



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



PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM – SBBq

CAMILA LANGER MARCIANO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO COMPLEXO
AMIOLÍTICO DE *Humicola brevis* var. *thermoidea* E SUA APLICAÇÃO
NA SACARIFICAÇÃO DO AMIDO**

CAMPO GRANDE – MS
MARÇO – 2023

CAMILA LANGER MARCIANO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO COMPLEXO
AMIOLÍTICO DE *Humicola brevis* var. *thermoidea* E SUA APLICAÇÃO
NA SACARIFICAÇÃO DO AMIDO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq do Instituto de Biociências (INBIO) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

Orientador: Prof. Dr. Douglas Chodi Masui

CAMPO GRANDE – MS
MARÇO – 2023

TERMO DE APROVAÇÃO

CAMILA LANGER MARCIANO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO COMPLEXO AMIOLÍTICO DE *Humicola brevis* var. *thermoidea* E SUA APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DO AMIDO

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq do Instituto de Biociências (INBIO) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

03 de fevereiro de 2023

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Douglas Chodi Masui (Orientador)

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)

Prof. Dr. Hamilton Cabral

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto FCFRP

Universidade de São Paulo (USP)

*“Aos meus pais e irmãs dedico esta pesquisa.
Vocês são os maiores incentivadores das
realizações dos meus sonhos. Muito obrigada.”*

AGRADECIMENTOS

Em tempos como estes em que ser cientistas requer muita coragem, ser apoiada e incentivada faz toda diferença. Ser cientista parece uma vida solitária, envolta por vidrarias e equipamentos, mas na verdade é impulsionada por pessoas que ajudam a superar cada desafio, sejam eles no âmbito profissional, sejam no pessoal. Os erros e acertos que vão surgindo no caminho vão moldando as escolhas dos cientistas, mas que sem essas pessoas ao seu redor, essas escolhas seriam um fardo a carregar. Por isso, as pessoas que me incentivaram a ter coragem, a superar os desafios e compartilharam o fardo das minhas escolhas, venho por aqui oferecer o meu agradecimento:

- À Deus, por me proteger e guiar durante este período e aos próximos que estarão por vir;
- Aos meus pais e irmãs por acreditarem na minha capacidade até quando eu mesmo duvidava e por estar presente em todos os momentos;
- A minha avó que mesmo compreendendo pouco, me motiva sempre a fazer o meu melhor;
- Ao meu orientador Prof. Dr. Douglas Chodi Masui pela amizade, orientação e paciência;
- Ao Prof. Dr. Roberto Ruller pela amizade e apoio;
- Ao Prof. Dr. Hamilton Cabral, a técnica Dr.^a Nathália Gonsales da Rosa-Garzon e os alunos presentes no laboratório de enzimologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) pela colaboração, auxílio e amizade.
- A Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes T. de M. Polizeli e a todos presente no laboratório de bioquímica da Faculdade Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP -USP) pela assistência, aprendizado e amizade.
- As Prof.^a Dr.^a Giovana Cristina Giannesi e Fabiana Fonseca Zanoelo pela instrução e colaboração;
- A Aline Pereira de Almeida que a amizade, parceria e paciência foram imprescindíveis para a conclusão desse trabalho;
- Aos meus amigos de laboratório (LBq-UFMS) por tornar os dias de trabalhos mais felizes;
- Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular pelo conhecimento fornecido e pela oportunidade de obter o título de Mestre;
- À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e a todos seus funcionários, alunos e professores pela estrutura acadêmica e pessoal;
- As instituições de fomento, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E UNIDADE	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Amido	14
2.2 Enzimas amilolíticas	17
2.3 Amilases de origem fúngica	21
2.3.1 Produção e características de amilases fúngicas	22
2.3.2 Microrganismo de estudo	24
2.4 Aplicações das amilases.....	26
2.4.1 Biorrefinaria – Bioetanol de milho	27
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Microrganismo em estudo	33
4.2. Manutenção da linhagem.....	33
4.3 Produção do complexo amilolítico do <i>H. brevis</i> por fermentação em estado sólido (FES)	33
4.3.1 Otimização da produção de amilase.....	33
4.4 Preparação do extrato bruto amilolítico.....	34
4.5. Ensaio enzimáticos	34
4.5.1 Determinação da atividade amilolítica através de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	34
4.5.2 Dosagem de proteína.....	35
4.6 Caracterização bioquímica da AmyHb em extrato bruto	35
4.6.1 Efeito do pH na atividade e na estabilidade enzimática.....	35
4.6.2 Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade enzimática	36
4.6.3 Efeito de sais e EDTA na atividade enzimática	36
4.6.4 Efeito de solventes na atividade enzimática	36
4.6.5 Efeito de etanol e NaCl na atividade e na estabilidade enzimática	37
4.6.6 Efeito de diferentes substratos amiláceos na atividade enzimática.....	37
4.7 Análise eletroforética e teste de atividade amilolítica em zimograma	37

4.8	Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	38
4.9	Sacarificação enzimática do amido de milho	38
4.9.1	Ensaio de hidrólise enzimática do amido de milho	38
4.9.2	Determinação da atividade amilolítica através do hidrolisado de amido de milho ..	39
4.6	Purificação da AmyHb por cromatografia de troca iônica e afinidade	40
4.7	Análise dos dados obtidos	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
5.1	Otimização da produção de amilase por fermentação em estado sólido (FES).....	42
5.2	Caracterização bioquímica da AmyHb em extrato bruto e da Termamyl [®]	46
5.2.1	Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática	46
5.2.2	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática	49
5.2.3	Efeito de sais e quelantes na atividade enzimática.....	53
5.2.4	Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática	54
5.2.5	Efeito do etanol e NaCl na atividade e estabilidade enzimática.....	55
5.2.6	Efeito do potencial de hidrólise sobre diferentes substratos.....	59
5.3	Análise eletroforética (SDS-PAGE) e teste da atividade de AmyHb em zimograma	60
5.4	Cromatografia de camada fina (CCD).....	61
5.5	Ensaio de sacarificação do amido de milho	62
5.6	Purificação da AmyHb	65
6	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquemática da estrutura química das cadeias de amilopectina e amilose.....	14
Figura 2. Estrutura dos grânulos de amido.....	16
Figura 3. Classificação das amilases conforme o modo de ação.....	18
Figura 4. Representação esquemática da ação sinérgica de algumas amilases sobre uma estrutura de amilopectina	19
Figura 5. Modelo estrutural de α -amilase de <i>Cordyceps farinosa</i> (CfAM).....	20
Figura 6. Estrutura tridimensional de diferentes amilases.	21
Figura 7. Morfologia do <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i>	25
Figura 8. Gerações de biocombustíveis.	28
Figura 9. Anatomia do milho e a distribuição do endosperma em seus diferentes tipos.	29
Figura 10. Fluxograma de obtenção de etanol a partir do milho.....	30
Figura 11. Efeito de temperatura e do tempo de cultivo para produção de AmyHb.	45
Figura 12. Efeito do pH na atividade da AmyHb e da Termamyl [®]	47
Figura 13. Efeito da temperatura na atividade da AmyHb e da Termamyl [®]	49
Figura 14. Termoestabilidade da AmyHb e da Termamyl [®] na ausência e na presença de íons em diferentes temperaturas.....	51
Figura 15. Efeito do etanol na atividade e na estabilidade enzimática da AmyHb e da Termamyl [®]	56
Figura 16. Efeito do NaCl na atividade e na estabilidade enzimática da AmyHb e da Termamyl [®]	58
Figura 17. Eletroforese em gel poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Zimograma da AmyHb e Termamyl [®]	61
Figura 18. Cromatografia de camada fina (CCD) dos produtos de hidrólise de amido solúvel por AmyHb.....	62
Figura 19. Hidrólise do amido de milho pela AmyHb, Termamyl [®] e Coquetel (AmyHb50%+Termamyl [®] 50%).	64
Figura 20. Purificação da amilase extracelular de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i> em coluna cromatográfica Q Sepharose [®] FF.	65
Figura 21. Purificação da amilase extracelular de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i> em coluna cromatográfica Sephadex G-50.	66
Figura 22. Eletroforese em gel poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) da amilase extracelular purificada de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i>	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de AmyHb.	42
Tabela 2. Adição de fontes suplementares de carbono sobre o farelo de trigo para produção de AmyHb.	43
Tabela 3. Adição de fontes suplementares de nitrogênio sobre o farelo de trigo para produção de AmyHb.	44
Tabela 4. Efeito de sais e EDTA na atividade amilolítica da AmyHb e da Termamyl [®]	53
Tabela 5. Efeito de solventes orgânicos na atividade da AmyHb e da Termamyl [®]	54
Tabela 6. Especificidade de substrato da AmyHb e da Termamyl [®]	59
Tabela 7. Purificação da amilase extracelular de <i>H. brevis</i> var. <i>thermoidea</i>	66

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E UNIDADE

- AmyHb** Complexo amilolítico de *Humicola brevis* var. *thermoidea*
- ART** Açúcares redutores totais
- ATCC** *American Type Culture Collection*
- CBM** Modulo de ligação a carboidratos
- CBM20** Modulo de ligação a carboidratos da família 20
- CCD** Cromatografia de camada delgada
- CAZy** Banco de dados de enzimas Ativas de Carboidratos
- DA** Amilases Desramificadoras
- DDGS** Dried Distillers Grains with Soluble
- EDTA** ácido etilenodiamino tetra-acético
- EUA** Estados Unidos da América
- EnA** Endoamilases
- ExA** Exoamilases
- FES** Fermentação em estado sólido
- FS** Fermentação submersa
- GH** Hidrolase de glicosídeos
- GH14** Hidrolases de glicosídeos da família 14
- GH15** Hidrolases de glicosídeos da família 15
- GH57** Hidrolases de glicosídeos da família 57
- GH119** Hidrolases de glicosídeos da família 119
- GH126** Hidrolases de glicosídeos da família 126
- GOD** Glicose oxidase
- HFCS** Xarope de milho rico em frutose
- IUPAC** União Internacional de Química Pura e Aplicada
- IUBMB** Comitê da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
- OFAT** *One factor at time*
- O- Glicosídeos** Oxigênio como intermediário da ligação glicosídica
- S- Glicosídeos** Enxofre como intermediário da ligação glicosídica
- SBD** Sítio de ligação com o amido
- SDS-PAGE** Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SHF Sacarificação e fermentação simultânea

SSF Hidrolise e fermentação separada

SSCF Sacarificação e co-fermentação simultânea

Kgf/cm² Um quilograma-força por centímetro quadrado

kDa Quilodalton

h Hora

min Minuto

mAU Mili unidade de absorvância.

mL Mililitro

mL. min⁻¹ Mililitro por minuto

mol. L⁻¹ Mol por litro

mg. mL⁻¹ Miligrama por mililitro

m/v Massa por volume

pI Ponto isoelétrico

rpm Rotação por minuto

v/v Volume por volume

Termamyl[®] α -amilase comercial de *Bacillus licheniformis*

t_{1/2} Tempo de meia vida

U Unidades totais

U. mg⁻¹ Unidades por miligrama

U. mL⁻¹ Unidades por mililitro

μ g Micrograma

xg Força centrífuga

α Alfa

β Beta

γ Gama

RESUMO

Dentre as enzimas usadas em bioprocessos, as amilases representam um grupo versátil de biocatalizadores usados pela indústria na sacarificação do amido. Isso porque, são enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas do amido e liberar glicose, maltose e cadeias curtas de oligossacarídeos e por isso representam 30% do mercado global de enzimas. Dentre os produtores de amilases, os fungos filamentosos termófilos são microrganismos promissores para aplicações biotecnológicas, pois possuem a capacidade de hidrolisar subprodutos agrícolas e gerar produtos de alto valor agregado através da técnica de fermentação em estado sólido (FES). Em vista disso, foi produzido e caracterizado bioquimicamente o complexo amilolítico do fungo filamentoso termófilo *Humicola brevis* var. *Thermoidea* (AmyHb), comparando-o com a amilase comercial Termamyl[®], bem como investigado a sua aplicação biotecnológica na sacarificação do amido. Assim, a produção enzimática foi otimizada em FES, na qual demonstrou a maior produção em meio contendo farelo de trigo a 50°C por 5-6 dias, sem adição de indutores. A atividade amilolítica ótima ocorreu em pH 5,0, a 60°C e a enzima se manteve estável entre pH 5,0 a 6,0, com termoestabilidade a 50°C e 60°C, principalmente na presença de Ca²⁺, resultados melhores do que encontrado pela Termamyl[®]. Ambas as enzimas foram fortemente inibidas por Hg⁺², Cu⁺² e Ag⁺, entretanto a AmyHb aumentou a atividade na presença de Mn⁺² e Na⁺. Além disso, a AmyHb não foi inibida na presença de solventes orgânicos e apresentou uma maior tolerância em uma ampla faixa de NaCl e etanol, tendo um melhor desempenho em hidrolisar amido de batata e maltose quando compara a amilase comercial. A análise do gel de eletroforese mostrou que a AmyHb apresenta uma massa molecular próxima a 48 e 43kDa. Os ensaios de hidrólise de farinha de milho demonstraram que o Coquetel (AmyHb50%+Termamyl[®]50%) elevou significativamente a liberação de glicose e açúcares redutores totais quando comparados as enzimas sozinhas. A purificação parcial da AmyHb, juntamente com as características observadas pelos experimentos sugerem que o *H. brevis* produz duas amilases diferentes, mas que apresentam peso molecular muito próximo, o que dificulta a separação e purificação delas. Assim, o complexo amilolítico do *H. brevis* apresenta propriedades físico-químicas promissoras, com um bom desempenho associado a amilase comercial, o que demonstra ser uma alternativa biotecnológica promissora para aplicação no bioprocessamento de fontes amiláceas.

Palavras chaves: Amilase, Fermentação em estado sólido (FES), *Humicola brevis*, Sacarificação.

ABSTRACT

Among the enzymes used in bioprocesses, amylases represent a versatile group of biocatalysts used by industry in starch saccharification. This is because they are enzymes capable of hydrolyzing the glycosidic bonds of starch and releasing glucose, maltose, and short chains of oligosaccharides and therefore represent 30% of the global enzyme market. Among amylase producers, thermophilic filamentous fungi are promising microorganisms for biotechnology applications, as they can hydrolyze agricultural by-products and generate high-value-added products through the solid-state fermentation technique (SSF). Because of this, the amylolytic complex of the thermophilic filamentous fungus *Humicola brevis* var. *Thermoidea* (AmyHb), comparing it with the commercial amylase Termamyl[®], as well as investigating its biotechnological application in starch saccharification. Thus, enzyme production was optimized in FES, which showed the highest production in a medium containing wheat bran at 50°C for 5-6 days, without the addition of inducers. The optimal amylolytic activity occurred at pH 5.0, at 60°C and remained stable between pH 5.0 to 6.0, with thermostability at 50°C and 60°C, mainly in the presence of Ca²⁺, better results than found by Termamyl[®]. Both enzymes were strongly inhibited by Hg⁺², Cu⁺², and Ag⁺, however, AmyHb increased activity in the presence of Mn⁺² and Na⁺. In addition, AmyHb was not inhibited in the presence of organic solvents and showed greater tolerance in a wide range of NaCl and ethanol, having a better performance in hydrolyzing potato starch and maltose when compared to commercial amylase. Analysis of the electrophoresis gel showed that AmyHb has a molecular mass close to 48 and 43kDa. The cornstarch flour hydrolysis assays demonstrated that the Cocktail (AmyHb50%+Termamyl[®]50%) significantly increased the release of glucose and total reducing sugars when compared to the enzymes alone. The partial purification of AmyHb, together with the characteristics observed by the experiments, suggest that *H. brevis* produces two different amylases, but with very similar molecular weights, which makes their separation and purification difficult. Thus, the amylolytic complex of *H. brevis* presents promising physicochemical properties, with a good performance associated with commercial amylase, which proves to be a promising biotechnological alternative for application in the bioprocessing of amylaceous sources.

Keywords: Amylase, Solid State Fermentation (SSF), *Humicola brevis*, Saccharification.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as enzimas usadas na indústria, as amilases têm uma longa história de sucesso que emergiu no começo do século XIX e atualmente corresponde a 30% do mercado global de enzimas. Isso porque, as amilases clivam as ligações glicosídicas presentes no amido e liberam glicose, maltose e cadeias curtas de oligossacarídeos (PAUL *et al.*, 2021; FAR *et al.*, 2020). O amido é um polissacarídeo formado por unidades de *D*-glicose unidas por ligações glicosídicas na forma de amilose e amilopectina, que por ser a principal fonte de carboidrato de reserva do reino vegetal é amplamente explorado pela indústria (IUGA; MIRONEASA 2019; SEUNG, 2020).

Por isso, o uso de amilases como biocatalisadores do amido apresentam vantagens como a alta especificidade, o incentivo a bioeconomia, a geração de menos danos a natureza e ainda, reduz os problemas de dependência a catalisadores químicos pela indústria (PAUL *et al.*, 2021; MONDEL *et al.*, 2022). Dessa forma, as amilases são usadas em diversos setores da indústria, mas a de biocombustível tem sofrido uma crescente expansão devido ao intenso consumo de combustíveis fósseis associado a problemas ambientais (LÄUFER, 2019; MESBAH, 2022; TROIANO; DUMONT, 2020). De acordo com as avaliações de comércio de enzimas, as α -amilases chegaram ao valor de US\$ 274,1 milhões em 2019 no mercado global, com previsão de atingirem US\$ 382,4 milhões até 2025 (MONDEL *et al.*, 2022).

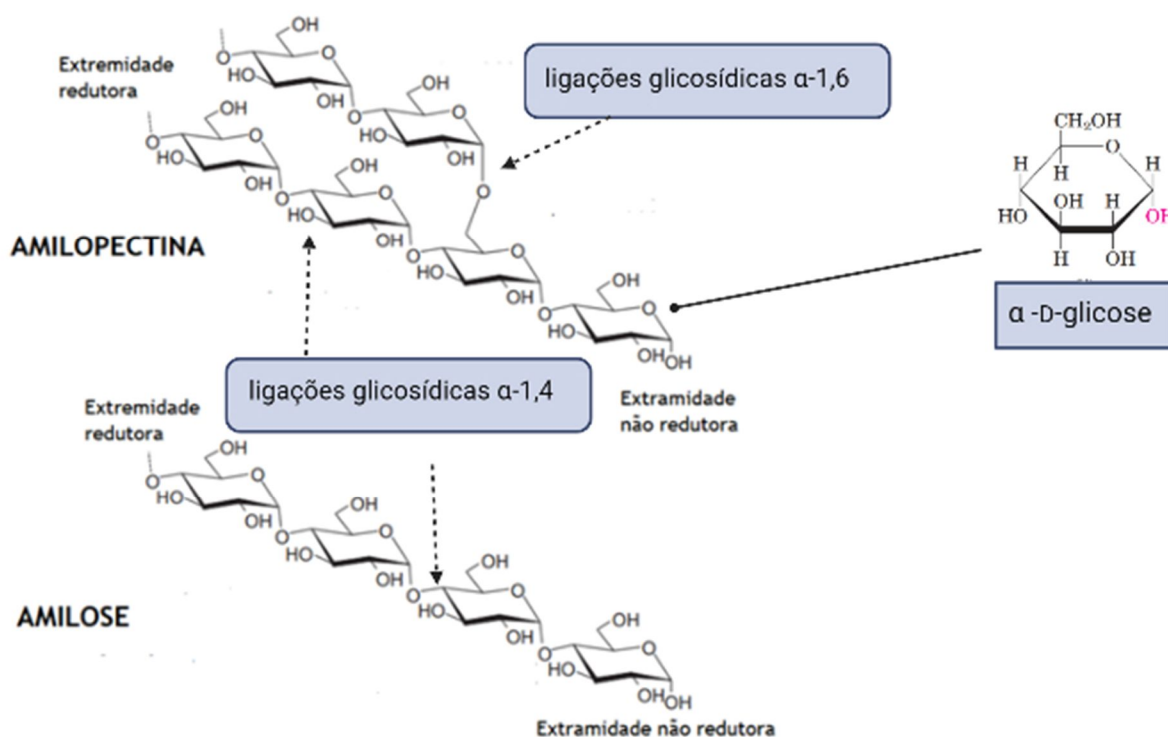
Nesse contexto, a produção de enzimas a partir de fungos filamentosos termófilos tem despertado interesse de aplicação biotecnológica. Isso porque, esses fungos apresentam elevada capacidade de hidrolisar subprodutos agrícolas e gerar produtos de alto valor agregado através da técnica de fermentação em estado sólido (FES). Além disso, os complexos enzimáticos secretados por esses fungos apresentam características favoráveis a indústria, como termotolerância e estabilidade em diferentes pH. (MONDEL *et al.*, 2022; MEYER, 2020; TROIANO; DUMONT, 2020).

Visto que em trabalhos anteriores o *H. brevis* mostrou ser um bom produtor de hidrolases, como xilanase e β -glucosidase (ALMEIDA *et al.*, 2022; MASUI *et al.*, 2012), este estudo produziu e caracterizou bioquimicamente o complexo amilolítico produzido pelo fungo *Humicola brevis* var. *thermoidea* (AmyHb), comparando-a com a enzima comercial Termamyl[®]. Os resultados demonstraram que a AmyHb apresenta propriedades físico-químicas promissoras, com um bom desempenho associado a amilase comercial, o que demonstra ser uma alternativa biotecnológica promissora para aplicação no bioprocessamento de fontes amiláceas.

1.1 Amido

O amido é um homopolissacarídeo de monômeros de *D*-glicose unidos por ligações glicosídicas α -1,4 como forma de reserva energética. Ele é depositado nos plastídios de folhas e em órgãos de armazenamento como grânulos insolúveis, dos quais, são compostos de frações de amilose e amilopectina (IUGA; MIRONEASA 2019; SEUNG, 2020). A amilose compreende em um polímero linear de até 6.000 resíduos de *D*-glicose unidos entre si por ligações glicosídicas α -1,4 (**Figura 1**). Em contraste, a amilopectina corresponde a um polímero ramificado de cadeias curtas de 10 a 60 resíduos de *D*-glicose unidos entre si por ligações glicosídicas α -1,4 e cadeias laterais de 15 a 45 resíduos de *D*-glicose unidas a cadeia principal por ligações α -1,6 (MACNEILL *et al.*, 2017; OH *et al.*, 2020).

Figura 1. Esquemática da estrutura química das cadeias de amilopectina e amilose.



Fonte: Adaptado de Cripwell, Zyl e Viljoen-Bloom (2021).

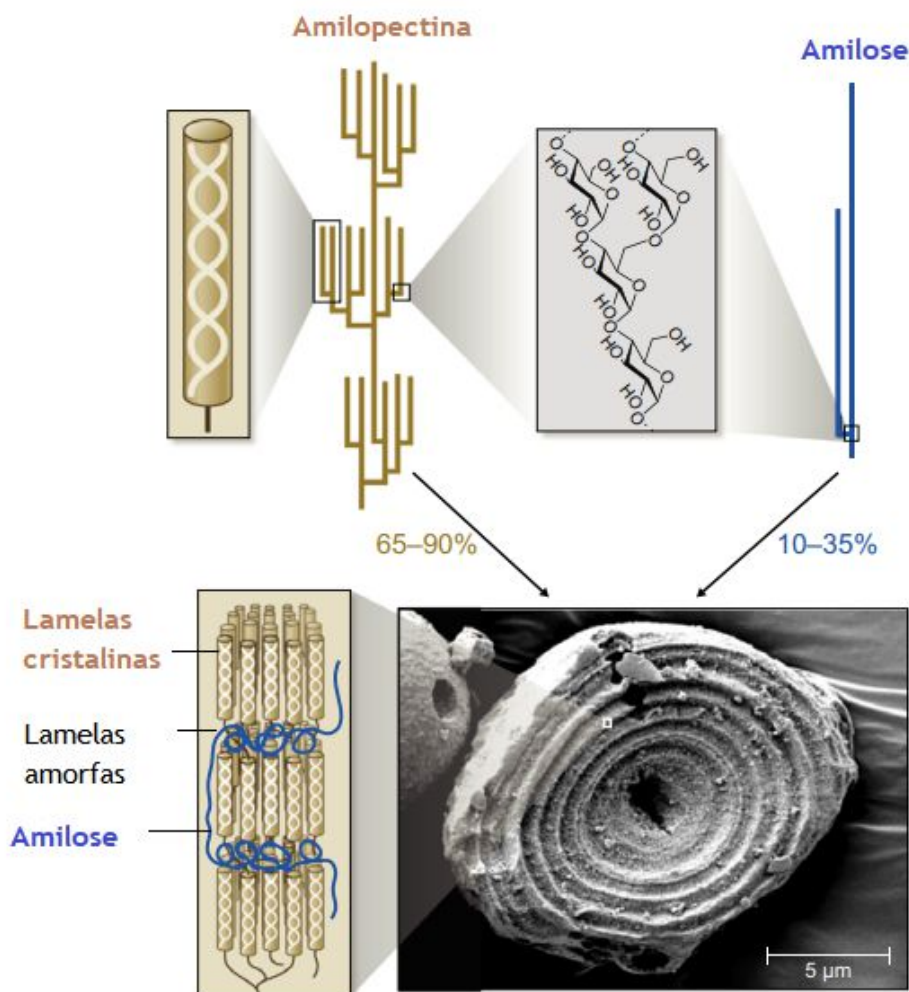
A maioria das espécies vegetais apresentam cerca de 20-30% de amilose e 70-80% de amilopectina, contudo, algumas espécies possuem teor de amilose alterado. O amido que apresenta pouca ou nenhuma fração de amilose é denominado ceroso, devido a aparência do endosperma e é amplamente utilizado na indústria têxtil. Já aqueles com elevada fração de amilose são mais resistentes e por isso são usados como prebiótico e na composição de bioplástico (RAGUIN; EBENHÖH, 2017; SEUNG, 2020).

No grânulo de amido, a cadeia de amilose compõe a zona amorfa e forma uma estrutura helicoidal com os átomos de hidrogênio na região interna e o grupo hidroxila ligando-se externamente, dando a estrutura um caráter hidrofóbico (IUGA; MIRONEASA 2019). Por outro lado, a amilopectina forma uma dupla hélice estabilizada por ligações de hidrogênio que constitui uma zona cristalina intercalada com uma zona amorfa, onde há intersecção dos pontos de ramificação com a amilose (MACNEILL *et al.*, 2017; RAGUINA; EBENHÖH, 2017; SEUNG, 2020). Assim, esse arranjo estrutural confere ao grânulo uma característica semicristalina (**Figura 2**), onde a parte cristalina é solúvel em água e a amorfa é insolúvel em água fria (IUGA; MIRONEASA 2019; MACNEILL *et al.*, 2017).

Além disso, o comprimento da cadeia ramificada da amilopectina permite a classificação do amido em tipos A, B e C de acordo com os padrões de difração de raios-X (OH *et al.*, 2020; PUNIA, 2019). Assim, o amido polimórfico do tipo A é geralmente encontrado em cereais (como trigo e milho) e possui cadeias ramificadas mais curtas formadas em condições quentes e secas. Já os do tipo B são encontrados em folhas e tubérculos (como bananas) com alto teor de amilose e possuem cadeias ramificadas mais longas formadas em condições de frio e umidade. O tipo C é uma mistura dos polimórficos do tipo A e B e pode ser encontrado em alguns legumes (MACNEILL *et al.*, 2017; PUNIA, 2019; RAGUIN; EBENHÖH, 2017).

Dessa maneira, o processamento e armazenamento do amido são influenciados pelas propriedades físico-químicas das moléculas de amilose e amilopectina. Quando o amido é aquecido (>50°C) em solução aquosa, as ligações de hidrogênio são rompidas, as duplas hélices são desdobradas e o grânulo fica irreversivelmente inturgescido, processo chamado de gelatinização (IUGA; MIRONEASA 2019; QUEK *et al.*, 2019).

Figura 2. Estrutura dos grânulos de amido.



Grandes anéis de crescimento (cada um contendo muitas lamelas cristalinas / amorfais alternadas) são visíveis na micrografia eletrônica de varredura de um grânulo de amido de batata parcialmente digerido. Fonte: Adaptado de Seung (2020).

O aquecimento contínuo leva a lixiviação da amilose e a formação de uma pasta viscosa solúvel e de fácil hidrólise. Contudo, quando essa pasta é resfriada as moléculas perdem energia e se rearranjam em hélices simples e hélices duplas, processo denominado retrogradação. Então, o grânulo recristaliza formando um gel firme e viscoelástico, mais resistente à hidrólise enzimática. A temperatura limite para a gelatinização é determinada pelo comprimento e organização da amilopectina, uma vez que, quanto mais moléculas de amilopectina se apresentarem no amido, maior será a ocorrência de gelatinização e menor a de retrogradação (CRIPWELL; ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2021; IUGA; MINONEASA, 2019; QUEK *et al.*, 2019).

Conforme as características de digestibilidade o amido pode ser dividido em: amido de digestão rápida, amido de digestão lenta e amido resistente. Assim, a hidrólise é influenciada pelo acesso ao substrato, adsorção do substrato devido ao reconhecimento, construção do complexo enzima-substrato e atividade catalítica (FAR *et al.*, 2020; IUGA; MINONEASA, 2019; PUNIA, 2019).

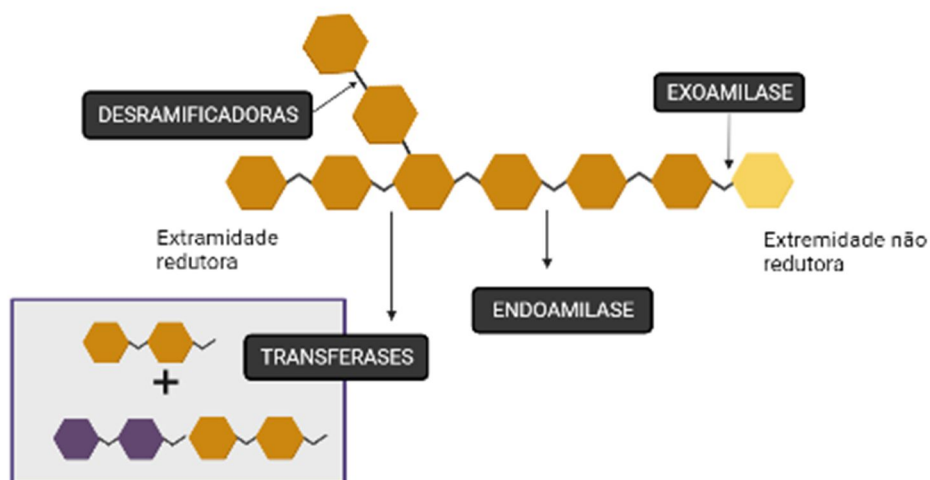
2.2 Enzimas amilolíticas

Descobertas por Anselme Payen em 1833, as amilases (E.C. 3.2.1) foram as primeiras enzimas a serem isoladas. São enzimas catalíticas que hidrolisam as ligações glicosídicas do amido e liberaram oligossacarídeos de glicose. Podem ser produzidas por tecidos animais, plantas, fungos, leveduras e bactérias (BOŽIĆ *et al.*, 2017; FAR *et al.*, 2020). Segundo a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) e a IUBMB (Comitê da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular), as amilases são classificadas na comissão de enzimas (E.C 3.2.1.-), como hidrolases (3), classe das glicosilases (2) e subclasse de compostos que hidrolisam *O*- e *S*-Glicosídeos (1) (<https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>).

Segundo o banco de dados de enzimas ativas para carboidratos, CAZy (<http://www.cazy.org/>), as amilases pertencem, em sua maioria, à família 13 da classe das hidrolases de glicosídeos (GHs), por isso, é conhecida como a família das α -amilases. Todavia, já foi observado a atividade dessa enzima em outras famílias como, nas GH14, GH15, GH 57, GH 119 e GH 126. Essa classificação utiliza principalmente os parâmetros introduzidos por Henrissat em 1996, no qual considera a sequência de aminoácidos e a estrutura tridimensional da proteína (CRIPWELL; ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2021; GANGADHARAN; JOSE; NAMPOOTHIRI, 2020; MØLLER, HENRIKSEN; SVENSOON, 2016).

De maneira geral, as amilases podem ser divididas em quatro grupos principais conforme seu modo de ação: endoamilases, exoamilases, desramificadoras e transferases (**Figura 3**) (CASTRO *et al.*, 2011; GANGADHARAN; JOSE; NAMPOOTHIRI, 2020). As Endoamilases (EnA) hidrolisam ao acaso as ligações glicosídicas α -1,4 no interior do amido e liberam oligossacarídeos de diferentes tamanhos. Compõem esse grupo as α -amilases (EC 3.2.1.1) que promovem a sacarificação (hidrolise de 50% a 60% do substrato) ou liquefação (hidrolise de 30% a 40% do substrato) do amido e liberam dextrinas do tipo alfa. Além disso, as α -amilases são em sua maioria metaloenzimas e necessitam de íons de cálcio (Ca^{2+}) para catálise enzimática e manter a sua estabilidade estrutural (PANDEY *et al.*, 2000; PAUL *et al.*, 2021).

Figura 3. Classificação as amilases conforme o modo de ação.



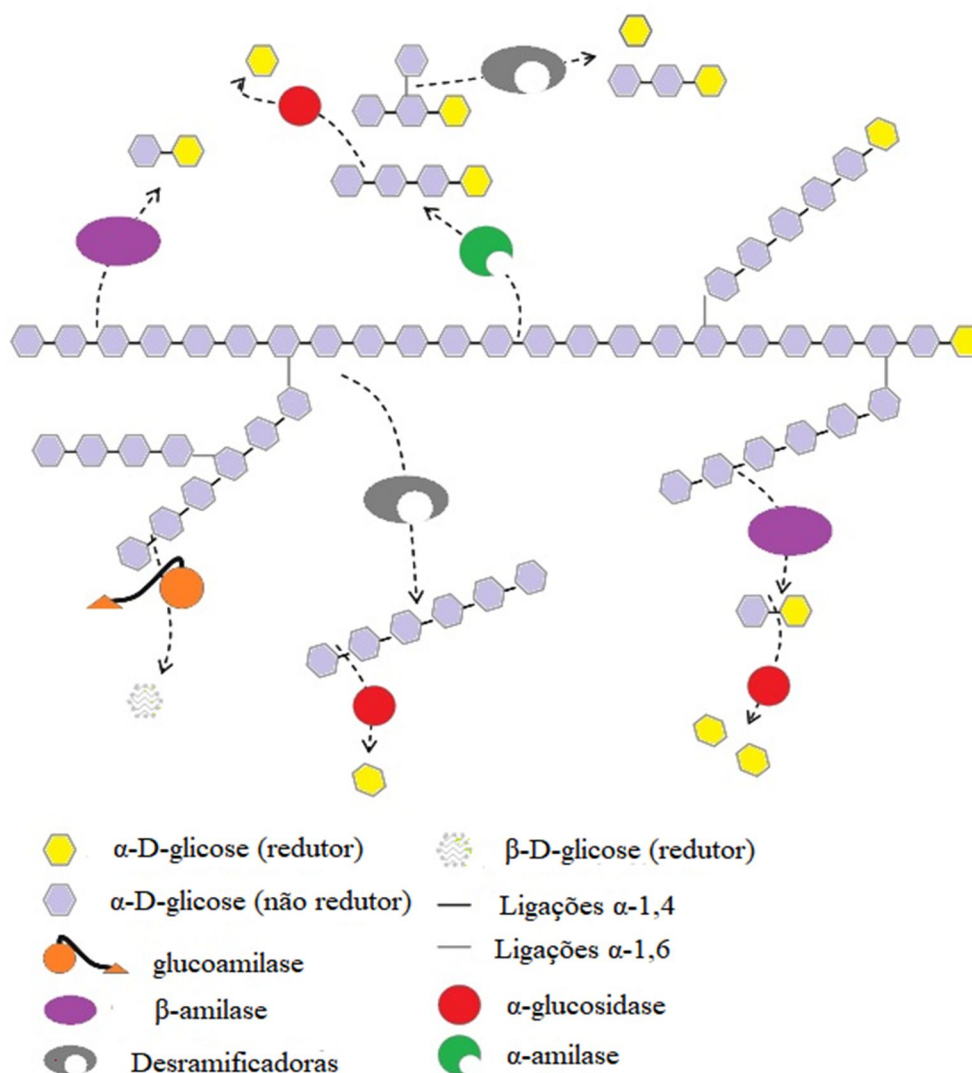
Representação de uma cadeia de amilopectina. As setas simulam a preferência de hidrólise na cadeia e a classificação da amilase. Fonte: Autor (2022).

Já as Exoamilases (ExA) hidrolisam as ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora da cadeia e liberam açúcares de baixa massa molecular, como glicose e maltose. Nesse grupo estão as β -amilases (EC 3.2.1.2), as α -glucosidases (EC 3.2.1.20) e as glucoamilases (EC 3.2.1.3) (CASTRO *et al.*, 2011; PAUL *et al.*, 2021). As β -amilases liberam β -maltose, uma vez que são capazes de converter a glicose anomérica alfa em beta (DUAN *et al.*, 2019; RAY, 2002). As α -glucosidase, ou maltases, liberaram glicose e maltodextrinas e as produzidas por fungos são capazes de realizar transglicosilação (ZHOU *et al.*, 2019). As glucoamilases, também denominadas γ -amilases, pertencem a família GH15 e liberam β -D-glicose. Além disso, podem formar isomaltoses na presença de grande quantidade de glicose e atuar como glicosiltransferase (KARIM; TASNIM, 2018; PAUL *et al.*, 2021).

Por outro lado, as amilases Desramificadoras (DA) podem hidrolisar as ligações α -1,6 presentes na ramificação e liberar maltotriose. Nesse grupo estão as isoamilases (EC 3.2.1.68) e as pululanases (EC 3.2.1.41) que hidrolisam sobretudo o pululano, que consiste em um polissacarídeo linear de maltotrioses unidas por ligações glicosídicas α -1,6 e que não é degradado por nenhuma outra amilase. E por fim, as Transferases que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 e as transferem a um receptor glicosídico formando uma nova ligação. Dessa maneira, as diferentes enzimas amilolíticas hidrolisam as cadeias do amido em sinergismo (Figura 4). (CASTRO *et al.*, 2011; HII *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2021).

Devido ao caráter poliespecífico de algumas amilases ao substrato, o posicionamento do sítio de ligação com o amido (SBD) é muitas vezes considerado para determinar a qual família essa amilase pertence. Esse domínio é composto por cerca de 100 resíduos de aminoácido e está presente em 10% das amilases, o qual, controla a concentração de substrato no sítio catalítico, melhora a processabilidade, libera oligossacarídeos, interage com as paredes celulares e faz regulação alostérica (MACHOVIČ *et al.*, 2005; MØLLER, HENRIKSEN; SVENSOON, 2016; PAUL *et al.*, 2021).

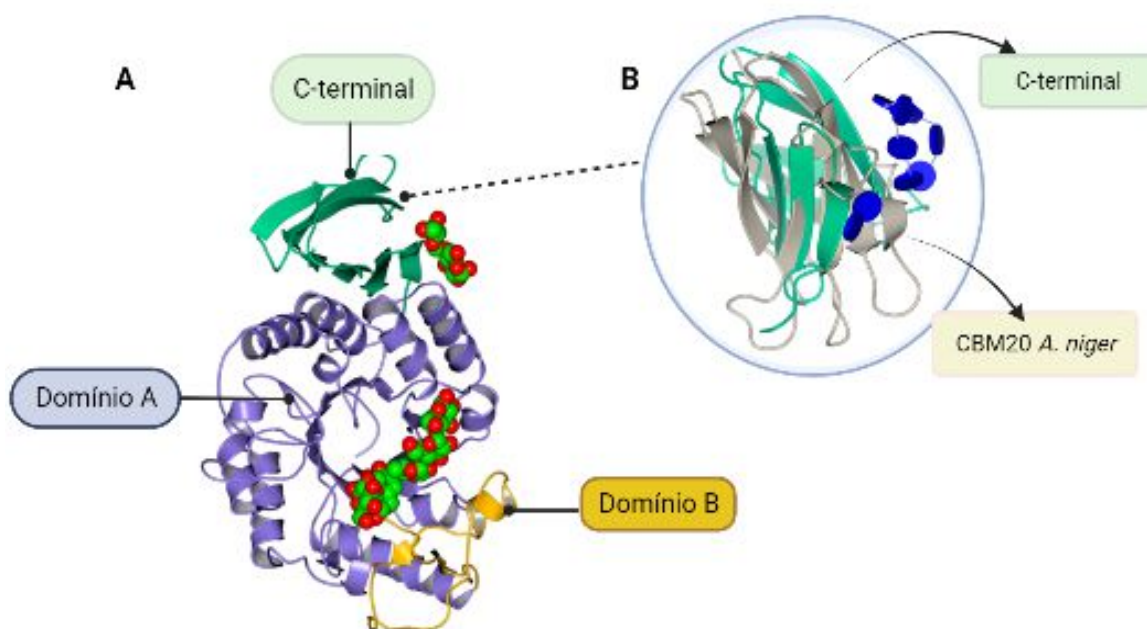
Figura 4. Representação esquemática da ação sinérgica de algumas amilases sobre uma estrutura de amilopectina



Acima na figura: sinergia entre endoamilase/exoamilase e endoamilase/amilase desramificadora. Abaixo na figura: sinergias entre amilase desramificadora/exoamilase e exoamilase/exoamilase. Fonte: Adaptado de Castro *et al.* (2011).

Na classificação do CAZy, o SBD está caracterizado junto ao módulo de ligação ao carboidrato (CBM). O CBM corresponde a domínios auxiliares não catalíticos e está associado a afinidade da enzima ao amido cru insolúvel (CRIPWELL; ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2021; GANGADHARAN; JOSE; NAMPOOTHIRI, 2020). Atualmente, o SBD está inserido dentro de quinze famílias do CBM que podem estar localizados na região C-terminal ou N-terminal da proteína. Destaca-se as amilases microbianas da CBM20 (**Figura 5**), que exibem alta afinidade com amido bruto a partir de dois sítios SBS localizados na região C-terminal (NGO *et al.*, 2019; PAUL *et al.*, 2021)

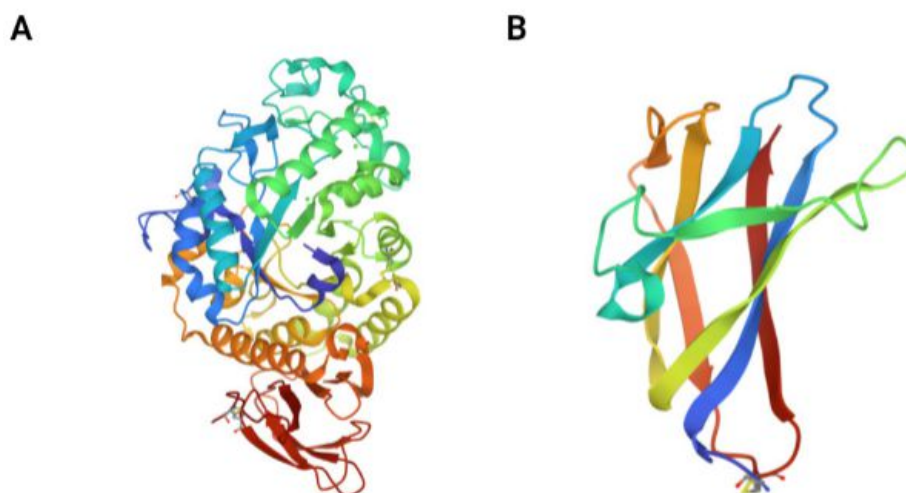
Figura 5. Modelo estrutural de α -amilase de *Cordyceps farinosa* (CfAM).



Estrutura tridimensional em (a) domínio A representado pelo barril (α/β)₈ em roxo, o domínio B em amarelo e o domínio C em verde composto pela região C-terminal. (b) Sobreposição do C-terminal de CfAM em verde, como a região CBM20 do *A. niger* em bege. Fonte: Adaptado de Roth *et al.* (2019).

A estrutura tridimensional das amilases varia de acordo com o tipo e a fonte (**Figura 6**), mas de modo geral tem a conformação de um barril (α/β)₈. São encontradas principalmente como monômeros, com uma única cadeia polipeptídica dobrada em três domínios (A, B e C). O domínio A é constituído pelo barril (β/α)₈, ou seja, 8 α -hélices e 8 folhas- β conectadas por sequências de alças. É uma região adaptada para se ligar aos monômeros de glicose e apresenta uma sequência primária com quatro regiões altamente conservada, onde, está o sítio catalítico e o sítio de ligação ao substrato (GANGADHARAN; JOSE; NAMPOOTHIRI, 2020; PINTO; DORN; FELTES, 2020; VAIDYA *et al.*, 2015).

Figura 6. Estrutura tridimensional de diferentes amilases.



Em (a) α -amilase de *Aspergillus oryzae* (PDB: 6TAA). (b) glucoamilase de *Aspergillus niger* (PDB: 1KUM).
Fonte: Banco de dados de proteínas RCSB.

O domínio B liga-se por pontes dissulfeto ao domínio A e está inserido intermediariamente. Já o domínio C, apresenta-se como folhas- β antiparalelas conectado ao domínio A na região C-terminal. Dessa forma, A e B são os domínios catalíticos e o C é o estabilizador. Além disso, as amilases apresentam uma tríade catalítica conservada com resíduos de aminoácidos, tal como aspartato (Asp-206 e Asp-270) e glutamato (Glu-230) (GANGADHARAN; JOSE; NAMPOOTHIRI, 2020; PAUL *et al.*, 2021; PINTO; DORN; FELTES, 2020).

2.3 Amilases de origem fúngica

Apesar de diversos organismos produzirem amilases, os fungos são os que possuem maior potencial industrial. Isso porque, eles são superiores aos sistemas de produção quando comparados ao uso de bactérias e leveduras, além de que crescem em meios contendo subprodutos agrícolas de baixo custo, possuem fácil extração enzimática e maior estabilidade de pH e temperatura (BALAKRISHNAN *et al.*, 2021; MEYER, 2020).

Os fungos filamentosos têm despertado grande interesse nos métodos biotecnológicos, pois possuem uma alta capacidade de hidrolisar polissacarídeos vegetais, como amido e celulose, e secretar enzimas, como amilases e celulases no meio circundante. O alto desempenho na produção de enzimas de interesse de fungos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*

e *Termitomyces thermophilus* são utilizados comercialmente e estudos descrevem a produção enzimática que alcançam quantidades de até 100 g.L⁻¹ (ANUPMA; TAMANG, 2020; BALAKRISHNAN *et al.*, 2021; MEYER, 2020).

Além disso, uma característica importante nos processos industriais é a atividade enzimática em altas temperaturas, pois proporciona menor risco de contaminação microbiana, maior solubilidade de substratos e rápidas taxas de hidrólise. E para isso, os fungos termofílicos mostram-se vantajosos, uma vez que produzem enzimas termotolerantes que atuam em temperaturas acima de 50°C (DUMORNÉ *et al.*, 2017; MESBAH, 2022; PAUL *et al.*, 2021). Entre os fungos produtores de amilases termotolerantes incluem, os termófilos *Thermomyces lanuginosa*, *Talaromyces emersonii*, *Humicola grisea var. thermoidea*, *Scytalidium thermophilum* e mesófilos *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Neurospora crassa* e *Rhizopus oryzae* (MESBAH, 2022; NOROUZIAN *et al.*, 2005; SAUER *et al.*, 2000; PANDEY *et al.*, 2000).

As enzimas produzidas por esses microrganismos podem apresentar em sua estrutura com ligações dissulfeto, dobramento de barril compacto (β/α), pontes salinas, carga superficial, entre outras adaptações que permitem maior estabilidade térmica. Essa termoestabilidade permanece mesmo quando clonadas e expressas em hospedeiros procarióticos mesófilos, o que demonstra a codificação genética dessas características (MESBAH, 2022; PAUL *et al.*, 2021).

2.3.1 Produção e características de amilases fúngicas

A produção de enzimas pelos fungos pode ocorrer por dois métodos de fermentação, a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS). Na primeira, o meio de cultivo é sólido, úmido e não imerso em água, no qual permite ao microrganismo o contato direto com o meio para crescimento e produção enzimática. Já na fermentação submersa, o microrganismo é inoculado em um meio aquoso, onde os nutrientes estão suspensos e sujeitos a agitação do meio de cultivo ou não (ASHOK; KUMAR, 2017; COSTA, 2018).

Uma das vantagens da técnica do FES é o uso de biomassas alternativas que expandiu nos últimos anos devido a crescente preocupação em aplicar os subprodutos agrícolas e florestais gerados em produtos de alto valor agregado. Assim, o uso industrial de microrganismos para a biossíntese de enzimas e outras biomoléculas a partir dessas biomassas têm fomentado a bioeconomia circular e promovido o uso dos recursos naturais de maneira responsável (DAHIYA *et al.*, 2022; TROIANO; DUMONT, 2020). Entretanto, a técnica de FES apresenta desvantagens em relação a FS devido ao monitoramento de parâmetros como temperatura, pH e umidade. Além

disso, estudos sugerem que a demanda de energia para o uso da FES é maior quando utilizada em escalas maiores (ASHOK; KUMAR, 2017).

Contudo, a escolha da técnica depende do comportamento de crescimento do microrganismo, rendimento de produção enzimático e da capacidade de hidrolisar o substrato. Assim, fungos filamentosos, leveduras e até mesmo algumas bactérias gram-positivas possuem características ideais para o uso de FES (COSTA, 2018; DAHIYA *et al.*, 2022). De maneira complementar, outras vantagens devem ser consideradas nesse tipo de fermentação, como a menor quantidade de água necessária, menos problemas de contaminação e a facilidade de processamento. Nos últimos anos, a FES tem se mostrado como uma possibilidade tecnológica vantajosa que precisa ser mais bem explorada em escala industrial. Para isso, é necessário o desenvolvimento de projetos de biorreatores racionais, escaláveis e com modelos matemáticos que possam abranger melhor as vantagens da técnica (ARORA; RANI; GHOSH, 2018; MICHELL *et al.*, 2019).

Dentre as amilases descritas, as α -amilases e as glucoamilases são comuns de serem produzidas por fungos. De modo geral, essas enzimas têm caráter ácido, com atividade em uma faixa de pH entre 4,0 e 7,0, com o ponto isoelétrico entre 4,0 e 5,0. Estudos indicam que essa característica ocorre devido a grande quantidade de resíduos de aminoácidos ácidos na superfície da proteína, principalmente aspartato e glutamato (PAUL *et al.*, 2021; MESBAH, 2022).

Em relação a massa molecular, o tamanho diverge dependendo do tipo e da espécie produtora. Dessa forma, as α -amilases apresentam um peso molar que varia de 10 a 210 kDa, com a maioria na faixa entre 50-60 kDa, enquanto as glucoamilases variam de 40 a 90 kDa, com algumas exceções como a glucoamilase de o *A. niger* que possui 125kDa (CRIPWELL; ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2021; KARIM; TASNIM, 2018; NOROUZIAN *et al.*, 2005).

Como a maioria das enzimas, as amilases fúngicas são inativadas em temperaturas acima de 50°C, com algumas exceções, como aquelas produzidas por microrganismo termófilos, os quais, tem atividade entre 50 e 80°C. Como por exemplo, o fungo *Rhizopus microsporus* que produz uma glucoamilase e uma α -amilases que apresentam atividade ótima a 65°C (MESBAH, 2022; TOMASIK; HORTON, 2012). Muita dessa termoestabilidade se dá pela presença de íons metálicos, que aumentam a rigidez estrutural da enzima através da cristalização dos resíduos hidrofóbicos (GANGADHARAN; JOSE; NAMPOOTHIRI, 2020).

Comparada às α -amilases que são em sua maioria dependentes de íons, as glucoamilases e β -amilases não requerem com frequência íons para catálise. Ainda assim, há espécies descritas que produzem α -amilases que são independentes de íons, como *Rhizomucor miehei* e *Talaromyces pinophilus* (PAUL *et al.*, 2021; RAY, 2002). Estudos descrevem que a presença de Zn^{2+} , Ba^{2+} ,

Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Na^{2+} e Mg^{2+} geralmente melhoram a atividade das amilases, enquanto Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ e Al^{3+} e EDTA costumam inibi-las (KUMAR; SATYANARAYANA, 2009; PAUL *et al.*, 2021; TOMASIK; HORTON, 2012).

Algumas amilases são capazes de atuar em ambientes salinos contendo concentração de NaCl pelo menos 1,0 M (mol L^{-1}). Estudos sugerem que a maior concentração de resíduos de aminoácidos ácidos, como o aspartato e o glutamato, confere a enzima maior estabilidade nessa alta salinidade (DUMORNÉ *et al.*, 2017; MESBAH, 2022). Apesar de grande parte das amilases halotolerantes derivarem de arqueas e bactérias, Chamekh *et al.* (2019) relataram a produção de enzimas halotolerantes, dentre estas, as amilases produzidas pelos fungos *Gymnoascus halophilus*, *Trichoderma gamsii*, *Fusarium brachygibbosum*, *Penicillium allii* e *Wallemia sp.*

2.3.2 Microrganismo de estudo

O gênero *Humicola* pertence à família Chaetomiaceae e a primeira descrição foi realizada por Traeen (1914) através das espécies *H. fuscoatra* e *H. grisea*. Curiosamente, Wang *et al.* (2019), realizou uma investigação filogenética multilocus, no qual, três espécies foram segregadas do gênero e dentre elas está o *H. grisea* descrita por Traeen. Atualmente, vinte e quatro espécies compõem oficialmente o gênero, que podem ser encontrados em diferentes habitats como, compostagem, decomposição e amostras de solo (IBRAHIM *et al.*, 2021).

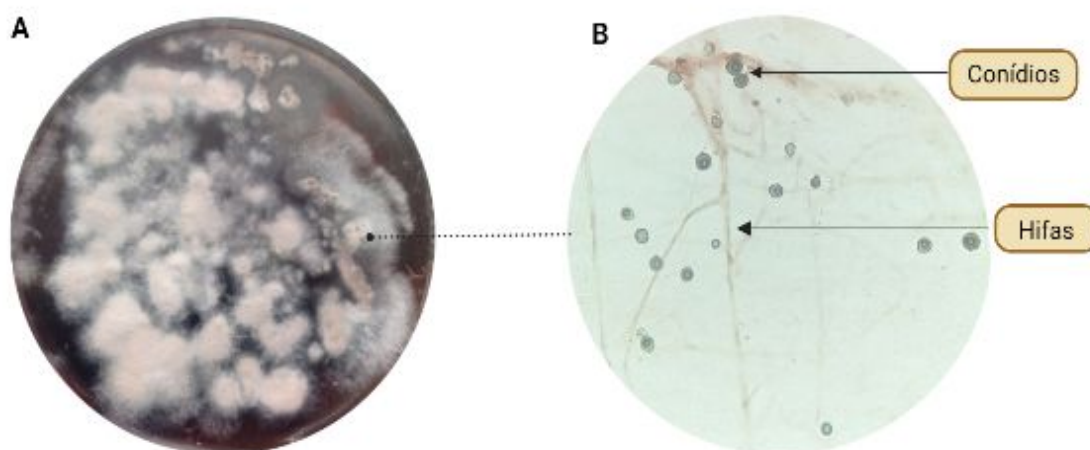
Os fungos deste gênero produzem conídios pigmentados com paredes espessas formados em hifas de forma terminal ou lateral (aleurioconídios) ou conidióforos pouco diferenciados. Nas espécies sexuadas, os ascósporos são limoniformes, achatados de forma bilateral e com um poro germinativo apical (IBRAHIM *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2019). *In vitro*, os fungos produzem colônias dispersas no meio ágar, das quais são formadas por aleurioconídios unicelulares, marrons ou escurecidas no micélio aéreo e incorporados ao meio (HAMBLETON; NICKERSON; SEIFERT, 2005).

Muitos desses microrganismos produzem enzimas extracelulares de importância industrial, como celulasas, xilanases e amilases. Em especial, os fungos termófilos desse gênero, que produzem termoenzimas, são fontes promissoras para demandas biotecnológicas (IBRAHIM *et al.*, 2021). Isso é observado na eficiência de espécies como *H. insolens* que tem uma excelente produção de celulasas alcalinas e termoresistentes e o fungo *H. brevis* var. *thermoidea* com uma endo-xilanase álcali-halo tolerante e termoestável (ALMEIDA *et al.*, 2022; FAN *et al.*, 2021; MASUI *et al.*, 2012).

Os metabólitos secundários gerados por esses fungos, também são aplicáveis industrialmente. Os compostos gerados, como cerebrosídeos, terpenóides, xantonas e xantoquinonas, apresentam atividade anticancerígenas, antialérgicas, antimicrobianas, antimalárica, anticoagulantes, antidiabéticas, inseticidas, fertilizantes biorgânicos e biocontrole (IBRAHIM *et al.*, 2021; NICOLA *et al.*, 2021).

O fungo filamentoso *H. brevis* var. *thermoidea* (ATCC 28402) (**Figura 6**) cresce em meio sólido entre 37-60°C, com temperatura mínima de crescimento em 23°C e máxima em 65°C (MASUI *et al.*, 2012). Estudos anteriores mostraram a sua preferência em cultivo FES contendo farelo de trigo e água (1:2 m/v). Além disso, o fungo *H. brevis* é um excelente produtor de enzimas extracelulares com propriedades industriais importantes, principalmente xilanase (ALMEIDA *et al.*, 2022; MASUI *et al.*, 2012).

Figura 7. Morfologia do *H. brevis* var. *thermoidea*.



Em (a) colônias do fungo inoculadas em meio ágar BDA (Potato Dextrose Agar) por 6 dias a 40°C. É possível ver ao fundo a mudança de coloração do meio pela pigmentação produzida pelo fungo (b) representa uma lâmina de *H. brevis* var. *thermoidea* visualizada em microscópio óptico

2.4 Aplicações das amilases

A primeira amilase a ser comercializada foi uma α -amilase produzida pelo *A. oryzae* e descoberta pelo Dr. Jokichi Takamine em 1894 para o tratamento de doenças digestivas e por isso ficou conhecida como TAKA-amilase (PAUL *et al.*, 2021; VAIDYA *et al.*, 2015). Atualmente, estima-se que as amilases correspondam a 30% do mercado global de enzimas, com aplicações em diversos setores (PAUL *et al.*, 2021).

As amilases são amplamente usadas na indústria alimentícia, principalmente na produção de xarope de milho rico em frutose (HFCS) para o mercado de cervejas e refrigerantes. Nesse processo são preferíveis enzimas termoestáveis, das quais são normalmente usadas α -amilase para o processo de liquefação, seguidas de glucoamilases e pululanases para a sacarificação. (CRIPWELL; ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2021; MESBAH, 2022). Por outro lado, a adição de amilase na alimentação de animais como galinhas e porcos permite maior crescimento desses animais, principalmente quando estes ainda são filhotes. A suplementação da enzima reduz a viscosidade do alimento no estômago e, conseqüentemente, melhora a digestão do amido pelo animal (FAR *et al.*, 2020).

No setor de panificação a amilase reduz a viscosidade da massa durante a fermentação, permitindo assim, maior tempo de liberação de dióxido de carbono ao disponibilizar açúcares adicionais. Com isso, há um prolongamento dessa etapa que aumenta o volume da massa, bem como, mantém a massa macia durante o processo de secagem e armazenamento. Além disso, a enzima é utilizada na produção de pasta de chocolate e na filtração do suco de maçã devido ao seu desempenho na viscosidade dos produtos (BOŽIĆ *et al.*, 2017; CRIPWELL; ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2021; IUGA; MINONEASA, 2019).

A indústria têxtil e de papel e celulose também utilizam amilase para melhorar a qualidade de seus produtos. Na primeira, ela é utilizada durante a tecelagem para retirar a camada de amido depositada sobre o fio, a fim de facilitar o processo, sem danificar o mesmo. Contudo, na fabricação de papel o amido é incorporado ao processo com a finalidade de aumentar a resistência e melhorar o acabamento, por isso, a enzima é usada para modificar o amido bruto e diminuir a viscosidade (CRIPWELL; ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2021; FAR *et al.*, 2020; PAUL *et al.*, 2021). Nos detergentes, as amilases presentes na composição facilitam a lavagem de roupas delicadas e com manchas de molhos, cremes e chocolate, além de serem ambientalmente mais seguros. Por isso, 90% dos detergentes líquidos produzidos nos dias de hoje contêm α -amilase termoestáveis e de pH alcalino (HMIDET *et al.*, 2018; MESBAH, 2022;).

Estudos recentes demonstraram a atividade da amilase na biorremediação de hidrocarbonetos. Foi observado que a α -amilase de diversos microrganismos foi capaz de degradar n-alcenos e polietileno de baixa densidade, compostos derivado do petróleo e que são altamente poluentes (PAUL *et al.*, 2021; PINTO; DORN; FELTES, 2020). Ainda na indústria petroquímica, essa enzima pode atuar como um biodesemulsificante, que quebra a emulsão de petróleo bruto e apresenta diversas vantagens como, maior compatibilidade ambiental e menor toxicidade (JIANG *et al.*, 2018; PAUL *et al.*, 2021).

Na área da saúde, a amilase é comumente inserida em tônicos para distúrbios digestivos e formulações farmacêuticas diversas. Essas enzimas são geralmente misturadas com xaropes de maltose previamente hidrolisados por β -amilases (MESBAH, 2022; PAUL *et al.*, 2021). Contudo, a principal aplicação da enzima pela indústria farmacêutica está em uma amilase reticulada que promove a liberação lenta de medicamentos e melhora o alcance do fármaco. Já na medicina diagnóstica, a atividade enzimática da amilase pode determinar patologias pancreáticas (CRIPWELL; ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2021; PAUL *et al.*, 2021).

Por fim, a amilase tem grande aplicação na produção de etanol de primeira geração. Isso porque, ela hidrolisa o amido presente em diferentes biomassas, como o milho, produzindo açúcares fermentescíveis. Esses açúcares são consumidos por leveduras na etapa de fermentação alcoólica, cujo resultado é a liberação do bioetanol (ATITALLAH *et al.*, 2019; LÄUFER, 2019).

2.4.1 Biorrefinaria – Bioetanol de milho

O bioetanol começou a ser utilizado como combustível no início do século XX na Europa e nos Estados Unidos. No Brasil, ele foi introduzido em 1925, mas teve o seu auge apenas em 1975 pelo Programa Nacional do Alcool (Proálcool) devido à crise do petróleo da época. Nos dias atuais, os Estados Unidos e Brasil contribuem com 90% da produção mundial de etanol combustível (AZHAR *et al.*, 2017; NEVES, 2021; TSE; WIENS; REANEY, 2021).

Pode-se classificar a produção de etanol em gerações nas quais diferem na biomassa (**Figura 7**). Assim, podem ser usadas fontes como, cana-de-açúcar, milho, sorgo e beterraba, bem como biomassa residual agroindustrial e florestal, como bagaço de cana (ALMEIDA *et al.*, 2022; VASIĆ; KNEZ; LEITGEB, 2021; YU *et al.*, 2019). No Brasil, a cana de açúcar é a principal matéria prima para produção de etanol, seguida do milho, cuja produção cresce a cada ano. Em 2020, a produção brasileira de etanol foi de 32,6 bilhões de litros, dos quais, 2,4 bilhões de litros foram derivados do milho (NEVES, 2021).

Figura 8. Gerações de biocombustíveis.



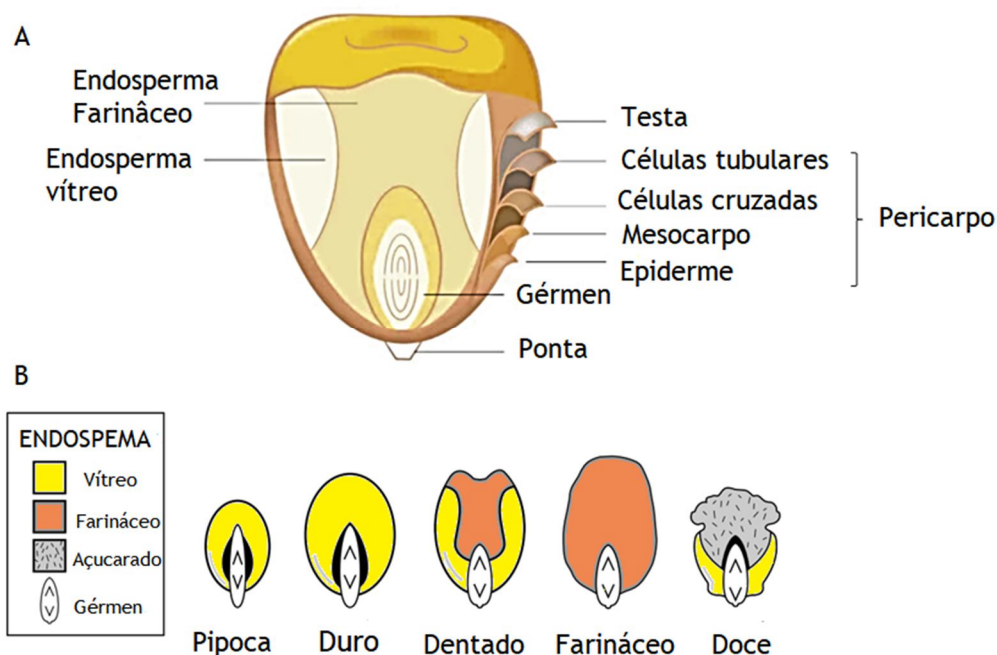
O esquema apresenta uma visão geral das gerações e suas biomassas utilizadas para produção de etanol. Fonte: Adaptado de Vasić, Knez e Leitgeb (2021).

O milho é um grão rico em amido, originado no México e pertencente à família *Poaceae*. De modo geral, o milho é formado por endosperma (83%), pericarpo (5%), gérmen (11%) e ponta (1%). O endosperma apresenta uma fração vítrea (externa) e uma farinácea (interna) que implicam na dureza do grão e em seus aspectos de moagem (**Figura 8A**). Na região vítrea o amido está altamente condensado e não há matriz proteica, enquanto na parte farinácea os grânulos de amido estão dispersos circundados pela matriz proteica (DICKERSON, 2023; MANOCHIO *et al.*, 2017).

Dessa maneira, o formato do grão, o tamanho do gérmen e a composição do endosperma podem determinar diferentes tipos de milho (**Figura 8B**), sendo os mais comumente encontrados, o sílex (*flint*), farináceo (*flour*), dentado (*dent*), pipoca (*pop*), doce (*sweet*) e duro (*waxy*). Já a composição química consiste em amido, lipídios, proteínas, fibras e minerais, dos quais, variam de acordo com o tipo de milho e região plantada (KUMAR; SINGH, 2019; YU *et al.*, 2019).

Nesse contexto, a concentração de amido presente no grão de milho é determinada principalmente pelo ambiente no qual ele foi plantado. Estudos mostram que quanto maior a temperatura de crescimento do milho, menor é o teor de amilose e a proporção de cadeias curtas de amilopectina. No Brasil, o milho duro é predominante devido às suas condições climáticas, diferente de países temperados como os Estados Unidos, onde o tipo dentado predomina. Um milho duro típico apresenta cerca de 1% de amilose e 99% de amilopectina, enquanto o dentado apresenta 23%–25% de amilose e 75%–77% de amilopectina (KUMAR; SINGH, 2019; PAULA *et al.*, 2021).

Figura 9. Anatomia do milho e a distribuição do endosperma em seus diferentes tipos.

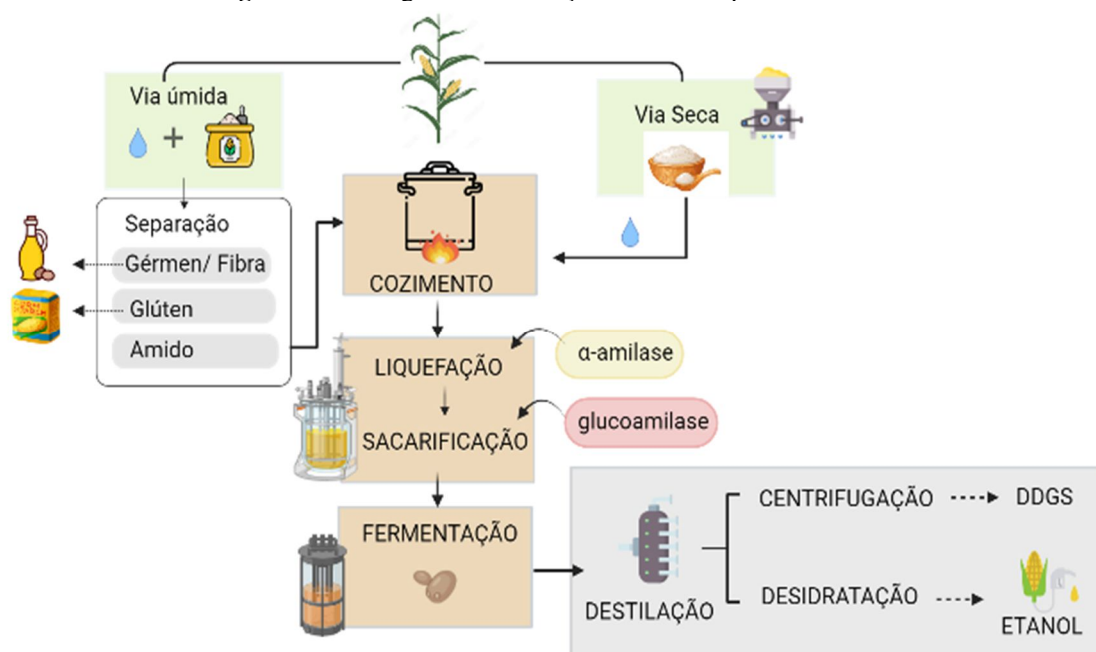


Anatomia do grão de milho e suas partes (a) Diferentes tipos de grão de milho conforme a distribuição do endosperma e tamanho do gérmen (b). Fonte: Adaptado de Dickerson (2003); Zhao e Chen (2023).

A eficiência na produtividade do etanol depende principalmente da extração do amido presente no milho. Por isso, a primeira etapa é a moagem do grão que pode ocorrer através de duas técnicas: a úmida e a seca (**Figura 9**). Na via úmida, a matéria prima é embebida em água antes dos grãos serem moídos até formar uma pasta, da qual, são separados o gérmen, fibra, glúten e amido. Os dois primeiros compostos são processados em óleo de milho, o glúten é filtrado e seco para produção de farinha e o amido é encaminhado para produção do etanol (ANDERSON; HELBERT, 2019; LÄUFER, 2019; MANOCHIO *et al.*, 2017).

Já no processo a seco a matéria prima é primeiro moída em pó e depois misturado em água até a formação do mosto. Então, tudo é levado para ser processado e apenas mais à frente será gerado um único coproduto, os DDGs (*Dried Distillers Grains with Soluble*), um suplemento proteico para alimentação animal. Devido ao custo energético e a necessidade de maior investimento capital, desde os anos 90 a maioria das usinas utilizam da via seca para moagem do milho (LÄUFER, 2019; MANOCHIO *et al.*, 2017). Segundo Kumar e Singh (2019), cerca de 90% de etanol produzido nos Estados Unidos no ano de 2016 foi através de moagem a seco e apenas 10% pela moagem úmida.

Figura 10. Fluxograma de obtenção de etanol a partir do milho.



O milho pode ser processado pela via úmida ou pela via seca. Na via úmida o grão é embebido em água e depois moído para então ser separado os seus compostos, o gérmen e a fibra que vão para produção de óleo vegetal, o glúten que compõem a farinha e o amido que segue para produção de etanol combustível. As etapas seguintes da via úmida assemelham-se com a da via seca a partir da separação, exceto no final, onde não há produção de DDGS (*Dried Distillers Grains with Soluble*). Na via seca o grão de milho é primeiramente moído para então ser misturado em água. O mosto formado é cozido sob alta pressão para gelatinização do amido. Em seguida, é adicionado α -amilases no processo de liquefação. A mistura é então resfriada e glucoamilase são adicionadas para sacarificação do amido. Com os açúcares fermentáveis liberados, leveduras são inseridas para o processo de fermentação. Por último, a mistura é destilada para que ocorra a separação do etanol da fração sólida. O etanol pode ser desidratado formando o etanol anidro e a fração sólida é centrifugada e seca para obtenção de DDGS. Fonte: Autor (2022).

Após a moagem do grão, o mosto formado é cozido sob alta pressão a aproximadamente 105°C por 5 minutos. Essa etapa é importante para a gelatinização do amido, no qual os grânulos ficaram inturgescidos expondo as ligações glicosídicas. Em seguida, são adicionadas α -amilases termoestáveis para hidrolisar parcialmente o amido e diminuir a viscosidade da pasta, processo denominado liquefação. Nessa etapa, o pH é ajustado para 6,0-7,0 e cal é adicionado como fonte de íons Ca^{2+} para ativação das enzimas. O processo ocorre dentre 1-3 horas a uma temperatura próxima dos 100°C e são utilizadas α -amilases de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus stearothermophilus* (BUŠIĆ *et al.*, 2018; KUMAR; SINGH, 2019; LÄUFER, 2019).

Em seguida, o caldo é resfriado para 60°C, o pH é ajustado para no máximo 5,0 e glucoamilases são adicionadas para liberar os açúcares fermentáveis, processo denominado sacarificação (KUMAR; SINGH, 2019; LÄUFER, 2019). As glucoamilase usadas são produzidas pelos fungos *Rhizopus sp.* e *A. niger*. Conforme o grau de digestibilidade do grão de milho

utilizado, outras amilases são necessárias para uma sacarificação mais eficiente, como pululanase e β -amilase provenientes geralmente de *Bacillus* sp. (LÄUFER, 2019; MANOCHIO *et al.*, 2017).

Na etapa da fermentação, o mosto é mantido a uma temperatura de 30°C e pH ótimo entre 4,0-5,0, no qual, leveduras são adicionadas para consumir os açúcares e produzir o etanol. A principal levedura usada são cepas da *Saccharomyces cerevisiae*, pois mantém a estabilidade em uma faixa maior de pH (AZHAR *et al* 2017; BUŠIĆ *et al.*, 2018). Contudo, muitas cepas são incapazes de competir com a levedura de tipo selvagem e bactérias que contamina os processos industriais de fermentação. Isso porque, condições estressantes como aumento na concentração de etanol, temperatura, estresse osmótico e contaminação bacteriana impedem o desenvolvimento e sobrevivência das leveduras durante a fermentação. Por isso, novos estudos visam a utilização de leveduras dos gêneros *Pichia*, *Candida*, *Schizosaccharomyces* e *Pachysolen* (AZHAR *et al.*, 2017; CRIPWELL; ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2021).

A fim de reduzir o tempo de residência de uso dos reatores, minimizar os níveis de enzimas e a inibição de células de levedura por etanol ou substratos, as indústrias utilizem a técnica de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Outros tipos de fermentação, como a hidrólise e fermentação separada (SHF) e a sacarificação e co-fermentação simultânea (SSCF), podem ser usadas dependendo da biomassa e da levedura de escolha (AZHAR *et al.*, 2017; BUŠIĆ *et al.*, 2018; MANOCHIO *et al.*, 2017).

Nesse contexto, há uma demanda por enzimas capazes de trabalhar nas condições ótimas da indústria e que não necessitem dos ajustes de temperatura e pH. Para isso, as amilases acidófilas e/ou termófilas apresentam-se como uma solução capaz de reduzir o tempo de liquefação e sacarificação, bem como o custo da produção. Além disso, outro foco de desenvolvimento dessa indústria tem sido a redução do uso de cal através de modificações genéticas e triagem de microrganismos produtores de amilases independentes de Ca^{2+} . Amilases com algumas dessas características já são comercializadas por diversas empresas, mas a indústria ainda encontra limitações, como a ineficiente expressão heteróloga em larga escala e a pouca secreção extracelular (LÄUFER, 2019; MESBAH, 2022).

Na etapa final, o vinho gerado é aquecido até evaporar e depois é condensado, o que faz com que seus diversos componentes sejam separados. Em seguida, o composto é levado para a destilação e como resultado é formado o álcool hidratado. Esse álcool passa ainda por um processo de desidratação, virando álcool anidro. O que resta após a remoção do etanol é seco até a formação do DDGS, uma ração destinada a alimentação de gado, aves e suínos. (KUMAR; SINGH, 2019; LÄUFER, 2019; MANOCHIO *et al.*, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar bioquimicamente o complexo amilolítico secretada pelo fungo *Humicola brevis* var. *thermoidea* (AmyHb) bem como, a sua aplicação biotecnológica na sacarificação do amido.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar a produção do complexo amilolítico de *H. brevis* em fermentação em estado sólido (FES) usando diferentes fontes de carbono provenientes ou não de agro-resíduos;
- Avaliar as propriedades do complexo amilolítico extracelular de *H. brevis* (AmyHb) e da α -amilase comercial (Termamyl[®]) em relação as propriedades bioquímicas;
- Analisar por zimograma a atividade da AmyHb e da amilase comercial em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE);
- Avaliar o potencial da AmyHb na sacarificação do amido de milho e em combinação com a amilase comercial (Termamyl[®]).
- Purificar a AmyHb a fim de determinar a classe amilolítica produzida.

3. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo em estudo

A linhagem de *H. brevis* var. *thermoidea* usada neste trabalho foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC 28402) e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. João Atílio Jorge da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP).

4.2. Manutenção da linhagem

A linhagem *H. brevis* var. *thermoidea* foi acondicionada através de repiques sucessivos em tubos de ensaio inclinado preparados com meio sólido Batata Dextrose Ágar 3,9% (Oxoid, GBR), previamente esterilizado em autoclave por 20 min a 1,5 Kgf/cm². Estes foram incubados em estufa a 40 °C e umidade constante de 70% durante 15 dias. O cultivo foi imediatamente utilizado para a produção enzimática ou armazenado à 4 °C com repiques mensais (MASUI *et al.*, 2012).

4.3 Produção do complexo amilolítico do *H. brevis* por fermentação em estado sólido (FES)

Para o inóculo em FES foi utilizado o repique produzido de acordo com o item 4.2. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 10 mL de água destilada previamente autoclavada por 20 min, a 1,5 Kgf/cm². A inoculação do fungo no substrato se deu pela transferência de 2 mL desta suspensão na fonte de carbono.

4.3.1 Otimização da produção de amilase

A produção da amilase foi otimizada pela metodologia *one-factor-at-time* (OFAT). Para isso, foram considerados a melhor fonte de carbono (5g), sendo que a esta fonte foi realizada uma suplementação adicional de carbono e nitrogênio, temperatura e tempo ótimo de crescimento do fungo para expressão da enzima (AmyHb). A princípio, todos os meios foram cultivados a 50 °C por 6 dias em FES e então a atividade amilolítica foi mensurada periodicamente para se obter o melhor perfil de produção enzimática.

Os meios foram preparados individualmente em Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 mL de água destilada e 5 g de diferentes fontes de carbono seca (farelo de trigo, quirela de milho, fubá,

palha de milho, sabugo de milho, cevada e amido solúvel). Em seguida, sobre a fonte de carbono definida foram adicionados 1% (m/m) de fontes suplementares de carbono (quirela de milho, fubá, cevada e amido solúvel) e nitrogênio (caseína, peptona, extrato de levedura e ureia), a fim de melhorar a expressão da amilase, respectivamente.

Uma vez estabelecido a melhor composição do meio, as variáveis tempo e temperatura foram avaliadas. Primeiramente, foi determinado a melhor temperatura de crescimento das culturas (40, 50, 55 60 e 70°C) para produção enzimática. Em seguida, foi mensurado a atividade enzimática diária das amostras durante dez dias para verificar o tempo de melhor produção amilolítica. Todos os cultivos foram produzidos em duplicata (n=2).

4.4 Preparação do extrato bruto amilolítico

Após o crescimento do fungo, nas melhores condições de produção de amilase, o meio de cultura foi suspenso em 30 mL de água destilada gelada e, em seguida, filtrado em peneira sintética. Então, a solução filtrada foi centrifugada a 10.000xg, por 10 min, a 4 °C em centrífuga Hermle Z236K (Hermle, DEU). O *pellet* foi descartado e o sobrenadante foi utilizado como extrato bruto para os testes de atividade enzimática.

4.5. Ensaios enzimáticos

4.5.1 Determinação da atividade amilolítica através de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

A atividade amilolítica da AmyHb e da enzima comercial Termamyl[®] foram mensuradas através da liberação de açúcares redutores utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acordo com método proposto por Miller (1959), usando glicose (Sigma-aldrich, USA) como padrão. Para isso, foi preparado uma microrreação adaptada para placas de 96 poços usando 10 µL de solução enzimática, 40 µL de água destilada e 50 µL de tampão acetato de sódio 50 mmol. L⁻¹, pH 5,0, contendo amido comercial 0,5% (m/v) (Sigma-Aldrich, USA) a 60 °C. Após 10 min de incubação, a reação foi interrompida com a adição de DNS na proporção 1:1, seguida de aquecimento em banho fervente. Uma alíquota de 100 µL foi retirada para leitura em microplaca a 540 nm em espectrofotômetro Spectramax 384 Plus (Molecular Devices CA-USA[®]).

Os pontos de controle foram realizados através da substituição de enzima ativa por enzima desnaturada por calor para estimar a hidrólise espontânea do substrato. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 µmol de açúcar

reduzido por minuto. 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 proteína presente no meio de reação (SEGEL, 1975). Uma unidade de produção enzimática em FES ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$) foi definida como a relação entre o número de unidades atividade enzimática por gramas da fonte de carbono.

4.5.2 Dosagem de proteína

A concentração de proteínas totais ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi determinada através de método descrito por Read e Northcote (1981), usando soro albumina bovina como padrão proteico. Para isso, foi preparado uma solução estoque contendo 1g de Coomassie Brilliant Blue G250 em 100 mL de etanol 95% e adicionado a 200 ml de H_3PO_4 85=88%. Então o reagente foi preparado com 1,5 mL de solução estoque há 2,0 mL de etanol 95%, 4,0 mL de H_3PO_4 85=88% e 30mL de água destilada. O meio reacional foi adaptado para microrreação em placas de 96 poços usando 10 μL de solução enzimática, 90 μL de água destilada e 250 μL de reagente. Após 5 min de repouso em temperatura ambiente para o surgimento da coloração, a leitura foi feita em 595 nm em espectrofotômetro Spectramax 384 Plus (Molecular Devices CA-USA[®]).

4.6 Caracterização bioquímica da AmyHb em extrato bruto

4.6.1 Efeito do pH na atividade e na estabilidade enzimática

A influência do pH sobre a atividade amilolítica foi realizada mediante a incubação individual de 0,12 μg (10 μL) de AmyHb e Termamyl[®], 50 μL de solução com 1% (m/v) amido comercial (Sigma-Aldrich, USA) diluído em água destilada e 40 μL de tampão glicina-citrato-fosfato 100 mmol L^{-1} com valores de pH entre 3,0-10,0 durante 10 min a 60 °C (RULLER *et al.* 2014). A estabilidade da enzima ao pH foi realizada através da incubação de 1,2 μg (100 μL) de AmyHb e Termamyl[®] em 900 μL de tampão glicina-citrato-fosfato 100 mmol L^{-1} com valores de pH entre 3,0-10,0 durante 24 h, a 25 °C. Uma alíquota de 10 μL de cada solução (0,12 μg) foi utilizada para determinar a atividade enzimática conforme descrito em 4.5.1. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual relativa, na qual a maior atividade enzimática foi considerada como 100%.

4.6.2 Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade enzimática

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado mediante uma microrreação, conforme descrito pelo item 4.5.1, contendo 0,12 µg (10 µL) de AmyHb e Termamyl[®], em temperaturas que variaram entre 25 e 80 °C. A termoestabilidade foi avaliada mediante a pré-incubação de 1,2 µg (100 µL) de AmyHb e Termamyl[®], em 900 µL de água destilada as temperaturas de 50, 60 e 70 °C. Além disso, a fim de melhorar a termoestabilidade da enzima foram preparadas diferentes alíquotas contendo MnCl₂ ou CaCl₂ na concentração de 10 mmol. L⁻¹. Para cada temperatura foi determinado intervalos de tempo entre 1,0 e 24h, dos quais pré-alíquotas de 100µL foram retiradas e resfriadas em banho de gelo por 1 min. Em seguida, uma alíquota de 10 µL contendo 0,12 µg de enzima foi utilizada para determinar a atividade enzimática conforme descrito em 4.5.1. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual relativa, na qual a maior atividade enzimática foi considerada como 100%.

4.6.3 Efeito de sais e EDTA na atividade enzimática

O efeito de diferentes sais (KCl, LiCl, NaCl, SrCl₂, MnCl₂, CaCl₂, CoCl₂, HgCl₂, ZnCl₂, FeCl₃, AgNO₃, CuSO₄, NiSO₄ e MgSO₄) e EDTA foram avaliados através da presença de 5 e 10 mmol. L⁻¹ destes aditivos na microrreação enzimática. Assim, as atividades enzimáticas foram realizadas conforme item 4.5.1, nas condições ótimas obtidas pelos testes anteriores. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual relativa, na qual o sistema reacional sem adição de nenhum composto foi considerado como 100%.

4.6.4 Efeito de solventes na atividade enzimática

O efeito de diferentes solventes orgânicos (isopropanol, formol, metanol e etanol) foram avaliados através da presença de 5% e 10% (v/v) desses compostos na microrreação enzimática. Assim, as atividades enzimáticas foram realizadas conforme item 4.5.1, nas condições ótimas obtidas pelos testes anteriores. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual relativa, na qual o sistema reacional sem adição de nenhum composto foi considerado como 100%.

4.6.5 Efeito de etanol e NaCl na atividade e na estabilidade enzimática

O efeito da concentração do etanol e NaCl na atividade enzimática foi determinado mediante uma microrreação contendo 0,12 µg (10 µL) de AmyHb e Termamyl® na presença de um gradiente de concentração de etanol, de 0 a 50% (v/v), ou NaCl, de 0,1 a 2,0 mol L⁻¹ (v/v). Então, as reações foram conduzidas conforme 4.5.1, nas condições ótimas obtidas pelos testes anteriores. Os testes de estabilidade em concentrações crescentes de etanol e NaCl, foram realizados individualmente através da pré-incubação de 1,2 µg (100 µL) de AmyHb e Termamyl®, em 900 µL de solução contendo água e etanol 0 a 50% (v/v) ou NaCl 0,1 a 2,0 mol L⁻¹ (v/v), durante 24h a 25 °C. Uma alíquota de 10 µL de cada solução (0,12 µg) foi utilizada para determinar a atividade enzimática conforme descrito em 4.5.1. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual relativa, na qual a maior atividade enzimática foi considerada como 100%.

4.6.6 Efeito de diferentes substratos amiláceos na atividade enzimática

Foram realizados experimentos de hidrólise enzimática com diferentes tipos de fontes amiláceas (amido de arroz, amido de trigo, amido de milho, amilopectina batata, amilopectina de milho e amilose de batata - Sigma-Aldrich, USA) e dissacarídeos contendo glicose (maltose e sacarose - Sigma-Aldrich, USA). Os substratos foram preparados na concentração de 1%, dos quais as fontes amilácea foram fervidas para o processo de gelatinização. Então, as reações foram preparadas conforme item 4.5.1, nas condições ótimas obtidas pelos testes anteriores. Os resultados obtidos foram expressos na forma de atividade residual relativa, na qual o sistema reacional sem adição de nenhum composto foi considerado como 100%.

4.7 Análise eletroforética e teste de atividade amilolítica em zimograma

A análise eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de acordo com o método de Laemmli (1970). Foi aplicado nos poços, 60 µg de AmyHb em extrato bruto e da Termamyl®. O marcador molecular utilizado foi o *Low molecular weight* – LMW (GE Healthcare, GBR) com peso molecular entre 20 e 97 (Fosforilase: 97kDa, Albumina: 66kDa, Ovoalbumina: 45kDa, Anidrase carbônica: 30kDa, Inibidor de tripsina: 20kDa). As bandas de proteínas foram reveladas com corante Coomassie Brilliant blue R-250.

No zimograma, a atividade amilolítica foi analisada ao aplicar 60 µg de AmyHb e Termamyl® desnaturada no gel poliacrilamida 12%. Então, o gel ficou incubado por 30 min a temperatura ambiente em solução de isopropanol 25% (v/v), sob baixa agitação, para remover o SDS e possíveis interferentes da atividade enzimática. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada e incubado em tampão acetato de sódio 50 mmol. L⁻¹, pH 5,0, contendo amido comercial 1 % (m/v) (Sigma-Aldrich, USA) durante 20 min, a 60 °C. Depois, o gel foi lavado sob agitação branda com água destilada durante 10 min e incubado em solução de iodo (I₂ 10mM) e iodeto de potássio (KI 14mM) (Fuwa, 1954) até o surgimento da banda. A imagem do gel foi capturada e arquivada em modo TIF (*Targed Image File*) e analisadas no programa Image Master 2D platinum v3.0 (GE) para detecção das massas moleculares de cada banda.

4.8 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Os produtos da hidrólise do amido comercial gerados pela AmyHb foram avaliados por cromatografia de camada delgada (CCD) em placas de sílica (Merck, folhas de alumínio 20x20 cm sílica gel 60). A hidrólise enzimática ocorreu pela incubação de 0,12 µg de AmyHb, 40 µL de água destilada e 50 µL de tampão acetato de sódio 50 mmol. L⁻¹, pH 5,0, contendo amido comercial 0,5% (m/v) (Sigma-Aldrich, USA) a 60 °C. A atividade amilolítica das amostras foi interrompida com ácido tricloroacético (TCA) (Sigma-Aldrich, USA) depois de 0,5, 1,0, 2,0 e 24 h de reação.

Então, foi aplicado na placa um volume de 10 µL das amostras hidrolisadas e 10 µL do padrão contendo glicose e maltose (1% p/v). A placa foi colocada em uma cuba de vidro com solução de corrida (acetato de etila, ácido acético, ácido fórmico e água destilada nas proporções 9:3:1:4, respetivamente). Após a corrida, os cromatogramas foram deixados por 24h à temperatura ambiente para secar. Em seguida, borrifou-se nas placas uma solução de orcinol 0,2% (p/v) diluído em etanol e ácido sulfúrico nas proporções de 9:1, respetivamente. Por último, as placas foram reveladas em estufa a 100°C até o aparecimento das bandas.

4.9 Sacarificação enzimática do amido de milho

4.9.1 Ensaios de sacarificação enzimática do amido de milho

Estudos de hidrólise enzimática de amido em condições laboratoriais, em que o objetivo é a análise da eficiência de uma amilase em específico são escassos. Por isso, nesta pesquisa, os ensaios para a hidrólise enzimática do amido de milho pelo complexo amilolítico AmyHb foram

realizados através de adaptações de diferentes estudos (JAIN; KATYAL, 2018; LI *et al.*, 2014; PERVEZ *et al.*, 2014). Dessa forma, os ensaios de hidrólise enzimática foram preparados em microtubos com farinha de milho comercial (Yoki™) na concentração de 5% (m/v) e em um volume final de 1mL ajustado com água destilada. Essa solução foi então fervida por 10 minutos para que o processo de gelatinização do amido e resfriada em gelo por mais 10 minutos para adição das enzimas. Assim, em diferentes microtubos foram adicionadas a AmyHb (6,0mg/g de substrato); a Termamyl® (6,0mg/g de substrato) e o Coquetel de AmyHb50%+Termamyl® 50% (3,0 + 3,0 mg/g de substrato), nos quais o volume final de 2mL foi ajustado com tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0. Além disso, uma mostra controle, sem a adição de enzimas, foi preparada. Então, as amostras foram todas acondicionadas e controladas em condições de ensaio usando termomixer (Thermo Scientific™, USA) a 60 °C e 300 rpm, durante 24h.

4.9.2 Determinação da sacarificação do amido pela atividade enzimática

Para os testes de hidrólise do amido de milho a atividade amilolítica da AmyHb, da Termamyl® e do Coquetel (AmyHb50%+Termamyl® 50%) foram determinadas através do método enzimático peroxidase/glicose-oxidase (BERGMEYER; GAWEHN, 1974) e do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959) par quantificar a glicose e os açúcares redutores totais presente, respectivamente. Para a metodologia de peroxidase/glicose-oxidase foi realizado uma microrreação adaptada para placas de 96 poços usando 5 µL de solução hidrolisada, 45 µL de água destilada e 250 µL de Kit comercial (Glicose GOD/Labtest). Após 10 min de incubação a 37°C para o surgimento da coloração, foi feita a leitura em 505 nm em espectrofotômetro Spectramax 384 Plus (Molecular Devices CA-USA®). Os resultados foram expressos em glicose (g.L⁻¹) e porcentagem de sacarificação através das equações, respectivamente (JAIN; KATYAL, 2018):

$$\text{Glicose (g.L}^{-1}\text{)} = \text{fator de diluição} \times \text{absorbância} \times \text{fator da curva}$$

$$\text{Sacarificação (\%)} = \frac{\text{Glicose (g.L}^{-1}\text{)}}{\text{Concentração inicial de carboidrato (g.L}^{-1}\text{)}} \times 100$$

Já para o método de açúcares redutores, foi realizado uma microrreação adaptada para placas de 96 poços usando 10 µL de solução hidrolisada, 90 µL de água destilada e 100 µL de

DNS. Após 10 min de incubação em banho fervente para o surgimento da coloração, foi feita a leitura em 540 nm em espectrofotômetro Spectramax 384 Plus (Molecular Devices CA-USA®). Os resultados foram expressos em ART (Açúcares Redutores Totais) através da equação:

$$ART (g.L^{-1}) = \text{fator de diluição} \times \text{absorbância} \times \text{fator da curva}$$

4.6 Purificação da AmyHb por cromatografia de troca iônica e afinidade

Foi realizado a cromatografia de troca iônica em coluna Q Sepharose FF acoplada no sistema de purificação de proteínas ÄKTA™ purifier (Cytiva, GB). A resina foi equilibrada com tampão A composto de acetato de sódio 100 mmol. L⁻¹, pH 4,5 e NaCl 50 mmol. L⁻¹. Em seguida, a resina foi carregada com 25 mL de extrato bruto de *H. brevis*, contendo 4100.0 U Totais de amilase que foram eluidos utilizando um gradiente linear do tampão B, composto de NaCl 300 mmol. L⁻¹ e recolhidas em frações de 1 mL por tubo. Aquelas frações que obtiveram absorção em 280 nm e atividade amilolítica (item 4.5.1) foram reunidas e concentradas utilizando Vivaspin® 10 kDa (Sartorius AG, DEU) através de centrifugação a 7.000xg, a 4 °C. O concentrado foi analisado conforme item 4.5.1 e 4.5.2, já o grau de pureza foi avaliado através de gel eletroforese SDS-PAGE conforme item 4.7.

Uma segunda etapa de purificação foi realizada através de cromatografia de filtração em coluna Sephadex G-50 acoplada no sistema de purificação de proteínas ÄKTA. Para isso o concentrado da troca iônica foi liofilizado em centrífuga rotacional a vácuo Alpha 2-4 LSC plus (Martin Christ, DEU) e equilibrado com tampão acetato de sódio 100 mmol. L⁻¹ e pH 4,5, do qual 5mL contendo 575,0 U Totais de amilase foi aplicado na coluna previamente equilibrada com tampão A composto de acetato de sódio 100 mmol. L⁻¹, pH 4,5 e NaCl 50 mmol. L⁻¹. As frações foram recolhidas em 1 mL. min⁻¹., das quais as que obtiveram absorção em 280 nm e atividade amilolítica (item 4.5.1) foram analisadas conforme item 4.5.1 e 4.5.2 e o grau de pureza foi avaliado através de gel eletroforese SDS-PAGE conforme item 4.7.

4.7 Análise dos dados obtidos

Todos resultados obtidos dos experimentos foram realizados em quintuplicata (n=5) empregando diferentes extratos de *H. brevis* em FES contendo AmyHb, sendo que os dados e os valores calculados representam a média \pm desvio padrão para as atividades enzimáticas. Além disso, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett no programa Graphpad Prism 9 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

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

A melhor fonte de carbono para o estímulo de produção de amilase por *H. brevis* var. *thermoidea* (AmyHb) utilizando fermentação em estado sólido foi o farelo de trigo com $849,6 \pm 18,2$ U.g⁻¹ (Tabela 1). Corroborando com Almeida *et al.* (2022) e Masui *et al.* (2012) que relatam que o *H. brevis* var. *thermoidea* tem melhor desenvolvimento em FES contendo farelo de trigo, no qual ele produz quantidades consideráveis de xilanase ($5.372,4 \pm 370,7$ U. g⁻¹), β-glucosidase ($7,7 \pm 0,6$ U.g⁻¹) e como mostra este estudo amilases. O farelo de trigo é um resíduo do grão de trigo moído comumente utilizado como substrato de FES para produção de diversas enzimas a partir de várias espécies. Isso porque, ele representa uma fonte nutricional rica, composta de carboidratos não amiláceos (55-60%), amido (14-25%), proteína (13-18%), minerais (3-8%) e gordura (3-4%) (KATILEVICIUTE *et al.*, 2019).

Tabela 1. Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de AmyHb.

Fonte de Carbono	U.g ⁻¹	U. mL ⁻¹	U totais
Farelo de Trigo	$849,6 \pm 18,2$	$141,6 \pm 4,4$	$4.248 \pm 120,1$
Sabugo de milho	$276,6 \pm 21,1$	$46,1 \pm 4,2$	$1.383,0 \pm 95,0$
Cevada	$229,8 \pm 17,1$	$38,3 \pm 3,0$	$1.149,1 \pm 102,5$
Fubá de milho	$211,9 \pm 22,1$	$35,3 \pm 2,2$	$1.059,8 \pm 97,5$
Quirela de milho	$208,3 \pm 10,2$	$34,7 \pm 4,0$	$1.041,5 \pm 107,2$
Palha de milho	-	-	-
Amido solúvel	-	-	-

Os valores representam as médias \pm SD ($n = 5$) da atividade enzimática de diferentes extratos de *H. brevis* em FES.

Muitos estudos descrevem uma eficiente secreção amilolítica em farelo de trigo por *P. chrysogenum* (687 U.mg⁻¹) e *P. griseofulvum* (652 U.mg⁻¹) (ERTAN; BALKAN; YARKIN, 2014); *Thermomyces lanuginosus* (535 U.g⁻¹) (KUMAMNENI; PERMAUL; SINGH, 2005); *Lichtheimia ramosa* ($320,7$ U.g⁻¹) e *Thermoascus aurantiacus* ($44,2$ U.g⁻¹) (OLIVEIRA *et al.*, 2016); *Gongronella butleri* ($63,25$ U.g⁻¹) (CAVALHEIRO *et al.*, 2017); *P. purpurogenum* ($23,5$ U.g⁻¹) (EL-NAGGAR; EL-HERSH, 2010); *P. citrinum* ($17,3 \pm 0,6$ U.mg⁻¹) e *A. clavatus* ($47,98 \pm 2,9$ U.mg⁻¹) (SHRUTHI; ACHUR; BORAMUTHI, 2020); *A. fumigatus* ($341,7 \pm 1,6$ U.mL⁻¹) (SINGH *et al.*, 2014) e *Bispora* sp. ($34,1$ U.mL⁻¹) (HUA *et al.*, 2014).

Entretanto, outras biomassas também são usadas na produção de amilase por FES como, casca de soja e grão de cerveja pelo *A. oryzae* (FRANCIS *et al.*, 2022; MELNICHUK *et al.*, 2020);

milheto pelo *A. terreus* (SETHI *et al.*, 2016); raiz de beterraba pelo *Monascus sanguineus* (TALLAPRAGADA *et al.*, 2017); casca de laranja pelo *T. pseudokoninguii* (ABDULAAL, 2018); cevada e arroz pelo *Monascus anka* e *A. kawachii* (YOSHIZAKI *et al.*, 2010), casca de melancia pelo *T. virens* (ABDEL-MAGEED *et al.*, 2022), bagaço de maçã pelo *Rhizopus delemar* (PATHANIA; SHARMA; HANDA, 2018), arroz e espiga de milho pelo *A. glaums*, *A. oryzae* e *P. purpurogenum* (EL-NAGGAR; EL-HERSH, 2010); cascas de frutas pelo *Phanerochaete chrysosporium* (OLORUNNISOLA; JAMAL; ALAM, 2018) e casa de mandioca pelo *Rhizopus stolonifer*, *A. niger* e *Phanerochaete chrysosporium* (POTHIRAS; EYINI, 2016).

Ademais, foi observado que as fontes com alto teor de amido apresentaram uma produção menor quando comparados ao farelo de trigo. Assim, pode-se sugerir que o tipo e a quantidade de amido presente nas fontes avaliados possam ter influenciado na expressão de amilases totais. Além disso, sugere-se que a quantidade de água presente no meio possa ter sido insuficiente para inturgescer o grânulo e auxiliar o acesso das enzimas amilolíticas às ligações glicosídicas (IUGA; MIRONEASA 2019; KRISHNA, 2005). Sugere-se também que nas fontes ricas em celulose a falta de pré-tratamento do meio e as pequenas quantidade de celulase produzidas pelo *H. brevis*, como demonstrado em estudos prévios, pode ter dificultado o acesso aos nutrientes pelo fungo (Li *et al.*, 2020; MASUI *et al.*, 2012).

Complementarmente, verificou-se que a adição suplementar de outras fontes de carbono sobre o farelo de trigo não promoveu estímulo na produção da enzima (**Tabela 2**). Em contraste a esses resultados, Kunamneni e autores (2005) relatam o aumento da produção de amilase em meio de farelo de trigo suplementado de 1% (m/m) de amido solúvel por *T. lanuginosus*. Interessantemente, a adição da cevada não estimulou a produção da amilase, mas também, não diminuiu a expressão da enzima. Isso sugere que os compostos presentes na cevada, carboidratos (80%), β -glucanos (3,7-7,7%), proteínas (11,5-14,2%) e lipídios (4,7-6,8%), tenham fornecido ao fungo um acréscimo nutricional para manter a expressão enzimática (PUNIA, 2019).

Tabela 2. Adição de fontes suplementares de carbono sobre o farelo de trigo para produção de AmyHb.

Fonte de carbono suplementado (1 %; m/m)	U.g ⁻¹	U. mL ⁻¹	U totais
Controle ^a	868,6 ± 21,2	144,1 ± 5,7	4.340,2 ± 133,9
Cevada	853,8 ± 12,5	142,3 ± 7,2	4.269,2 ± 123,2
Quirela de milho	529,2 ± 13,4*	88,2 ± 7,2*	2.646,9 ± 145,6*
Amido solúvel	261,6 ± 17,2*	43,8 ± 1,9*	1.308,7 ± 119,7*
Fubá de milho	168,8 ± 9,1*	28,3 ± 7,2*	849,0 ± 121,8*

Legenda: (^a) Farelo de trigo. (*) Diferença significativa pelo teste de Dunnet (p<0,05). Os valores representam as médias ± SD (n = 5) da atividade enzimática de diferentes extratos de *H. brevis* em FES.

Em relação as fontes suplementares de nitrogênio, os resultados mostraram que a adição dessas fontes não melhorou a expressão da AmyHb (**Tabela 3**). De maneira similar, Sethi *et al.* (2016) verificou que a adição de nitrogênio não estimulou significativamente a expressão de amilase pelo *Aspergillus terreus* e ainda concluiu que os meios compostos de agro resíduos fornecem taxas de carbono e nitrogênio suficiente para o desenvolvimento do microrganismo. Além disso, Shruthi e autores (2020), observaram que o acréscimo de extrato de levedura diminuiu a produção de amilase por *P. citrinum*, resultado similar ao encontrado pelo *H. brevis*.

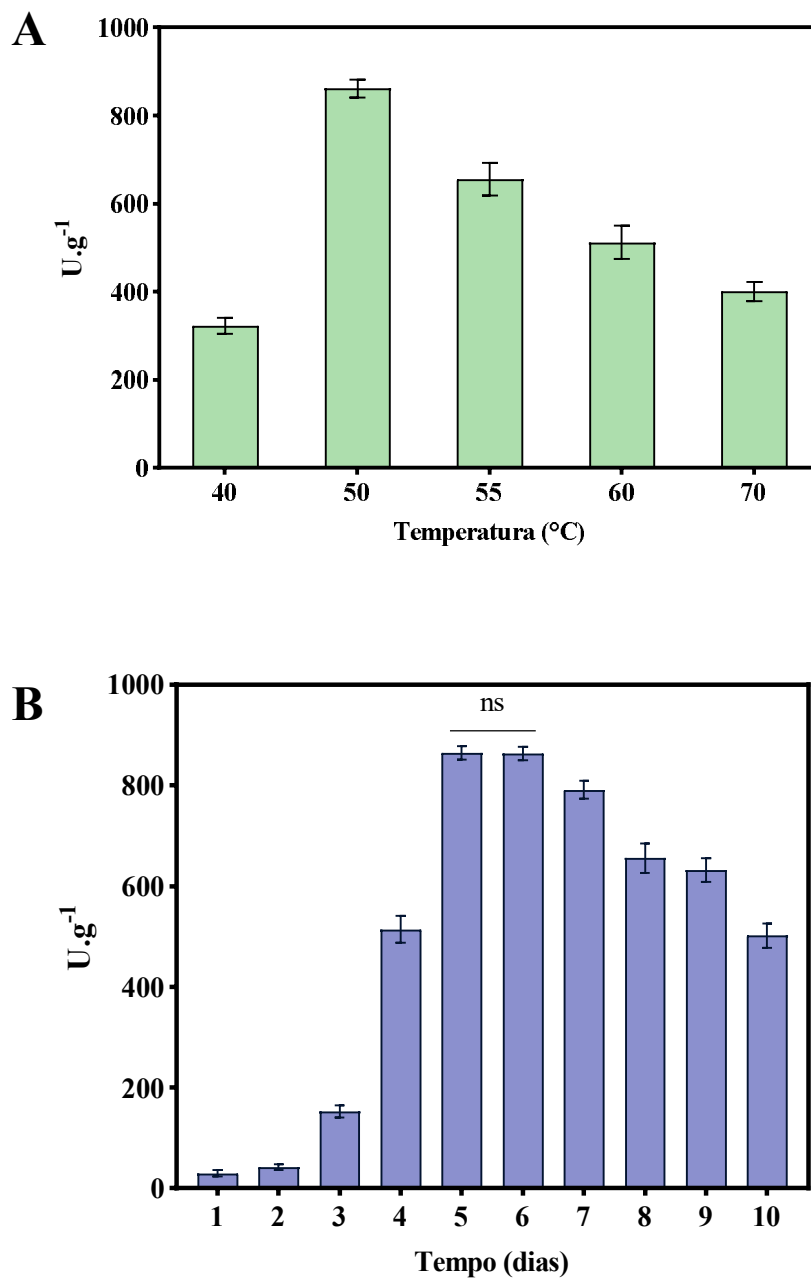
Tabela 3. Adição de fontes suplementares de nitrogênio obre o farelo de trigo para produção de AmyHb.

Fonte de nitrogênio suplementado (1 %; m/m)	U.g ⁻¹	U. mL ⁻¹	U totais
Controle ^a	816,7 ± 22,7	136,1 ± 2,6	4.080,2 ± 243,3
Extrato de levedura	631,8 ± 18,1*	105,3 ± 3,2*	3.159,6 ± 210,7*
Caseína	487,8 ± 20,30*	81,3 ± 7,0*	2.439,8 ± 109,9*
Ureia	482,4 ± 8,2*	80,4 ± 6,2*	2.412,0 ± 123,2*
Peptona	435,7 ± 19,1*	72,5 ± 5,3*	2.175,6 ± 214,0*

Legenda: (a) Farelo de trigo. (*) Diferença significativa pelo teste de Dunnet (p<0,05). Os valores representam as médias ± SD (n = 5) da atividade enzimática de diferentes extratos de *H. brevis* em FES.

Uma das vantagens da técnica do FES é a utilização de substratos simples, como os de agro resíduos que em geral não necessitam de suplementação nutricional e que dinamizam a bioeconomia circular (DAHIYA *et al.*, 2022). Isso foi observado nos resultados desse estudo, que dentro das condições testadas, o meio contendo apenas farelo de trigo apresentou o melhor desempenho na produção de amilase pelo *H. brevis*. Ademais, esses resultados assemelham-se aos encontrados por Almeida *et al.* (2022) e de Masui *et al.* (2012) na produção de xilanases e β-glucosidases por *H. brevis*.

Para o teste do efeito da temperatura e tempo de cultivo, verificou-se que a maior expressão da amilase ocorreu a 50°C (861,4 ± 19,3 U. g⁻¹) com máximo entre 5 dias (864,8 ± 13,8 U.g⁻¹) e 6 dias (863,1 ± 13,4 U. g⁻¹) (**Figura 10**). Para outros fungos termófilos, Kunamneni *et al.* (2005) obtiveram uma produção de amilase por *T. lanuginosus* em farelo de trigo a 50°C após 5 dias (261 U.g⁻¹). Similarmente, Oliveira *et al.* (2016), relataram a produção de amilase por *T. aurantiacus* (44,2 U.g⁻¹) e pelo fungo mesófilo *L. ramosa* (320,4 U. g⁻¹) em farelo de trigo por 5 dias. Já em fungos do mesmo gênero, foi relatado por Riaz *et al.* (2006) a produção de uma glucoamilase de *Humicola* sp. (10,44 U. mg⁻¹), a 37°C por 3 dias em fermentação submersa composta por meio Vogel, no qual eles substituíram a glicose por farelo de trigo.

Figura 11. Efeito de temperatura e do tempo de cultivo para produção de AmyHb.

Efeito da temperatura de cultivo (**A**) e o efeito do tempo de cultivo (**B**) na produção de AmyHb. Os valores representam as médias \pm SD ($n = 5$) da atividade enzimática de diferentes extratos de *H. brevis* em FES. Legenda: (ns) Não significativa pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$).

O efeito do pH na expressão da enzima não foi avaliado, uma vez que a cultura possui uma composição simples, farelo de trigo e água, e a sua consistência sólida inviabiliza a observação de possíveis mudanças de pH. Sabe-se que a adição de fonte de nitrogênio pode levar a alterações do pH, mas o uso deste se fez dispensável pelos resultados anteriores (KRISHNA, 2005). Portanto, o pH final (6,45) do extrato bruto corresponde as interações dos complexos enzimáticos, metabolitos e do próprio meio pelo fungo.

5.2 Caracterização bioquímica da AmyHb em extrato bruto e da Termamyl®.

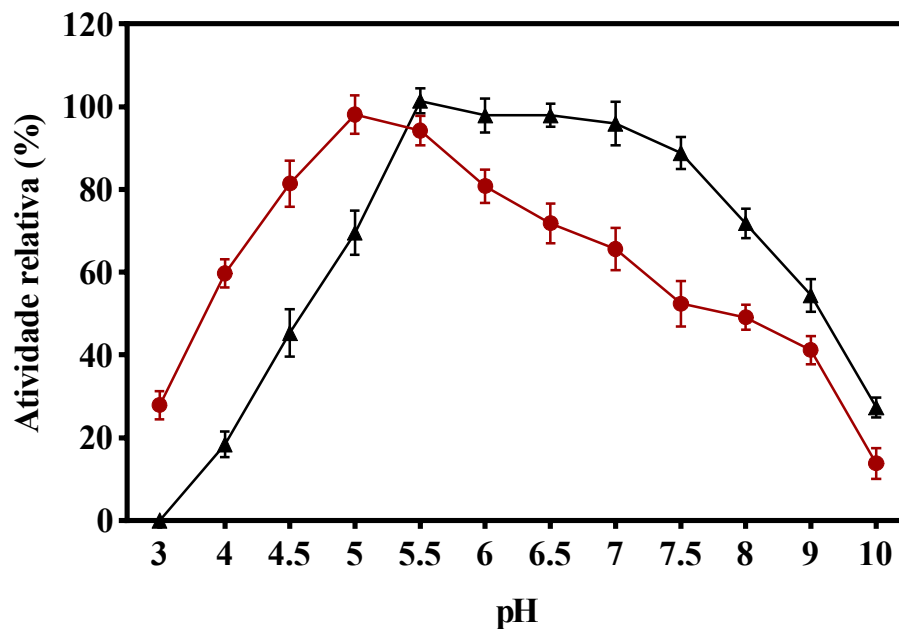
5.2.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática

Foi avaliada a influência do pH na atividade enzimática da AmyHb e da amilase comercial Termamyl®. Observou-se que a AmyHb obteve atividade de 100% em pH 5,0, enquanto a comercial apresentou o seu ótimo em pH 5,5 (**Figura 11A**). O pH ótimo obtido pela AmyHb foi semelhante ao encontrado em outras espécies do gênero *Humicola*, como a glucoamilase de *H. grisea* var. *thermoidea* (TOSI; TEREZI; JORGE, 1993). Para fungos cultivados em FES, as mesmas características foram relatadas para amilases de *Gongronella butleri* (CAVALHEIRO *et al.*, 2017) e *M. sanguineus* (TALLAPRAGADA *et al.*, 2017). Já para fungos cultivados em FS, a atividade ótima em pH 5,0 foi descrito em espécies de fungos como *Thamnidium elegans*, *Cordyceps farinosa*, *Rhizomucor pusillus* (ROTH *et al.*, 2019), *A. wentii* (LAGOS *et al.*, 2021) e *T. pinophilus* (XIAN *et al.*, 2015).

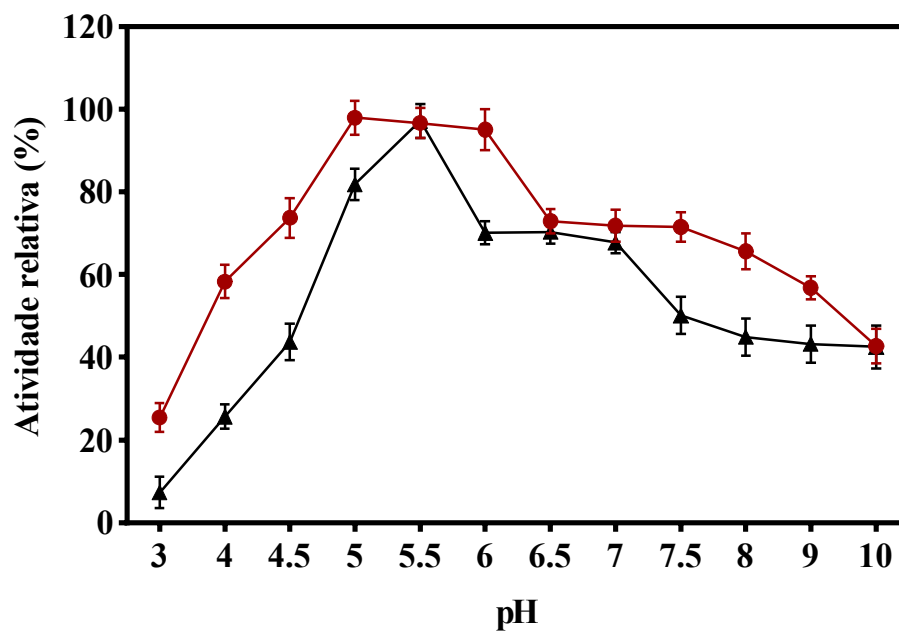
Além disso, a AmyHb manteve atividade relativa acima de 80% entre a faixa de pH 4,5 e 6,0 o que se encontra em concordância com o caráter ácido observado para a maioria das amilases fúngicas que apresentam valores de pH que vão de 4,0 a 7,0. Esses resultados são promissores nas técnicas de sacarificação do amido que apresentam um pH entre 3,0 e 5,0. Assim, essas amilases não demandam a neutralização da pasta de amido, como ocorre na produção de etanol combustível a partir do milho (CRIPWELL; ZYL; VIJOEN-BLOOM, 2021; MESBAH, 2022). Adicionalmente, em processo de suplementação probiótica, as amilases que são utilizadas devem apresentar atividade em pH neutro ou ácido, similar as propriedades digestivas dos animais (EL-SAADONY *et al.*, 2021).

Figura 12. Efeito do pH na atividade da AmyHb e da Termamyl®.

A



B



Efeito de pH (A). Estabilidade em pH (B). (●) AmyHb; (▲) Termamyl®. Foi considerado 100% a atividade de $24,2 \pm 0,5 \text{ U.mg}^{-1}$ e $484,8 \pm 31,9 \text{ U.mg}^{-1}$ respectivamente. Os valores representam as médias \pm SD ($n = 5$) da atividade enzimática.

Por outro lado, a enzima comercial mostrou atividade relativa acima de 80% na faixa de pH 5,5 e 7,5 e quando comparada a AmyHb, apresentou uma maior atividade em pH de caráter básico do que em pH de caráter ácido. A Termamyl[®] é uma das amilases comerciais mais utilizadas pela indústria e corresponde a uma α -amilase produzida pelo *Bacillus licheniformis*. Essa bactéria é considerada de modo geral como não patogênica e tem sido usada pela indústria desde 1972, no qual já foram desenvolvidas diversas cepas modificadas desse microrganismo (MURAS *et al.* 2021; ROTH *et al.* 2019). Assim, comparada as amilases fúngicas as de bactérias apresentam um bom desempenho em pH alcalino (ROTH *et al.* 2019).

Para o teste de estabilidade, a AmyHb manteve-se estável quando incubada entre valores de pH 5,0 e 6,0 em um período de 24h, a 25°C (**Figura 11B**). Nessas mesmas condições, a AmyHb deteve atividade relativa de cerca de 70% em pH 4,0; 6,5; 7,0 e 7,5 e de aproximadamente 60% em pH 4,0; 8,0 e 9,0. Para amilases produzidas em farelo de trigo por FES, Singh *et al.* (2014) observou que a atividade da amilase de *A. fumigatus* quando incubada a 40°C por 30 min teve uma diminuição quando o pH era elevado. Já Anindyawati *et al.* (1998), descreveu que as três isoformas amilolíticas do fungo *A. awamori* KT-11 permaneceram com atividade em uma ampla faixa de pH (AmyII 4,5-8,5, AmyIII 3,5 -7,5 e AmyIII 4,0-7,0) por 15h a 4°C. De forma complementar, Riaz *et al.* (2007) descreve que a glucoamilase purificada de *Humicola* sp. possui pH ótimo em 4,7 e mantém estabilidade em uma faixa de pH de 3,5 a 5,9.

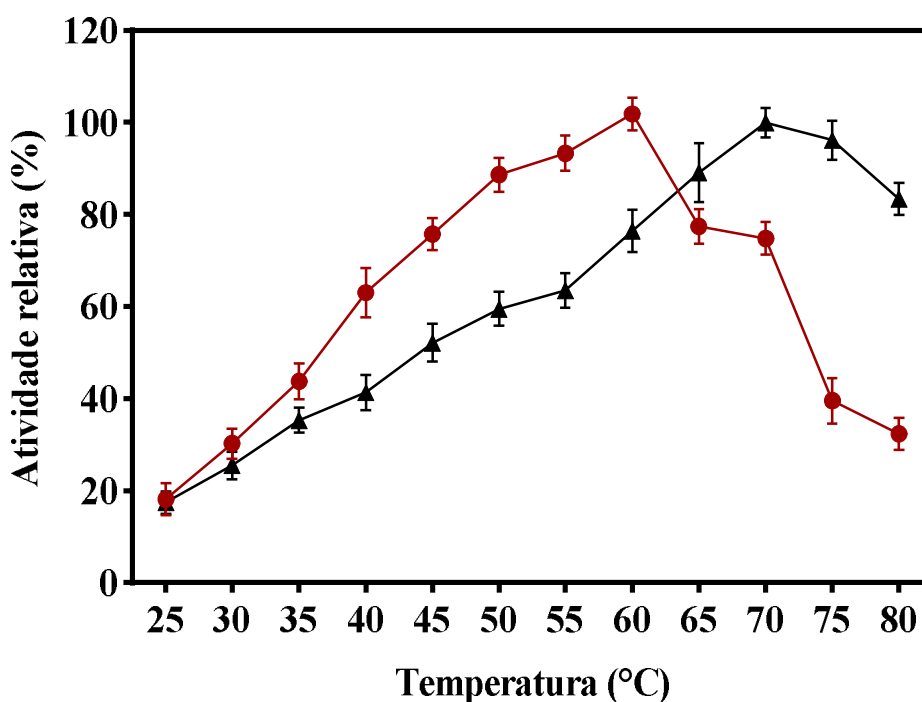
Em contrapartida, a amilase comercial manteve-se estável em pH 5,5 quando incubada por 24h, a 25°C, mas perdeu cerca de 10% de atividade em pH 5,0 e 30% entre os valores de pH 6,0 e 7,0. Uma das dificuldades encontradas pela indústria é que as amilases que existem no mercado são instáveis em certas condições ácidas/básicas, o que limita a sua aplicação. Por isso, cepas mutantes de microrganismos que expressam amilase são comumente produzidas, como por exemplo, uma cepa mutante construída a partir da Termamyl[®] que tem maior estabilidade em pH 4,5 (GANGADHARAN; JOSE; NAMPOOTHIRI, 2020).

Segundo estudos, a estabilidade de amilases em pH ácidos deve-se ao excesso de resíduos de ácido glutâmico e aspártico na enzima, além de menos resíduos de aminoácidos carregados positivamente (PARASHAR; SATYANARAYANA, 2018). De maneira geral, a composição estrutural de uma enzima determina a sua atividade ótima e estabilidade ao pH através da soma de cada aspecto que afeta o seu pKa (PINTO; DORN; FELTES, 2020). Nielsen e autores (2001) descrevem que a velocidade de reação de uma α -amilase ocorre pela protonação de Asp231 em pH baixo e desprotonação de Glu261 em pH alcalino, por isso, o pKa das amilases deriva principalmente desses dois grupos de resíduos de aminoácidos em seu sítio ativo.

5.2.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática

Para o efeito da temperatura, a AmyHb apresentou atividade ótima a 60°C, e exibiu próximo de 90% da sua atividade nas temperaturas, 55 °C e 50 °C, cerca de 70% a 45°C, 65°C, 70°C (**Figura 12**). Esses valores são similares aqueles descritos para outras amilases expressas por fungos termófilos, nas quais variaram entre 50 e 80°C (MESBAH, 2022; TOMASIK; HORTON, 2012). Por outro lado, a Termamyl® apresentou atividade ótima a 70°C e 75°C. Apesar do *Bacillus licheniformis* ser um microrganismo mesófilo, ele pode produzir α -amilases com atividade ótima que variam entre 50°C e 100°C (MURAS *et al.*, 2021).

Figura 13. Efeito da temperatura na atividade da AmyHb e da Termamyl®



(●) AmyHb; (▲) Termamyl®. Foi considerado 100% a atividade de $22,3 \pm 1,0 \text{ U.mg}^{-1}$ e $454,8 \pm 23,9 \text{ U.mg}^{-1}$, respectivamente. Os valores representam as médias \pm SD ($n = 5$) da atividade enzimática.

De maneira similar, a glucoamilase expressa por *H. grisea* var. *thermoidea* em FES, apresentaram a atividade em temperatura ótima de 60 e 55°C, respectivamente (CAMPOS; FELIX, 1995; TOSI; TERENZI; JORGE, 1993). Adicionalmente, foi relatado que *Paecilomyces variotti* (MICHELIN *et al.*, 2010) e *A. terreus* (SETHI *et al.*, 2016) produzem uma amilase com temperatura ótima também à 60 °C. Para fungos mesófilos, características semelhantes foram demonstradas por Carvalho *et al.* (2014) para glucoamilase de *P. citrium* e por Spinelli *et al.* (1996)

para glucoamilase de *N. crassa exo-I*. Em contrapartida, em estudos realizados em FES, Oliveira *et al.* (2016) caracterizou as amilases do fungo mesófilo *L. ramosa* e termófilo *T. aurantiacus* com temperatura ótima a 60°C.

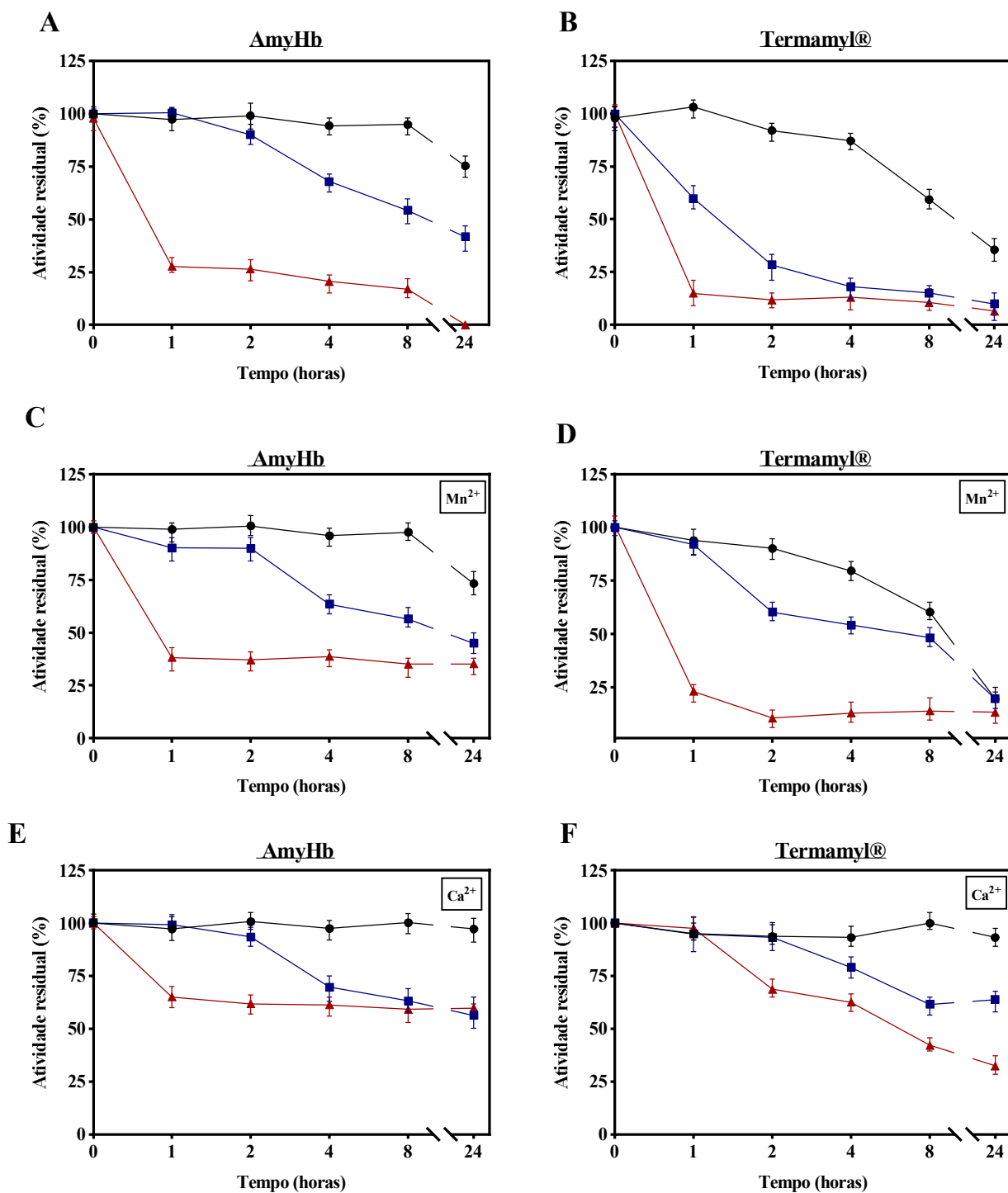
Foi observado que para a termoestabilidade, a AmyHb reteve 100% de sua atividade por até 8h, diminuindo sua atividade após 24h em cerca de 75% a temperatura de 50°C. Resultado melhor do que demonstrado pela enzima comercial que manteve 90% de atividade em apenas 2h e apresentou um tempo de meia vida próximo a 8h na mesma temperatura (**Figura 13A e 13B**). Já a 60°C, a enzima foi estável até 1h mostrando uma diminuição de sua estabilidade em 2h e $t_{1/2}$ próximo de 8h, enquanto a Termamyl[®] atingiu o valor de $t_{1/2}$ já na primeira hora de incubação. Além disso, a AmyHb manteve cerca de 25% de sua estabilidade durante 4h, já a enzima comercial reteve somente de 15% de sua atividade durante 8h a temperatura de 70°C.

De modo similar, Almeida *et al.* (2017) relatou que a amilase produzida pelo *A. brasiliensis* manteve-se estável por 120 minutos, a 50°C e por 100 minutos, a 60°C, mas apresentou $t_{1/2}$ de 32 minutos a 70°C. Além disso, os mesmos autores descrevem que a amilase de *R. oryzae* reteve atividade residual apenas a 50°C, com tempo de meia vida em 12 minutos. Além disso, Wang e autores (2018) observou que dentre as nove α -amilases recombinantes de *A. niger*, quatro (AmyA, AmyD, AmyF e AmyM) foram completamente estáveis em temperaturas abaixo de 40°C, duas (AmyC e AmyE) mantiveram mais de 60% de atividade residual entre 40 °C e 50°C por 1h e outras duas (AmyG e AmyH) permaneceram com atividade residual acima de 40% a 70°C.

O uso industrial recorrente de enzimas produzidas pelos gêneros *Bacillus* e *Aspergillus* devem-se principalmente pela melhor estabilidade em altas temperaturas. Entretanto, essa termoestabilidade ocorre em grande parte pela suplementação de íons (PARASHAR; SATYANARAYANA, 2018; SINDHU *et al.*, 2017). Não obstante, a literatura descreve que a maioria das amilases produzidas por microrganismos são dependentes de íons ou são mais estáveis em sua presença (PAUL *et al.* 2021). Isso ocorre, como é o caso da enzima comercial Termamyl[®], que somente é capaz de manter sua atividade enzimática em temperaturas próximas a 100°C quando incubadas na presença de Ca²⁺ (LIM; HAZWANI-OSLNA; OSLNA, 2020; MURAS *et al.*, 2021).

A fim de melhorar a termotolerância tanto das enzimas amilolíticas AmyHb e da Termamyl[®], ambas foram incubadas na presença de Mn²⁺ e Ca²⁺. Os resultados mostraram que a adição de Mn²⁺ não melhorou a termoestabilidade da AmyHb nas temperaturas de 50°C e 60°C, porém apresentou uma melhora de 10% em sua atividade residual a 70°C, mantendo sua estabilidade térmica por até 24h (**Figura 13C e 13D**).

Figura 14. Termoestabilidade da AmyHb e da Termamyl® na ausência e na presença de íons em diferentes temperaturas.



Termoestabilidade da AmyHb na ausência de íons (A), na presença de Mn²⁺ (C) e na presença de Ca²⁺ (E). (●) 50 °C; (■) 60 °C; (▲) 70 °C. Termoestabilidade da Termamyl® na ausência de íons (B), na presença de Mn²⁺ (D) e na presença de Ca²⁺ (F). Foi considerado como 100% a atividade de 25,7 ± 1,8 U.mg⁻¹ e 481,3 ± 28,9 U.mg⁻¹, respectivamente. Os valores representam as médias ± SD (n = 5) da atividade enzimática.

Contudo, para a enzima comercial, o Mn^{2+} não foi capaz de alterar a estabilidade da enzima e apresentou atividade residual a atividade a 50°C, com mesmo perfil que o experimento na ausência deste íon. Todavia, a presença de Mn^{2+} , só se tornou levemente efetivo na manutenção da estabilidade da enzima comercial a temperatura de 60°C, mas não teve nenhum efeito sobre a estabilidade a 70°C. Um ponto importante a ser destacado é que diferentemente da enzima amilolítica AmyHb, a enzima comercial Termamyl[®] foi quase totalmente inativada, independente da temperatura avaliada, na presença de Mn^{2+} .

Por outro lado, a adição de Ca^{2+} melhorou a estabilidade tanto da AmyHb quanto da enzima comercial em todas as temperaturas testadas (**Figura 13E e 13F**). Observou-se que ambas as enzimas permaneceram estáveis por 24h a 50°C e por 2h a 60°C, além de reterem cerca de 60% de atividade residual em 24h nessa mesma temperatura. Além disso, a 70°C, a AmyHb manteve 65% da sua atividade residual por 24h, enquanto a Termamyl[®] ficou estável apenas por 1h e foi perdendo estabilidade térmica continuamente até atingir 30% de atividade residual em 24h.

A termotolerância é uma propriedade vantajosa nos processos industriais, pois proporciona menor risco de contaminação microbiana, maior solubilidade de substratos e rápidas taxas de hidrólise. Amilases termoestáveis são usadas em diversas indústrias, como a de detergentes, têxteis, cervejeiras, panificação e papel (FAROOQ *et al.*, 2021; MESBAH, 2022;). Além disso, o processamento do amido em altas temperaturas permite que a liquefação e a gelatinização ocorram simultaneamente, diminuindo o custo energético gerado pelas constantes mudanças térmicas (DUMORNÉ *et al.*, 2017; MESBAH, 2022; PAUL *et al.*, 2021).

Estudos sugerem que a termoestabilidade adquirida com a adição de íons pelas amilases ocorre devido a um sítio de ligação iônica conservado, principalmente nas α -amilases, posicionado entre os domínios A e B. Assim, essa interação com o íon cálcio minimiza os resíduos hidrofóbicos da proteína, compactando-a e levando a maior estabilidade (DEY *et al.*, 2016; LINDEN *et al.*, 2003; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2018). Roth *et al* (2019) realizou um estudo estrutural, no qual se correlacionou o aumento da hidrofobicidade interna e hidrofobicidade externa da enzima com uma maior termoestabilidade de amilases derivadas dos fungos *Thamnidium elegans* e *A. oryzae* e espécies de bactérias do gênero *Bacillus*.

5.2.3 Efeito de sais e quelantes na atividade enzimática

O efeito de diferentes sais e EDTA sobre as enzimas AmyHb e a Termamyl[®] é mostrado na **Tabela 4**. Observou-se que o NaCl e o MnCl₂ estimularam em aproximadamente 30% a atividade residual da AmyHb na concentração de 5 mmol. L⁻¹. Entretanto, o MnCl₂ aumentou ainda mais a atividade da enzima (47,1%) na concentração de 10 mmol. L⁻¹, enquanto o NaCl estimulou menos nessa mesma concentração (9,4%). De maneira semelhante, Mn²⁺ e Ca²⁺ estimularam as amilases fúngicas de *T. lanuginosus* (PETROVA *et al.*, 2000; NGUYEN *et al.*, 2002) e *Aureobasidium pullalans* (LI *et al.*, 2006).

Tabela 4. Efeito de sais e EDTA na atividade amilolítica da AmyHb e da Termamyl[®].

Aditivo	Atividade relativa (%)			
	AmyHb		Termamyl [®]	
	5 mmol. L ⁻¹	10 mmol. L ⁻¹	5 mmol. L ⁻¹	10 mmol. L ⁻¹
Controle	100,0 ± 1,0	100,0 ± 1,0	100,0 ± 6,8	100,0 ± 6,8
MnCl₂	132,3 ± 6,1*	147,1 ± 6,0*	81,0 ± 9,0*	67,7 ± 4,9*
NaCl	130,5 ± 6,9*	109,4 ± 4,9*	99,7 ± 7,6*	93,2 ± 6,7*
CoCl₂	96,6 ± 0,8*	100,1 ± 8,8*	87,7 ± 2,6*	63,8 ± 2,9*
MgSO₄	93,5 ± 2,2*	98,5 ± 0,7*	107,8 ± 9,8*	96,2 ± 6,0*
KCl	89,0 ± 5,1*	99,6 ± 1,0*	118,0 ± 0,5*	94,9 ± 5,0*
SrCl₂	89,8 ± 2,6*	90,2 ± 6,0*	113,0 ± 0,8*	85,8 ± 4,9*
CaCl₂	85,3 ± 4,1*	82,0 ± 1,3*	67,6 ± 4,3*	65,0 ± 6,6*
NiSO₄	93,5 ± 2,3*	81,2 ± 0,6*	58,4 ± 3,7*	64,0 ± 5,7*
ZnCl₂	90,9 ± 2,2*	88,1 ± 0,3*	74,6 ± 6,2*	38,6 ± 5,5*
FeCl₃	60,2 ± 0,8*	42,9 ± 1,4*	66,1 ± 6,7*	18,2 ± 2,5*
CuSO₄	16,0 ± 4,6*	10,7 ± 1,6*	5,5 ± 3,4*	3,2 ± 0,6*
HgCl₂	26,5 ± 2,1*	5,7 ± 0,4	5,4 ± 1,2*	6,7 ± 4,4*
AgNO₃	0*	0*	0*	0*
EDTA	86,1 ± 3,4*	92,6 ± 1,5*	16,2 ± 3,6*	51,8 ± 0,5*

Legenda: Controle: atividade na ausência de íons. (*) Diferença significativa pelo teste de Dunnett (p<0,05). Foi considerado como 100% a atividade de 22,5 ± 0,2 U. mg⁻¹ e 472,4 ± 29,9 U.mg⁻¹, respectivamente. Os valores representam as médias ± SD (n = 5) da atividade enzimática.

Verificou-se que a Termamyl[®] mostrou apenas um pequeno estímulo na presença de 5 mmol. L⁻¹ de KCl (18,0%), SrCl₂ (13,0%) e MgSO₄ (7,8%), respectivamente. Gupta *et al.* (2003) descreve que algumas espécies de *Bacillus* parecem ser capazes de substituir Ca²⁺ por Sr²⁺. Em contrapartida, a atividade da AmyHb e da amilase comercial foram inibidas fortemente pelo CuSO₄ e HgCl₂ e completamente pelo AgNO. Esses resultados corroboram com os encontrados por Tosi e colaboradores (1993) para amilase de *Humicola grisea* var. *Thermoidea*.

Adicionalmente, Spinelli *et al.* (2008) relatou que a atividade da glucoamilase de *N. crassa* exo-1 aumentou em 50-60% na presença de Mn^{2+} e foi inibida em 50-65% na presença de Cu^{2+} .

De modo complementar, a adição de EDTA mostrou inibir mais fortemente a enzima comercial do que a AmyHb. Essa pouca inibição gerada pelo EDTA também foi relatada para amilases de *A. niger* (WANG; LI; LU, 2018), *Rhizomucor miehei* (WANG *et al.*, 2020) e *Penicillium citrinum* (CARVALHO *et al.*, 2014). Por outro lado, a falta de influência do EDTA na atividade da amilase foi relatada para *A. brasiliensis* e *R. oryzae* (ALMEIDA *et al.*, 2017), *A. terreus* (SETHI *et al.*, 2016) e *Humicola grisea* var. *Thermoidea* (TOSI; TERENCE; JORGE, 1993).

5.2.4 Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática

Os testes de efeito de diferentes solventes orgânicos sobre a atividade da AmyHb e da Termamyl® mostraram que a adição desses compostos aumentou a atividade enzimática da AmyHb, enquanto houve a inibição da atividade da enzima comercial por alguns deles (Tabela 5). Dessa maneira, foi observado que o formaldeído elevou a atividade relativa da AmyHb em 213,9% e 291,2% nas concentrações de 5% e 10%, respectivamente. Entretanto a enzima comercial não sofreu influência com 5% desse solvente, mas aumentou em 39,5% a sua atividade relativa na concentração de 10%.

Tabela 5. Efeito de solventes orgânicos na atividade da AmyHb e da Termamyl®.

Solventes	Atividade relativa (%)			
	AmyHb		Termamyl®	
	5% (v/v)	10% (v/v)	5% (v/v)	10% (v/v)
Controle	100,0 ± 0,8 ^a	100,0 ± 0,8 ^a	100,0 ± 2,4 ^a	100,0 ± 2,4 ^a
Isopropanol	164,0 ± 3,4*	178,8 ± 3,6*	95,2 ± 2,2*	90,3 ± 6,5*
Formaldeído	213,9 ± 0,3*	291,2 ± 5,5*	101,8 ± 2,4*	139,5 ± 9,1*
Metanol	169,1 ± 3,1*	107,2 ± 0,7*	110,4 ± 5,1*	84,3 ± 7,1*
Etanol	151,1 ± 9,2*	114,9 ± 2,3*	98,3 ± 6,7*	88,1 ± 5,9*

Legenda: Controle: atividade na ausência de solventes. (*) Diferença significativa pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). Foi considerado como 100% a atividade de $22,5 \pm 0,2$ U. mg^{-1} e $421,7 \pm 19,0$ U. mg^{-1} , respectivamente. Os valores representam as médias \pm SD ($n = 5$) da atividade enzimática.

Além disso, na concentração de 5%, o isopropanol, o metanol e o etanol elevaram a atividade relativa da AmyHb em 64,0%, 69,1% e 51,1%, respectivamente. Mesmo com o aumento da concentração em 10% dos solventes não foi verificado inibição da enzima, pelo contrário, a enzima permaneceu estável em metanol e aumentou a atividade relativa na presença de isopropanol

em 78,8% e etanol em 14,9%. Em contrapartida, a Termamyl[®] foi inibida pelo metanol a 10% e pelos solventes isopropanol e etanol nas concentrações testadas, mas apresentou um aumento de 10,4% da sua atividade relativa com a adição de 5% de metanol.

Os resultados encontrados são mais favoráveis do que os descritos pela literatura. Dey e Banerjee (2015) observaram que a amilase do *A. oryzae* não sofreu estímulo, mas permaneceu estável na presença de 10% a 30% de metanol e etanol. Já Silva *et al.* (2009), relatou que a amilase de *A. niveus* foi estável na presença de metanol, etanol e isopropanol a 5%, porém foi inibido por etanol e isopropanol a 10%. Da mesma maneira, Xian *et al.* (2015) descreveram que a amilase de *Talaromyces pinophilus* foi fracamente inibida por etanol, metanol e isopropanol na concentração de 5%.

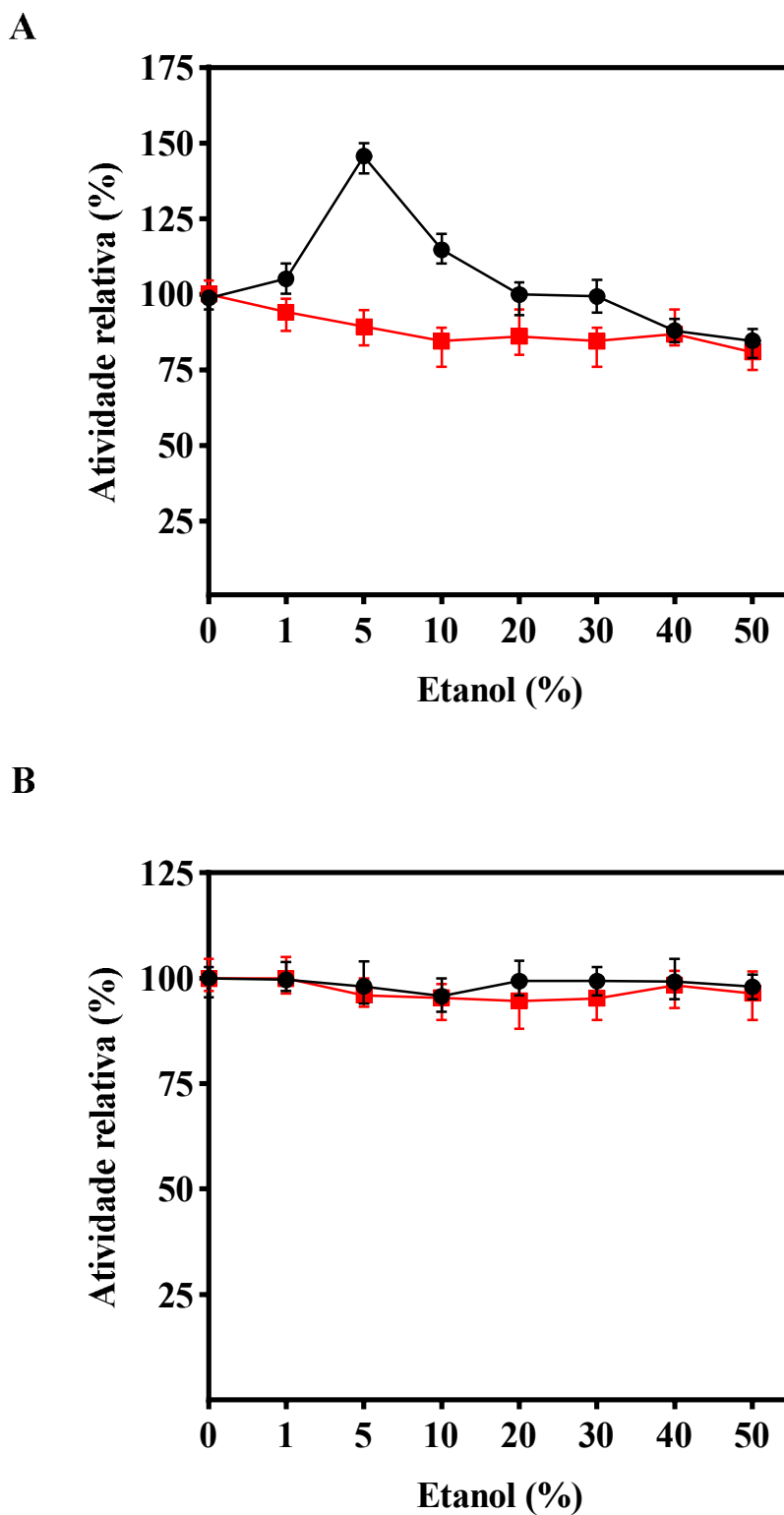
Estudos que abordam o efeito de solventes orgânicos sobre a atividade de amilases fúngicas ainda é escasso. Entretanto, alguns autores sugerem que a tolerância de enzimas por esses compostos está relacionada com a estabilidade das mesmas em sais, como NaCl. Isso porque, em ambiente com alta salinidade, os solventes orgânicos reduzem a atividade com a água (AMOOZEGAR *et al.*, 2019; MESBAH, 2022; ZHU *et al.*, 2020). Assim, as amilases tolerantes a solventes orgânicos mais bem relatadas são produzidas pelas bactérias *Nesterenkonia* sp. (SHAFIEI; ZIAEE; AMOOZEGAR, 2012) e *Bacillus subtilis* (EMTENANI; ASOODEH; EMTENANI, 2014).

Além disso, Tomasika e Horton (2012) sugerem que muitos desses compostos orgânicos estimulam a hidrólise enzimática. Isso ocorre, através da ligação desses solventes a sítios ativos específicos ou inespecíficos da enzima, induzindo mudanças conformacionais que removem os inibidores dos sítios ativos da enzima. Em contrapartida, Silva e colaboradores (2009), descrevem que a glicosilação de enzimas eucarióticas protege o seu o sítio catalítico de mudanças conformacionais causadas pelos solventes orgânicos, o que resulta na estabilidade da enzima.

5.2.5 Efeito do etanol e NaCl na atividade e estabilidade enzimática

Corroborando com os resultados anteriores, a atividade da AmyHb foi estimulada na presença de até 10% de etanol (**Figura 15A**). Porém, a partir dessa concentração a enzima se manteve estável e apresentou uma inibição próxima a 20% quando em 40%-50% de etanol. Já a Termamyl[®], foi inibida em todas as concentrações de etanol testadas. Para os testes de estabilidade, ambas as enzimas permaneceram estáveis quando incubadas em concentrações de 1% a 50% de etanol por 24h (**Figura 15B**).

Figura 15. Efeito do etanol na atividade e na estabilidade enzimática da AmyHb e da Termamyl®.



Efeito do etanol (A) e Estabilidade em etanol (B). (●) AmyHb; (■) Termamyl®. Foi considerado 100% a atividade de $23,7 \pm 0,9$ U.mg⁻¹ e $481,1 \pm 27,2$ U.mg⁻¹, respectivamente. Os valores representam as médias \pm SD ($n = 5$) da atividade enzimática.

Esses resultados são promissores para estudos envolvendo microrganismos recombinantes para a indústria de etanol. Nas últimas décadas, a técnica de bioprocessamento consolidado (CBP) tem crescido com uma abordagem mais eficiente e econômica para produção de combustíveis derivados de biomassa lignocelulósica e amilácea. Isso porque, essa tecnologia utiliza de um único organismo para produção de enzimas, hidrólise do substrato, fermentação da glicose e produção do etanol (CRIPWELL *et al.*, 2020; HAAN *et al.*, 2021). Cripwell e colaboradores (2019), conseguiram produzir etanol a partir do amido de milho em uma única etapa, através de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que expressou uma α -amilase e uma glucoamilase proveniente de *T. emersonii*.

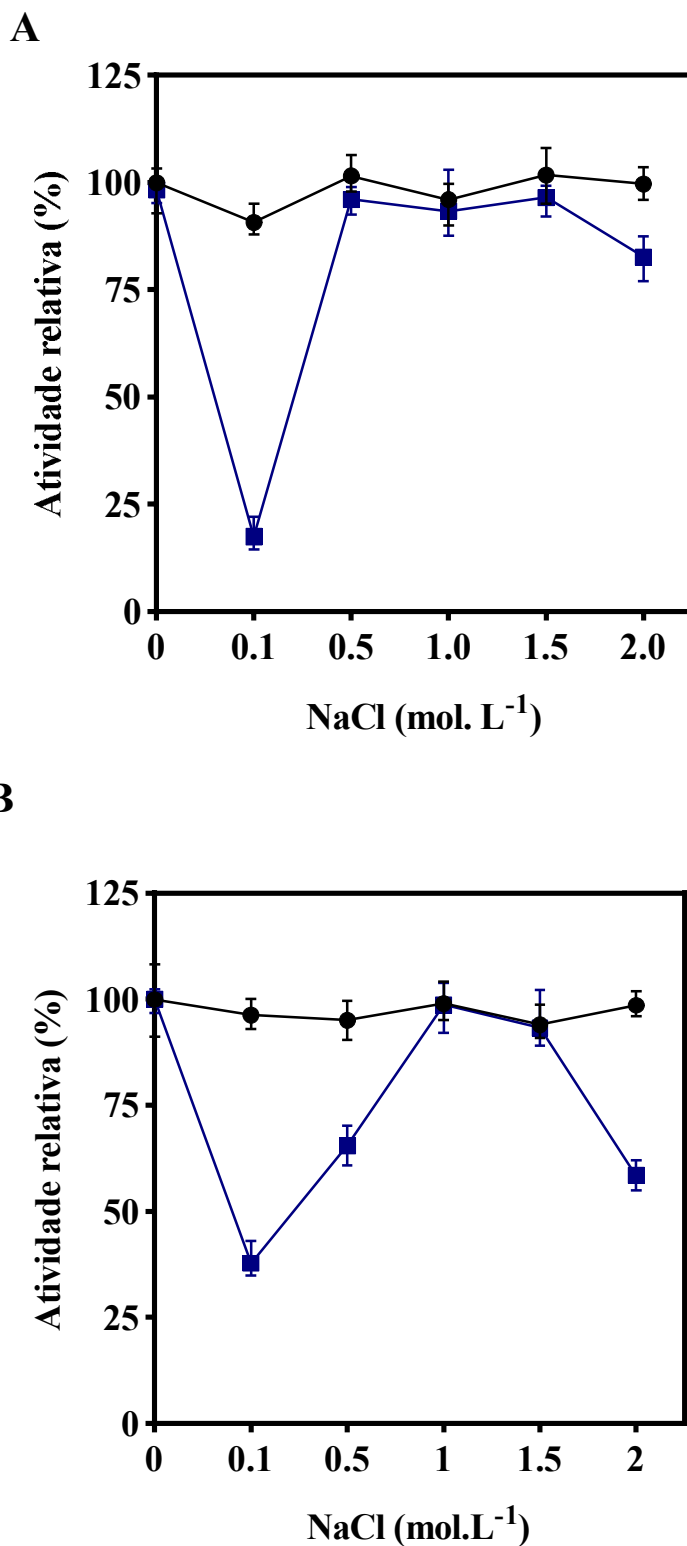
Já os testes de efeito e estabilidade de NaCl, mostraram que a AmyHb não sofre influência significativa desse sal nas concentrações de 0,1 a 2,0 mol. L⁻¹, bem como, se mantém estável quando incubada nessas mesmas concentrações por 24h (**Figura 15**). Por outro lado, a Termamyl[®] foi fortemente inibida na presença de 0,1 mol. L⁻¹ desse sal e permaneceu estável apenas nas concentrações de 1,0 e 1,5 mol. L⁻¹ de NaCl.

Não existem muitos relatos de halotolerância e haloestabilidade para amilases fúngicas, pois essa característica é mais comum em amilases bacterianas. Ainda assim, Shruthi e autores (2020), verificaram atividade amilolítica de *A. clavatus* ($162,71 \pm 17,9$ U.mg⁻¹) e *P. citrinum* ($39,26 \pm 9,0$ U.mg⁻¹) em uma reação contendo 2% e 4%, respectivamente. Do mesmo modo, Niknejad *et al.* (2013), relatou que a amilase de *P. chrysogenum* aumentou a sua atividade na presença de 10% de NaCl e as enzimas amilolíticas das cepas de *P. polonicum* e *F. incarnatum* tiveram atividade máxima em concentração de 5% desse sal.

Dessa maneira, a falta de influência do NaCl sobre a AmyHb é vantajosa em setores da indústria, em que o uso desse sal se faz necessário, como na produção de certos tipos de detergentes (MESBAH, 2022). Em outras áreas da indústria, como biorremediação, síntese de biocombustível e alimentícia, ocorrem condições adversas que demandam aumento da concentração de sais, principalmente do NaCl, portanto, a AmyHb apresenta-se como uma alternativa (AMOOZEGAR *et al.*, 2019; PINTO; DORN; FELTES, 2020; MARGESIN; SCHINNEAR, 2001).

Segundo estudos, a maior frequência de resíduos de aminoácidos ácidos, como serina e treonina, na estrutura de enzimas que hidrolisam polissacarídeos como xilana e amido proporciona melhor tolerância em ambientes salinos (DUMORNÉ *et al.*, 2017). Além disso, experimentos com amilases independentes de cálcio, sugerem que nessas enzimas o Ca²⁺ está frouxamente ligado, e por isso é substituído por outros íons metálicos, principalmente o Na⁺, o que resulta na estabilidade da amilase (PARASHAR; SATYANARAYANA, 2018).

Figura 16. Efeito do NaCl na atividade e na estabilidade enzimática da AmyHb e da Termamyl®.



Efeito de NaCl (A) e Estabilidade em etanol (B). (●) AmyHb; (■) Termamyl®. Foi considerado 100% a atividade de $22,0 \pm 1,5$ U.mg⁻¹ e $479,5 \pm 33,2$ U.mg⁻¹, respectivamente. Os valores representam as médias \pm SD ($n = 5$) da atividade enzimática.

5.2.6 Efeito do potencial de hidrólise sobre diferentes substratos

A especificidade do substrato da AmyHb e da Termamyl® foram determinadas pela hidrólise de diferentes fontes amiláceas (**Tabela 6**). Os resultados mostraram que a ordem de preferência de hidrólise da AmyHb foi amilose de batata (105,3%), amilopectina de batata (84,1%), amido de milho (82,3%), amido de trigo (78,6%), maltose (59,7%), amido de arroz (47,1%) e amilopectina de milho (41,2%). Já a enzima comercial apresentou preferência de hidrólise por amido de milho (89,1%), seguido de amilose de batata (86,9%), amido de trigo (81,7%), amilopectina de batata (74,1%), amido de arroz (62,9%), amilopectina de milho (56,0%) e por último maltose (6,0%).

Corroborando com os resultados encontrados para AmyHb, Petrova *et al.* (2000), relatou que a α -amilase de *Thermomyces lanuginosus* hidrolisa efetivamente o amido batata. De modo semelhante, Xian *et al.* (2015) verificou que a α -amilase de *Talaromyces pinophilus* tinha uma alta preferência por amilose (105,9%), seguida por amido de batata (97,5%), amido de trigo (94,4%), amido de milho (93,2%), amido de arroz (94,0%) e amilopectina ($68,29 \pm 1,25$ %).

Tabela 6. Especificidade de substrato da AmyHb e da Termamyl®

Substratos	Atividade relativa (%)	
	AmyHb	Termamyl®
Controle	100,0 \pm 6,3 ^a	100,0 \pm 7,9 ^a
Amilose de batata	105,3 \pm 3,8*	86,9 \pm 5,5*
Amilopectina batata	84,1 \pm 6,5*	74,1 \pm 4,2*
Amido de milho	82,3 \pm 4,4*	89,1 \pm 0,3*
Amido de trigo	78,6 \pm 5,0*	81,2 \pm 3,2*
Maltose	59,7 \pm 2,1*	6,0 \pm 2,6*
Amido de arroz	47,1 \pm 2,6*	62,9 \pm 8,2*
Amilopectina de milho	41,2 \pm 6,4*	56,0 \pm 4,4*
Sacarose	0*	0*

Legenda: Controle: amido comercial. (*) Diferença significativa pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). Foi considerado como 100% a atividade de $23,5 \pm 1,2$ U. mg^{-1} e $453,3 \pm 19,2$ U. mg^{-1} , respectivamente. Os valores representam as médias \pm SD ($n = 5$) da atividade enzimática.

De maneira análoga, Xian e Feng (2017) observaram que a glucoamilase de *A. tritici* tem menor atividade específica ($30,14 \pm 0,51$ U. mg^{-1}) para amido de batata solúvel quando comparada as outras fontes testadas. Complementarmente, Xu e autores (2016), descreveram que a glucoamilase de *P. oxalicum* tem preferência maior por amido de arroz (211,3%) e milho (206,7%) do que amido de batata (90,8%) e trigo (59,9%). Da mesma forma, a α -amilase de *A. orizye*

hidrolisou melhor o amido de arroz (67%), seguido de amido de trigo (60%), amido de batata (60%), amido de milho (60%) e amilopectina (56%) (DEY; BANERJEE, 2015).

Comparado a enzima comercial, a AmyHb demonstrou melhor hidrolise de maltose. Isso pode ser justificado pelo fato de que as α -amilases apresentam mais dificuldade de hidrolisar cadeias curtas de glicose. Por outro lado, as glucoamilases possuem mais afinidade a essas cadeias, o que pode sugerir que o complexo amilolítico do *H. brevis* contenha uma glucoamilase. (CASTRO; CASTILHO; FREIRE, 2011; PAUL *et al.*, 2021) Ainda assim, a especificidade a certos substratos não depende apenas da classe da amilase, mas também do microrganismo produtor. Por exemplo, a α -amilase de *Paecilomyces variotii* exibiu uma atividade muito menor contra maltose (21%) (MICHELIN *et al.*, 2010), mas a glucoamilase de *Bispora* sp. também não hidrolisou bem esse dissacarídeo (24%) quando comparados a outras fontes (HUA *et al.*, 2014).

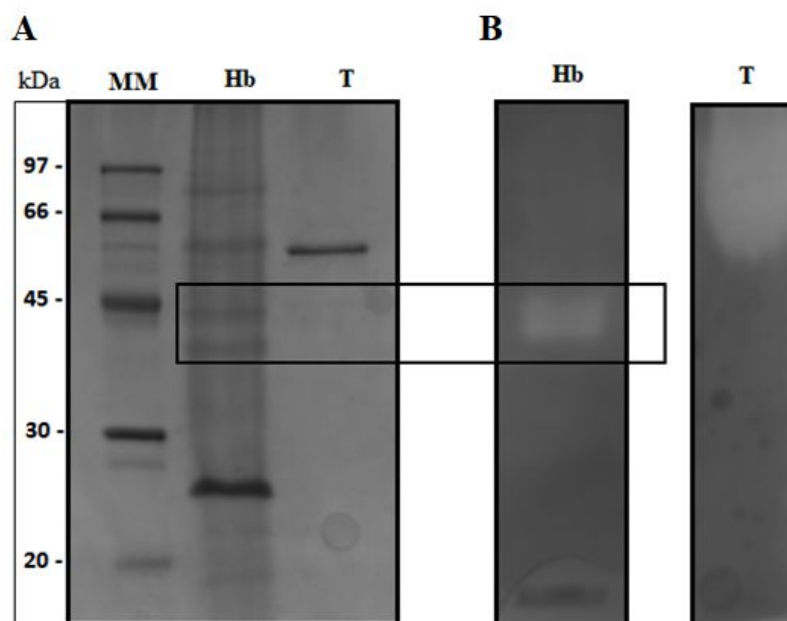
5.3 Análise eletroforética (SDS-PAGE) e teste da atividade de AmyHb em zimograma

A partir dos resultados obtidos anteriormente foi realizado a análise por zimograma da atividade da AmyHb e da Termamyl® (**Figura 13B**) em gel de eletroforese de poliacrilamida a 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) (**Figura 13A**). A análise do zimograma e do gel de eletroforese sugerem que a AmyHb possui massa molecular entre 48 e 43 kDa. Entretanto, como o experimento ocorreu em extrato bruto, não é possível afirmar se a enzima corresponde a uma estrutura heterodimérica, se o microrganismo produz dois tipos diferentes de amilases ou trata-se de um monômero que se apresenta glicosilado diferentemente.

Dentro do gênero *Humicola*, as amilases descritas correspondem a glucoamilases monoméricas com massa entre 60 e 70kDa, *H. grisea* (74kDa), *H. grisea* var. *thermoidea* (63kDa) e *Humicola* sp. (72,8kDa) (CAMPOS; FELIX, 1995; RIAZ *et al.*, 2007; TOSI; TRENZI; JORGE, 1993). Adicionalmente, Jensen e autores (1988) relataram a produção de uma α -amilase (50-57kDa), α -glucosidase (44-48kDa) e glucoamilase (70–77kDa) pelo fungo filamentoso *T. lanuginosus*. Por outro lado, Mishra e Maheshwari (1996) descreveram uma α -amilase dimérica (91 e 24kDa) de *T. lanuginosus* IISc.

Algumas glucoamilases produzidas por fungos apresentam massa molecular próximas ao observada pelo AmyHb como, *Fusarium solari* (40kDa) (BHATTI *et al.*, 2007); *Arthrotrrys amenspora* (44,7kDa) (NOROUZIAN *et al.*, 2000); *A. fumigatus* (42kDa) (SILVA; PERALTA, 1998); *Thermomucor indicae-seudaticae* (42kDa) (KUMAR; SATYANARAYANA, 2003).

Figura 17. Eletroforese em gel poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Zimograma da AmyHb e Termamyl®



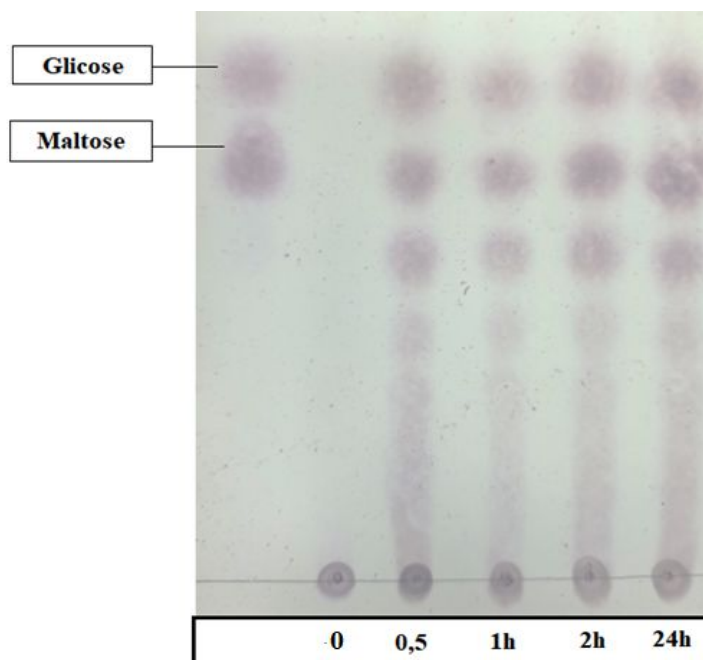
Eletroforese em gel 12% de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) (A). Zimograma (B). Legenda: MM: marcador molecular; Hb: AmyHb em extrato bruto (60 µg); T: Termamyl® (60 µg).

5.4 Cromatografia de camada fina (CCD)

A análise por CCD mostrou que a hidrólise de amido comercial pela AmyHb teve como produto principal glicose e maltose, entretanto, houve também a liberação de oligossacarídeos de cadeia curta nos intervalos de tempo testados (**Figura 14**). Estudos anteriores realizados com CCD, descrevem que as glucoamilases liberam predominantemente glicose, enquanto α -amilases liberam maltotriose, maltotriose e maltopentose (LAGO *et al.*, 2021; MICHELIN *et al.*, 2010). Além disso, em muitos desses estudos, a liberação exclusiva de glicose é considerada evidência conclusiva para determinar que a enzima se trata de uma glucoamilase, como ocorreu com a enzima amilolítica de *A. niveus* (SILVA *et al.*, 2009).

De maneira similar, Cavalheiro *et al.* (2017) verificou em ensaios com CCD que o extrato bruto contendo enzimas amilolíticas de *G. butleri* hidrolisaram o amido e liberaram glicose em maior concentração. Complementarmente, a análise de hidrólise do extrato bruto de *A. brasiliensis* em diferentes fontes amiláceas mostrou grande liberação de glicose e pequena quantidade de oligossacarídeos, o que sinaliza maior secreção de glucoamilase. O mesmo foi encontrado para *R. oryzae*, em que o extrato bruto secretou mais glucoamilase, mas como apresentou em pequena quantidade a liberação de mais alguns oligossacarídeos, foi sugerido a presença de α -amilases também (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Figura 18. Cromatografia de camada fina (CCD) dos produtos de hidrólise de amido solúvel por AmyHb.



Os marcadores usados foram glicose (10 μ L) e maltose (10 μ L). Foi aplicado 10 μ L da reação contendo amido e solução amilolítica incubada por 0, 0,5, 1, 2 e 24 h, a 60°C.

Portanto, a análise por CCD com os resultados obtidos anteriormente sugerem que o extrato enzimático de *H.brevis* possui atividade predominantemente sacarificante (exoamilases), pois libera mais glicose e maltose, e reduzido potencial dextrinizante (endoamilases), pois aparecem cadeias menores de oligossacarídeos. Entretanto, experimentos adicionais são necessários para confirmar que a AmyHb corresponde a duas classes diferentes de amilase.

5.5 Ensaio de sacarificação do amido de milho

Para os testes de hidrólise do amido de milho foi utilizado como substrato a farinha de milho comercial, pois esta é processado de maneira semelhante ao milho da indústria de bioetanol. Em ambos os casos, ocorre a moagem a seco do grão de milho inteiro e limpo, retendo todo ou parte do gérmen e fibra de milho original a fim de reduzir o tamanho das partículas do grão. Esse processo é realizado com equipamentos, como moinhos e peneiras que variam de acordo com o tipo de indústria e o país na qual ele é produzido (GWIRTZ; GARCIA-CASAL, 2013; SERNASALDIVAR; CARRILLO, 2019).

Dessa maneira, os micros ensaios de hidrólise da farinha de milho por AmyHb em pH 5,0 a 60°C demonstraram a liberação de 9,4 g.L⁻¹ de glicose e 15,0 g.L⁻¹ de ART (Açúcares Redutores Totais) em 24h, com taxa de sacarificação de 36,6% (**Figura 19**). Por outro lado, nas mesmas

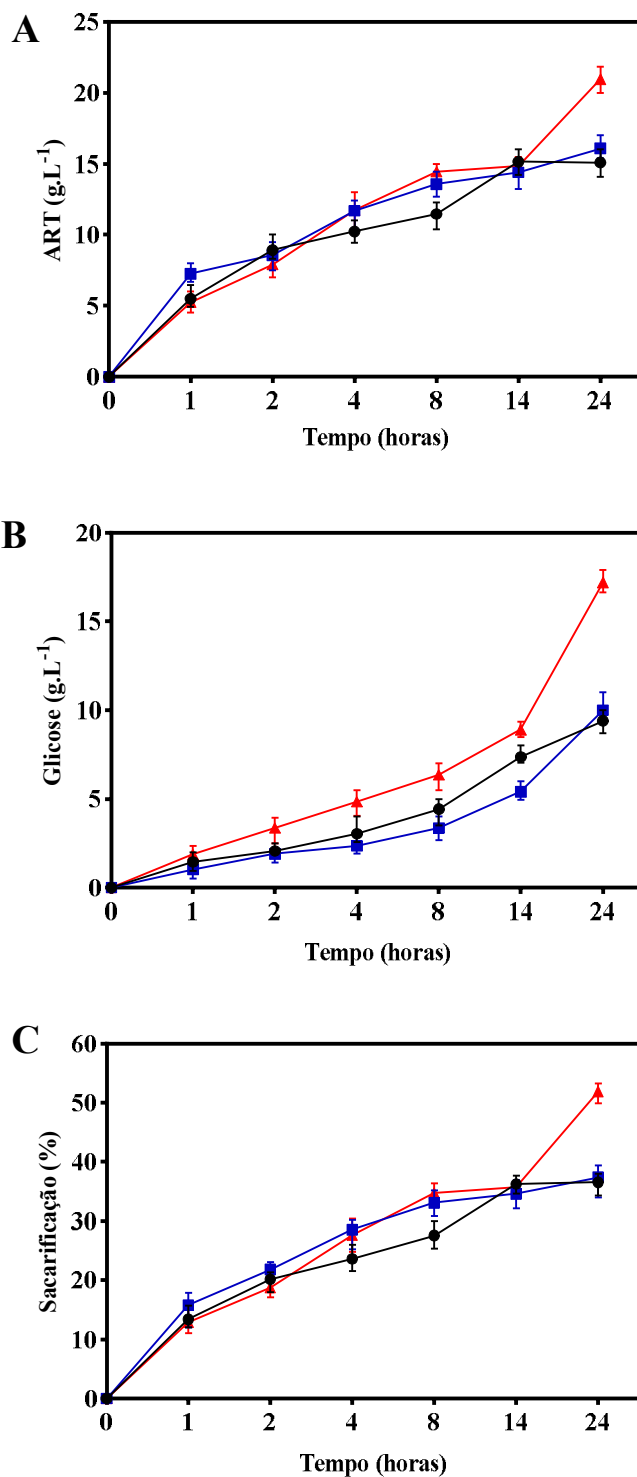
condições, a Termamyl[®] liberou 10,0 g.L⁻¹ de glicose e 16,1 g.L⁻¹ de ART durante as 24h e apresentou 37,4% de sacarificação. Esses valores foram sutilmente melhores que os apresentados pela AmyHb, o que, juntamente com os resultados dos testes anteriores de especificidade de substrato, sugerem uma maior afinidade da enzima comercial pela amilopectina de milho, uma vez que a farinha de milho apresenta uma composição de 23-25% de amilose e 75-77% de amilopectina (KUMAR; SINGH, 2019).

Experimentos de sacarificação de amido por diferentes amilases microbianas variam muito em quantidade de enzima e substrato usado, bem como fonte amilácea, tempo, pH e temperatura de hidrólise. Assim, Jain e Katyal (2018) verificaram que a hidrólise de amido de milho pelo extrato bruto de *A. niger* (1,5mL) contendo glucoamilase liberou 13,9 g.L⁻¹ de ART em 2h, com eficiência de sacarificação de 52,6% na temperatura de 60°C e pH 5,5. Já, Pervez *et al.* (2014), relatou um percentual de sacarificação de 60,0%, com 40,0 g. L⁻¹ de glicose, após 90 minutos de hidrólise de amido de mandioca por 30mL de α -amilase e amiloglucosidase purificadas de *A. fumigatus* a 60°C. Por outro lado, Hua *et al.* (2014) descreve que após liquefação do amido de milho com α -amilase comercial de *Bacillus licheniformis* a 90°C por 2h, a etapa de sacarificação com a glucoamilase de *Bispora* sp. apresentou uma alta eficiência de sacarificação (96,1%) na temperatura de 70°C após 6h de incubação.

Interessantemente, o Coquetel (AmyHb50%+Termamyl[®]50%) apresentou o melhor resultado de hidrólise a partir da primeira hora, com uma crescente liberação de glicose até a formação de 17,2 g.L⁻¹ de glicose e 20,9 g.L⁻¹ de ART em 24h, com um percentual de sacarificação de 51,9%. Esses resultados indicam um bom sinergismo entre a AmyHb e a Termamyl[®], o que sugere que o complexo amilolítico da AmyHb ainda em extrato bruto é uma enzima promissora para uso industrial, principalmente na de bioetanol.

Neste caso, a produção de etanol combustível a partir do amido de milho utiliza amilases em duas etapas, na liquefação e na sacarificação. Na primeira, são usadas α -amilases termoestáveis que aguentam temperaturas acima de 90°C na presença de Ca²⁺ por 1-3h, já na última são usadas glucoamilases termoestáveis que aguentam temperaturas acima de 50°C por 1-2h (KUMAR; SINGH, 2019; LÄUFER, 2019). Considerando os resultados descritos até então, a AmyHb seria aplicável na etapa de sacarificação, visto que ela é estável a 50°C por 8h e a 60°C por 2h, tempo necessário de hidrólise. Além disso, a AmyHb não é íon dependente, mas melhora a estabilidade na presença de Ca²⁺, por tanto, a adição desse íon na etapa de liquefação não afetaria a sua atividade. Ademais, a amilase de *H. brevis* é estável em etanol, o que em conjunto com as outras características descritas podem ser usada em processos de sacarificação e fermentação simultânea (SSF).

Figura 19. Hidrolise do amido de milho pela AmyHb, Termamyl® e Coquetel (AmyHb50%+Termamyl®50%).

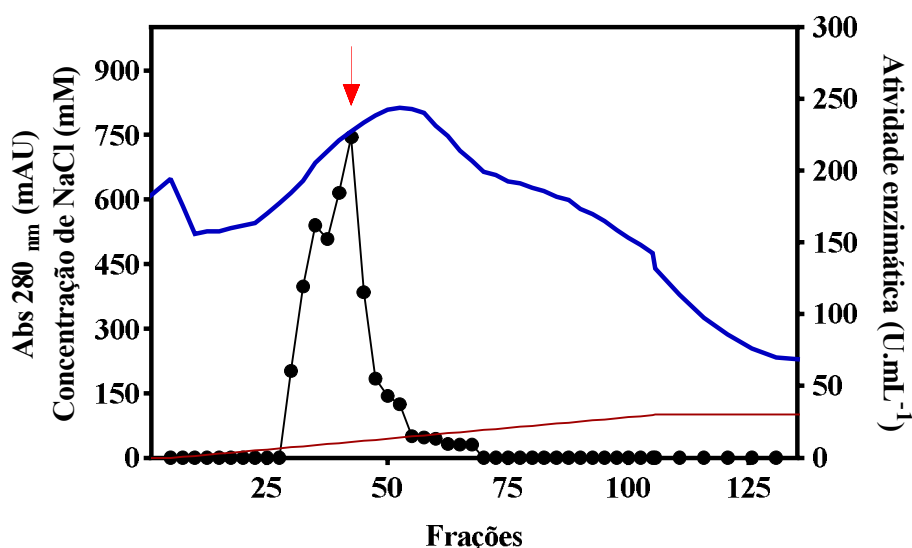


Glicose (A), Açúcares redutores (B) e Sacarificação (C) Foi considerado como 100% a quantidade de carboidrato equivalente a 41g.L⁻¹. (●) AmyHb; (■) Termamyl®; (▲) Coquetel (AmyHb50%+Termamyl®50%). Os valores representam as médias ± SD (n = 5) da atividade enzimática.

5.6 Purificação da AmyHb

A fim de compreender melhor as características do complexo amilolítico produzido pelo *H. brevis var thermoidea*, foram realizados experimentos cromatográficos de purificação. Para isso, foi aplicado 25mL de extrato bruto de AmyHb contendo 4.100,0U em coluna de troca iônica Q Sepharose® FF que apresentou um pico de proteínas com atividade amilolítica durante a eluição da amostra, indicado pela seta na **figura 20**. Dessa maneira, as frações referentes a esse pico foram agrupadas e resultaram em 575,0 U totais e 14% de recuperação e um fator de purificação de 2,2 vezes (**Tabela 7**).

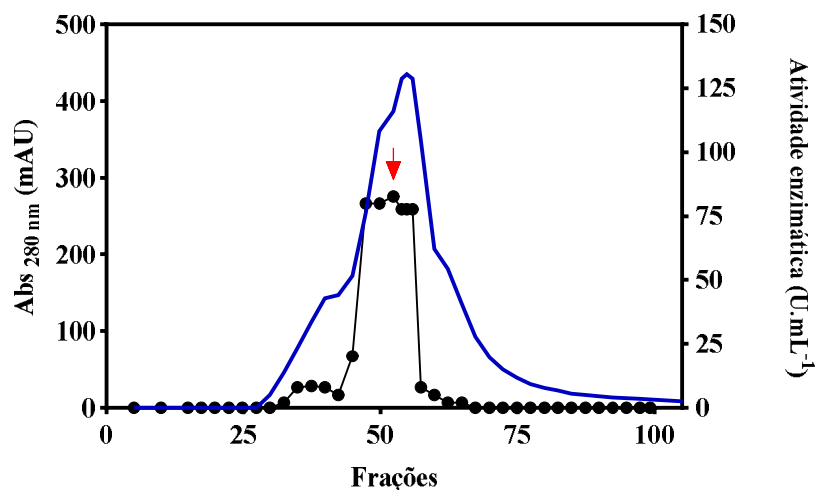
Figura 20. Purificação da amilase extracelular de *H. brevis var. thermoidea* em coluna cromatográfica Q Sepharose® FF.



(●) Atividade enzimática (U.mL⁻¹); (●) Concentração de NaCl (mM); (●) Proteínas totais (Abs 280_{nm} mAU).

Entretanto, a análise do gel eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) mostrou que a amostra não alcançou o grau de pureza adequado (**Figura 22**), portanto, a amostra foi submetida a uma nova etapa cromatográfica. Para isso, foi utilizado uma coluna de filtração Sephadex G-50 que tem como propriedade separar as proteínas com o peso molecular superior a 30 kDa. A eluição da amostra nessa resina resultou em um único pico de proteínas com atividade amilolítica, indicado pela seta na **figura 21**. Assim, as frações referentes a esse pico foram agrupadas e resultaram em 480,0 U totais e 11,7% de recuperação e um fator de purificação de 2,4 vezes (**Tabela 7**).

Figura 21. Purificação da amilase extracelular de *H. brevis* var. *thermoidea* em coluna cromatográfica Sephadex G-50.



(●) Atividade enzimática (U.mL⁻¹); (●) Proteínas totais (Abs 280_{nm} mAU).

Mesmo que a percentagem de rendimento da AmyHb tenha sido baixa, as amilases purificadas do gênero *Humicola* também não demonstraram um elevado rendimento. Como descreve Riaz *et al.*, (2007), que após realizar precipitação fracionada por sulfato de amônio, cromatografia de troca aniônica (Q-Sepharose, pH 7,5) e cromatografia de interação hidrofóbica (Phenyl Sepharose[®]) a glucoamilase de *Humicola* sp. obteve um rendimento de 33,0% e índice de purificação de 39,0. Já Tosi e colaboradores (1993) relataram que a glucoamilase de *Humicola grisea* var. *thermoidea* obteve rendimento de 25,0% e índice de purificação de 18,5 após cromatográfica de troca iônica (Carboximetilcelulose, pH 5,0).

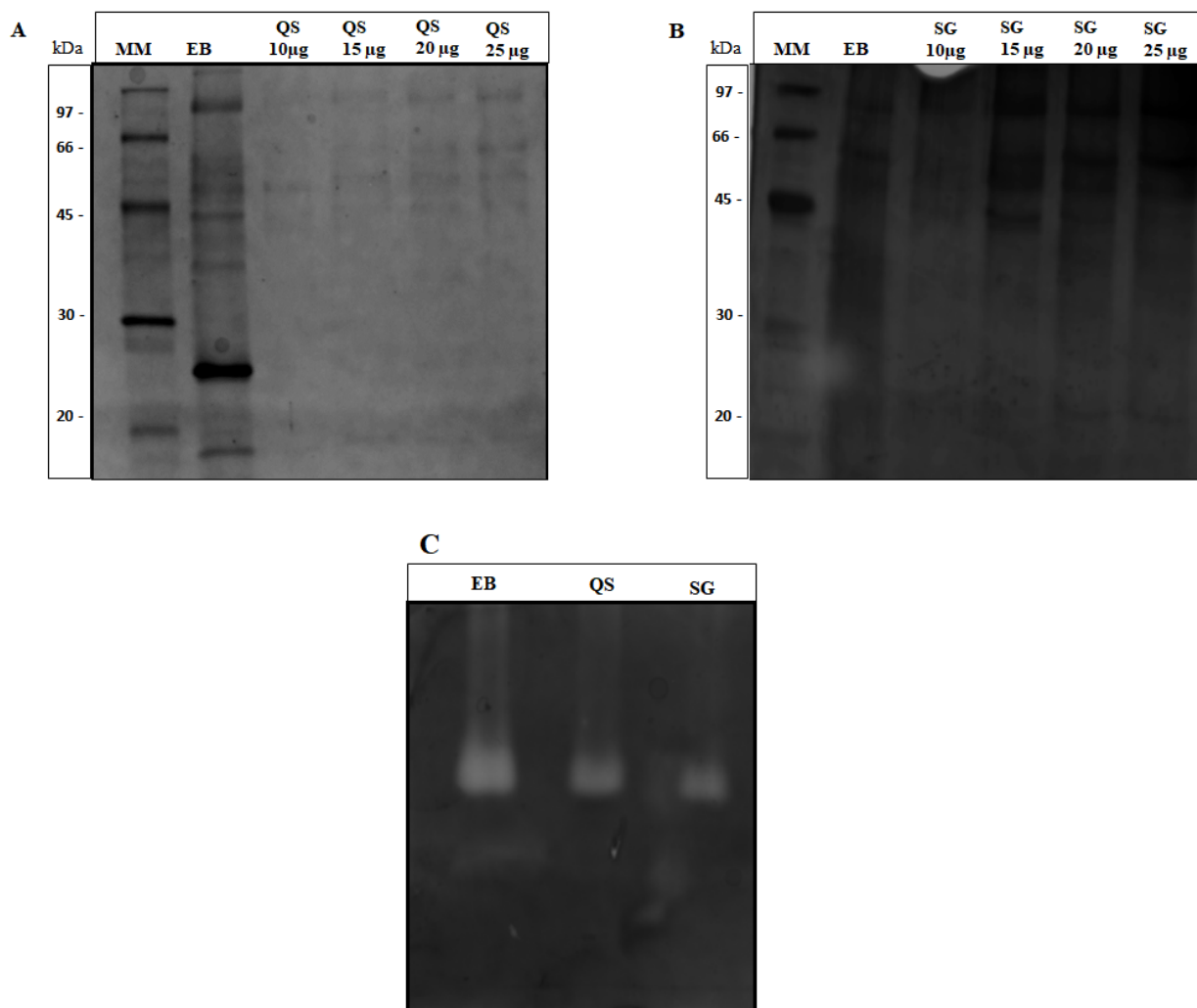
Tabela 7. Purificação da amilase extracelular de *H. brevis* var. *thermoidea*.

Amostra	Proteínas totais (mg)	U totais	U.mg ⁻¹	U.mL ⁻¹	Rendimento (%)	Índice de Purificação
Extrato bruto	6,3	4100,0	26,0	164,0	100,0	1,0
Q Sepharose [®] FF	2,0	575,0	57,5	115,0	14,0	2,2
Sephadex [®] G-50	1,3	480,0	61,5	80,0	11,7	2,4

Além disso, o gel de eletroforese para as amostras purificadas, demonstrou pouca quantidade de proteína o que dificultou a análise. Apesar desses resultados, o objetivo dessa purificação parcial foi somente para compreender melhor o complexo amilolítico da *H. brevis* e poder definir a classe de amilase da qual a AmyHb pertence. Ainda assim, os resultados até então

descritos sugerem que se o *H. brevis* produz duas amilases diferentes, elas apresentam peso molecular muito próximo, o que dificulta a separação e purificação delas. Por isso, se faz necessário, outros experimentos e métodos para se obter resultados melhores.

Figura 22. Eletroforese em gel poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) da amilase extracelular purificada de *H. brevis* var. *thermoidea*.



Eletroforese em gel 12% de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) **(A)** Amostra das frações de purificado em Q Sepharose® FF (QS) **(B)** Amostra das frações de purificado em Sephadex® G-50 (SG) **(C)** Zimograma. Legenda: MM: marcador molecular; EB: AmyHb em extrato bruto (40 µg); QS: Q Sepharose® FF; SG: Sephadex® G-50

6 CONCLUSÃO

As amilases como biocatalizadores representam uma ferramenta fundamental nos processos de sacarificação de compostos amiláceos (MONDEL *et al.*, 2022; SEUNG, 2020). Assim, a obtenção de amilases por fungos filamentosos termófilos através de FES apresenta vantagens como a hidrólise de subprodutos agrícolas para geração de produtos de alto valor agregado que favorece a bioeconomia e gera menos danos a natureza. Ainda assim, apenas uma parcela do potencial desses microrganismos foi explorada ou descrita e por isso, tona-se essencial mais estudos com eles (CRIPWELL; ZYL; VILJOEN-BLOOM, 2021; MEYER, 2020).

Dessa maneira, os resultados deste estudo mostram que o *H. brevis* var. *thermoidea* apresenta a maior produção do complexo amilolítico em FES com meio composto por farelo de trigo, a 50°C por 5-6 dias e sem a demanda de indutores. Esses valores assemelham-se com os achados de Almeida *et al.* (2022) e de Masui *et al.* (2012) na produção de xilanases e β -glucosidases de *H. brevis* nessas mesmas condições. Ademais, a AmyHb mostrou ter atividade ótima em pH 5,0 e em temperatura de 60°C, com estabilidade em pH 5,0 a 6,0 por 24h e apresentou termotolerância elevada a 50°C. Entretanto, na temperatura de 60°C e 70°C a termoestabilidade foi maior na presença de Ca^{2+} , mesmo assim, os resultados foram melhores do que os apresentados pela Termamyl[®].

Além disso, a AmyHb elevou a atividade na presença de Na^+ e Mn^{2+} , além disso a adição de EDTA mostrou inibir mais a enzima comercial do que a AmyHb. Contudo, ambas as enzimas foram fortemente inibidas pelo Cu^+ , Hg^{2+} e Ag^+ . Já na presença de solventes orgânicos a Termamyl[®] foi inibida pela maioria dos compostos testados, enquanto a AmyHb foi estimulada por todos eles, principalmente o formaldeído. Tanto o complexo amilolítico do *H. brevis* quanto a Termamyl[®], foram estáveis em diferentes concentrações de etanol por 24h, entretanto, apenas a AmyHb foi estável entre concentrações de 0,1-2 mmol. L⁻¹ de NaCl.

De modo complementar, os testes de sacarificação do amido de milho demonstraram que o Coquetel (AmyHb50%+Termamyl[®]50%) apresentou o melhor resultado de hidrólise, com um percentual de sacarificação de 51,9% em 24h, o que indica um bom sinergismo entre a AmyHb e a Termamyl[®]. Esses resultados sugerem que o complexo amilolítico da AmyHb ainda em extrato bruto é uma enzima promissora para o bioprocessamento de fontes amiláceas. Além disso, a elevada estabilidade da enzima em etanol com a boa performance na hidrólise indicam que a AmyHb tem características promissoras para estudos envolvendo microrganismos recombinantes para a indústria de etanol combustível.

Adicionalmente, AmyHb preferiu substrato de amido de batata para hidrolise e mostrou elevado hidrolise da maltose em comparação com a Termamyl[®]. Verificou-se também, a formação de glicose, maltose e cadeias menores de oligossacarídeos por CCD através da hidrolise de amido comercial pela AmyHb, o que sugere uma maior atividade sacarificante e reduzida atividade dextrinizante da enzima. A análise do zimograma e do gel de eletroforese sugerem que a AmyHb possui massa molecular entre 48 e 43 kDa e que juntamente com os testes de hidrolise, sugerem a presença de duas classes diferentes de amilases.

Por fim, os testes cromatográficos realizados a fim de compreender melhor o complexo amilolítico da *H. brevis* e definir a classe de amilase da qual a AmyHb pertence, foram limitados pela pouca quantidade de proteínas. Ainda assim, sugere-se que caso o *H. brevis* produza duas amilases diferentes, elas apresentam peso molecular muito próximo, o que dificulta a separação e purificação delas. Dessa maneira, outros experimentos são necessários a fim de esclarecer melhor as características da AmyHb. Contudo, os resultados deste estudo evidenciam que a AmyHb apresenta características físico-químicas e de desempenho de hidrolise promissora para uso industrial, principalmente na produção de bioetanol. Além disso, se faz necessário mais estudos com amilases de fungos filamentosos termófilos, uma vez que a literatura ainda é escassa

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAGEED, H. M.; *et al.* Biotechnology approach using watermelon rind for optimization of α -amylase enzyme production from *Trichoderma virens* using response surface methodology under solid-state fermentation. **Folia Microbiologica**, v. 67, n. 2, p. 253-264, 2022.
- ABDULAAL, W. H. Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. **BMC Biochem.**, v. 19, n. 1, p. 4, Jun 14 2018.
- ALMEIDA, A. P.; *et al.* Investigation of biochemical and biotechnological potential of a thermo-halo-alkali-tolerant endo-xylanase (GH11) from *Humicola brevis* var. *thermoidea* for lignocellulosic valorization of sugarcane biomass. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 44, 2022
- ALMEIZA, P. Z.; *et al.* Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. **Biota Neotropica**. v.17, : e20170337, 2017
- AMOOZEGAR, M. A.; *et al.* Halophiles and Their Vast Potential in Biofuel Production. **Front. Microbiol.**, v. 10, p. 1895, 2019.
- ANDERSON B. ; ALMEIDA, H. Corn Dry Milling: Processes, Products, and Applications. *In*: SERNA-SALDIVA, S. O. (Ed.). **Corn Chemistry and Technology**. 3 ed. Oxford: Elsevier, p. 405- 433, 2019.
- ANINDYAWATI, T.; *et al.* Three Different Types of α -Amylases from *Aspergillus awamori* KT-11: Their Purifications, Properties, and Specificities. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 7, p. 1351-1357, 1998.
- ANUPMA, A.; TAMANG, J. P. Diversity of Filamentous Fungi Isolated From Some Amylase and Alcohol-Producing Starters of India. **Front. Microbiol.**, v.11, p. 905, 2020.
- ARORA, S.; RANI, R.; GHOSH, S. Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v.269, p. 16-34, 2018.
- ASHOK, A.; KUMAR, D. S. Different methodologies for sustainability of optimization techniques used in submerged and solid state fermentation. **3 Biotech**, v.7, n. 5, p. 30, 2017.
- AZHAR, M. S. H.; *et al.* Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochem. Biophys. Rep.**, v.10, p. 52-61, 2017.

BALAKRISHNAN, M.; *et al.* 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. 33, 2021.

BERGMEYER, H. U.; GAWEHN, K. (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*, 2ed. Elsevier, v.1, p. 800, 1974.

BERMAN, H. M.; *et al.* The Protein Data Bank (RCSB PDB). **Nucleic Acids Research**, v. 28: p. 235-242, 2000.

BHATTI, H. N.; *et al.* Purification and characterization of a novel glucoamylase from *Fusarium solani*. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 338-343, 2007.

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

CAMPOS, L.; FELIX, C. R. Purification and Characterization of a Glucoamylase from *Humicola grisea*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 61, n. 6, p. 2436-2438, 1995.

CARVALHO, C.; *et al.* Production and Functional Properties of Free and Immobilized Glucoamylases of *Penicillium citrinum*. **Jacobs Journal of Biotechnology and Bioengineering**, v.1, n. 2, p. 7, 2014.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non-conventional processes. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v.1, n. 4, p. 245, 2011.

CAVALHEIRO, G. F.; *et al.* Catalytic Properties of Amylolytic Enzymes Produced by *Gongronella butleri* Using Agroindustrial Residues on Solid-State Fermentation. **Biomed. Res. Int.**, 2017.

CHAMEKH, R.; *et al.* Isolation, Identification and Enzymatic Activity of Halotolerant and Halophilic Fungi from the Great Sebkhha of Oran in Northwestern of Algeria. **Mycobiology**, 47, n. 2, p. 230-241, 2019.

COSTA, J. A. V.; TREICHEL, H.; KUMAR, V.; PANDEY, A. Advances in Solid-State Fermentation. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, p. 1-7, 2018.

CRIPWELL, R. A.; ROSE, S. H.; FAVARO, L.; VAN ZYL, W. H. Construction of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for the efficient consolidated bioprocessing of raw starch. **Biotechnol Biofuels**, v. 12, n. 201, 2019

CRIPWELL, R. A.; FAVARO, L.; VILJOEN-BLOOM, M.; VAN ZYL, W. H. Consolidated bioprocessing of raw starch to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*: Achievements and challenges. **Biotechnology Advances**, v.42, 2020.

CRIPWELL, R. A.; VAN ZYL, W. H.; VILJOEN-BLOOM, M. Fungal Biotechnology: Fungal Amylases and Their Applications. *In*: ZARAGOZA, Ó. e CASADEVALL, A. (Ed.). **Encyclopedia of Mycology**. Oxford: Elsevier, p. 326-336, 2021.

DAHIYA, D.; SHARMA, H.; RAI, A. K.; NIGAM, P. S. Application of biological systems and processes employing microbes and algae to Reduce, Recycle, Reuse (3Rs) for the sustainability of circular bioeconomy. **AIMS Microbiol**, v.8, n.1, p. 83–102, 2022.

DEY, T. B.; BANERJEE, R. Purification, biochemical characterization and application of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 83-90, 2015.

DEY; T. B.; KUMAR, A.; BANERJEE, R.; CHANDNA, P.; KUHAD, R. C. Improvement of microbial α -amylase stability: Strategic approaches. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1380-1390, 2016

DICKERSON, G. W. **Specialty Corns**. New Mexico State University, Department of Agriculture cooperating, 2003.

DUAN, X.; *et al.* Production of recombinant beta-amylase of *Bacillus aryabhatai*. **Prep. Biochem Biotechnol**, 49, n. 1, p. 88-94, 2019.

DUMORNÉ, K.; CÓRDOVA, C. D.; ASTORGA-ELÓ, M.; RENGANATHAN, P. Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 27, n.4, p. 649–659.

EL-NAGGAR NEL, A.; EL-HERSH, M. S. Organic acids associated with saccharification of cellulosic wastes during solid-state fermentation. **J. Microbiol**, 49, n. 1, p. 58-65, Feb 2011.

ELODIE, D.; *et al.* The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. **Nucleic Acids. Res.**, v.50: D571–D577, 2022. Disponível em: <http://www.cazy.org/>. Acessado em: 11/08/2022.

EL-SAADONY, M. T.; *et al.* The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 117, p. 36-52, 2021.

ELYASI FAR, B.; AHMADI, Y.; YARI KHOSROSHAHI, A.; DILMAGHANI, A. Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. **Adv. Pharm. Bull.**, v. 10, n. 3, p. 350-358, 2020.

EMTENANI, S.; ASOODEHA, A.; EMTENANI, S. Gene cloning and characterization of a thermostable organic-tolerant α -amylase from *Bacillus subtilis* DR8806. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 290–298, 2015.

ERTAN (İNCEOĞLU), F.; BALKAN, B.; YARKIN, Z. Determination of the effects of initial glucose on the production of α -amylase from *Penicillium* sp. under solid-state and submerged fermentation. **Biotechnol. Equip.**, v. 28, n. 1, p. 96-101, 2014.

FAN, C.; *et al.* CRISPR/Cas9-mediated genome editing directed by a 5S rRNA-tRNA(Gly) hybrid promoter in the thermophilic filamentous fungus *Humicola insolens*. **Biotechnol. Biofuels**, v.14, n. 1, p. 206, 2021.

FAROOQ, M. A. *et al.* Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: a review. **Archives of Microbiology**, v. 203, p.1281–1292, 2021.

FRANCIS, F.; *et al.* Synthesis of alpha-amylase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **J. Basic Microbiol.**, v. 42, n. 5, p. 320-326, 2002.

FUWA, H. A. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. *The Journal of Biochemistry*, v.41, p. 583-603, 1954.

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

GOPINATH, S. C.; *et al.* Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. **Biomed. Res. Int.**, p. 1272193, 2017.

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

GWIRTZ, J. A.; GARCIA-CASAL, M. N. Processing maize flour and corn meal food products. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1312, n. 1 p. 66-75, 2013.

HAAN, R. *et al.* Heterologous production of cellulose- and starch-degrading hydrolases to expand *Saccharomyces cerevisiae* substrate utilization: Lessons learnt. **Biotechnology Advances**, v. 53, 2021.

HAASUM, I.; ERIKSEN, S.; JENSEN, B.; OLSEN, J. Growth and glucoamylase production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in a synthetic medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 656-660, 1991.

HAMBLETON, S.; NICKERSON, N. L.; SEIFERT, K. A. *Leohumicola*, a new genus of heat-resistant hyphomycetes. **Studies in Mycology**, v. 53, p. 29-52, 2005.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochem. J.**, v. 316 , p. 695-696, 1996.

HMIDET, N.; JEMIL, N.; NASRI, M. Simultaneous production of alkaline amylase and biosurfactant by *Bacillus methylotrophicus* DCS1: application as detergent additive. **Biodegradation**, v. 30, n. 4, p. 247-258, 2019.

HUA, H.; *et al.* A thermostable glucoamylase from *Bispora sp.* MEY-1 with stability over a broad pH range and significant starch hydrolysis capacity. **PLoS One**, v. 9, n. 11, 2014.

IBRAHIM, S. R.; MOHAMED, S. G.; ALTYAR, A. E.; MOHAMED, G. A. J. C. M. Natural products of the fungal genus *Humicola*: Diversity, biological activity, and industrial importance. **Curr. Microbiol.**, v. 78, n. 7, p. 2488-2509, 2021.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme Nomenclature. Disponível em: <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/>. Acessado em: 10/08/2022.

IUGA, M.; MIRONEASA, S. A review of the hydrothermal treatments impact on starch based systems properties. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 60, n. 22, p. 3890-3915, 2020.

JAIN, D.; KATYALL, P. Optimization of gluco-amylase production from *Aspergillus spp.* for its use in saccharification of liquefied corn starch. **3 Biotech**, v. 8, n. 101, 2018.

JENSEN, B.; NEBELONG, P.; OLSEN, J.; REESLEV, M. J. B. L. Enzyme production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 41-45, 2004.

JIANG, J.; *et al.* Application of α -amylase as a novel biodemulsifier for destabilizing amphiphilic polymer-flooding produced liquid treatment. **Bioresour. Technol.**, v. 259, p. 349-356, 2018.

KARIM, K.; TASNIM, T. Fungal Glucoamylase Production and Characterization: A Review. **Bioreach. communications**, v. 4, 2018.

KATILEVICIUTE, A.; *et al.* A Sight to Wheat Bran: High Value-Added Products. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, 2019.

KELLY, D.; *et al.* Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 649-659, 2017.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems-an overview. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 25, n. 1-2, p. 1-30, 2005.

KUMAR, P.; SATYANARAYANA, T. Microbial glucoamylases: characteristics and applications. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 29, n. 3, p. 225-255, 2009.

KUMAR, D.; SINGH, V. Bioethanol Production From Corn *In*: SERNA-SALDIVA, S. O. (Ed.). **Corn Chemistry and Technology**. 3 ed. Oxford: Elsevier, p. 405- 433, 2019.

KUNAMNENI, A.; PILLAI, S.; SINGH, S. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for enhanced production of α -amylase in solid state fermentation by *Thermomyces lanuginosus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAGO, M. C.; *et al.* The glucoamylase from *Aspergillus wentii*: Purification and characterization. **J. Basic Microbiol.**, v. 61, n. 5, p. 443-458, 2021.

LÄUFER, A. Starch Biorefinery Enzymes. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 166, p. 137-152, 2019.

LEE, S. Y.; RA, C. H. Comparison of Liquid and Solid-State Fermentation Processes for the Production of Enzymes and Beta-Glucan from Hulled Barley. **J. Microbiol Biotechnol.**, v. 32, n. 3, p. 317-323, 2022.

LI, H.; *et al.* Purification and characterization of extracellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1006-1012, 2007.

LI, P.; *et al.* Biological pretreatment of corn straw for enhancing degradation efficiency and biogas production. **Bioengineered**, v.11, n. 1, p. 251-260, 2020.

LIM, S. L.; HAZWANI-OSLNA, N. S.; OSLNA, S. N. Purification and Characterisation of Thermoestable α -amylases from microbial sources. **BioResources**, v.15, n. 1, p. 2005-2029, 2020.

LI, Z.; CAI, L.; GU, Z.; SHI, Y. C. Effects of Granule Swelling on Starch Saccharification by Granular Starch Hydrolyzing Enzyme. **J. Agric. Food Chem**, v. 62, p. 8114–8119, 2014.

MACHOVIC, M.; SVENSSON, B.; MACGREGOR, E. A.; JANECEK, S. A new clan of CBM families based on bioinformatics of starch-binding domains from families CBM20 and CBM21. **Febs. j.**, v. 272, n. 21, p. 5497-5513, 2005.

MACNEILL, G. J.; *et al.* Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation. **J. Exp. Bot.**, v. 68, n. 16, p. 4433-4453, 2017.

MANOCHIO, C.; *et al.* Ethanol from biomass: A comparative overview. **Renewable and Sustainable Energy Review**, v. 80, p. 743-755, 2017.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. **Extremophiles**, v. 5, p. 73–83, 2001.

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, n. 8, p. 2689-2701, 2012.

MELNICHUK, N.; *et al.* Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. **Waste Management**, v. 106, p. 155-161, 2020.

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

MEYER, V.; *et al.* Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. **Fungal Biol. Biotechnol.**, v. 7, p. 5, 2020.

MICHELIN, M.; *et al.* Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. **Carbohydr. Res.**, v. 345, n. 16, p. 2348-2353, 2010.

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

MISHRA, R. S.; MAHESHWARI, R. Amylases of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: Their purification, properties, action on starch and response to heat. **Journal of Biosciences**, v. 21, n. 5, p. 653-672, 1996.

MITCHELL, D. A. *et al.* Design and Operation of a Pilot-Scale Packed-Bed Bioreactor for the Production of Enzymes by Solid-State Fermentation. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v.169, p. 27-50, 2019.

MONDAL, S.; MONDAL, K.; HALDER, S. K.; THAKUR, N.; MONDAL, K. C. Microbial Amylase: Old but still at the forefront of all major industrial enzymes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.45, 2022.

MURAS, A.; ROMERO, M.; MAYER, C.; OTERO, A. Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. **Critical reviews in biotechnology**, v. 41, p. 609-627, 2021.

MØLLER, M. S.; HENRIKSEN, A.; SVENSSON, B. Structure and function of α -glucan debranching enzymes. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 73, n. 14, p. 2619-2641, 2016.

NEVES, F. M. (Org.) **Etanol de milho: cenário atual e perspectivas para a cadeia no Brasil**. 1 ed. Ribeirão Preto, SP: UNEM, 2021.

NGO, S. T.; *et al.* Interaction of carbohydrate binding module 20 with starch substrates. **RSC Adv.**, v. 9, n. 43, p. 24833-24842, 2019.

NGUYEN, Q. D.; *et al.* Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme and microbial technology**, v. 31, n. 3, p. 345-352, 2002.

NICOLA, L.; *et al.* The Mycobiota of High Altitude Pear Orchards Soil in Colombia. **Biology (Basel)**, v.10, n. 10, 2021.

NIELSEN, J. E.; BORCHERT, T. V.; VRIEND, G. The determinants of α -amylases pH-activity profiles. **Proteins Engineering**, v. 14, n. 7, p. 505-512, 2001.

NIKNEJAD, F. *et al.* Halotolerant Ability and α -Amylase Activity of Some Saltwater Fungal Isolates. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.12, p. 113-119, 2013.

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

OH, S.-M.; *et al.* Starch nanoparticles prepared by enzymatic hydrolysis and self-assembly of short-chain glucans. **Food Science and Biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 585-598, 2020.

OLIVEIRA, A. P. A.; *et al.* Production and Catalytic Properties of Amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by Solid-State Fermentation. **The Scientific World Journal**, 2016, p. 7323875, 2016/06/20 2016.

OLORUNNISOLA, K. S.; JAMAL, P.; ALAM, M. Z. Growth, substrate consumption, and product formation kinetics of *Phanerochaete chrysosporium* and *Schizophyllum commune* mixed culture under solid-state fermentation of fruit peels. **Biotech.**, v 8, n. 10, p. 429, 2018.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.; THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* Advances in Microbial Amylases. **Biotechnology and applied biochemistry**, v.31, p. 135-152, 2000.

PARASHAR, D.; SATYANARAYANA, T. An Insight Into Ameliorating Production, Catalytic Efficiency, Thermostability and Starch Saccharification of Acid-Stable α -Amylases From Acidophiles. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology** v.6, 2018.

PATHANIA, S.; SHARMA, N.; HANDA, S. Utilization of horticultural waste (Apple Pomace) for multiple carbohydrase production from *Rhizopus delemar* F(2) under solid state fermentation. **J. Genet. Eng. Biotechnol.**, v.16, n. 1, p. 181-189, 2018.

PAUL, J. S.; *et al.* Aspects and recent trends in microbial α -amylase: a review. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 193, n. 8, p. 2649-2698, 2021.

PAULA, V. R. C.; *et al.* Comparison of digestible and metabolizable energy and digestible phosphorus and amino acid content of corn ethanol coproducts from Brazil and the United States produced using fiber separation technology for swine. **J. Anim. Sci.**, v. 99, n. 6, 2021.

PAYEN, A., PERSONZ, J. F. Mémoire su la Diastase, les Principaux Produits de ses Réactions et leurs Applications Aux Arts Industrielles. **Ann. Chim.**, v. 53, p. 73-92, 1833.

PERVEZ, S.; AMAN, A.; IQBAL, S.; SIDDIQUI, N.; QADER, S. A. U,. Saccharification and liquefaction of cassava starch: an alternative source for the production of bioethanol using amyolytic enzymes by double fermentation process. **BMC Biotechnology**, v. 14, n. 49, 2014, 14.

PETROVA, S. D.; *et al.* Production and characterization of extracellular α -amylases from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* (wild and mutant strains). **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 20, p. 1619-1624, 2000.

PINTO É, 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, 2020.

POTHIRAJ, C.; EYINI, M. Enzyme Activities and Substrate Degradation by Fungal Isolates on Cassava Waste During Solid State Fermentation. **Mycobiology**, v. 35, n. 4, p. 196-204, 2007.

PUNIA, S. J. I. J. o. B. M. Barley starch: Structure, properties and in vitro digestibility-A review. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 155, p. 868-875, 2020.

QUEK, W. P.; YU, W.; FOX, G. P.; GILBERT, R. G. J. A. Molecular structure-property relations controlling mashing performance of amylases as a function of barley grain size. **J. Amylase**, v. 3, n. 1, p. 1-18, 2019.

RAGUIN, A.; EBENHÖH, O. J. B. S. T. Design starch: stochastic modeling of starch granule biogenesis. **Biochemical Society Transactions**, v. 45, n. 4, p. 885-893, 2017.

RAY, R. R. Beta-amylases from various fungal strains. A review. **Acta. Microbiol Immunol. Hung.**, v. 51, n. 1-2, p. 85-95, 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. **Anal Biochem.**, v. 116, n. 1, p. 53-64, 1981.

RIAZ, M.; *et al.* Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 5, p. 558-564, 2007.

ROTH, C.; *et al.* Structural and functional characterization of three novel fungal amylases with enhanced stability and pH tolerance. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 19, p. 4902, 2019.

RULLER, R. *et al.* Concomitant adaptation of a GH11 xylanase by directed evolution to create an alkali-tolerant/thermophilic enzyme. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 27, p. 255-262, 2014.

SAUER, J.; *et al.* Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1543, n. 2, p. 275-293, 2000.

SEGEL, I.H. (1975). Bioquímica: Teoria e problemas. Livros Técnicos e Científicos Editora. Rio de Janeiro, RJ

SERNA-SALDIVAR. S. O.; CARRILLO, E. P. Food Uses of Whole Corn and Dry-Milled Fractions. Corn 3ed. **Chemistry and Technology**, pages 435-467, 2019.

SETHI, B. K.; *et al.* Production of α -Amylase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 Using Pearl Millet and Its Structural Characterization. **Front Plant. Sci.**, v. 7, p. 639, 2016.

SEUNG, D. J. N. P. Amylose in starch: Towards an understanding of biosynthesis, structure and function. **New Phytologist**, v. 228, n. 5, p. 1490-1504, 2020.

SHAFIEI, M.; ZIAEE, A. A.; AMOOZEGAR, A. M. Purification and characterization of a halophilic α -amylase with increased activity in the presence of organic solvents from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. **Extremophiles**, v. 16; p.627–635, 2012.

SHRUTHI, B. R.; ACHUR, R. N. H.; NAYAKA BORAMUTHI, T. Optimized Solid-State Fermentation Medium Enhances the Multienzymes Production from *Penicillium citrinum* and *Aspergillus clavatus*. **Current Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 2192-2206, 2020.

SINDHU, R., *et al.* Molecular improvements in microbial α -amylases for enhanced stability and catalytic efficiency. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1740-1748, 2017.

SIEW LING, H.; JOO SHUN, T.; LING, T.; ARIFF, A. Pullulanase: Role in Starch Hydrolysis and Potential Industrial Applications. **Enzyme research**, v. 2012, p. 921362, 2012.

SILVA, T. M. *et al.* Properties of a purified thermostable glucoamylase from *Aspergillus niveus*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.36, p.1439–1446, 2009.

SILVA, W. B.; PERALTA, R. M.; Biochemical characterization of an extracellular enzyme from a heat-tolerant fungus. **Biological and Health Science**, v.6, n. 1, p. 7-12, 2000.

SINGH, S.; *et al.* Production of fungal amylases using cheap, readily available agricultural residues, for potential application in textile industry. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 9, 2014.

SPINELLI, L. B. B.; DE LOURDES T.M. POLIZELI, M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. Biochemical characterization of glucoamylase from the hyperproducer exo-1 mutant strain of *Neurospora crassa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 138, n. 2-3, p. 173-177, 1996.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T. P. K. J. J. o. A.; MICROBIOLOGY, E. α -amylase production and applications: a review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 166-175, 2014.

TALLAPRAGADA, P.; DIKSHIT, R.; JADHAV, A.; SARAH, U. Partial purification and characterization of amylase enzyme under solid state fermentation from *Monascus sanguineus*. **J. Genet. Eng. Biotechnol.**, v. 15, n. 1, p. 95-101, 2017.

TAKAMINE J. Process of making diastatic enzyme. US patent No.525,813. Peoria, IL., patented, 1894.

TSE, T.; WIENS D. J.; REANEY M. J. Production of Bioethanol - A Review of Factors Affecting Ethanol Yield. **Fermentation**, v. 7, n. 4, p. 268, 2021.

TOMASIK, P.; HORTON, D. Enzymatic conversions of starch. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 68, p. 59-436, 2012.

TOSI, L. R. O.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. Purification and characterization of an extracellular glucoamylase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **J. Microbiol.**, v. 39, n. 9, p. 846-852, 1993.

TRAAEN, A. E. Untersuchungen über Bodenpilze aus Norwegen. **Nytt Mag Naturvidenskapene**, v. 52, p. 1-121, 1914.

TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMONT, M. J. R.; Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, 2020.

VAIDYA, S.; SRIVASTAVA, P.; RATHORE, D. P.; PANDEY, A. K. AMYLASES : A PROSPECTIVE ENZYME IN THE FIELD OF BIOTECHNOLOGY. **J. Appl. Biosci.**, v. 41, n.1, p. 1-18, 2015.

VASIĆ, K.; KNEZ, Ž.; LEITGEB, M. Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis from Different Lignocellulosic Sources. **Molecules**, v. 26, n. 3, 2021.

WANG, X. W.; *et al.* Redefining *Humicola* sensu stricto and related genera in the Chaetomiaceae. **Stud. Mycol.**, v. 93, p. 65-153, 2019.

XIAN, L.; *et al.* Purification and characterization of a highly efficient calcium-independent α -amylase from *Talaromyces pinophilus* 1-95. **PLoS One**, v.10, n. 3, 2015.

XIAN, L.; FENG, J. X. : Purification and biochemical characterization of a novel mesophilic glucoamylase from *Aspergillus tritici* WZ99. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.107, p. 1122-1130, 2018.

XU, Q. S.; YAN, Y.; FENG, J. X. Efficient hydrolysis of raw starch and ethanol fermentation: a novel raw starch-digesting glucoamylase from *Penicillium oxalicum*. **Biotechnol Biofuels**, v. 9, n. 216, 2016.

XU, P.; ZHANG, S.-Y.; LUO, Z.-G.; ZONG, M.-H. *et al.* Biotechnology and bioengineering of pullulanase: state of the art and perspectives. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 43, 2021.

YOSHIZAKI, Y.; *et al.* Characterization of glucoamylase and α -amylase from *Monascus anka*: enhanced production of α -amylase in red koji. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 110, n. 6, p. 670-674, 2010.

YU, J.; *et al.* Process integration for ethanol production from corn and corn stover as mixed substrates. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 10-16, 2019.

ZHAO, M.; CHEN, B. Corn Oil. *In: Reference Module in Food Science*: Elsevier, 2023.

ZHOU, B.; *et al.* Development of a strategy for the screening of α -glucosidase-producing microorganisms. **J. Microbiol.**, v. 58, n. 2, p. 163-172, 2020.