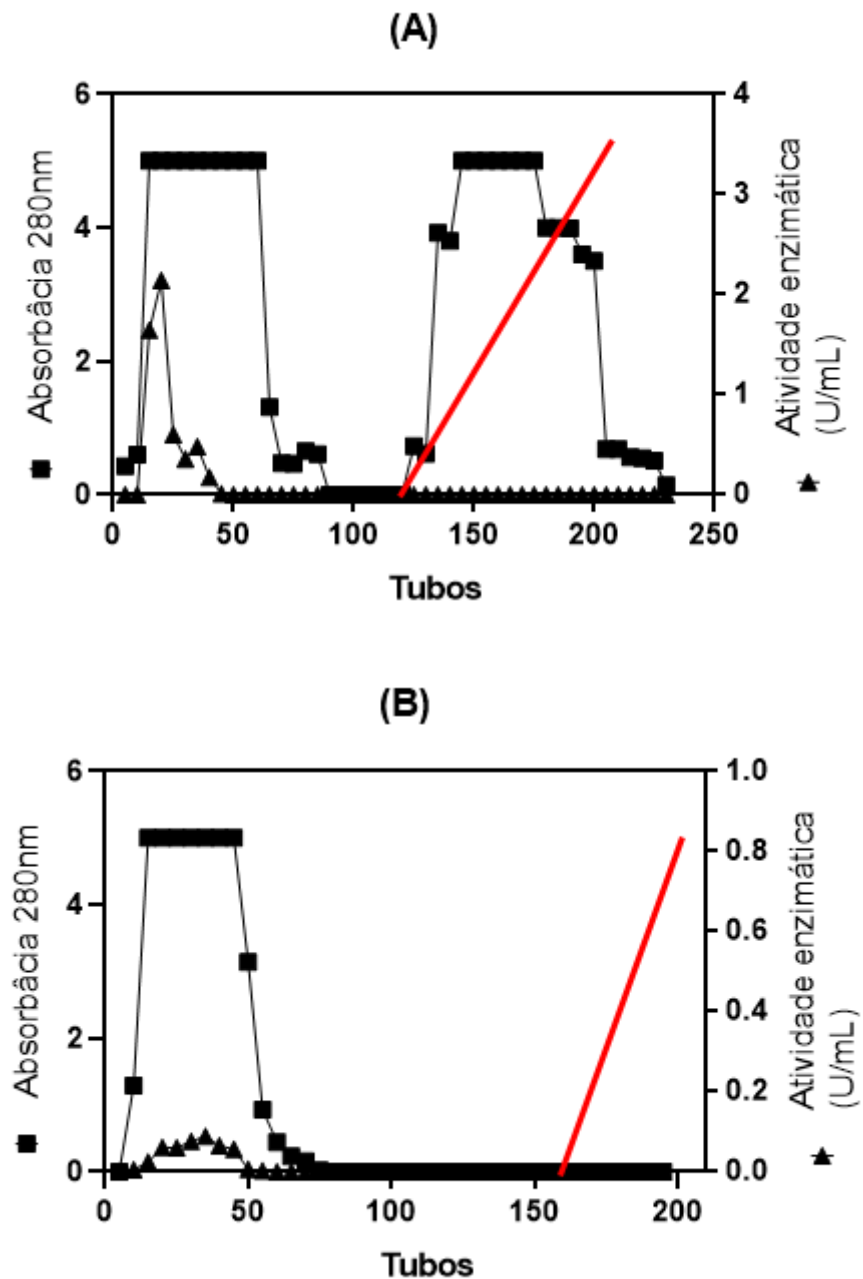


Tabela 4. Purificação da amilase extracelular de *Rasamsonia composticola*.

Etapas	Proteínas totais(mg/ml)	Atividades total(U/ml)	AE	Rendimento(%)	Purificação
Extrato liofilizado	142	105	0,144	100	1
DEAE-Fractogel	16	87	5,37	82	8,8
Phenyl Sepharose	7,6	73	9,6	69	18

4.7 Caracterização bioquímica da amilase semi-purificada de *Rasamsonia composticola*.

4.7.1. Efeito da temperatura na atividade amilolítica

A amilase purificada apresentou um aumento gradativo de sua atividade nas temperaturas de 45°C a 50°C alcançando seu valor ótimo em 55°C, como observado na figura 9.

Bahar e Çelebi (1998) encontraram para a glucoamilase purificada do fungo *Aspergillus niger*, com temperatura ótima de 55°C. Enquanto Thorsen (2006) apresentou a temperatura ótima de 70 °C para uma glucosamilase de *Thermomyces lanuginosus*. Logo, se observa uma temperatura ótima das glucoamilase fúngicas na faixa de 50 a 70°C. Enzimas com alta temperatura de atividade são mais estáveis a altas temperaturas, sendo úteis para a utilização em máquinas de panificação como por exemplo (Mondal, *et al.* 2022). Uma maior temperatura ocasiona uma maior agitação das moléculas, desestabilizando sua estrutura assim mudando sua conformação e não apresentando sua atividade catalítica (Tao, *et al.*, 2021).

Figura 9. Efeito da temperatura na atividade da amilase de *Rasamsonia composticola*. O gráfico foi expresso em atividade relativa com a maior atividade em 100%.

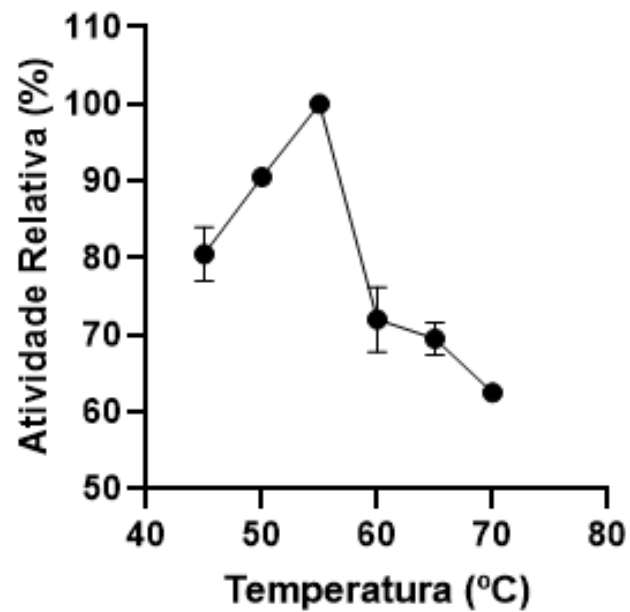


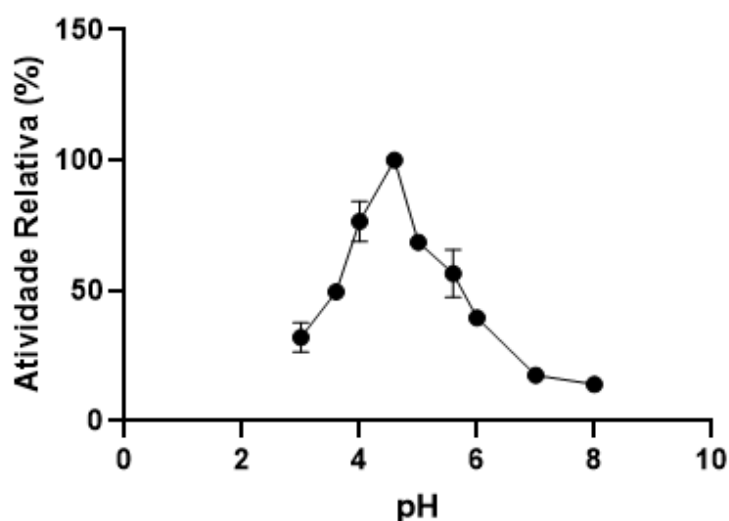
Figura 9. Efeito da temperatura na atividade da amilase de *Rasamsonia composticola*. O gráfico foi expresso em atividade relativa com a maior atividade em 100%.

4.7.2 Efeito do pH na atividade amilolítica

A avaliação do efeito do pH na atividade da enzima semi-purificada indicou que a faixa de 4,0 - 5,0 é a mais adequada para sua atividade, sendo o pH 4,5 o que se observou maior atividade. O gráfico (figura 10) demonstra a atividade relativa tendo a maior atividade como 100%.

No trabalho descrito por Hoschke (2002) ele encontrou a atividade ótima para uma α -amilase de *Thermomyces lanuginosus* na faixa de pH de 4.6-6.6, já para uma glucoamilase o autor observou o pH ótimo da enzima na faixa de 4.6-5.6, para enzimas purificadas de *Thermomyces lanuginosus*. Em *Aspergillus fumigatus*, o pH da glucoamilase ficou entre a faixa de 4,5 e 5,5 (Li e Liu, 2021). Portanto, se observa uma atividade ótima em faixa de pH mais ácidas, isso pode se dar pela carga de resíduos de aminoácidos presentes na enzima, sendo desnaturada em pH mais alcalinos pela mudança de carga de seus aminoácidos (Karim, 2018). Assim, as enzimas fúngicas apresentam uma ótima atividade em pH ácidos (El-Gendy, 2012).

Figura 10. Efeito do pH na atividade amilolítica de *Rasamsonia composticola*. A atividade foi expressa em atividade relativa com a maior atividade como 100%.



4.7.3 Efeito de substratos na atividade enzimática

A enzima purificada hidrolisou amido (100%) e outros polissacarídeos complexos como xilana (59%), carboximetilcelulose (32%), como observado na tabela 5.

CMC, Avicel e Sacarose, são oligossacarídeos que apresentam glicose em sua estrutura, e por isso são degradadas pela amilase. Além disso, deve-se considerar o fato da enzima estar semi-purificada, podendo haver a presença de outras enzimas, dentre elas as xilanases, o que pode explicar a atividade sobre a xilana. Em trabalho de Gao (2015) a α -amilase de *Aspergillus* também apresentou atividade em outros substratos que apresentava glicose na sua composição, como Glicogênio e Maltotriose.

Tabela 5. Efeito de substratos na atividade enzimática de *Rasamsonia composticola*.

Especificidade ao substrato	
Substrato	Atividade relativa (%)
Amido	100
Avicel	23±0,4
Xilana	59±0,3
Sacarose	11±0,2
Pectina maçã	ND
Pectina citrus	ND
CMC*	32±0,2

* CMC: Carboximetilcelulose.

ND: Não detectável

4.7.4 Efeito de íons e EDTA na atividade enzimática

O íon Ca^{+2} aumentou a atividade amilolítica em 264% (5mM), enquanto os íons Al^{+3} , NH_4^{+} e EDTA inibiram completamente sua atividade a 5mM. Na tabela 6, pode-se observar os resultados com diferentes concentrações de íons e EDTA, e são expressos em atividade relativa.

Chen (2005) avaliou o efeito de íons em uma glucoamilase purificada de *Chaetomium thermophilum* e a enzima aumentou sua atividade na presença de Ca^{+2} 50mM. Já no trabalho de Hoschke (2002) a α -amilase de *T. lanuginous* apresentou aumento de 135% na presença de Ca^{+2} 10mM, e na presença de Zinco

(Zn⁺²) 10mM houve a inibição de sua atividade com 24%. Sua inibição por Al⁺² (5mM), NH⁴ (5mM) e EDTA 5mM, Em trabalho de Gao (2015), foi realizado a caracterização de um α -amilase recombinante de *Aspergillus* expressa em *Geomyces pannorum*, a qual apresentou ativação na presença de Ca⁺² e uma das inibições por EDTA, processo que ocorre neste presente trabalho. Em trabalho com *Trichoderma pseudokoningii*, Abdulaal (2018) observou também aumento de 152% da amilase na presença de cálcio 5 mM. Esses achados podem ser explicados pelo envolvimento desses íons com as cadeias sulfidrilas da enzimas inativando-a (Nouadri, 2010).

Tabela 6. Efeito de íons e EDTA na atividade enzimática de *Rasamsonia composticola*.

Efeito de íons e EDTA na Atividade Enzimática		
Reagentes	Atividade relativa (%)	
	1mM	5mM
Controle	100	100
CuSO ₄	54±0,3	39±0,3
FeSO ₄	88±0,2	55±0,1
CaCl ₂	161±0,2	264±0,05
KCl	115±0,3	92±0,25
MgSO ₄	101±0,5	76±0,1
AlCl ₃	19±0,8	ND
ZnCl ₃	63±0,2	37±0,2
NH ₄ Cl	4±0,3	ND
HgCl ₂	49±0,1	22±0,1
EDTA	53±0,6	ND

ND: Não detectável

4.8. Classificação da amilase de *Rasamsonia composticola*.

Para determinação da classe da amilase, foi empregado o método descrito por Xiao (2006), o qual utiliza de ensaios utilizando métodos DNS (Miller, 1985) e Iodo (Fuwa, 1954.) Os resultados obtidos nesse experimento e as características bioquímicas, sugerem que a amilase de *Rasamsonia composticola* seria uma glucoamilase. Os resultados podem ser observados na tabela 7.

Nos estudos de Xiao (2006) a glucoamilase de *Aspergillus niger* (Sigma A-1602), obteve uma atividade de 205 U/mL para DNS e 202 U/mL para Iodo. Ademais, a glucoamilase cliva ligações das extremidades não redutoras do amido, liberando monômeros de glicose diminuindo assim a massa do amido impedindo a ação do Iodo. Por conta dessas características, a glucoamilase da família GH15 se apresenta promissora para produção de produtos provenientes do amido, como alimentos, na produção de biocombustível, diminuição de viscosidade (Mondal, *et al.* 2022; Rossel, *et al.* 2022; Busi, *et al.* 2021, Tao, *et al.*, 2021)

Tabela 7. Determinação de classe de amilase de *R. composticola*.

Amilase de <i>Rasamsonia composticola</i> (U/mL)	
*DNS	Iodo
8,8	7,81

*DNS: Ácido 3,5-Dinitrosalicílico.

5. CONCLUSÃO

O fungo termofílico *Rasamsonia composticola* produziu amilase em Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando resíduos agroindustriais (casca de maracujá e casca extrusada de laranja), como fonte de carbono, e 1% peptona como fonte de nitrogênio, a 40°C e 96 horas.

A enzima apresenta uma potencial uso na indústria de alimentos como de biocombustível, por conta de suas características bioquímicas. A enzima foi semi-purificada 18 vezes com um rendimento de 69%, utilizando duas etapas cromatográficas. A caracterização bioquímica demonstrou uma atividade ótima em faixa de pH ácido (4.6) e temperatura de 55°C. A enzima hidrolisou seu substrato o Amido (100%), Xilana (59%) e CMC (32%). Foi ativada na presença de Ca^{+2} , e inibida por Al^{+2} , NH_4 , e EDTA. Os resultados, obtidos sugerem que a enzima pertence à classe das glucoamilase.

Ademais, o fungo termofílico *Rasamsonia composticola* demonstrou ser um bom produtor de amilase, com características bioquímicas interessantes para uma possível aplicação em biotecnológica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulaal, W.H. Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. **BMC Biochem**, v. 19, p. 4, 2018.

Aguilar, C.N., *et al.* Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. **Process. Biochem.** v. 36, p. 565-570, 2001.

Barakat, K. M., *et al.* Bioethanol production from immobilized amylase produced by marine *Aspergillus flavus* AUMC10636, **Egypt. J. Aquat. Res.**, 2022.

Bahar, T., Çelebi, S. S., Characterization of glucoamylase immobilized on magnetic poly(styrene) particles, **Enzy. and Micro. Technol.**, v. 23, p. 301-304, 1998.

Berikten, D., Survival of thermophilic fungi in various preservation methods: A comparative study, **Cryobiol.**, v. 101, p. 38-43, 2021.

Bertoldo, C., Antranikian, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. **Biocatal. Biotransform.** v. 6, p. 151-160, 2002.

Bhatti, H.N., *et al.* Optimization of Media for Enhanced Glucoamylase production in solid-state fermentation by *Fusarium solani*. **Food. Technol. Biotech.** v. 45, p. 51–56, 2007.

BRENDA is available at www.brenda-enzymes.org).

Bušić, A., *et al.* Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: A review. **Food. Technol. Biotechnol.**, v. 56(3), p. 289-311, 2018.

Busi, M. V., Casati, D. F. G., *et al.* Characterization of SdGA, a cold-adapted glucoamylase from *Saccharophagus degradans*, **Biotechnol. Rep.** v. 30, 2021.

Castro, A. M., Castilho, L. R. Freire, D. M. G., *et al.* Valorization of residual agroindustrial cakes by fungal production of multienzyme complexes and their use in cold hydrolysis of raw starch. **Waste Biomass Valorization**, v. 2(3), p. 291-302, 2011.

Chen J, *et al.* Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *Chaetomium thermophilum*. **J. Gen. Appl. Microbiol.** v. 51(3), p. 175-81, 2005.

Chi, C., *et al.* Promoting starch interaction with caffeic acid during hydrothermal treatment for slowing starch digestion, **Innovative Food Sci. Emerg. Technol.** v. 82,

p. 103-168, 2022.

Cripwell, R. A., *et al.* Fungal Biotechnology: Fungal Amylases and Their Applications. **J Encyclop. of. Mycol.**, p. 326-336, 2021.

Dakhmouche, S. D., *et al.* Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder, **J. of Food. Engineer.**, v. 73, p. 190-197, 2006.

Demirjian *et al.* Enzymes from extremophiles. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 5, p. 144-151, 2001.

Dumont, M.J., *et al.* Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable Sustainable Energy Rev.** v. 117, p. 109-472, 2020.

Egbune, E. O., *et al.* Characterization of a surfactant-stable α -amylase produced by solid-state fermentation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) tubers using *Rhizopus oligosporus*: Kinetics, thermal inactivation thermodynamics and potential application in laundry industries, **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, v. 39, p. 102-290, 2022.

El-Gendy, M.M.A. Production of glucoamylase by marine endophytic *Aspergillus* sp. JAN-25 under optimized solid-state fermentation conditions on agro residues. **Aust. J. Basic. Appl. Sci.** v. 6, p. 41-54, 2012.

Feroza, B., *et al.* Production of Glucoamylase by *Aspergillus niger* in liquid culture and determination of its cultural condition. **Bangl. J. Sci. Indus.** v. 33, p. 309-311, 1998.

Franco, D. G. Produção, purificação e caracterização bioquímica de uma xilanase produzida pelo fungo termofílico *Rasamsonia composticola* utilizando resíduos agroindustriais. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular)** - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Orientador: Fabiana Fonseca Zanoelo. 2018.

Fuwa, H., A new method for microdetermination of amylose activity by the use of amylose as the substrate, **The J. of Biochem.**, v. 41, p.583–603, 1954.

Gangadharan, D., Jose, A., Nampoothiri, K. M. Recapitulation of stability diversity of microbial α -amylases. **Amylase.** v. 4, p. 11-23, 2020.

Gao, B., *et al.* Development of a novel *Aspergillus* uracil deficient expression system and its application in expressing a cold-adapted α -amylase gene from Antarctic fungi

Geomyces pannorum, **Process. Biochem.** v. 50, p.1581-1590, 2015.

Goyal, N., Gupta, J. K., Soni, S. K. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. **Enzyme Microb. Technol.** v. 37, p. 723-734, 2005.

Guimarães, N. C. A., *et al.* Polygalacturonase from *Aspergillus japonicus* (PGAj): Enzyme production using low-cost carbon source, biochemical properties and application in clarification of fruit juices, **Biocatal. Agric. Biotechnol.** v. 39, p. 102-233, 2022

Houbraken, J. *et al.* C. *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. **Anton. van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 403-421, 2012.

Hoschke, A., *et al.* Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626, **Enzyme Microb. Technol.** v. 31, 2002.

Janeček, S., *et al.* Fungal α -amylases from three GH13 subfamilies: their sequence-structural features and evolutionary relationships, **Internat. J. of Bio. Macromol.**, v. 159, p. 763-772, 2020.

Karim M. R., *et al.* Fungal Glucoamylase Production and Characterization. **Biores Comm.** v. 4, p. 591- 605, 2018.

Kumari, N., *et al.* Microbial amylases: An overview on recent advancement. **J Entomol Zool Stud.** v. 7, p. 198-205, 2019.

Li, J., Liu, S., *et al.* Expression and characterization of a raw-starch glucoamylase from *Aspergillus fumigatus*, **Process Biochem.** v. 111, p. 97-104, 2021.

Liu, F., Zheng, H., Song, H., *et al.* Effects of different carbohydrate-binding modules on the enzymatic properties of pullulanase, **Internat. J. of Biolog. Macromol.** v. 137, p. 973-981, 2019.

Lowry, O. H.; *et al.* Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p; 265-276, 1951.

Malik, B., *et al.* Microbial amylases: an overview on recent advancement. **J. of Entomol. and Zoo. Stud.**, v. 7, p. 198-205, 2019.

Masui, D. C.; *et al.* Production of a xylose-stimulated β -glucosidase and a

cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *thermoidea* under solid state fermentation. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 28, p. 2689-2701, 2012.

McIlvaine T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **J. Biol. Chem.** v. 49, p. 183–186. 1921

Mesbah, N. M. Industrial Biotechnology Based on Enzymes From Extreme Environments. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 10, 2022.

Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.** v. 3, p. 26-428. 1959

Mondal, K. C., *et al.* Microbial Amylase: Old but still at the forefront of all major industrial enzymes, **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, v. 45, p. 102-509, 2022.

Mur, L. A. J., Sun, Y., *et al.* Secondary metabolites of endophytic fungi isolated from *Huperzia serrata*, **Fitoterapia**, v. 155, p. 104970, 2021.

Nahar, S., *et al.* Production of glucoamylase by *Rhizopus* in liquid culture. **Pak. J. Bot.** v. 40(4), p. 1693-1698, 2008.

Nguyen, Q. D.; *et al.* Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzy. and Microb. Technol.**, v. 31, p. 345-352, 2002.

Norouzian, D. A., *et al.* Fungal glucoamylases. **Biotechnol Adv.**, v. 24, n. 1, p. 80-85, 2006.

Nouadri, T., *et al.* Purification and characterization of the α -amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. **African J. of Biochem. Resear.** v. 4. p. 155-162, 2010.

Okoth, M.W, *et al.* The effect of homogenisation, stabiliser and amylase on cloudiness of passion fruit juice, **Food Control**, v. 11, , p. 305-311, 2000.

Pamidipati, S., *et al.* Degradation of Lignin in Agricultural Residues by locally Isolated Fungus *Neurospora discreta* . **Appl Biochem Biotechnol**, v. 181, p. 1561–1572, 2017.

Pavezzi, Fabiana Carina. Produção e caracterização de glucoamilases termoestáveis de *Aspergillus awamori* obtidas por PCR mutagênico e expressas em *Saccharomyces cerevisiae*. 71 f. **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista**, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2006.

Paul J. S., Gupta N, Beliya E, Tiwari S, Jadhav SK. Aspects and Recent Trends in Microbial α -Amylase: a Review. **Appl Biochem Biotechnol.** ;v. 193, p. 2649-2698, 2021.

Paul, J. S., *et al.* Valorization of rice milled by-products (rice husk and de-oiled rice bran) into α -amylase with its process optimization, partial purification and kinetic study, **Process. Biochem.** v. 120, p. 101-113, 2022.

Parbat, R., Singhal, B. Production of glucoamylase by *Aspergillus oryzae* under solid state fermentation using agro industrial products. **Internat. J. Microbiol. Res.** v. 2, p. 204-207, 2011.

Polaina, J., *et al.* Glucoamylases: structural and biotechnological aspects. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 89, p. 1267-73, 2011.

Polizeli, M. L. T. M., *et al.* Mycelial glucoamylases produced by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* strains 15.1 and 15.8: purification and biochemical characterization. **Brazil. J. of Microbiol.** v. 39, p. 344-352, 2008.

Polizeli, M. L. T. M., *et al.* Purification and functional properties of a novel glucoamylase activated by manganese and lead produced by *Aspergillus japonicus*, **International J. of Bio. Macromol.** v. 102, p. 779-788, 2017.

Ramadas, M., *et al.* Production of amyloglucosidase by *Aspergillus niger* under different cultivation regimens. **World. J. Microbiol. Biotechnol.** 12, 267-271, 1996.

Rasti, B., Comprehensive study on transglycosylation of CGTase from various sources, **Heliy.**, v. 7, p 06305, 2021.

Robyt, J.F. Cyclodextrins. In: Essentials of carbohydrate chemistry. New York, **Springer**, v. 8, p. 245-250, 1998.

Rossel, R. A. V., *et al.* Environmental controls of soil fungal abundance and diversity in Australia's diverse ecosystems, **Soil Bio. and Biochem.** v. 170, p. 108694, 2022.

Tao, Y., *et al.* Effect of moderate electric field on glucoamylase-catalyzed hydrolysis of corn starch: Roles of electrophoretic and polarization effects, **Food Hydrocolloids**, v. 122, 2022, p. 107-120,

Vargas, I. P., Estudo bioquímico de β -glucosidase de *Rasamsonia composticola* e aplicações na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular)** - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, . Orientador: Fabiana Fonseca Zanoelo. 2019.

Wikandari, R., *et al.* The role of filamentous fungi in advancing the development of a sustainable circular bioeconomy, **Bioresource Technology**, v. 345, p. 126531, 2022.

Xiao Z, *et al.* A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. **Anal Biochem.** v. 351, p. 146-8.2006.

Xu, Y., *et al.* Microbial saccharification – Biorefinery platform for lignocellulose, **Ind. Crops and Prod.** v. 189, p. 115761, 2022.

Yurdugül, S., *et al.* Potential of fungal thermostable alpha amylase enzyme isolated from Hot springs of Central Anatolia (Turkey) in wheat bread quality, **Food. Biosci.**, v. 45, p. 101492, 2022.

Zanoelo, F. F., *et al.* β -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose, **FEMS Microbio. Lett.**, v. 240, p. 137–143, 2004.