

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

BRENDA SILVIA TOMICHÁ DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMILASE PRODUZIDA POR *Rhizopus*  
*oryzae* ISOLADO DE BANCADA LATERÍTICA**

CAMPO GRANDE/MS

2023

BRENDA SILVIA TOMICHÁ DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMILASE PRODUZIDA POR *Rhizopus oryzae*  
ISOLADO DE BANCADA LATERÍTICA

Dissertação de Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para defesa da dissertação.

Orientadora: Dra. Gecele Matos Paggi.

Coorientadora: Dra. Nayara Fernanda Lisboa Garcia.

CAMPO GRANDE/MS

2023

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, especialmente a minha mãe, Pura Silvia, por seu amor incondicional, apoio e compreensão, por sempre me incentivar nos momentos mais difíceis e nunca ter me deixado desamparada em qualquer circunstância, sem dúvida alguma se consegui chegar até aqui, foi graças a ela.

Agradeço a minha irmã Nathalia Carolina e seu esposo, Claumedir, por toda compreensão, apoio e incentivo diariamente, sem questionamentos ou julgamentos.

Agradeço a minhas tias Eugenia Blacuth e Cornélia Tomichá, por todo carinho e prontidão para cuidar de mim, especialmente em meus momentos enfermos, que foram muitos ao longo dessa jornada do mestrado.

Agradeço aos meus colegas de laboratório que são pessoas incríveis, especialmente às minhas orientadoras Dra. Gecele Matos Paggi e a Dra. Nayara Fernanda Lisboa Garcia, por aceitar me orientar de forma tão atenciosa e presente. Agradeço ao Anthony Orichuela Evangelista por toda ajuda e companheirismo no desenvolvimento da pesquisa. Agradeço especialmente a Dra. Marivaine Silva Brasil e ao Emílio Flores Filho por todo suporte.

Agradeço aos meus queridos amigos por sua amizade leal, verdadeira, inocente e completamente despropositada, sempre me confortaram com sua presença e apoio, zelando e torcendo pelo meu sucesso, Adler Cavalcante de Moraes, Otávio Sessa de Souza, Gabriel do Prado Martins, Denner Figueiredo Nascimento, Victor Augusto Fonseca Pinto, especialmente Augusto Nogueira Albuquerque Matos, Juan L. Carolino, Jonas Gabriel Ramos da Sila Ataliba e a todos os outros que sou incapaz de listar, pois mesmo não estando tão perto quanto gostariam sempre se mostraram próximos.

Agradeço a todos os meus colegas de curso, especialmente a Erick Yudi Maruyama Rodrigues, Maria Helena Fermiano e Karine Domingos de Araújo. Agradeço a todo corpo da UFMS, que sempre foi tão solícito comigo durante a minha jornada no mestrado.

Por fim, agradeço a Deus, por me dar saúde, força e sabedoria para nunca desistir de realizar a pesquisa com todos os desafios que ocorreram.

*“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.” - Isaac Newton*

## RESUMO

Amilases são amplamente utilizadas na indústria devido suas características bioquímicas e seu custo de produção reduzido quando comparado com outros compostos. A busca por linhagens de fungos filamentosos que produzam amilases termoestáveis é importante para ampliar sua aplicação em processos industriais que requerem temperaturas elevadas. Neste estudo, foram isolados fungos filamentosos do solo de afloramentos de ferro, com potencial para produção de amilase. Foram avaliados 34 fungos filamentosos e o isolado 21, identificado como *Rhizopus oryzae* apresentou potencial para produção de amilase. Após a otimização das condições de cultivo, a maior produção de amilase por *R. oryzae* foi de 21,30 U/g de substrato seco, quando cultivado em farelo de trigo, suplementado com ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O e NaNO<sub>3</sub>), umidade de 55% a 30°C por 48 h, apresentando aumento de 47,4% em relação ao parâmetro inicial. A caracterização bioquímica da enzima produzida pelo isolado *R. oryzae*, mostrou ótima atividade enzimática em pH 5,0 a 75°C, com atividade catalítica de 62,57 U/g de substrato. A enzima apresentou atividade residual superior a 80% entre 30 e 50°C após 1 h de incubação, e 65% quando incubada em pHs de 4,5-9,0 após 24 h. Essas características tornam a enzima produzida pela linhagem de *Rhizopus oryzae* isolada das bancadas lateríticas promissoras para aplicação em processos industriais que requerem amilases termoestáveis. A utilização de fungos filamentosos do solo de afloramentos de ferro produtores de enzimas amilolíticas é recente e pode oferecer novas possibilidades para a obtenção e aplicação de enzimas com características desejáveis para a indústria.

**Palavras-chave:** Amilases, afloramentos ferruginosos, linhagens fúngicas, cultivo em estado sólido, caracterização bioquímica.

## ABSTRACT

Amylases are highly used in industry because of its cost of production and biochemical characteristics. It requires studies that search for filamentous fungal strains focused on production of thermotolerant amylases is desired to increase in industrial applications that request high temperatures. In the present study was isolated filamentous fungi from ironstone outcrops soil, with potential for amylase production. Of the 34 fungi was evaluated and the isolate 21, molecularly identified as *Rhizopus oryzae*, showed potential for amylase production. After performing the optimization of the amylolytic production of isolated *R. oryzae*, the highest amylase production obtained was 21.30 U/g of dry substrate of the wheat bran, supplemented with  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{NaNO}_3$ ) in 55% moisture, at 30°C for 48 hours, increasing of 47.4% compared with initial production. The biochemical characterization of the enzyme produced by isolated *R. oryzae* show optimal enzymatic activity at pH 5.0 to 75°C with 62,57 U/g of amylolytic activity, residual activity higher than 80% of the enzyme was observed between temperatures from 30°C to 50°C after 1 hour of incubation, and residual activity higher than 65% at pHs range 4.5-9.0 after 24 h of incubation. These characteristics turn this strain of *Rhizopus oryzae* promising for industrial application in processes that require amylases thermostable. The use of filamentous fungi from the soil of iron outcrops producing amylolytic enzymes is recent and may offer new possibilities for the production and application of enzymes with desirable characteristics for the industry.

**Keywords:** Amylases, ironstone outcrops, fungal strains, solid-state fermentation and biochemical characterization

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efeito de diferentes subprodutos agroindustriais na produção de amilase por cultivo em estado sólido de *Rhizopus oryzae*, após 96 horas, contendo 70% de umidade a 28°C suplementado com a fonte de nitrogênio composta por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{NaNO}_3$ . 20
- Figura 2.** Produção de amilase por *Rhizopus oryzae* em farelo de trigo por cultivo em estado sólido por 96 h com 70% de umidade. (A) Produção de amilase em diferentes fontes de nitrogênio, (B) Produção de amilase em função da temperatura de cultivo. 21
- Figura 3.** Produção de amilase pelo *Rhizopus oryzae* por cultivo em estado sólido em farelo de trigo suplementado com a fonte de nitrogênio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{NaNO}_3$  em diferentes umidades a 30°C por 96 h (A) e em função do tempo de cultivo (B) 22
- Figura 4.** Efeito do pH (A) e temperatura (B) sobre a atividade da amilase produzida pelo fungo *Rhizopus oryzae* 23
- Figura 5.** Caracterização bioquímica da amilase produzida por fermentação em estado sólido nos parâmetros otimizados de *Rhizopus oryzae*. (A) pH de estabilidade e (B) temperatura de estabilidade 24
- Figura 6.** Modificações enzimáticas da molécula do amido pelos métodos DNS e iodétrico 25

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Locais de coleta dos solos e sua coordenada geográfica	15
<b>Tabela 2.</b> Fontes de nitrogênio utilizadas e suas concentrações	16
<b>Tabela 3.</b> “ <i>Screening</i> ” da produção de amilase por fungos filamentosos isolados do solo de bancadas lateríticas, cultivados em farelo de trigo contendo 70% de umidade inicial a 28°C por 96 h	19
<b>Tabela 4.</b> Caracterização morfológica dos fungos isolados a partir do solo de bancadas lateríticas, município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. Colônias analisadas após 72h crescimento em meio BDA	30



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1 Isolamento dos microrganismos e área de estudo	13
3.2 Caracterização morfológica dos fungos isolados	13
3.3 “Screening” das linhagens com potencial para produção de amilase	14
3.3.1 Inóculo e Cultivo em Estado Sólido (CES)	14
3.3.2 Extração da enzima produzida	14
3.3.3. Determinação da atividade de amilase	14
3.4. Otimização da produção de amilase por cultivo em estado sólido (CES)	14
3.4.1 Efeito de diferentes substratos para produção de amilase	14
3.4.2 Efeito das fontes de nitrogênio na produção de amilase	15
3.4.3 Efeito da temperatura na produção de amilase	15
3.4.4 Efeito da umidade na produção de amilase	16
3.4.5 Efeito do tempo de cultivo para produção de amilase	16
3.5 Caracterização bioquímica da enzima produzida	16
3.5.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima	16
3.5.3. Avaliação do potencial dextrinizante do extrato enzimático	16
3.6. Análise estatística	17
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>18</b>
4.1. Otimização dos parâmetros de cultivo para produção de amilase	19
4.1.1. Seleção de substratos para produção de amilase	19
4.1.2. Efeito da fonte de nitrogênio na produção de amilase	19
4.1.3. Efeito da temperatura na produção de amilase	20
4.1.4. Efeito da umidade na produção da amilase	21
4.1.5. Efeito do tempo de cultivo na produção de amilase	21
4.2 Caracterização bioquímica da enzima	22
4.2.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática	22
4.2.2 Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da enzima	23
4.2.3. Potencial de dextrinização do extrato enzimático	24
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>25</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>26</b>
<b>ANEXO I – TABELA DE CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA</b>	<b>29</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O amido é o principal polissacarídeo de reserva de carboidratos encontrado nas plantas, composto por unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas (Cho & Kang, 2020). Sua hidrólise produz moléculas simples que são utilizadas na alimentação humana, produção de ração animal, fármacos (Oliveira et al., 2016), além de ser amplamente utilizado na produção de bioplásticos e bioetanol (Maia et al., 2020).

A hidrólise do amido em açúcares simples pode ser realizada por catalisadores químicos ou biológicos, sendo o uso de enzimas uma alternativa mais eficiente e sustentável na indústria (Ghanbarzadeh et al., 2021), pois enzimas conduzem reações de forma específica e seletiva, permitindo a obtenção de produtos de alta qualidade e baixa geração de resíduos quando comparado com a hidrólise química (Almeida et al., 2017), reduzindo o impacto ambiental da atividade industrial.

Amilases são enzimas que atuam na degradação do amido (Bertoft 2018; Park et al. 2018) realizando clivagens no interior e exterior da molécula. As amilases são divididas em endoamilases e exoamilases, e de acordo com as ligações glicosídicas que clivam. As  $\alpha$ -amilases clivam randomicamente no interior do substrato produzindo maltose,  $\beta$ -amilases nas extremidades não redutoras da cadeia produzindo  $\beta$ -dextrina, e glicoamilases atuam na liberação de glicose das extremidades não redutoras (Farooq et al., 2021).

Dentre os organismos capazes de sintetizar enzimas amilolíticas destacam-se os fungos filamentosos por apresentarem elevada produção de enzimas e estabilidade a variações de pH e temperatura (Suwannarach et al., 2019).

A produção de amilases por microrganismos pode ser realizada por cultivo submerso ou cultivo em estado sólido (Balakrishnan et al., 2021), entretanto, o cultivo em estado sólido tem se mostrado uma alternativa interessante para a produção de amilases de alta qualidade, pois oferece vantagens como, baixo custo de produção, baixo risco de contaminação e eficiência catalítica das enzimas (Premalatha et al., 2022), tornando o cultivo em estado sólido uma estratégia importante para otimizar a produção de amilases em escala industrial (Srivastava et al., 2019).

A obtenção de espécies fúngicas que produzam amilases bioquimicamente estáveis é importante pois muitos processos industriais demandam características específicas para cada processo realizado, entretanto, um dos entraves para sua aplicação são as características bioquímicas das enzimas utilizadas, pois as amilases tendem a apresentar maior estabilidade em pHs mais ácidos e baixa atividade em temperaturas elevadas, além de serem inibidas pelo

seu produto de hidrólise, o que inviabiliza a utilização desses biocatalisadores em processos que demandam altas temperaturas e pH básico, limitando consideravelmente as aplicações dessas enzimas. Dessa forma, visando contribuir para a expansão da aplicação da amilase em processos industriais, faz-se necessário bioprospectar linhagens produtoras de amilase com elevada atividade e estabilidade a altas temperaturas.

Enzimas termoestáveis podem ser obtidas de fungos termófilos ou termotolerantes, que por sua vez, podem ser isolados de ambientes hostis (Gomes et al., 2019) com elevadas temperaturas, como as bancadas lateríticas localizadas em Corumbá - MS. Neste contexto, o presente estudo visou o isolamento de fungos filamentosos do solo das bancadas lateríticas de Corumbá-MS, com potencial para produção de amilase, otimização do processo de produção enzimática e caracterizar bioquimicamente a amilase obtida.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo do presente estudo visou isolar fungos filamentosos do solo das bancadas lateríticas de Corumbá-MS, com potencial para produção de amilase, otimizar a produção e caracterizar bioquimicamente a amilase produzida.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Isolar os microrganismos do solo das bancadas lateríticas, Corumbá-MS;
- Caracterizar morfológicamente as linhagens isoladas;
- Avaliar a produção de amilase das linhagens isoladas;
- Otimizar a produção de amilase da linhagem selecionada;
- Caracterizar bioquimicamente a amilase obtida.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Isolamento dos microrganismos e área de estudo

Afloramentos ferruginosos são formações geológicas resultantes da deposição de sedimentos ferruginosos e intemperismo. Os afloramentos ferruginosos de Corumbá-MS, Brasil, foram formados a partir da deposição de minerais do Planalto Residual de Urucum e são chamados de “bancadas lateríticas” ou “Cangas” (Lima et al. 2019, Ruas et al. 2020) devido a sua baixa altimetria. A região é classificada como AW megatérmica pela classificação de Köppen (Lenzi & Paggi, 2020), com solos áridos, baixa disponibilidade de recursos e baixa umidade (Takahasi & Meirelles, 2014).

Foram coletadas amostras de solo de cinco afloramentos ferríferos (**Tabela 1**), localizados na cidade de Corumbá, MS, Brasil. As amostras de solo foram diluídas seriadamente ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ) em solução salina 0,85% e inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose (BDA) com 1 mg/mL de ampicilina. As placas de Petri foram incubadas a 28 e 45°C visando isolar cepas mesófilas e termófilas. As cepas foram cultivadas até a obtenção de cepas puras.

**Tabela 1.** Locais de coleta dos solos e sua coordenada geográfica.

Locais de coleta	Coordenadas geográficas
Fazenda Monjolo	19° 16'28.4"S, 57° 31'42.7"W
Fazenda São João	19° 10'46.2"S, 57° 32'19.1"W
Fazenda Vale do Paraíso	19°10'05.1"S 57°33'26.3"W
Parque Municipal de Piraputangas I	19° 14'31.0"S, 57° 38'08.0"W
Parque Municipal de Piraputangas II	19° 17'02.0"S, 57° 37'06.0"W

#### 3.2 Caracterização morfológica dos fungos isolados

As linhagens puras foram cultivadas a 28°C por 72 h. Posteriormente, os fungos isolados foram fotodocumentados e caracterizados morfológicamente, incluindo a avaliação da topografia, cor do centro, cor da borda, aspecto, textura e tipo de borda (Klich & Pitt, 1988).

### **3.3 “Screening” das linhagens com potencial para produção de amilase**

#### **3.3.1 Inóculo e Cultivo em Estado Sólido (CES)**

Os microrganismos isolados foram cultivados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 40 mL de meio BDA autoclavado e inclinado, por 96 h a 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem da superfície do meio de cultura contendo 25 mL de solução nutriente composta por sulfato de amônio 0,1%, sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,1% e nitrato de sódio 0,1% (m/v) previamente autoclavada. A inoculação do fungo nos substratos, foi realizada pela transferência de 5 mL da suspensão microbiana ( $10^7$  esporos/g de substrato seco) para os Erlenmeyer contendo 5 gramas (g) de farelo de trigo umedecido com 5 mL de solução nutriente previamente autoclavado (Pereira et al., 2015), por 96 h a 28°C.

#### **3.3.2 Extração da enzima produzida**

O extrato enzimático foi obtido adicionando 50 mL de água destilada nos frascos de Erlenmeyer onde o cultivo em estado sólido foi realizado. Posteriormente, o meio foi macerado e mantido em agitação a 100 rpm por uma h. O produto da agitação foi filtrado em tecido sintético voal, seguido de centrifugação por 10 min a  $2325 \times g$  e o sobrenadante, denominado extrato enzimático, foi utilizado nos ensaios subsequentes.

#### **3.3.3. Determinação da atividade de amilase**

A atividade da amilase foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto em 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 contendo 1% de amido de milho (Maizena®) como substrato a 50°C. Após 10 min de reação, adicionou-se 1 mL de ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) conforme descrito por Miller (1959). A absorbância da amostra foi medida a 540 nm em espectrofotômetro SP-220 (Biospectro), em comparação com a curva padrão de glicose (0-1 mg/mL). Os resultados foram expressos em unidade por grama de substrato seco (U/g), definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor por minuto de reação (Cavalheiro et al., 2017).

### **3.4. Otimização da produção de amilase por cultivo em estado sólido (CES)**

#### **3.4.1 Efeito de diferentes substratos para produção de amilase**

Cinco substratos foram selecionados para produção de amilase, sendo farelo de trigo, sabugo de milho, palha de milho, casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar cortados, pré-tratados com lavagem, secagem a 50°C e ralados. O cultivo foi realizado em frascos de erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de cada substrato. Os frascos foram inoculados com 5

mL de inóculo e incubados a 28°C por 96 h. Os parâmetros de cultivo ótimos de cada etapa, foram adotados no cultivo subsequente.

### 3.4.2 Efeito das fontes de nitrogênio na produção de amilase

O efeito das fontes de nitrogênio na produção de amilase em CES foi estudado utilizando sete soluções conforme Merheb-Dini et al. (2009) e Souza et al. (2020), conforme apresentado na tabela 2.

**Tabela 2.** Fontes de nitrogênio utilizadas e suas concentrações.

<b>Solução</b>	<b>Composição da solução</b>	<b>Concentração (m/v)</b>
<b>1</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .	<b>0,3%</b>
<b>2</b>	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	<b>0,3%</b>
<b>3</b>	NaNO <sub>3</sub>	<b>0,3%</b>
<b>4</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O e NaNO <sub>3</sub>	<b>0,1%, 0,1%, 0,1%</b>
<b>5</b>	Extrato de levedura	<b>0,3%</b>
<b>6</b>	Peptona	<b>0,3%</b>
<b>7</b>	Extrato de levedura e peptona	<b>0,3%</b>

Os substratos foram umedecidos com a solução nutriente selecionada separadamente e autoclavado, o efeito da atividade enzimática foi determinada conforme descrição no item 3.3.3.

### 3.4.3 Efeito da temperatura na produção de amilase

A temperatura ótima para a produção de amilase foi determinada incubando o microrganismo em condições que foram selecionadas anteriormente nas temperaturas de 25 a 40°C com incrementos de 5°C. A atividade enzimática foi determinada conforme descrição no item 3.3.3.

### 3.4.4 Efeito da umidade na produção de amilase

O efeito da variação da umidade para produção de amilase foi estudado variando o teor de umidade do meio de cultivo de 50 a 80%, com incrementos de 5%. O cultivo foi realizado em condições otimizadas, sendo o parâmetro selecionado utilizado nos estudos seguintes. A atividade enzimática foi determinada conforme descrição no item 3.3.3.

### **3.4.5 Efeito do tempo de cultivo para produção de amilase**

O tempo de cultivo para a produção de amilase foi determinado em CES, incubando os frascos por 192 h em CES. A cada 24 horas de cultivo, a enzima foi extraída, visando determinar o melhor tempo de produção da enzima. O efeito da atividade enzimática foi determinado conforme descrição no item 3.3.3.

## **3.5 Caracterização bioquímica da enzima produzida**

### **3.5.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da enzima**

O pH ótimo foi determinado avaliando a atividade enzimática em diferentes valores de pH (3,0–8,0), a 50°C usando o tampão McIlvaine. A temperatura ótima avaliando a atividade em diferentes temperaturas (30–85°C), no respectivo pH ótimo da enzima. A estabilidade da enzima em diferentes pH foi estudada incubando a enzima em diferentes valores de pH por 24 h a 30°C, usados tampão McIlvaine (pH 3,0–8,0), 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0–8,5) e 0,1 M Glicina-NaOH (pH 8,5–10,5). A termoestabilidade foi avaliada incubando a enzima por 1 h sob diferentes condições de temperatura (30–80°C). As atividades residuais da enzima foram determinadas sob pH e temperatura ótimos.

### **3.5.3. Avaliação do potencial dextrinizante do extrato enzimático**

A atividade dextrinizante foi avaliada em ensaios conduzidos em tampão de acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0) contendo 1% de amido. A despolimerização do amido foi quantificada pelo método iodométrico descrito por Fuwa (1954) e Pongsawadi e Yagisawa (1987). A reação foi composta por 0,1 mL do extrato enzimático e 0,3 mL de tampão contendo amido. Após incubação por 10 min a 55°C, a reação foi interrompida pela adição de 4 mL de HCl 0,2 M, 0,5 mL de reagente iodo (0,3% KI e 0,03% I<sub>2</sub>) e 10 mL de água destilada. A absorbância foi medida a 700 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir a intensidade da cor azul do complexo iodo-amido em 10% por minuto de reação.

## **3.6. Análise estatística**

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados como a média de dois ensaios independentes. A análise estatística dos dados incluiu ANOVA seguido pelo teste de Tukey com nível de significância de 1%, com o auxílio do *software* estatístico ASSISTAT (Silva & Azevedo, 2016).



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados 34 fungos filamentosos mesófilos de cinco bancadas lateríticas localizadas no Pantanal Sul Mato Grossense, e caracterizados de acordo com suas características, local de coleta e diferentes morfotipos (**Anexo I**). A produção de amilase pelos fungos isolados foi avaliada cultivando os microrganismos em farelo de trigo por 96 h (**Tabela 4**).

Entre os fungos avaliados para produção de amilase, os isolados 11 e 21 apresentaram maior produção de amilase,  $14,01 \pm 0,35$  e  $14,45 \pm 1,60$  U/g de substrato, respectivamente. Devido a produção de amilase em seu maior valor absoluto o isolado 21 foi selecionado para ensaios de otimização e caracterização da amilase produzida, sendo identificado molecularmente pela empresa GoGenetics como *Rhizopus oryzae* (*arrhizus*).

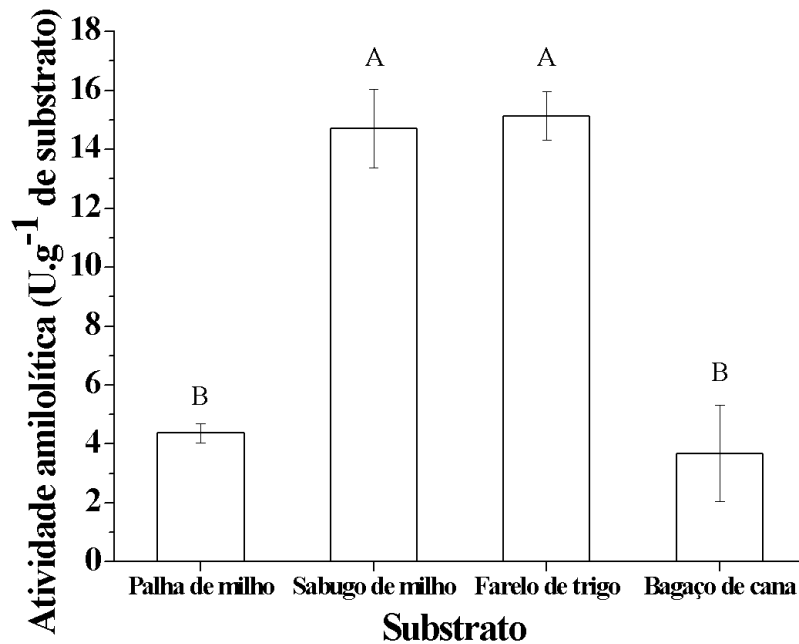
**Tabela 3.** “Screening” da produção de amilase por fungos filamentosos isolados do solo de bancadas lateríticas, cultivados em farelo de trigo contendo 70% de umidade inicial a 28°C por 96 h.

Fungos isolados	Amilase (U/g de substrato)	Fungos isolados	Amilase (U/g de substrato)
1	$6,04 \pm 0,59$	18	$0,00 \pm 0,00$
2	$0,00 \pm 0,00$	19	$3,88 \pm 0,78$
3	$0,00 \pm 0,00$	20	$8,93 \pm 1,39$
4	$4,45 \pm 1,43$	21	$14,45 \pm 1,60$
5	$3,34 \pm 0,74$	22	$13,77 \pm 0,32$
6	$3,64 \pm 0,99$	23	$7,606 \pm 0,076$
7	$3,97 \pm 0,46$	24	$6,72 \pm 1,80$
8	$12,81 \pm 1,35$	25	$8,22 \pm 0,82$
9	$9,88 \pm 1,62$	26	$10,26 \pm 2,67$
10	$8,89 \pm 3,34$	27	$12,43 \pm 0,49$
11	$14,01 \pm 0,35$	28	$5,72 \pm 1,70$
12	$8,14 \pm 3,54$	29	$5,69 \pm 1,03$
13	$6,80 \pm 0,62$	30	$4,92 \pm 2,26$
14	$7,99 \pm 1,06$	31	$7,83 \pm 2,27$
15	$11,42 \pm 0,98$	32	$10,57 \pm 0,12$
16	$7,86 \pm 1,35$	33	$4,06 \pm 1,60$
17	$2,63 \pm 0,23$	34	$7,86 \pm 0,99$

## 4.1. Otimização dos parâmetros de cultivo para produção de amilase

### 4.1.1. Seleção de substratos para produção de amilase

Dentre os substratos avaliados, o farelo de trigo foi o substrato que apresentou maiores valores absolutos na produção de amilase por *R. oryzae*, produzindo  $15,13 \pm 0,83$  U/g de substrato, seguido do sabugo de milho com  $14,71 \pm 1,34$  U/g (**Figura 1**).



**Figura 1.** Produção de amilase em diferentes substratos agroindustriais por cultivo em estado sólido pelo fungo *Rhizopus oryzae*, 96 h, contendo 70% de umidade a 28°C suplementado com a fonte de nitrogênio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O e NaNO<sub>3</sub>).

Estudos descrevem o farelo de trigo como excelente substrato para a produção de diferentes enzimas, devido às suas características físico-químicas, tais como sua matriz sólida que favorece a adesão de fungos filamentosos, sua capacidade de retenção de umidade e sua abundância de sais inorgânicos, carbono e nitrogênio (Biswas et al., 2019, Almanaa et al., 2020). Portanto, o farelo de trigo foi selecionado como substrato para os ensaios subsequentes.

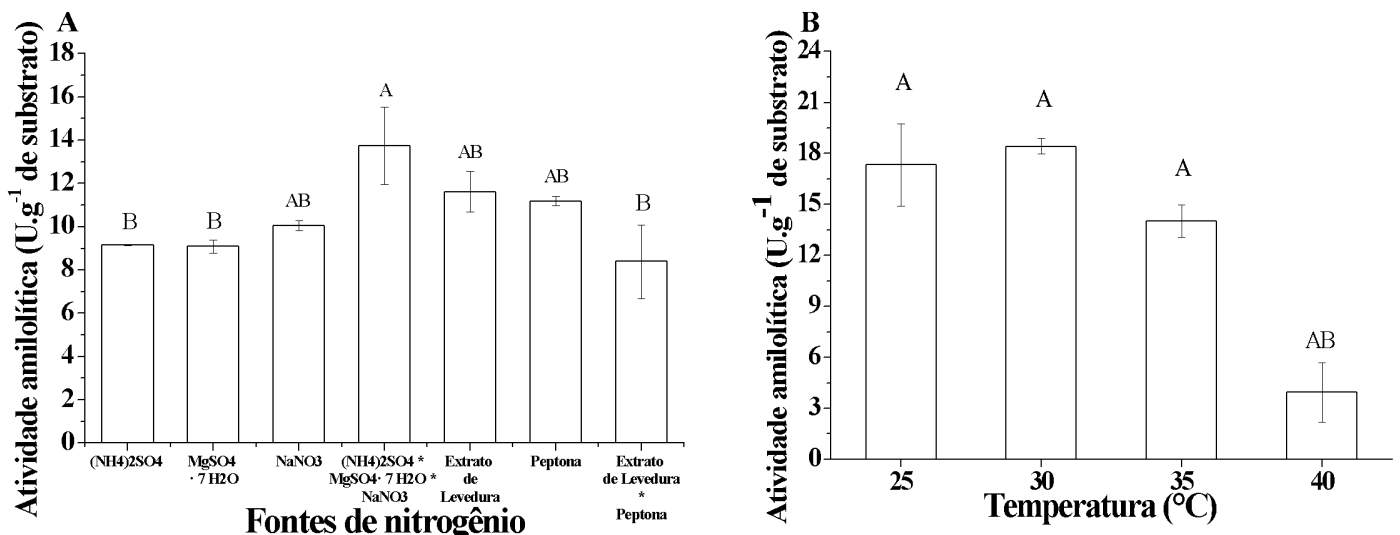
### 4.1.2. Efeito da fonte de nitrogênio na produção de amilase

A maior produção de amilase pelo microrganismo foi obtida nas fontes ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e NaNO<sub>3</sub>) e Extrato de Levedura, resultando em uma produção média de 13,74 U/g e 11,61 U/g de substrato, respectivamente. Por outro lado, a combinação de Extrato de Levedura e Peptona resultou na menor produção de amilase, produzindo 8,39 U/g de substrato (**Figura 2A**). Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que indicaram a

solução de sulfato de amônio, sulfato de magnésio heptahidratado e nitrato de sódio, como bons indutores para a produção de amilases fúngicas (Ferreira et al., 2015, Oliveira et al., 2016, Cavalheiro et al., 2017). Isso ocorre porque algumas amilases são metaloenzimas que necessitam de cátions específicos como o  $Mg^{+2}$  ou  $Ca^{+2}$  para manter a sua conformação espacial assegurando a estabilidade e atividade da enzima (Merheb-Dini et al., 2009, Prajapati et al., 2014).

#### 4.1.3. Efeito da temperatura na produção de amilase

*R. oryzae* apresentou maior produção de amilase quando cultivado a 30°C ( $18,42 \pm 0,46$  U/g), no entanto, não houve diferença significativa quando comparado às temperaturas de 25 a 35°C. Por outro lado, foi observada diminuição na produção de amilase em temperaturas acima de 35°C (**Figura 2B**). O mesmo foi observado no estudo com *Trichoderma virens*, onde 30°C foi a temperatura mais adequada para produção de amilase (Abdel-Mageed et al., 2022).



**Figura 2.** Produção de amilase por *Rhizopus oryzae* por cultivo em estado sólido em farelo de trigo contendo 70% de umidade, após 96 h. (A) Diferentes fontes de nitrogênio, (B) Temperatura de cultivo.

A temperatura é um importante parâmetro no cultivo em estado sólido pois está diretamente associada à produção de enzimas, visto que uma temperatura abaixo do ideal para o microrganismo pode levar a um desenvolvimento lento e não fornece energia necessária para a biossíntese de enzimas. Em contrapartida, temperaturas acima do ideal pode levar a desnaturação das proteínas inibindo o desenvolvimento do microrganismo produtor (Fadel et al., 2020, Farooq et al., 2021), por influenciar diretamente na energia que é requerida pelo organismo.

#### 4.1.4. Efeito da umidade na produção da amilase

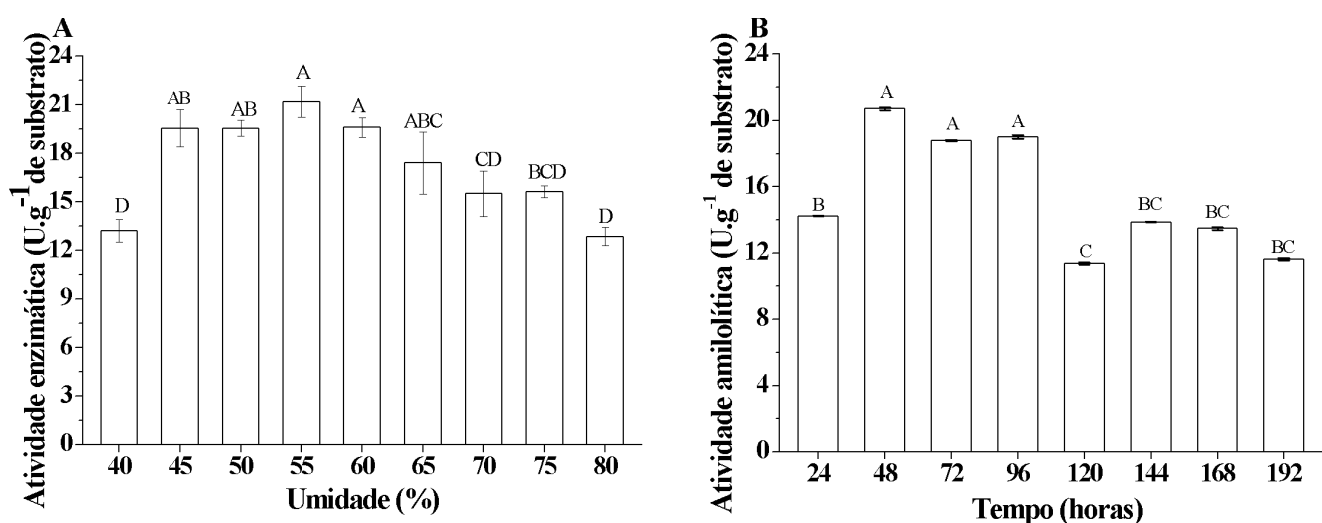
A maior produção de amilase pelo fungo *R. oryzae*,  $21,19 \pm 0,78$  U/g. (**Figura 3A**), foi obtida em farelo de trigo, contendo 55% de umidade inicial após 96 h de cultivo.

A umidade é um dos fatores decisivos para o desenvolvimento dos fungos. A umidade excessiva pode reduzir a porosidade do substrato, dificultar as trocas gasosas e favorecer o surgimento de bactérias indesejáveis. Por outro lado, baixos níveis de umidade podem dificultar a distribuição de nutrientes no substrato e consequentemente, prejudicar o crescimento dos fungos (Benabda et al., 2019). Microrganismos que necessitam de baixos níveis de umidade para produção de enzimas auxiliam na redução dos custos de produção, além de reduzirem o risco de contaminação por bactérias (Sanguine et al., 2022).

#### 4.1.5. Efeito do tempo de cultivo na produção de amilase

A produção de amilases é diretamente influenciada pelo tempo de cultivo. *R. oryzae* apresentou máxima produção de amilase após 48 h de cultivo, obtendo 21,30 U/g de substrato ( $2,13$  U/mL) (**Figura 3B**). Pode-se observar um aumento na produção de amilase até o 4º dia de incubação, posteriormente houve uma expressiva redução na produção da enzima.

Bernardes et al. (2014) obteve um resultado similar ao estudar *Rhizomucor miehei* cuja produção máxima de amilase ocorreu em 48 h de incubação (13 U/g de substrato) em quirera de milho, usando como fonte de nitrogênio sulfato de amônio 0,1%, pH 4,5. O tempo de cultivo para produção de enzimas é uma das características mais relevantes para a indústria, pois ela interfere diretamente nos custos de produção (Garbin et al., 2021).



**Figura 3.** Produção de amilase por *Rhizopus oryzae* por cultivo em estado sólido em farelo de trigo suplementado com a fonte de nitrogênio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{NaNO}_3$  em (A) diferentes umidades e em função do (B) tempo de cultivo a 30°C por 96 h.

A otimização dos parâmetros de cultivo demonstrou que o cultivo em farelo de trigo, suplementado pela fonte de nitrogênio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{NaNO}_3$ , contendo 55% de umidade inicial a  $30^\circ\text{C}$  e com 48 h de cultivo foram as condições ideais para a produção de amilase por *R. oryzae*. A otimização das condições de cultivo resultou em um aumento de 47,4% na produção da amilase quando comparado o parâmetro de substrato com o parâmetro de tempo de cultivo (Figura 1 e 3).

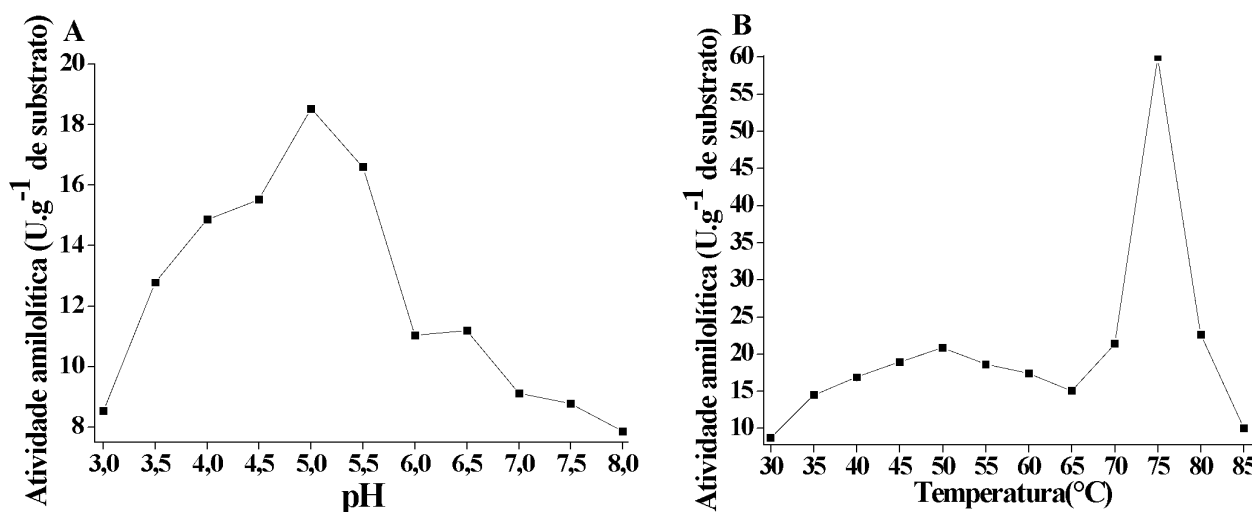
A produção de amilase por *R. oryzae* indica um perfil interessante em aplicações que requeiram moderada necessidade de água (55%) e curto período de incubação (48 h), o que estimula a sua caracterização e o desenvolvimento de ensaios para a aplicação dessa enzima.

## 4.2 Caracterização bioquímica da enzima

### 4.2.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

A amilase produzida por *R. oryzae* apresentou maior atividade enzimática em pH 5,0 (Figura 4A). Nossos resultados estão de acordo com a literatura, que relata a atividade ideal de enzimas amilolíticas em pH entre 4,0 e 7,0 (Paludo et al., 2018; Abdulaal et al., 2019; Ademakinwaal et al., 2019). O pH é um dos fatores mais importantes na atividade enzimática, pois a concentração de íons de hidrogênio na solução afeta a distribuição e as interações químicas entre o sítio ativo da enzima e o substrato, podendo favorecer ou eliminar interações iônicas que são necessárias para a conformação ativa da enzima (Nelson & Cox 2019; Paul et al., 2021).

A temperatura para a atividade ótima da amilase produzida por *R. oryzae* foi a  $75^\circ\text{C}$  (Figura 4B), sendo a atividade enzimática nas temperaturas de 70 e  $80^\circ\text{C}$  superiores às obtidas nas temperaturas de 30 a  $65^\circ\text{C}$ .



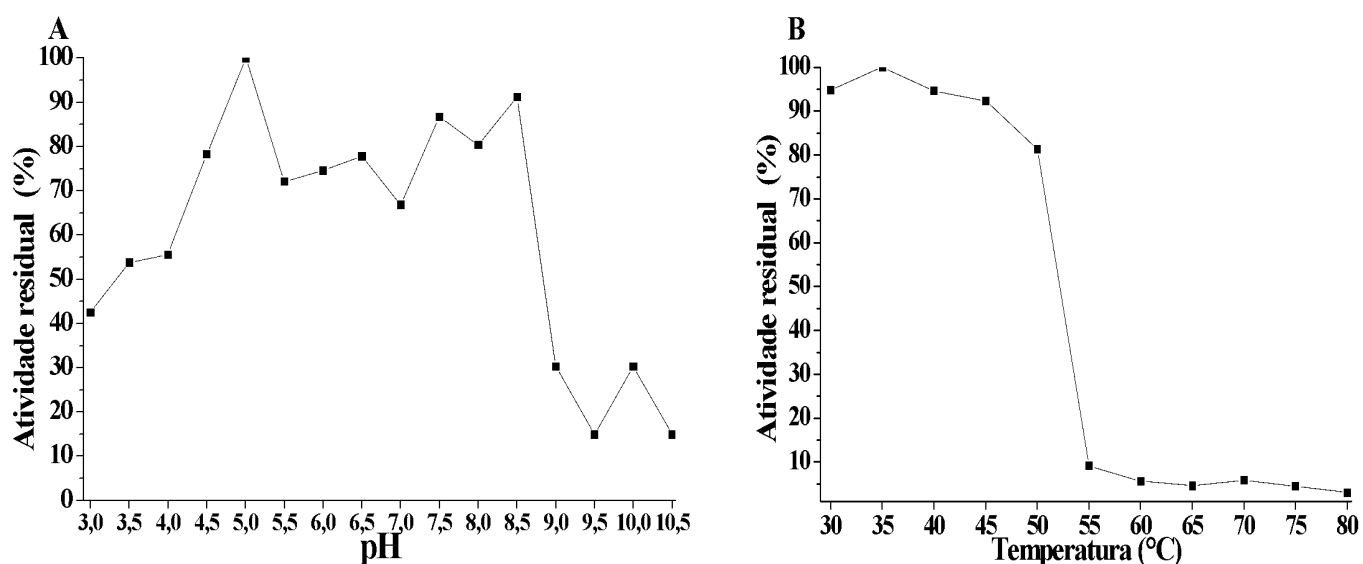
**Figura 4.** Efeito do pH (A) e temperatura (B) sobre a atividade da amilase produzida pelo *Rhizopus oryzae*.

A temperatura ótima obtida nesse estudo é superior a temperatura ótima relatada na literatura para amilases produzidas por microrganismos mesófilos, que geralmente estão na faixa de 40°C-65°C (Singh et al., 2016; Simair et al., 2017; Ghosh et al., 2020), o que permite a aplicação dessa enzima em processos industriais em torno de 70°C por curto período de tempo.

Enzimas que possuem atividade ótima em temperaturas elevadas são aplicadas em diversos segmentos da indústria, como na indústria têxtil, onde as amilases são usadas no processo de “*desinzing*” que se trata do redimensionamento da fibra textil, que ocorre entre 60 a 80°C. Ainda podem ser utilizadas em processos de fermentação para produção de bebidas alcoólicas, que ocorrem entre 60 a 70°C (Arora et al., 2020).

#### 4.2.2 Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da enzima

A enzima estudada apresentou estabilidade elevada em ampla faixa de pH, com atividade residual superior a 65% em pH de 4.5 a 8.5 após 24 h de incubação (Figura 5A), o que viabiliza a aplicação dessa enzima em processos que ocorrem em pHs ácidos e básicos como o processo da sacarificação e liquefação do amido (Apostolidi et al., 2020) e na produção de detergentes que ocorrem em pH básico e temperaturas de 40 a 60°C (Hmidet et al., 2019; Priyadarshini et al., 2020; Kherouf et al., 2021).



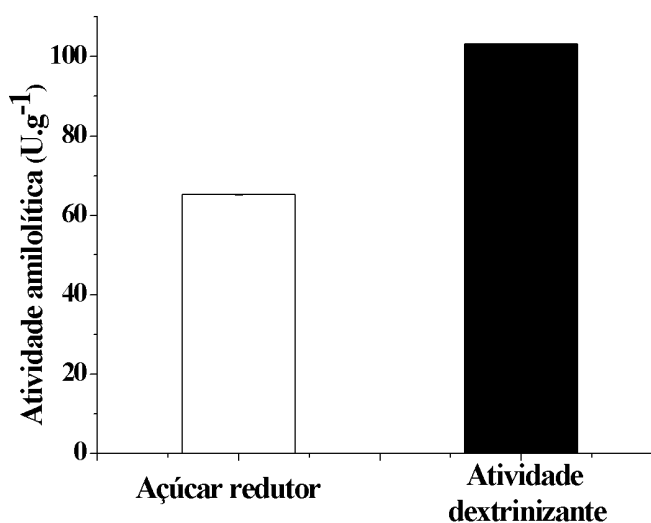
**Figura 5:** Caracterização bioquímica da amilase produzida por cultivo em estado sólido nos parâmetros otimizados de *Rhizopus oryzae*. (A) pH de estabilidade e (B) temperatura de estabilidade.

A amilase produzida por *R. oryzae* mostrou uma atividade catalítica residual superior a 80% da atividade inicial após 1 h de incubação a 50°C (**Figura 5B**). A termoestabilidade obtida no presente estudo é incomum para fungos mesófilos descritos na literatura. Cavalheiro et al. (2017) obteve aproximadamente 20% de atividade residual após 1 hora de incubação a 50°C ao estudar o fungo *Gongronella butleri*. Almeida et al. (2017), estudando o fungo *R. oryzae* isolado da Mata Atlântica brasileira obteve atividade residual inferior a 40% quando incubada por 20 minutos a 50°C.

A estabilidade à temperatura é um fator importante na seleção de amilases para processos industriais, especialmente aqueles que envolvem altas temperaturas, como a produção de xarope de glicose (Wang et al., 2019, Far et al., 2020). Quando uma enzima é instável a altas temperaturas pode ocorrer a perda de sua atividade catalítica (Sharma et al., 2019), levando a redução da eficiência do processo e aumentando os custos de produção. Portanto, a seleção de amilases estáveis a temperatura é essencial para garantir a eficiência e rentabilidade dos processos industriais que essas enzimas serão aplicadas.

#### 4.2.3. Potencial de dextrinização do extrato enzimático

Foi estudado o potencial sacarificante e dextrinizante do extrato enzimático produzido por *R. oryzae*, resultando em 62,5 U/g de açúcar redutor no método de DNS e 100 U/g no método dextrinizante (**Figura 6**). Nossos resultados indicam que a amilase produzida por *R. oryzae* possui predominantemente atividade dextrinizante, resultando em uma grande quantidade de extremidades reductoras de cadeia.



**Figura 6.** Modificações enzimáticas da molécula do amido pelos métodos DNS e iodométrico.

Os resultados indicam que o extrato enzimático estudado apresenta características de endoamilase, haja vista que a dextrina é obtida por clivagens no interior do polissacarídeo amido (Paul et al., 2021; Farooq et al., 2021).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fungo *R. oryzae* apresentou potencial promissor para produção de amilase utilizando subprodutos agroindustriais como substrato, com baixa umidade (55%), em um curto período de tempo (48 h de cultivo).

A amilase obtida apresentou atividade em temperaturas elevadas e estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura. O potencial sinérgico de liquefação e sacarificação do amido, que indica a atuação de diferentes tipos de enzimas na hidrólise do amido, foi outra característica promissora da amilase produzida por *R. oryzae*.

A eficiência nos ensaios de otimização da produção de amilase associado às características do extrato enzimático produzido por *R. oryzae* estimula a aplicação dessa enzima em processos industriais que exigem alta estabilidade estrutural.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MAGEED, Heidi M. et al. Biotechnology approach using watermelon rind for optimization of  $\alpha$ -amylase enzyme production from *Trichoderma virens* using response surface methodology under solid-state fermentation. **Folia microbiologica**, p. 1-12, 2021.
- ABDULAAL, Wesam H. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. **BMC biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 1-6, 2018.
- ADEMAKINWA, Adedeji N. et al. Optimization of aqueous two-phase partitioning of *Aureobasidium pullulans*  $\alpha$ -amylase via response surface methodology and investigation of its thermodynamic and kinetic properties. **International journal of biological macromolecules**, v. 140, p. 833-841, 2019.
- ALMANAA, Taghreed N. et al. Solid state fermentation of amylase production from *Bacillus subtilis* D19 using agro-residues. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 2, p. 1555-1561, 2020.
- ALMEIDA, Paula Zaghetto de et al. Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. **Biota Neotropica**, v. 17, 2017.
- ARORA, Naveen Kumar; MISHRA, Jitendra; MISHRA, Vaibhav (Ed.). **Microbial enzymes: roles and applications in industries**. Berlin Heidelberg: Springer, 2020.
- APOSTOLIDI, Myrto Elvira et al. Catalytic and thermodynamic properties of an acidic  $\alpha$ -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii* ATHUM 8891. **3 Biotech**, v. 10, n. 7, p. 311, 2020.
- BALAKRISHNAN, M. et al. Optimization and scale-up of  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes. **BMC biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2021.
- BENABDA, Olfa et al. Optimization of protease and amylase production by *Rhizopus oryzae* cultivated on bread waste using solid-state fermentation. **Journal of Chemistry**, v. 2019, p. 1-9, 2019.
- BERNARDES, A. V. et al. Utilization of agro-industrial by-products for the production of  $\alpha$ -amylase by *Rhizomucor miehei*. **Revista Brasileira de Tecnologia Ambiental**, v. 8, n. 2, p. 1439-1451, 2014.
- BERTOFT, Eric. Analyzing starch molecular structure. In: **Starch in food**. Woodhead Publishing, 2018. p. 97-149.
- BISWAS, Pallavi et al. Wheat bran as substrate for enzyme production and its application in the bio-deinking of mixed office waste (MOW) paper. **BioResources**, v. 14, n. 3, p. 5788-5806, 2019.
- CAVALHEIRO, Gabriéla Finoto et al. Catalytic properties of amylolytic enzymes produced by *Gongronella butleri* using agroindustrial residues on solid-state fermentation. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- CHO, Yong-Gu; KANG, Kwon-Kyoo. Functional analysis of starch metabolism in plants. **Plants**, v. 9, n. 9, p. 1152, 2020.
- FADEL, M. et al. Production of glucoamylase,  $\alpha$ -amylase and cellulase by *Aspergillus oryzae* F-923 cultivated on wheat bran under solid state fermentation. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, v. 23, p. 8-22, 2020.
- FAR, Babak Elyasi et al. Microbial alpha-amylase production: progress, challenges and perspectives. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 10, n. 3, p. 350, 2020.
- FAROOQ, Muhammad Adeel et al. Biosynthesis and industrial applications of  $\alpha$ -amylase: A review. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 1281-1292, 2021.
- FERREIRA, Osania Emerenciano et al. Production of  $\alpha$ -amylase by solid state fermentation by *Rhizopus oryzae*. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 7, p. 622-628, 2015.

- FUWA, Hidetsugu. A new method for microdetermination CF amylase activity by the use of amylose as the substrate. **The journal of Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 583-603, 1954.
- GARBIN, Andreza P. et al.  $\beta$ -glucosidase from thermophilic fungus *Thermoascus crustaceus*: production and industrial potential. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.
- GHANBARZADEH, Bahareh et al. Enzymatic deinking of office waste printed paper: Optimization via response surface methodology. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-9, 2021.
- GHOSH, Banita et al. Bio characterization of purified isoamylase from *Rhizopus oryzae*. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 453-459, 2020.
- GOMES, Eldon Carlos Queres et al. Fungi Present in Soils of Antarctica. Fungi of Antarctica: Diversity, **Ecology and Biotechnological Applications**, p. 43-67, 2019.
- HMIDET, Noomen; JEMIL, Nawel; NASRI, Moncef. Simultaneous production of alkaline amylase and biosurfactant by *Bacillus methylotrophicus* DCS1: application as detergent additive. **Biodegradation**, v. 30, p. 247-258, 2019.
- KHEROUF, Marwa et al. Statistical optimization of a novel extracellular alkaline and thermostable amylase production from thermophilic *Actinomadura keratinilytica* sp. Cpt29 and its potential application in detergent industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, p. 102068, 2021.
- KLICH, Maren A.; PITT, John Ingram. A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs. North Ryde. **New South Wales, Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization**, 1988.
- LENZI, Maurício; PAGGI, Gecele M. Reproductive biology of *Dyckia excelsa* Leme (Bromeliaceae): a xerophyte species from ironstone outcrops in central-western Brazil. **Plant Species Biology**, v. 35, n. 1, p. 97-108, 2020.
- LIMA, Michele Soares de et al. Checklist of the flora in ironstone outcrops at the Urucum Plateau, Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Biota Neotropica**, v. 19, 2019.
- MAIA, Jorge Lucas et al. Microalgae starch: A promising raw material for the bioethanol production. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 165, p. 2739-2749, 2020.
- MERHEB-DINI, Carolina et al. Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9210-9217, 2009.
- MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- OLIVEIRA, Ana Paula Aguero et al. Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation. **The Scientific World Journal**, v. 2016, 2016.
- PALUDO, Luana Cristina et al. Optimization, kinetic and bioprocess parameters of amylases production from *Coprinus comatus* under submerged culture using starch-based simple medium: Partial enzyme characterization. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 16, p. 529-537, 2018.
- PARK, Sung Hoon et al. Properties and applications of starch modifying enzymes for use in the baking industry. **Food science and biotechnology**, v. 27, p. 299-312, 2018.
- PAUL, Jai Shankar et al. Aspects and recent trends in microbial  $\alpha$ -amylase: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, p. 2649-2698, 2021.
- PEREIRA, Josiani et al. Production and characterization of  $\beta$ -glucosidase obtained by the solid-state cultivation of the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, p. 723-732, 2015.

- PONGSAWADI, Piamsook; YAGISAWA, Mitsuo. Screening and identification of a cyclomaltoextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, v. 65, n. 4, p. 463-467, 1987.
- PRAJAPATI, Vimal S.; TRIVEDI, Ujjval B.; PATEL, Kamlesh C. A statistical approach for the production of thermostable and alkophilic  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 under solid-state fermentation. **3 Biotech**, v. 5, p. 211-220, 2015.
- PREMALATHA, Arunachallam et al. Optimization of culture conditions for enhanced production of extracellular  $\alpha$ -amylase using solid-state and submerged fermentation from *Aspergillus tamarii* MTCC5152. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2022.
- PRIYADARSHINI, Sonali; PRADHAN, Sukanta Kumar; RAY, Pratima. Production, characterization and application of thermostable, alkaline  $\alpha$ -amylase (AA11) from *Bacillus cereus* strain SP-CH11 isolated from Chilika Lake. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 804-812, 2020.
- RUAS, Renata De Barros et al. Strong genetic structure in *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae), an endangered species found on ironstone outcrops in Pantanal, Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 192, n. 4, p. 691-705, 2020.
- SANGUINE, Isadora Stranieri et al. Xylanases of *Trichoderma koningii* and *Trichoderma pseudokoningii*: Production, characterization and application as additives in the digestibility of forage for cattle. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 44, p. 102482, 2022.
- SHARMA, Sunny et al. Thermostable enzymes for industrial biotechnology. In: **Advances in enzyme technology**. Elsevier, 2019. p. 469-495.
- SILVA, Francisco de Assis Santos; DE AZEVEDO, Carlos Alberto Vieira. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.
- SIMAIR, Altaf Ahmed et al. Production and partial characterization of  $\alpha$ -amylase enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and potential applications. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.
- SINGH, Ravindra Nath et al. Production, purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from soil isolate *Bacillus* sp. strain B-10. **Journal of BioScience & Biotechnology**, v. 5, n. 1, 2016.
- SRIVASTAVA, Neha et al. Solid-state fermentation strategy for microbial metabolites production: An overview. **New and future developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 345-354, 2019.
- SOUZA, Mariana Tainná Silva et al. Prospection of Filamentous Fungi and the Production of Amylase by *Aspergillus* sp. M1. 7.2. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 6, n. 3, p. 0365-0376, 2020.
- SUWANNARACH, Nakarin et al. Optimization and characterization of red pigment production from an endophytic fungus, *Nigrospora aurantiaca* CMU-ZY2045, and its potential source of natural dye for use in textile dyeing. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, p. 6973-6987, 2019.
- TAKAHASI, Adriana; MEIRELLES, Sergio Tadeu. Ecologia da vegetação herbácea de bancadas lateríticas (cangas) em Corumbá, MS, Brasil. **Hoehnea**, v. 41, p. 515-528, 2014.
- WANG, Yu-chuan et al. High-level expression of a novel  $\alpha$ -amylase from *Thermomyces dupontii* in *Pichia pastoris* and its application in maltose syrup production. **International journal of biological macromolecules**, v. 127, p. 683-692, 2019.

### ANEXO I – Tabela de caracterização morfológica

**Tabela 4.** Caracterização morfológica dos fungos isolados a partir do solo de bancadas lateríticas, município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. Colônias analisadas após 72 h crescimento em meio BDA.

Isolado	Topografia	Cor do centro	Cor da borda diferenciada	Aspecto	Textura	Borda	Origem
1	Rugosa	Branco	Branco	Seco	Aveludada	Regular	Vale do Paraíso
2	Rugosa	Marrom e creme	Branco	Seco	Aveludada	Regular	Monjolo
3	Lisa	Branco com anéis cinza	Branco com anéis cinza	Seco	Aveludada	Regular	Monjolo
4	Verrucosa	Preto	Branco	Seco	Aveludada	Regular	Piraputangas I
5	Rugosa	Verde	Branco	Seco	Aveludada	Regular	Piraputangas I
6	Umbilicada	Verde	Vermelho e branco	Seco	Aveludada	Regular	Vale do Paraíso
7	Rugosa	Laranja	Laranja	Seco	Aveludada	Regular	Piraputangas I
8	Rugosa	Branco com marrom	Branco com marrom	Seco	Aveludada	Regular	Piraputangas II
9	Lisa	Laranja	Laranja	Seco	Granular	Irregular	Piraputangas II
10	Rugosa	Marrom e creme	Branco	Seco	Aveludada	Regular	Monjolo
11	Lisa	Amarelo	Verde com branco	Seco	Granular	Irregular	Piraputangas I
12	Rugosa	Creme com preto	Creme com preto	Seco	Aveludada	Regular	Vale do Paraíso
13	Rugosa	Verde com branco	Verde com branco	Seco	Granular	Irregular	Piraputangas II
14	Rugosa	Creme com preto	Branco	Seco	Aveludada	Regular	Monjolo
15	Rugosa	Branco com marrom claro	Branco com marrom claro	Seco	Aveludada	Regular	Monjolo
16	Rugosa	Creme	Creme	Seco	Aveludada	Regular	Piraputangas I
17	Lisa	Branco com anéis cinza	Branco com anéis cinza	Seco	Aveludada	Regular	Vale do Paraíso
18	Rugosa	Verde com branco	Verde com branco	Seco	Granular	Irregular	Piraputangas II

19	Umbilicada	Laranja	Verde com branco	Úmido	Aveludada	Regular	Monjolo
20	Lisa	Amarelo	Verde com branca	Seco	Granular	Irregular	Piraputangas II
21	Lisa	Preto	Preto	Seco	Algodonosa	Irregular	Vale do Paraíso
22	Lisa	Preto	Preto	Seco	Algodonosa	Irregular	Piraputangas II
23	Umbilicada	Marrom esverdeado	Marrom esverdeado	Seco	Granular	Irregular	Piraputangas II
24	Lisa	Verde com amarelo	Verde com amarelo	Seco	Granular	Irregular	Vale do Paraíso
25	Umbilicada	Verde com amarelo	Borda branca	Seco	Aveludada	Regular	Piraputangas I
26	Rugosa	Preto em 3 camadas	Marrom com creme	Seco	Aveludada	Regular	Vale do Paraíso
27	Rugosa	Verde	Bordas brancas	Seco	Aveludada	Regular	Piraputangas II
28	Rugosa	Creme com marrom	Creme com marrom	Seco	Aveludada	Regular	Monjolo
29	Rugosa	Creme com amarelo	Creme com amarelo	Seco	Algodonosa	Irregular	Piraputangas II
30	Rugosa	Amarelo e verde escuro	Verde claro	Seco	Aveludada	Regular	Vale do Paraíso
31	Rugosa	Cinza	Branco	Seco	Aveludada	Irregular	Vale do Paraíso
32	Rugosa	Branco	Verde.	Seco	Aveludada	Irregular	Vale do Paraíso
33	Lisa	Marrom	Branca	Seco	Aveludada	Irregular	Piraputangas I
34	Lisa	Branca	Branca	Seco	Aveludada	Irregular	Piraputangas I