

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Caracterização bioquímica de amilases produzidas por *Gongronella butleri*,
Thermoascus aurantiacus e *Lichtheimia ramosa* por cultivo em estado sólido**

**CAROLINE TOLDATO SOUZA &
GABRIEL DO NASCIMENTO LOPES PINHEIRO**

**Dourados
Mato Grosso do Sul
2022**

**Caracterização bioquímica de amilases produzidas por *Gongronella butleri*,
Thermoascus aurantiacus e *Lichtheimia ramosa* por cultivo em estado sólido**

**CAROLINE TOLDATO SOUZA &
GABRIEL DO NASCIMENTO LOPES PINHEIRO**

Orientador: Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade
Federal da Grande Dourados,
como parte das exigências do
Curso de Bacharelado em
Biotecnologia.

**Dourados
Mato Grosso do Sul
2022**

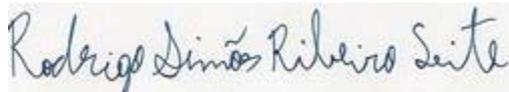
**CAROLINE TOLDATO SOUZA &
GABRIEL DO NASCIMENTO LOPES PINHEIRO**

**Caracterização bioquímica de amilases produzidas por *Gongronella butleri*,
Thermoascus aurantiacus e *Lichtheimia ramosa* por cultivo em estado sólido**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade
Federal da Grande Dourados,
como parte das exigências do
Curso de Bacharelado em
Biotecnologia

APROVADO EM: 14 de junho de 2022

Banca Examinadora



Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite



Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz



Prof. Dr. Alessandro Minillo

AGRADECIMENTOS

Aos pais por todo apoio e pela ajuda, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao professor Rodrigo Simões Ribeiro Leite por ter sido meu orientador e ter desempenhado tal função com dedicação e por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiaram o nosso aprendizado.

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

“Não importa o quão poderoso você se torne, nunca tente fazer tudo sozinho. Caso contrário irá falhar.”

(Uchiha Itachi)

RESUMO

Os biocatalisadores utilizados em processos biotecnológicos são influenciados por diversos fatores, dentre eles: temperatura, pH, tempo de reação, concentração de substrato e produto. O objetivo deste trabalho foi a caracterização bioquímica de amilases produzidas pelos dos fungos filamentosos *Gongronella butleri* (mesofílico), *Thermoascus aurantiacus* (termofílico) e *Lichtheimia ramosa* (mesofílico). A amilase produzida pelo fungo filamentoso *Gongronella butleri* apresentou atividade ótima em pH 5,0 a temperatura de 55°C, em relação a estabilidade ao pH, a enzima reteve mais de 78% de sua atividade original após ser incubada por 24 horas em ampla faixa de pH 3,0 a 10,5, em relação a sua termoestabilidade, ela reteve 80% de sua atividade catalítica após 1h a 40°C. As amilases produzidas pelos fungos filamentosos *Lichtheimia ramosa* e *Thermoascus aurantiacus* apresentaram atividade ótima em pH 6,0 a temperaturas de 60°C. A amilase produzida por *L. ramosa* foi estável na faixa de pH 3,5 a 10,5 e manteve sua atividade catalítica após 1 hora a 55°C, quando incubado pelo mesmo período a 60°C foi recuperado 75% de sua atividade original. A enzima produzida pelo *T. aurantiacus* foi estável na faixa de pH 4,5 a 9,5 e permaneceu estável após 1 hora a 50°C, quando a temperatura foi aumentada para 60° C, a enzima apresentou apenas 25% de sua atividade inicial. A amilase produzida por *G. butleri* apresentou potencial para hidrolisar amidos provenientes de fontes botânicas distintas (milho, batata, mandioca e trigo), enquanto as enzimas produzidas por *T. aurantiacus* e *L. ramosa* apresentaram maior potencial catalítico para o amido proveniente do milho. Os resultados descritos estimulam a continuidade do trabalho, visando adaptar as características distintas apresentadas pelas enzimas para aplicação em diferentes processos industriais.

Palavras-chave: Amilase, Cultivo em estado sólido, Processos Biotecnológicos, Termoestabilidade.

ABSTRACT

The biocatalysts used in biotechnological processes are influenced by several factors, including: temperature, pH, reaction time, substrate and product concentration. The objective of this work was the characterization of the biochemistry of objective amylases by the filamentous fungicidal *Gongronella butleri* (mesophilic), *Thermoascus aurantiacus* (thermophilic) and *Lichtheimia ramosa* (mesophilic). The band amylase produced by the filamentous fungus *Gongronella butleri* shows activity at pH 5.0 at a temperature of 55° C, in relation to pH stability, an enzyme retained more than 78% of its original activity after being incubated for 24 hours at pH 3.0 at 10.5, in relation to its thermostability, it retained 80% of its catalytic activity after 1h at 40° C. As amylase by the filamentous agents *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* showed optimal activity at pH 6.0 at temperatures of 60°C. The amylase produced by *L. ramosa* was stable in the range of pH 3.5 to 10.5 and maintained its catalytic activity after 1 hour at 55° C, when incubated for the same period at 60° C, 75% of its original activity was recovered. The initial enzyme produced by *T. aurantiacus* was stable in the range of pH 4.5 and stable at a temperature of 9.5 and stable for 1 hour at a temperature of 50° C, when an enzyme was increased to 60° C, an enzyme presented only 25% of its activity. The amylase directed by *G. butleri* presented potential starches from distinct botanical sources (potato, mandioliisa, branches and wheat) as potential sources of treatment for *T. aurantiacus* and *L. ramosa*. The proposed results for further work, developed as different characteristics of different processes for the application of different processes.

Keywords: Amylase, Solid state culture, Biotechnological Processes, Thermostability.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	9
2 METODOLOGIA	12
2.1 Microrganismos	12
2.2 Inóculo	13
2.3 Produção de amilases por fermentação em estado sólido	13
2.4 Extração das enzimas	13
2.5 Determinação da atividade de amilase.	13
2.6 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática	14
2.7 Avaliação do potencial catalítico para diferentes fontes de amido	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1 Caracterização bioquímica	14
3.1.1 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática	14
3.1.2 pH e temperatura de estabilidade	17
3.1.3 Hidrólise enzimática de amidos derivados de fontes vegetais distintas	19
4 CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas que aceleram a velocidade de uma reação. Os processos catalisados por enzimas são geralmente mais rápidos, eficientes e ambientalmente sustentáveis. As enzimas podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbiana (MONTEIRO et al., 2009).

Cada enzima catalisa um determinado tipo de reação, sendo todas direcionadas para um composto denominado de substrato. A especificidade entre enzima-substrato está relacionada com a forma tridimensional que ambos têm (CAVALHEIRO et al., 2017).

Existem fatores que influenciam a atividade enzimática, dentre eles: temperatura, pH, tempo de reação, concentração de substrato e produto. O ajuste adequado desses parâmetros aumenta consideravelmente a velocidade da reação catalisada (OLIVEIRA et al., 2016).

Embora esses biocatalisadores possam ser obtidos de diferentes fontes biológicas, as enzimas aplicadas em processos industriais, de forma geral, são obtidas a partir de cultivos microbiológicos. As enzimas microbianas são produzidas em menor tempo, apresentam alto rendimento e facilidade de manipulação, e principalmente, são estruturalmente mais estáveis (NAGARAJAN, 2012; LIU e KOKARE, 2017).

As vantagens no emprego de enzimas comparadas aos catalisadores químicos também podem ser destacadas. As enzimas possuem elevada especificidade, não geram subprodutos indesejáveis, são facilmente inativadas quando desejado e não apresentam toxicidade (MONTEIRO et al., 2009).

Dentre as enzimas aplicadas em processos industriais, as enzimas amilolíticas ocupam cerca de 30% do mercado mundial (OLIVEIRA et al., 2016). As amilases promovem a hidrólise do amido a açúcares redutores, sendo detectadas há mais de um século em grande variedade de materiais biológicos. De acordo com Harger (1982), essas enzimas foram detectadas em extratos de trigo (1811), na saliva (1831), no malte (1833) e em cultivos realizados com o fungo *Aspergillus oryzae* (1881).

O amido é uma parte importante da dieta humana e um dos principais produtos de armazenamento de energia vegetal, sendo abundante no trigo, arroz, milho, mandioca e batata. As enzimas que catalisam a hidrólise do amido são usadas na produção da maltodextrina, xaropes de glicose e maltose, podendo ser usadas em vários processos industriais, como na produção de biocombustíveis, medicamentos, detergentes, cervejas, pães e ração animal (CAVALHEIRO et al., 2017).

A hidrólise enzimática do amido depende da ação conjunta de diferentes enzimas. De acordo com o modo de atuação, as amilases podem ser classificadas em quatro grupos distintos: endoamilases, exoamilases, desramificantes e transferases (NOROUZIAN et al., 2006; PANDEY et al., 2006).

Segundo as referências citadas os mecanismos de ação enzimática são:

As α -amilases (E.C. 3.2.1.1) são enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4 presentes no interior da molécula de amido (endoamilases), liberando como produto final oligossacarídeos lineares de diferentes tamanhos e α -dextrinas limites (oligossacarídeos ramificados).

As exoamilases agem sobre as extremidades da molécula de amido produzindo glicose, maltose e β -dextrinas limites, dentre elas: β -amilases, glucoamilases e α -glicosidases. As β -amilases (EC 3.2.1.2) hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas α -1,4 a partir de extremidades não redutoras da molécula, liberando maltose e β -dextrinas limites. Além da hidrólise, esta enzima também causa inversão da configuração anomérica de α para β da maltose liberada.

As glucoamilases (EC 3.2.1.3) removem resíduos de glicose da extremidade não-redutora da molécula do amido por hidrólise das ligações α -1,4. Essa enzima, também converte a configuração do carbono anomérico da glicose de α para β , sendo também capaz de hidrolisar as ligações α -1,6 das ramificações da amilopectina, embora com menor eficiência. As α -glicosidases (EC 3.2.1.20) catalisam preferencialmente a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4. Diferem-se das glucoamilases no seu substrato de preferência, agindo melhor sobre sacarídeos curtos, liberando glicose com configuração α .

As isoamilases (EC 3.2.1.68) são enzimas desramificantes que hidrolisam exclusivamente as ligações α -1,6 da amilopectina, deixando apenas polissacarídeos lineares de cadeia longa. Porém, não hidrolisam a ligação α -1,6 do pululano, sendo essa a maior diferença entre isoamilases e pululanases.

As transferases hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 da molécula de amido e transferem para um aceptor glicosídico fazendo uma nova ligação. É o caso da ciclodextrina glicosiltransferase - CGTase (EC 2.4.1.19) essa enzima produz oligossacarídeos cíclicos com 6, 7 ou 8 resíduos de glicose e dextrinas ramificadas de alto peso molecular. As ciclodextrinas são produzidas através de uma reação intramolecular de transglicosilação, na qual a enzima quebra a ligação α -1,4 e ao mesmo tempo liga a extremidade redutora a não redutora. As ciclodextrinas podem ser utilizadas para encapsulação de moléculas bioativas (fármacos, cosméticos, aromas, etc.).

O emprego de biocatalisadores em processos industriais é muito difundido, estima-se que cerca de 25 a 33% dos produtos comercializados mundialmente apresentam tecnologia enzimática na sua confecção (DE CONTI et al., 2001). No entanto, o custo de produção desses biocatalisadores ainda é consideravelmente elevado. Dessa forma, existe uma constante busca por processos de cultivos microbiológicos de baixo custo, visando contribuir para reduzir esse problema (MONTEIRO et al., 2009).

Nesse sentido, diversos trabalhos descrevem o cultivo em estado sólido de fungos filamentosos em resíduos agroindustriais, como alternativa para a produção de enzimas em meios de baixo custo (GARBIN et al., 2021; CAVALHEIRO et al. 2017; COSTA et al., 2019).

O cultivo em estado sólido (CES) pode ser definido como o cultivo de microrganismo sobre uma matriz sólida e insolúvel, na ausência de água livre entre as partículas de substrato. Desta forma, CES distingue-se do cultivo submerso (CSm), onde nutrientes e microrganismos são encontrados dissolvidos ou suspensos em grandes quantidades de água. O CES necessita ser aprimorado em muitos aspectos, como de engenharia e automação de processo, cinética de crescimento e transferência de massa e energia (RUTSATZ et al., 2009).

De um modo geral, os fungos filamentosos são considerados os microrganismos mais adaptados ao cultivo em estado sólido, porque as hifas podem crescer na superfície das partículas sólidas, simulando seus habitats naturais. (CAVALHEIRO et al., 2017).

O cultivo estado sólido tem sido empregado em diferentes trabalhos, principalmente para produção de enzimas envolvidas na degradação de polímeros

vegetais complexos, comumente presentes em resíduos agroindustriais (WIŚNIEWSKI, 2010; GARBIN et al., 2021; CAVALHEIRO et al. 2017; COSTA et al., 2019).

De acordo com Pandey (2003), o cultivo em estado sólido apresenta algumas vantagens e desvantagens em relação ao cultivo submerso, sendo algumas de suas vantagens a possibilidade da utilização de substratos agrícolas não refinados podendo conter os nutrientes necessários para o desenvolvimento do microrganismo e a existência de tratamento de efluentes é considerada simples, por geralmente todo material residual pode ser utilizado como na suplementação de animais.

Em contrapartida, Pandey (2003) também cita certas desvantagens, como o cultivo em estado sólido ser uma técnica restrita a microrganismos que têm a possibilidade de crescimento com níveis de umidade reduzidos, a diversidade de produtos que podem ser obtidos é reduzida e devido a heterogeneidade do processo, o controle e manutenção dos parâmetros cultivo são reduzidos.

A escolha do processo de cultivo pode interferir nas características do produto gerado, além disso, outros fatores também influenciam no rendimento do bioprocessamento, como: temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio, atividade da água, entre outros. Dessa forma, não é possível afirmar que o cultivo em estado sólido se oponha ou substitua o cultivo submerso, pois cada uma dessas técnicas possui suas especificidades e particularidades (PANDEY, 2003).

Considerando as informações anteriormente expostas, o presente trabalho teve como objetivo comparar as propriedades catalíticas de enzimas amilolíticas provenientes de cultivos em estado sólido dos fungos *Gongronella butleri*, *Lichtheimia ramosa* e *Thermoascus aurantiacus*, utilizando resíduos agroindustriais como substratos de baixo custo.

2 METODOLOGIA

2.1 Microrganismos: Os fungos filamentosos *Lichtheimia ramosa* (mesófilo), *Thermoascus aurantiacus* (termofílico) e *Gongronella butleri* (mesófilo) foram utilizados para produção de amilase. *Lichtheimia ramosa* foi isolado de bagaço de cana de açúcar proveniente da usina de açúcar e álcool. *Thermoascus aurantiacus* foi isolado de biomassa vegetal em decomposição, coletada em resquício da Mata Atlântica (Mata do Azulão). *Gongronella butleri* foi isolado de amostras de solo

coletadas do Cerrado, todos localizados no município de Dourados – MS. Os microrganismos foram mantidos no ágar Sabouraud Dextrose a 4°C no Laboratório de Enzimologia e Processos Fermentativos – LEPFER, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – FCBA, Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD.

2.2 Inóculo: Os microrganismos foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250ml contendo 40 ml de ágar Sabouraud dextrose e incubados por 48h, *T. aurantiacus* a 45°C, *G. butleri* e *L. ramosa* a 28°C. As suspensões microbianas foram obtidas pela adição de 30 mL de solução nutriente (0.1% sulfato de amônio, 0.1% sulfato de magnésio heptahidratado e 0.1% nitrato de amônio), seguida de suave raspagem da superfície do meio de cultura. O inóculo nos resíduos agroindustriais foi realizado pela transferência de 5ml de suspensão microbiana.

2.3 Produção de amilases por cultivo em estado sólido: Os fungos foram cultivados em frascos de Erlenmeyer de 250mL, contendo 5g de farelo de trigo, contendo 65% de umidade inicial (solução nutriente descrita anteriormente), mantidos por 96h a 30°C, para *G. butleri* e *L. ramosa*, e 45°C para *T. aurantiacus*. O farelo de trigo, utilizado como substrato, foi lavado com água destilada e seco em estufa a 50°C por 48h. Todos os materiais utilizados foram devidamente autoclavados por 20min a 120°C.

2.4 Extração das enzimas: As enzimas foram extraídas pela adição de 50mL de água destilada nos substratos miceliados, seguido de agitação constante a 100 rpm por 1 h. As amostras foram filtradas em tecido de nylon e centrifugadas a 1.500 xg por 5min a 5°C. O sobrenadante foi considerado extrato enzimático e usado nos ensaios subsequentes.

2.5 Determinação da atividade de amilase: A atividade enzimática foi determinada pela adição de 0.1mL do extrato enzimático em 0.9mL de tampão de acetato de sódio (0,1M, pH 5,0), contendo 1% de amido de milho. Após a incubação por 10 min a 50°C, os açúcares redutores liberados foram quantificados em espectrofotômetro a 540 nm pelo método DNS (3,5-ácido dinitrosalicílico, MILLER, 1959). Uma unidade de

atividade enzimática foi definida como quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de produto por minuto de reação.

2.6 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática: O pH ótimo foi determinado mensurando as atividades das enzimas a 50°C em diferentes valores de pH (3,0-8,0), utilizando tampão McIlvaine buffer. A temperatura ótima foi determinada pela dosagem das atividades enzimáticas em diferentes condições de temperatura (30-75°C), nos respectivos valores de pH ótimo de cada enzima. A estabilidade das enzimas ao pH foi avaliada incubando-as por 24 horas a 25°C em diferentes valores de pH; os tampões utilizados foram McIlvaine buffer (pH 3,0-8,0), Tris-HCl 0,1M (pH 8,0-8,5) e Glicina-NaOH 0,1M (pH 8,5-10,5). A termoestabilidade foi estudada incubando as enzimas por 1h em diferentes condições de temperatura (30-75°C). As atividades residuais foram determinadas nas condições ótimas de pH e temperatura da enzima.

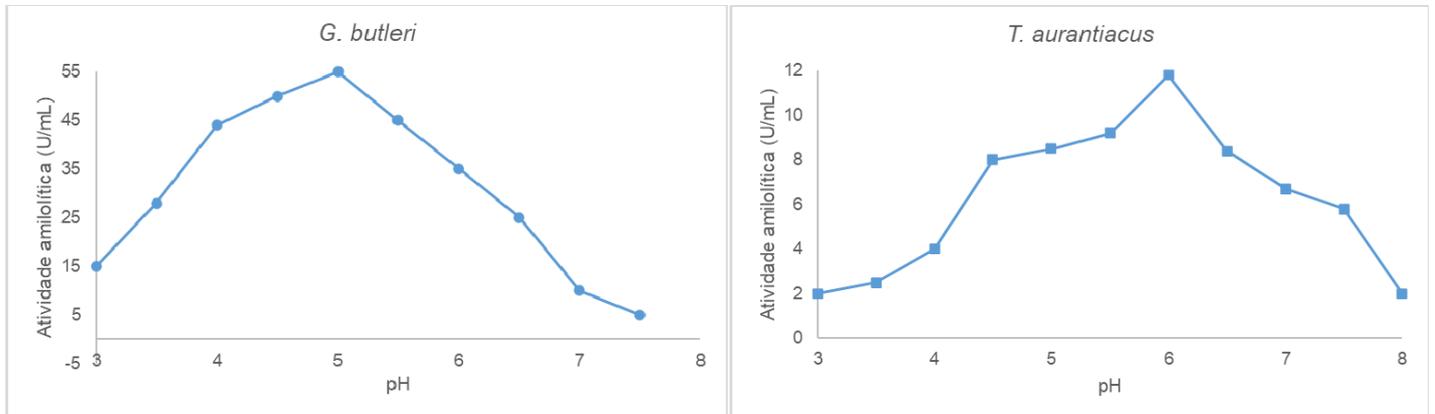
2.7 Avaliação do potencial catalítico para diferentes fontes de amido: Os extratos enzimáticos foram avaliados quanto ao potencial de hidrolisar amidos provenientes de diversas fontes vegetais. Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando como substrato, 0,1% de amido de batata, trigo, mandioca e milho. As reações ocorreram em tampão acetato de sódio (0,1M, pH 5,0). O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de DNS (MILLER, 1959).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização bioquímica

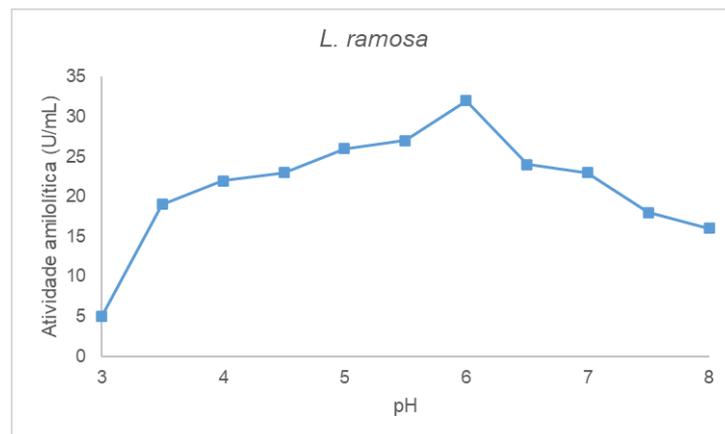
3.1.1 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática

A amilase produzida por *G. butleri* apresentou atividade ótima em pH 5,0. (Figura 1 a). Porém, a alta atividade enzimática foi observada no intervalo de pH de 4,0–5,5. Já as amilases produzidas por ambos os fungos *T. aurantiacus* e *L. ramosa* apresentaram atividade ótima em pH 6,0 (Figura 1b e 1c).



(a)

(b)



(c)

FIGURA 1: Efeito do pH ótimo sobre as amilases produzidas pelos fungos *G. butleri*. (a), *T. aurantiacus* (b) e *L. ramosa* (c).

As amilases fúngicas descritas na literatura apresentam atividade ótima em diferentes valores de pH, normalmente entre 4,5 e 7,0 (GIANESSI et al., 2006), valores próximos aos observados no presente trabalho.

Sinha e Vakilwala (2016) obtiveram o melhor resultado de atividade enzimática para α -amilases produzidas por *Aspergillus spp.* em pH 6,0 e Singh et al. (2021) reportaram que as amilases produzidas por *Aspergillus fumigatus* NTCC 1222 apresentaram melhor atividade enzimática em pH 6,0. Resultados estes que não diferem dos encontrados no presente estudo.

O efeito do pH na atividade enzimática é um fenômeno amplamente descrito (BARROCA et al., 2017; BARRON et al., 2017; CAO et al., 2016; ROSSETO et al., 2016). Assim, a obtenção do pH ótimo de atividade mostra-se como um dado relevante para aplicações tecnológicas.

A temperatura ótima das enzimas produzidas pelos fungos *T. aurantiacus* e *L. ramosa* foi 60°C (Figuras 2b e 2c). A amilase produzida por *G. butleri* apresentou temperatura ótima em 55°C (Figura 2a).

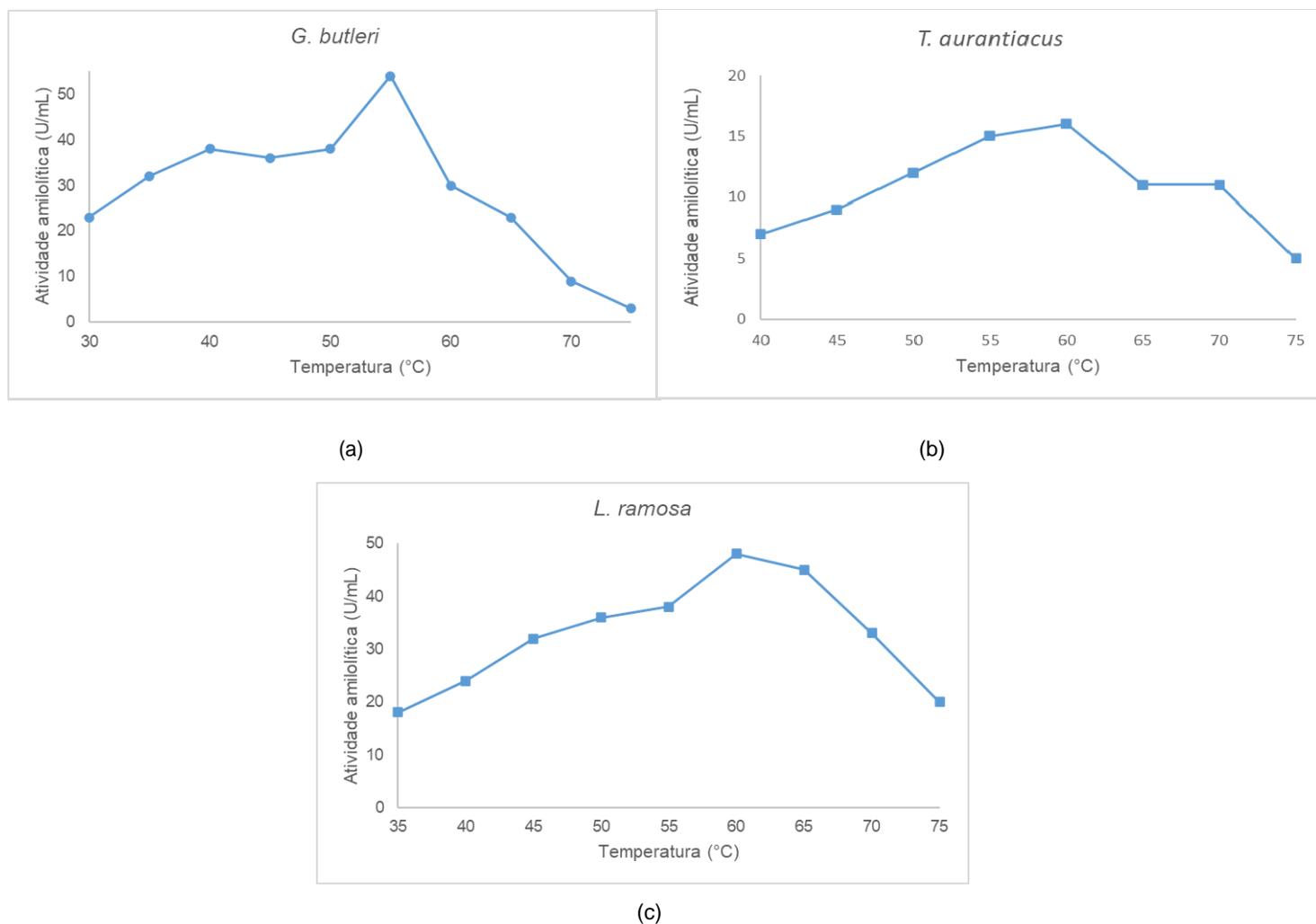


FIGURA 2: Temperatura ótima das amilases produzidas pelos fungos *G. butleri*. (a), *T. aurantiacus* (b) e *L. ramosa* (c) em relação à temperatura.

As temperaturas ótimas obtidas para a espécie estudada foram elevadas quando comparadas com amilases produzidas por outras espécies de fungos. Soni et al. (2003) relataram maior atividade catalítica da glucoamilase de *Aspergillus sp.* a

50°C. Em outro estudo, a temperatura ótima da amilase produzida pelo *Fusarium solani* foi de 40°C (KUMAR et al., 2012).

3.1.2 pH e temperatura de estabilidade

Em relação a estabilidade ao pH, a enzima produzida pelo fungo *G. butleri* reteve mais de 78% de sua atividade original após ser incubada por 24 horas em ampla faixa de pH (3,0 a 10,5) (Figura 3a). As enzimas de *L. ramosa* e *T. aurantiacus* também se mostraram estáveis em ampla faixa de pH. A amilase produzida por *L. ramosa* manteve sua atividade em pH 3,5 a 10,5 e a enzima produzida pelo *T. aurantiacus* foi estável em pH 4,5 à 9,5 (Figuras 3b e 3c).

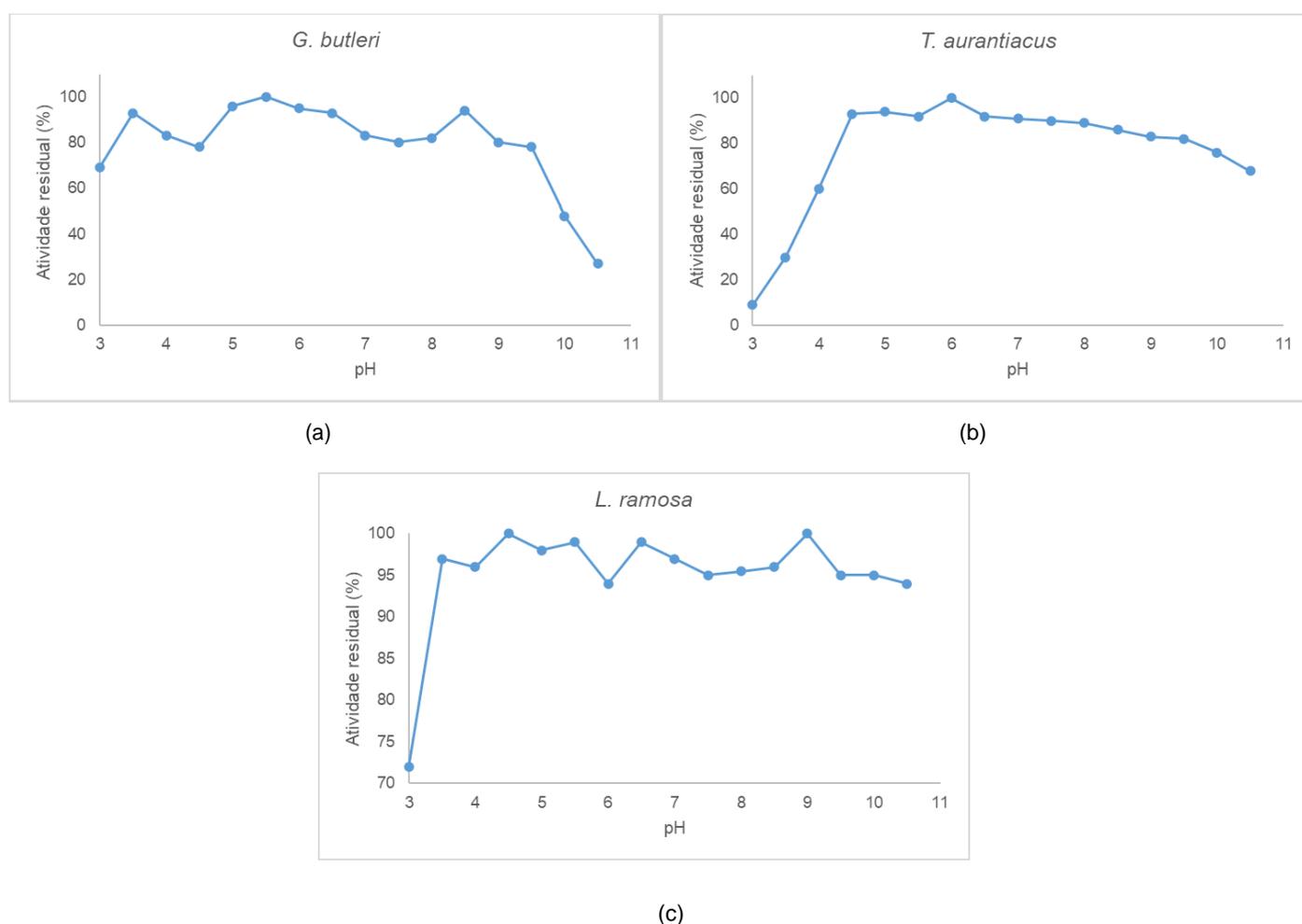


FIGURA 3: Estabilidade ao pH das amilases produzidas pelos fungos *G. butleri*. (a), *T. aurantiacus* (b) e *L. ramosa* (c).

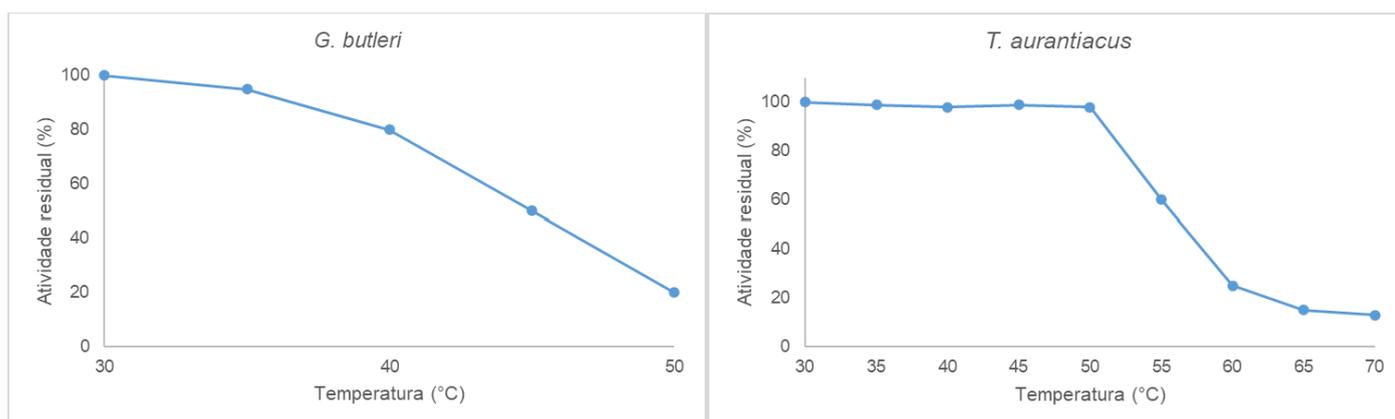
Nwagu e Okolo (2011) relataram que a amilase produzida por *Aspergillus fumigatus* manteve 94% de sua atividade em pH 4,5 a 6,5. A amilase produzida por

Syncephalastrum racemosum permaneceu estável entre pH 4,0 a 8,0 (FREITAS et al., 2014), mostrando então que estabilidade ao pH das amilases obtidas no presente trabalho é mais alta.

A manutenção da atividade enzimática em uma ampla faixa de pH é uma vantagem para aplicação em processos industriais, porque requer menores ajustes de pH entre os tratamentos sequenciais de liquefação e sacarificação de amido (MICHELIN et al., 2008).

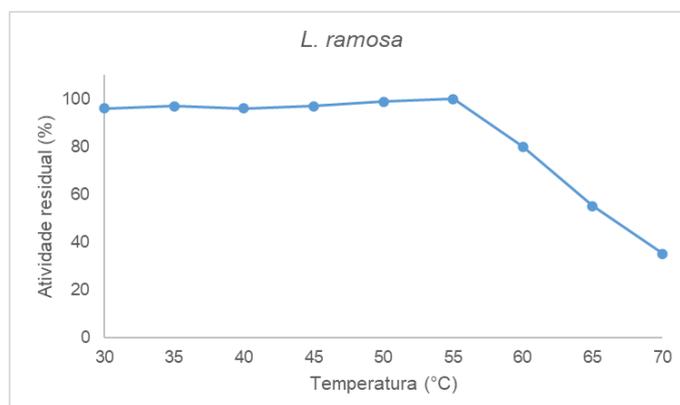
Com relação a temperatura de estabilidade, a amilase produzida por *G. butleri* reteve 80% de sua atividade catalítica após 1 h à 40°C. Quando incubada pelo o mesmo período a 45°C, a enzima perdeu cerca de 50% da atividade.

A amilase produzida por *L. ramosa* manteve sua atividade catalítica após 1 hora a 55°C e 75% de sua atividade original quando incubada pelo mesmo período a 60°C. A amilase produzida pelo fungo *T. aurantiacus* permaneceu estável após 1 hora a 50°C, quando a temperatura foi aumentada para 60°C, a enzima apresentou apenas 25% de sua atividade inicial (Figuras 4b e 4c).



(a)

(b)



(c)

FIGURA 4: Estabilidade à temperatura de amilases produzidas pelos fungos *G. butleri* (a), *T. aurantiacus* (b) e *L. ramosa* (c).

A característica descrita anteriormente é muito importante para aplicação industrial, visto que a maioria dos processos requer enzimas termotolerantes (GOMES et al., 2007).

No estudo de Varalakshmi et al. (2013), α -amilase produzida por *Aspergillus oryzae* reteve apenas 70% de sua atividade original após 1 h a 28°C, mostrando assim que as enzimas produzidas no presente trabalho são mais termoestáveis.

Em geral, as enzimas secretadas no meio extracelular têm maior estabilidade estrutural em relação às enzimas intracelulares, principalmente quando produzidas por cultivo em estado sólido (PANDEY, 2009). A maioria das enzimas extracelulares têm carboidratos ligados à sua estrutura, o que confere à elas maior estabilidade estrutural (OKUYAMA et al., 2005).

Embora a estabilidade da proteína esteja muito relacionada à glicosilação, não se pode apenas atribuir a esse fator, há diversos outros fatores que influenciam na estabilidade proteica, como: diferentes tipos de ligações, sendo elas covalentes ou não, contribuem para manter a estrutura terciária de uma proteína. Existem interações hidrofóbicas, eletrostáticas, iônicas, pontes de hidrogênio e dissulfeto. Ou seja, por menor que seja a variação da composição estrutural da proteína, pode resultar em maior ou menor estabilidade a agentes físicos e químicos. (OLIVEIRA et al., 2016).

3.1.3 Hidrólise enzimática de amidos derivados de fontes vegetais distintas

Os extratos enzimáticos produzidos por *T. aurantiacus* e *L. ramosa* mostraram maior potencial catalítico no amido de milho, obtendo 34,94 U/mL e 12,26 U/mL, respectivamente (Tabela 1). Diferenças na ação das enzimas amilolíticas podem estar relacionadas à composição das moléculas de amido, em particular, o conteúdo de ramificações e a extensão de suas cadeias (HUBER et al, 2000).

O extrato enzimático produzido pelo fungo *G. butleri* apresentou a capacidade de degradar de forma similar, os diferentes tipos de amidos avaliados no presente trabalho (Tabela 1). Essa característica é raramente vista, pois amidos de diferentes

espécies botânicas têm características estruturais distintas, podendo então influenciar a catálise enzimática (TESTER et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005).

Considerando este fato, é possível inferir que o extrato enzimático produzido pelo fungo *G. butleri*, provavelmente apresenta enzimas amilolíticas com capacidade catalítica distinta. Trabalhos anteriores relatam a produção de diferentes tipos de amilases por fungos filamentosos cultivados em meios complexos (SILVA et al., 2013).

TABELA 1: Atividade catalítica em amidos provenientes de fontes vegetais distintas.

	Milho (U/mL)	Batata (U/mL)	Mandioca (U/mL)	Trigo (U/mL)
<i>G. butleri</i>	4,9	4,75	4,8	5,5
<i>T. aurantiacus</i>	13	4	3	4,8
<i>L. ramosa</i>	35	-	6	11

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a amilase produzida pelo fungo *Lichtheimia ramosa* apresenta maior estabilidade estrutural, em comparação com as enzimas produzidas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* e *Gongronella butleri*. O potencial catalítico apresentado pelo extrato enzimático produzido por *G. butleri* é interessante, podendo ser utilizado para hidrólise de amidos de diferentes fontes botânicas. Outro aspecto que merece destaque é a escassez de trabalhos prévios de produção de amilases com *G. butleri* e *L. ramosa*, o que estimula a continuidade do presente estudo.

REFERÊNCIAS

CAVALHEIRO, G.F.; SANGUINE, I.S.; SANTOS, F.R.S.; COSTA, A.C.; FERNANDES, M.; DA PAZ M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. Catalytic properties of amylolytic enzymes produced by *Gongronella butleri* using agroindustrial residues on solid-state fermentation. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-8, 2017. doi: 10.1155/2017/7507523

COSTA, A.C.; CAVALHEIRO, G.F.; DA PAZ, M.F.; VIEIRA, E.R.Q.; FONSECA, G.G.; GANDRA, J.; GOES, R.; LEITE, R.S.R. Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application and additives in bovine feeding. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 1-8, 2019. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101161

DE CONTI, R.; RODRIGUES, J.A.R.; MORAN, P.J.S. Biocatalysis: recent advances. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 672-675, 2001. doi: 10.1590/S0100-40422001000500014

FREITAS, L.S.; MARTINS, E.S.; FERREIRA, O.E. Produção e caracterização de α -amilase termoestável de *Syncephalastrum racemosum*. **Brazilian Journal of Biosciences**. v. 12, n. 4, p. 226–232, 2014. ISSN 1980-4849

GARBIN, A.P.; GARCIA, N.F.L.; CAVALHEIRO, G.F.; SILVESTRE, M.A.; RODRIGUES, A.; DA PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. β -glucosidase from thermophilic fungus *Thermoascus crustaceus*: production and industrial potential. **Anais da academia brasileira de ciências**, v. 93, n. e20191349, p. 1-11, 2021. doi: 10.1590/0001-3765202120191349

GIANNESI, G.C.; POLOZELI, M.L.T.M.; TEREZI, H.F.; JORGE, J.A. A novel α -glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* that converts maltose into trehalose: purification and partial characterisation of the enzyme. **Process Biochemistry**. v. 41, n. 8, p. 1729–1735, 2006. doi: 10.1016/.procbio.2006.03.017

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; SILVA, M. Thermostable enzymes: sources, production and industrial applications. **Química Nova**. v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007. doi:10.1590/S0100-40422007000100025

HARGER, C. ; SPRADA, D. ; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: Bioquímica das Fermentações, 1982. 56 p.

HUBER, K.C.; MILLER, J.N. Channels of maize and sorghum starch granules. **Carbohydrate Polymers**. v. 41, n. 3, p. 269–276, 2000. doi: 10.1016/S0144-8617(99)00145-9

KUMAR, D.; MUTHUKUMAR, M.; GARG, N. Kinetics of fungal extracellular α -amylase from *Fusarium solani* immobilized in calcium alginate beads. **Journal of Environmental Biology**, v. 33, n. 6, p. 1021–1025, 2012.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. do N. “Aplicações Industriais Da Biotecnologia Enzimática”. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, janeiro de 2009, p. 9-23, doi: 10.19142/rpq.v3i5.83.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. doi: 10.1021/ac60147a030.

MICHELIN, M.; RULLER, R.; WARD, R.J.; MORAES, L.A.B.; JORGE, J.A.; TEREZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus

Paecilomyces variotii. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 17–25, 2008. doi: 10.1007/s10295-007-0261-1

NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SHARER, J.M.; MOO-YOURG, M. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 80-85, 2006. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.06.003

NWAGU, T.N.; OKOLO, B.N. Growth profile and amylolytic activity of a thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from soil. **Asian Journal of Biotechnology**. v. 3, n. 1, p. 46–57, 2011. doi: 10.3923/ajbkr.2011.46.57

OLIVEIRA, A.P.A., SILVESTRE, M.A.; GARCIA, N.F.L.; ALVES-PRADO, H.F.; RODRIGUES, A.; DA PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE R.S.R. Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation. **The Scientific World Journal**, v. 2016, p. 10 , 2016. doi: 10.1155/2016/7323875

OLIVEIRA, A.P.A.; SILVESTRE, M.A.; ALVES-PRADO, H.F.; RODRIGUES, A.; DA PAZ, M.F.; FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. **African Journal of Biotechnology**. v. 14, n.14, p. 1215–1223, 2015. doi: 10.5897/AJB2014.14062

OKUYAMA, M.; TANIMOTO, Y.; ITO, T.; ANZAI, A.; MORI, H.; KIMURA, A.; MATSUI, H.; CHIBA, S. Purification and characterization of the hyper-glycosylated extracellular α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 37, n. 5, p. 472–480, 2005. doi: 10.1016/j.enzmictec.2004.06.018

PANDEY, A.; Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 81-83, 2003. doi: 10.1016/S1369-703X(02)00121-3

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. **Springer**. New Delhi, 742 p. 2006. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-35141-4>

SINGH,S., MANGLA, J., SINGH, S. Evaluation of *Aspergillus fumigatus* NTCC1222 as a source of enzymes for detergent industry. **Resources, Environment and Sustainability**. v. 5, 100030, 2021. doi: 10.1016/j.resenv.2021.100030.

SILVA, T.M.; DAMÁSIO, A.R.L.; MALLER, A.; MICHELIN, M.; SQUINA, F.B.; JORGE, J.A.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification, partial characterization, and covalent immobilization-stabilization of an extracellular α -amylase from *Aspergillus niveus*. **Folia Microbiologica**. v. 58, n. 6, p. 495-502, 2013. doi: 10.1007/s12223-013-0230-1

SINHA, S., VAKILWALA, M. Effect of various process parameters of fungal amylase from *Aspergillus spp.* **RSIS internacional**, v. 3, n. 5, p. 23 – 27, 2016. ISSN 2321 – 2705

SONI, S.K.; KAUR, A.; GUPTA J.K. A solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch,. **Process Biochemistry**. v. 39, n. 2, p. 185–192, 2003. doi: 10.1016/S0032-9592(03)00058-X

TESTER, R.F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch—composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**. v. 39, n.2, p. 151–165, 2004. doi: 10.1016/j.jcs.2003.12.001

VARALAKSHMI, K.N.; TAMRAKAR, B.; KUMARI, K.; KURAMI, P.; NAVALE, S.; POKHREL, S. Purification and Biochemical Characterization of pH Tolerant and Acid Stable α -amylase from *Aspergillus oryzae* JGI 21 Isolated from Soil. **Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition**. v. 8, n. 1-2, p. 14-20, 2013. <https://hrcak.srce.hr/file/155441>