UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Thiago Machado Pasin

**Prospecção, purificação e propriedades
funcionais de uma glucoamilase de *Aspergillus
japonicus*: aplicação do extrato enzimático em
reciclagem de papel**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Thiago Machado Pasin

**Prospecção, purificação e propriedades funcionais de uma
glucoamilase de *Aspergillus japonicus*: Aplicação do extrato
enzimático em reciclagem de papel**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica
Orientador: Profa. Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli

RIBEIRÃO PRETO – SP
2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pasin, Thiago Machado

Prospecção, purificação e propriedades funcionais de uma glucoamilase de *Aspergillus japonicus*: aplicação do extrato enzimático em reciclagem de papel, 2015. 156p. Ribeirão Preto, 2015.

156p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioquímica.

Orientadora: Polizeli, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes

1. Fungos Filamentosos, 2. Reciclagem de papel,
3. *Aspergillus japonicus*, 4. Amilase, 5. Purificação.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Carmen e Névio, cujo amor incondicional sempre me guiou aos caminhos certos e me possibilitaram esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli pelos anos de orientação, transferência de conhecimentos, pela amizade, paciência e o crescimento profissional que a convivência com ela me proporcionou. Sua dedicação foi fundamental para a minha formação enquanto pessoa e cientista.

Aos amigos e companheiros de laboratório pela amizade, convivência e pela gentil ajuda para a conclusão deste trabalho. Especialmente a Vivian que me recebeu com os braços abertos e incentivou desde o começo o meu crescimento na pesquisa e conhecimento, a Rosy que me adotou e me auxiliou em experimentos e momentos de muita conversa e ombro amigo e o Paulo que tirou muitas dúvidas do cotidiano de experimentos.

Aos meus irmãos Fábio, Renan e Eliano, escolhidos por Deus e também pelo meu coração para serem minha eterna base de sustentação.

Aos meus amigos, cada um sendo parte de uma história e juntos fazendo a minha vida...

Karol, Deisy, Paulo e Priscila (grupo dos negos) Gabriel e Lucas Lima, Jéssica, Cabral, Renata, Poch, Paulo (Paulin), Igor, Matheus, Leitoso, Bob.

Aos Técnicos de laboratório e docentes responsáveis:

Ricardo, Mariana e Maurício pela colaboração e disponibilidade. Ricardo Alarcon e Mariana, pela amizade, pela convivência, e pelas risadas durante muitas conversas.

Ao Professor Dr. João Atílio Jorge pela tamanha dedicação e simpática recepção cada vez que se fazia necessário batermos em sua porta.

Aos Funcionários do Departamento de Bioquímica.

Ivone, pela atenção e ajuda na resolução de todos os problemas mais burocráticos, resolvendo de forma hábil e exemplar. Por seu carinho, amor e respeito pelo o que faz. Sou muito grato a você.

A FAPESP, pelo apoio financeiro, bolsa e auxílio pesquisa.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

“O amor é paciente, o amor é bondoso. Não inveja, não se vangloria, não se orgulha. Não maltrata, não procura seus interesses, não se ira facilmente, não guarda rancor. O amor não se alegra com a injustiça, mas se alegra com a verdade. Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta” (1 Coríntios 13:4-7).

“Assim, eles já não são dois, mas sim uma só carne. Portanto, o que Deus uniu, ninguém separa” (Mateus 19:6).

A Tamires Pires de Souza minha namorada, futura esposa e mãe dos meus filhos que tudo suportou e ficou ao meu lado nos melhores e piores momentos, não deixando de me amar e me apoiar durante toda a nossa vida juntos.

Te amo

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE TABELAS.....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Fungos.....	2
1.1.1. <i>Aspergillus japonicus</i>	4
1.2 Descrição do amido.....	6
1.3 Sistema amilolítico.....	9
1.4 Processos fermentativos na produção de enzimas microbianas.....	12
1.5 Amilases na indústria.....	14
OBJETIVOS.....	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Isolamento dos micro-organismos em estudo.....	20
3.2 Micro-organismo em estudo.....	20
3.3 Screening dos fungos filamentosos para atividade amilolítica e manutenção da cepa.....	20
3.4 Inóculos.....	21
3.5 Meios de cultura líquidos.....	21
3.6 Obtenção da massa micelial e do meio de cultivo.....	21
3.7 Métodos de determinação da atividade enzimática.....	21
3.7.1 Dosagem da atividade enzimática pelo método sacarificante (reação com	

DNS).....	21
3.7.2 Determinação da atividade segundo reação de acoplamento com glicose oxidase.....	22
3.8 Dosagens de proteínas.....	23
3.9 Determinação do tempo de cultivo e condição física para crescimento e produção amilolítica pelo fungo <i>A. japonicus</i>	23
3.10 O efeito do pH inicial do meio de cultivo na produção da enzima pelo fungo <i>A. japonicus</i>	24
3.11 Efeito da temperatura e de fontes de nitrogênio no crescimento e produção enzimática pelo fungo <i>A. japonicus</i>	24
3.12 Cultivo de <i>A. japonicus</i> em diferentes fibras e resíduos alimentícios.....	24
3.13 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de amilase por <i>A. japonicus</i>	25
3.14 Diferentes concentrações de maltose e amido de batata no cultivo de <i>Aspergillus japonicus</i>	25
3.15 Determinação do complexo amilolítico e análise dos carboidratos hidrolisados por TLC.....	25
3.16 Mutações morfológicas do fungo <i>Aspergillus japonicus</i> induzidas por luz ultravioleta.....	26
3.17 Efeito da indução de mutações no fungo <i>Aspergillus japonicus</i> visando aumento da produção de amilases.....	26
3.18 Efeito da temperatura na atividade da amilase produzida pelo fungo <i>A. japonicus</i>	27
3.19 Efeito da temperatura na estabilidade da amilase produzida pelo fungo <i>A. japonicus</i>	27
3.20 Efeito do pH na atividade da amilase produzida pelo fungo <i>A. japonicus</i>	28
3.21 Efeito do pH na estabilidade da amilase produzida pelo fungo <i>A. japonicus</i>	28
3.22 Processo de purificação da amilase produzida por <i>Aspergillus japonicus</i>	29
3.23 Eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	29
3.24 Eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE).....	30

3.25 Gel atividade.....	30
3.26 Método de coloração por Coomassie e método de coloração por prata.....	30
3.27 Hidrólise de diferentes substratos amilolíticos pela glucoamilase purificada.....	31
3.28 Efeito de agentes químicos na atividade da glucoamilase purificada.....	31
3.29 Determinação do conteúdo de carboidratos das enzimas.....	31
3.30 Determinação das constantes cinéticas.....	32
3.31 Identificação dos aminoácidos.....	32
3.32 Desagregamento do papel e determinação da consistência da polpa celulósica.....	32
3.33 Tratamento enzimático da polpa celulósica.....	33
3.34 Determinação de alvura da polpa celulósica.....	33
3.35 Análises estatísticas.....	34
 RESULTADOS.....	 35
 PARTE 1.....	 36
4.1 Isolamento dos fungos e estudo do crescimento em diferentes temperaturas.....	37
4.2 Screening dos fungos filamentosos.....	39
4.3 Teste de diferentes meios de cultura para a produção de amilases pelo fungo <i>Aspergillus japonicus</i>	41
4.4 Determinação do tempo de cultivo e condição física para crescimento e produção amilolítica pelo fungo <i>A. japonicus</i>	42
4.5 Efeito do pH sobre a produção enzimática por <i>A. japonicus</i>	43
4.6 Efeito da temperatura e de fontes de nitrogênio no crescimento e produção enzimática pelo fungo <i>A. japonicus</i>	44
4.7 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de amilase por <i>A. japonicus</i>	45
4.8 Cultivo do fungo <i>A. japonicus</i> em diferentes fibras e resíduos alimentícios.....	47
 PARTE 2.....	 49

4.9 Efeito da temperatura na atividade da amilase produzida pelo fungo <i>A. japonicus</i>	50
4.10 Efeito do pH na atividade da amilase produzida pelo fungo <i>A. japonicus</i>	51
4.11 Determinação da estabilidade à temperatura da amilase produzida pelo fungo <i>A. japonicus</i>	52
4.12 Determinação da estabilidade ao pH da amilase produzida pelo fungo <i>A. japonicus</i>	54
4.13 Mutação induzida por luz ultravioleta na morfologia do fungo <i>Aspergillus japonicus</i>	55
4.14 Efeito da indução de mutações no fungo <i>Aspergillus japonicus</i> visando aumento da produção de glucoamilases.....	56
4.15 Estabilidade à temperatura da glucoamilase produzida pelo fungo <i>Aspergillus japonicus</i>	58
PARTE 3.....	60
4.16 Diferentes concentrações de amido de batata e maltose no cultivo de <i>A. japonicus</i>	61
4.17 Determinação de complexo amilolítico e análise carboidratos hidrolisados utilizando cromatografia em placa delgada de sílica (TLC).....	62
4.18 Purificação da amilase produzida por <i>Aspergillus japonicus</i>	63
4.19 Grau de pureza da amostra.....	64
4.20 Determinação da massa molecular.....	65
4.21 Efeito do pH sobre a reação da glucoamilase purificada.....	66
4.22 Estabilidade ao pH da glucoamilase purificada.....	66
4.23 Efeito da temperatura na reação da glucoamilase purificada.....	67
4.24 Estabilidade a temperatura da glucoamilase purificada.....	68
4.25 Hidrólise de diferentes substratos amilolíticos.....	69
4.26 Diferentes concentrações de íons, EDTA e 2-mercaptoetanol sobre a atividade da glucoamilase purificada.....	70
4.27 Determinação do conteúdo de carboidratos da enzima.....	72
4.28 Determinação das constantes cinéticas.....	72
4.29 Análise proteica para identificação da glucoamilase.....	74
PARTE 4.....	77
4.30 Tratamento enzimático das polpas celulósicas.....	78

4.30.1 Desagregamento do papel e determinação da consistência da polpa celulósica.....	78
3.30.2 Efeito do tratamento enzimático das polpas celulósicas com a amilase extraída do fungo <i>Aspergillus japonicus</i>	78
3.30.3 Determinação de alvura da polpa celulósica.....	79
4.31 Determinação de amilase residual e açúcares redutores no filtrado da polpa de celulose tratada.....	80
 DISCUSSÃO.....	 83
 CONCLUSÕES.....	 100
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 103

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BLAST: Basic local alignment search tool

BSA: Soroalbumina bovina

CBM: Carbohydrate binding module

DO: Densidade óptica

EC: Enzyme commission number

EDTA: Etilenodiaminotetraacetato

g: Grama

g: Gravidade

GH: Glicosil hidrolases

kDa: Kilodaltons

M: Molar

mL: Mililitros

p/v: Peso/volume

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

PM: Massa molecular

pb: Pares de base

pI: Ponto isoelétrico

qsp: Quantidade suficiente para

rpm: Rotações por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

Temed: Tetrametiletenodiamina

v/v: Volume por volume

V: Volts

pH: Potencial hidrogeniônico

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

µg: Microgramas

µL: Microlitros

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Conidióforos de <i>A. japonicus</i> Saito. Microcultivo em PDA (potato dextrose agar) a 30°C. Cepa isolada em solo de área rural.....	5
Figura 02. Estrutura química e conformação espacial da amilose.....	6
Figura 03. Estrutura química da amilopectina, ilustrando as ligações α -1,4 e α -1,6 e a estrutura geral da molécula.....	7
Figura 04. Microscopia do amido de batata doce.....	8
Figura 05. Representação esquemática dos mecanismos de ação de diferentes classes de amilases sobre a molécula de amido.....	11
Figura 06. Crescimento dos fungos isolados em diferentes temperaturas com meio de cultura sólido.....	38
Figura 07. Tempo de crescimento e produção amilolítica pelo fungo <i>A. japonicus</i> em condição (A) Estática e (B) Agitação.....	43
Figura 08. Efeito do pH na produção de amilase por <i>A. japonicus</i>	44
Figura 09. Efeito da temperatura e da fonte de nitrogênio no crescimento e na produção enzimática do fungo <i>A. japonicus</i>	45
Figura 10. Efeito da temperatura na atividade da amilase produzida por <i>A. japonicus</i>	51
Figura 11. Efeito do pH na atividade da amilase produzida pelo fungo <i>Aspergillus japonicus</i>	52
Figura 12. Determinação da estabilidade enzimática em diferentes temperaturas, durante uma hora de reação.....	53

Figura 13. Determinação da estabilidade da amilase produzida por <i>A. japonicus</i> em diferentes tempos de incubação, nas temperaturas de 40°, 50° e 60°C.....	54
Figura 14. Determinação da estabilidade à diferentes pHs, durante uma hora de reação da amilase produzida pelo fungo <i>A. japonicus</i>	55
Figura 15. Diferenças morfológicas de crescimento do fungo <i>A. japonicus</i> quando exposto em diferentes tempos à Luz Ultravioleta.....	56
Figura 16. (A) Estabilidade da enzima a diferentes temperaturas em diferentes tempos, produzida pelo fungo sem exposição à luz ultravioleta. (B) Estabilidade da enzima a diferentes temperaturas em diferentes tempos, produzida pelo fungo que foi exposto a luz ultravioleta.....	59
Figura 17. Cromatografia em placa delgada de sílica da amilase produzida pelo fungo <i>Aspergillus japonicus</i> cultivado em meio KHANNA com amido de batata, incubada em 5, 10 e 20 minutos com (A) Amido de batata 1% (B) e com maltose 1%. O padrão é referente aos marcadores que são: glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose e amido, representados pelos números 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente.....	63
Figura 18. Distribuição da enzima (•) e atividade da glucoamilase () depois de eluição em Cromatografia de troca iônica DEAE - celulose. (__) Gradiente de NaCl.....	64
Figura 19. Eletroforese e representação da massa molecular da glucoamilase produzida pela <i>A. japonicus</i> . 10% de SDS-PAGE (A) corado com azul brilhante de Coomassie e (B) corado com nitrato de prata, (C) 10% a actividade PAGE e (D) a determinação da massa molecular em SDS-PAGE.....	65
Figura 20. Efeito do pH na atividade da glucoamilase produzida pelo fungo <i>A. japonicus</i>	66
Figura 21. Determinação da estabilidade da glucoamilase nos pH de 3.0 a 8.0 por um período total de 300 minutos.....	67

Figura 22. Efeito da temperatura na atividade da glucoamilase produzida pelo fungo <i>A. japonicus</i>	68
Figura 23. Determinação da estabilidade da glucoamilase em diferentes temperaturas durante duas horas e meia de reação.....	69
Figura 24. Efeito da adição de $MnCl_2$ nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 mM para a atividade da glucoamilase em relação ao controle que não recebeu qualquer adição de íons.....	72
Figura 25. (A) Velocidade máxima da amilase em diferentes concentrações de substrato com 2 minutos de reação, utilizando a representação gráfica de MICHAELIS-MENTEN, (1913). (B) Representação gráfica de LINEWEAVER-BURK, (1934) ou duplo recíproco.....	74
Figura 26. Fenograma construído com base nas glucoamilases que foram similares no processo de identificação com a glucoamilase produzida pelo fungo <i>Aspergillus japonicus</i> . Os números de acesso dos fungos no NCBI são <i>A. nidulans</i> FGSC A4 (XP_680671.1), <i>A. niger</i> (3EQA_A), <i>A. awamori</i> (BAD06004.1), <i>A. ficuum</i> (AAT58037.1) e <i>P. chrysogenum</i> (BAC82551.1). A análise filogenética foi feita no programa CLUSTALW (http://www.genome.jp/tools/clustalw/).....	76
Figura 27. (A) “Bolachas” de papel reciclado prensado após a aplicação da enzima. (B e C) aparelho de medição da alvura.....	78
Figura 28. Alvura relativa do papel (A) Sufite e (B) do papel de revista.....	80
Figura 29. Amilase inicial (50,37 U/mL) e amilase residual, nos filtrados das polpas após 180 minutos de incubação a 55°C no biobranqueamento.....	81
Figura 30. Quantidade de açúcares redutores presentes nos filtrados das amostras.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Análise do crescimento dos halos (cm) dos fungos cultivados durante 48 horas.....	39
Tabela 02: Determinação do pH final e das amilases intra e extracelulares produzidas por <i>A. japonicus</i>	40
Tabela 03. Produção de amilase pelo fungo <i>A. japonicus</i> utilizando diferentes meios de cultura.....	42
Tabela 04. Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de amilase por <i>A. japonicus</i>	46
Tabela 05. Efeito da suplementação de resíduos industriais no crescimento e na produção amilolítica pelo fungo <i>A. japonicus</i>	48
Tabela 06 Atividade enzimática, quantidade de proteínas e atividade específica produzida pelos fungos que foram expostos à luz ultravioleta em diferentes tempos.....	58
Tabela 07. Diferentes concentrações de amido de batata como fonte indutora da produção de amilase por <i>A. japonicus</i>	61
Tabela 08. Diferentes concentrações de maltose como fonte indutora da produção de amilase por <i>A. japonicus</i>	62
Tabela 09. Purificação da Glucoamilase extracelular de <i>Aspergillus japonicus</i>	64
Tabela 10. Hidrólise de diferentes substratos pela glucoamilase produzida pelo fungo <i>A. japonicus</i>	70
Tabela 11. Efeito de diferentes íons, EDTA e 2-mercaptoetanol na atividade da glucoamilase de <i>A. japonicus</i>	71
Tabela 12. Valores de velocidade nas diferentes concentrações de substrato em 2 minutos de reação.....	73
Tabela 13. Constantes cinéticas da glucoamilase pura produzida pelo fungo termotolerante <i>Aspergillus japonicus</i> em meio suplementado com amido de batata.....	74

Tabela 14. Análise comparativa dos aminoácidos da glucoamilase produzida pelo fungo <i>Aspergillus japonicus</i> com aminoácidos de diferentes espécies de fungos com 100% de identidade.....	75
--	----

RESUMO

O gênero *Aspergillus* tem se destacado na produção de enzimas de aplicação industrial, destacando-se dentre estas, as amilases, capazes de hidrolisar as ligações α -glicosídicas do amido. As amilases são usadas nos processos industriais para a produção de etanol, glicose e xarope de frutose, além da indústria têxtil, de papéis e detergentes.

Neste contexto, este trabalho visou a prospecção de fungos filamentosos para a produção de amilase e a padronização das condições de cultura do *Aspergillus japonicus*. A otimização das condições de reação da amilase produzida pelo fungo, a purificação, caracterização e teste de diferentes concentrações de íons na atividade enzima pura, a determinação do conteúdo de carboidratos, das constantes cinéticas e análise dos aminoácidos que compõem a glucoamilase purificada e a aplicação da amilase bruta produzida pelo fungo *A. japonicus* no processo de branqueamento do papel reciclado.

Os resultados do screening de fungos filamentosos bons produtores de enzimas amilolíticas evidenciaram dois fungos com alta produção de amilase, os quais foram identificados como *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus japonicus*. Os estudos prosseguiram com o *A. japonicus* como fungo selecionado. Este fungo mostrou melhor produção enzimática no meio de cultura KHANNA e máxima produção amilolítica após 4 dias de crescimento em condições estáticas obtendo uma atividade de 44.65 ($\pm$ 0.49) U/mL. O pH ideal do meio de cultivo foi de 5,5 e a temperatura ótima de 25°C. As melhores fontes de carbono para a produção enzimática foram o amido de batata e a maltose, respectivamente, e o melhor resíduo de alimento foi a casca e bagaço de laranja.

Após a caracterização das condições de cultivo do fungo, vieram as caracterizações dos parâmetros físico-químicos da amilase. A temperatura e pH ótimo de ensaio enzimático foram padronizados sendo, respectivamente, 50°C e 5,5. A amilase manteve a sua atividade em torno de 90% de 30° a 50°C após uma hora de incubação, aproximadamente 95% de sua atividade nos pH de 4,0 a 6,0 e 50% nos pH de 6,5 à 9,0 após uma hora de incubação. Os produtos da hidrólise da amilase mostraram a formação apenas de glicose, na cromatografia de placa delgada de sílica, podendo-se supor que esta enzima trata-se de uma glucoamilase, o que foi comprovado por experimentos subsequentes. A enzima bruta foi submetida a eluição em DEAE-cellulose e uma glucoamilase com massa molecular de 72 kDa foi purificada conforme determinado por SDS-PAGE. A temperatura ótima desta glucoamilase purificada foi de 65°C e o pH foi de 5.0. A enzima também demonstrou alta estabilidade a diferentes temperaturas e pH, assim como, uma grande quantidade de produtos gerados quando usada a amilopectina como substrato de reação. A glucoamilase mostrou uma alta ativação na presença de 10 mM de $MnCl_2$, KCl, $Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3H_2O$, and 2-mercaptoetanol e um valor de K_m de 0,59 mg/mL, $V_{m\acute{a}x}$ de 308,01 U/mg e K_{cat} de 369,58 (s^{-1}). A quantidade de carboidratos que compõem a estrutura da enzima bruta e purificada foram quantificados sendo de 15% e 5,5%, respectivamente. A enzima pura teve seus aminoácidos identificados por análise comparativa com outros gêneros e espécies de fungos produtores de glucoamilase, a enzima também apresentou identidade com o domínio de ligação ao amido existente no fungo *Neosartorya fischeri* NRRL 181.

Quando a glucoamilase bruta foi aplicada no processo de biobranqueamento do papel reciclado impresso por tinta ao jato, a enzima apresentou uma média de 23,34% de aumento da alvura relativa quando comparada ao controle, já na polpa de papel de revista a enzima levou a uma média de 23,89% de aumento na alvura relativa. Os resultados apresentados abrem a possibilidade da utilização destas enzimas no biobranqueamento de polpa de celulose, para a produção e reciclagem de papel pelas indústrias.

ABSTRACT

The genus *Aspergillus* has been highlighted in the production of enzymes for industrial application, standing out among these, amylases, capable of hydrolyzing the α -glycosidic linkages of starch. Amylases are used in industrial processes for the production of ethanol, glucose and fructose syrup, in addition to textiles, detergents and paper. In this context, this work aimed the prospecting of filamentous fungi to produce amylase and the standardization of *Aspergillus japonicus* culture conditions. The optimization of reaction conditions for amylase produced by the fungus, purification, characterization and testing different concentrations of ions in pure enzyme activity, determining the carbohydrate content, the kinetic constants, analysis of the amino acids that comprise the purified glucoamylase and the application of crude amylase in the bleaching process of the recycled paper.

The results of the screening of filamentous fungi that produced good levels of amylolytic enzymes showed two fungi with high production of amylase, which were identified as *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus japonicus*. The studies continued with *A. japonicus* as selected fungus. This strain showed the best enzyme production in the culture medium Khanna and maximum amylolytic production after 4 days of growth under static conditions obtaining an activity of 44.65 ($\pm$ 0.49) U/ml. The optimum pH of the medium was 5.5 and the optimum temperature of 25°C. The best carbon sources for the enzyme production were potato starch and maltose, respectively, and the best food residue was orange peel and bagasse.

After the characterization of fungal culture conditions, came the characterization of physical and chemical parameters of amylase. The temperature and optimum pH of enzyme assay were standardized being, respectively, 5.5 and 50°C. Amylase retained its activity around 90% at 30 to 50°C after one hour of incubation, approximately 95% of its activity in the pH range of 4.0 to 6.0 and 50% in pH range of 6.5 to 9.0 after an hour of incubation. Amylase hydrolysis products showed only the formation of glucose, in thin layer chromatography on silica, and it can be assumed that it is a glucoamylase, which was confirmed by subsequent experiments. The crude enzyme was subjected to elution through DEAE-cellulose and a glucoamylase showing a molecular weight of 72 kDa as determined by SDS-PAGE was purified. The optimum temperature of this purified glucoamylase was 65°C and the pH was 5.0. The enzyme also showed high stability at different temperatures and pH, as well as a large amount of products generated when used as a reaction substrate the amylopectin. Glucoamylase showed a high activation in the presence of 10 mM de $MnCl_2$, KCl , $Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3H_2O$, and 2-mercaptoethanol and a K_m value of 0.59 mg/mL, V_{max} of 308.01 U/mg and K_{cat} of 369.58 (s^{-1}). The amount of carbohydrates that compose the structure of crude and purified enzyme were measured at 15% and 5.5%, respectively. The pure enzyme had its amino acids identified by comparison with other genera and species of fungi producers of glucoamylase, the enzyme also showed identity with the existing starch binding domain in *Neosartorya fischeri* NRRL 181 fungus.

When the crude glucoamylase was applied in biobleaching process of the recycled paper printed by the ink jet, the enzyme showed an average of 23.34% increase in relative brightness as compared to control, in the journal paper pulp has led to the enzyme an average of 23.89% increase in the relative brightness. The results presented here open the possibility of using these enzymes in pulp biobleaching pulp for the production and recycling of paper by industry.

A procura de fontes mais ricas de enzimas como, por exemplo, micro-organismos com possíveis aplicações industriais, tem sido de grande valor para o ramo da biotecnologia. Os micro-organismos são dotados de um imenso potencial de degradação de material orgânico, produzindo um “pool” de enzimas o qual tem sido explorado comercialmente ao longo dos anos (JAYANI *et al.*, 2005). Desse modo, há necessidade de se explorar a biodiversidade microbiota de variados ambientes, incluindo a procura por novas fontes de enzimas de interesse industrial. Nesse contexto, a bioprospecção pode ser entendida como uma exploração sistemática e legal da diversidade de vida existente em qualquer local do meio ambiente e tem como objetivo principal à busca de recursos genéticos e bioquímicos para fins comerciais (SANTOS, 2001).

1.1 Fungos

Os fungos formam um vasto grupo de organismos classificados em um reino próprio, denominado Fungi, pertencente ao Domínio Eukaryota. Não só estão incluídos neste grupo organismos de dimensões consideráveis, os cogumelos, mas também muitas formas microscópicas, como bolores e leveduras. O número de espécies conhecidas de fungos é estimada em pelo menos 99.000, sendo a maioria terrestres, mas talvez existam entre 3,5 a 5,1 milhões de espécies, sendo que a maioria ainda não foi identificada, estudada e descrita pelos micologistas (BLACKWELL, 2011). Assim, a prospecção de enzimas de interesse industrial em fungos de solo brasileiro e resíduos ainda é um tema pouco explorado e de potencial interesse biotecnológico.

Nas últimas décadas, a utilização de fungos em bioprocessos ganhou importância devido à produção de enzimas com características físico-químicas variadas e com potenciais excelentes para a aplicação industrial. A capacidade de síntese em grande escala, bem como a facilidade com que são secretadas para o meio externo constituem algumas dessas características (PAPAGIANNI, 2004).

Os fungos podem ocupar muitos ambientes como solos, materiais orgânicos em decomposição, plantas, dentre outros. Essa diversidade de habitats, evolutivamente, garantiu a esses organismos a capacidade de sintetizar uma série de enzimas com diferentes características, possibilitando-lhes o uso da matéria orgânica do meio (GOUKA *et al.*, 1997). Como outros micro-organismos, podem se adaptar a ambientes inóspitos, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão e salinidade ultrapassam valores considerados padrões para a maioria dos micro-organismos (LASA E

BERENGUER, 1993).

Os micro-organismos transportam os nutrientes através da membrana plasmática como, por exemplo, compostos de baixa massa molecular. Para tal, eles secretam exoenzimas, as quais hidrolisam as macromoléculas presentes no substrato até atingir a forma e a solubilidade necessária para que sejam transportadas pela membrana (PUTZKE E PUTZKE, 2002). Entre estas enzimas encontram-se as amilases, pectinases, xilanas, celulasas e ligninas, que são importantes para diversos processos com potenciais aplicações industriais, incluindo ração animal.

Os fungos filamentosos, em virtude de sua presença em vários ecossistemas e habitats, são cultivados em meios de cultura com relativa simplicidade de composição, são fáceis de manusear, suas condições de cultivo são facilmente controladas, ocupam pouco espaço e crescem onde há fonte de carbono associada ao calor e umidade (TREVISAN, 2004).

Os *Aspergillus* estão inseridos no filo Ascomycota, o qual é o maior filo do reino Fungi, pois compreende quase 50% de todas as espécies conhecidas de fungos. Este gênero pertence à ordem dos Eurotiales e família Trichocomaceae. Os Ascomicetos, de forma geral, apresentam tanto ciclo sexual como assexual, e possuem como característica principal a presença de uma estrutura reprodutiva denominada asco, na qual são formados os ascósporos (esporos sexuais) (GUARRO *et al.*, 1999). A classificação destas espécies tem sido baseada primariamente em diferenças nas características morfológicas (GAMS *et al.*, 1985).

As colônias do gênero *Aspergillus* crescem rapidamente e podem possuir colorações diversas (verdes, amarelas, marrons, brancas e pretas), consistindo em uma densa cobertura com conidióforos eretos, nos quais os conídios formam colunas compactas e, em sua maioria, são pigmentados (SAMSON *et al.*, 1995).

O gênero *Aspergillus* é um modelo biológico clássico e, em geral, tem grande relevância prática, por existirem espécies produtoras de enzimas industriais, ácidos orgânicos e outros produtos comercialmente importantes. Existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus* comumente isolados do solo, materiais em decomposição, ar e também de vários outros ambientes. Devido à grande produção de enzimas extracelulares, são extensamente utilizados em processos biotecnológicos.

1.1.1 *Aspergillus japonicus*

Os experimentos foram conduzidos com o fungo *Aspergillus japonicus* para a produção de amilase. A produção de amilase foi também reportada em várias espécies de fungos diferentes, tais como *Fusarium solani* (KUMAR *et al.*, 2012), *Aspergillus oryzae* (ICHINOSE *et al.*, 2014), *Aspergillus niger* (VARALAKSHMI *et al.*, 2009) e *Streptomyces erumpens* (KAR *et al.*, 2008).

O fungo *Aspergillus japonicus* Saito, é membro do gênero *Aspergillus* seção Nigri (formalmente grupo dos *Aspergillus niger*) e é distribuído por todo mundo, crescendo em uma vasta variedade de substratos. Devido a sua importância biotecnológica, a identificação das linhagens precisa ser clara, mas até agora, a taxonomia dos “black” *Aspergilli* está longe de ser esclarecida, pois as diferenças entre as espécies são muito sutis (ABARCA *et al.*, 2004).

Aspergillus japonicus Saito é uma espécie de *Aspergillus* que produz colônias pretas com micélio branco, denso e basal e com ausência de exudato e pigmentos solúveis. São quase completamente cobertos por conídios de coloração preta ou marrom escura, com formato redondo e, ocasionalmente elíptico além de uniseriados. Esta espécie tem sido isolada de solos, raízes de plantas e folhas em decomposição, predominantemente em regiões tropicais e subtropicais (KLICH e PITT, 1988). Essa espécie cresce rapidamente a temperatura ambiente (24-28°C), possuindo colônias com cerca de 5,0 a 6,0 cm de diâmetro durante 4 dias de incubação em meio sólido. Alguns sinônimos considerados são *A. japonicus* var. *atrofuscus*, *A. brunneo-violaceus*, *A. japonicus* var. *capillatus* e *A. atro-violaceus* (RAPER e FENNELL, 1965). O ascocarpo das Aspergillales é do tipo Cleistotécio, completamente fechado durante todas as fases do desenvolvimento, formando-se no interior de um entrelaçado frouxo de hifas vegetativas e, em muitos casos, a superfície não está nitidamente delimitada da parte vegetativa do micélio. Os ascos são formados em vários níveis dentro do cleistotécio e, em geral, constituem, quando maduros, uma massa pulverulenta (SMITH, 1955) (Figura 01).

O micélio vegetativo dos fungos filamentosos sofre transformações dando origem ao micélio reprodutivo. Os propágulos formados no micélio reprodutivo podem ter origens assexuadas, sexuadas ou pelo fenômeno da parassexualidade (GOMPERTZ *et al.*, 1999).

A fase sexuada dos fungos é denominada de teleomórfica ou perfeita e a fase assexuada, anamórfica ou imperfeita (GOMPERTZ *et al.*, 1999). Os propágulos

assexuados inferiores originam-se de estruturas denominadas esporângios, por um processo interno de clivagem de seu citoplasma, e são chamados esporangiósporos. Pela ruptura dos esporângios, os esporos são liberados. A hifa especial que sustenta o esporângio é denominada esporangióforo (GOMPERTZ *et al.*, 1999).

Figura 01. Conidióforos de *A. japonicus* Saito. Microcultivo em PDA (potato dextrose agar) a 30°C. Cepa isolada em solo de área rural. Fotografia: F.D.A. Facchini.

Na fase sexuada, os propágulos originam-se da fusão de estruturas diferenciadas com caráter de sexualidade. O núcleo haplóide de uma célula doadora funde-se com o núcleo haplóide de uma célula receptora, formando um zigoto. Posteriormente, por divisão meiótica, originam-se quatro ou oito núcleos haplóides, alguns dos quais se recombinarão geneticamente (GOMPERTZ *et al.*, 1999).

No processo parassexual, o ponto inicial é a heterocariose ocorrendo depois à fusão de núcleos dando diplóides heterozigotos, sendo, em geral, verificada somente pela análise genética, uma vez que, estudos citológicos em fungos são difíceis de serem realizados. O passo seguinte é a produção de recombinantes. O mecanismo de recombinação envolve permutas mitóticas recíprocas (fazendo com que os núcleos filhos sejam homozigóticos para os marcadores distais com relação ao ponto de permuta, ou continuarão heterozigotos como a linhagem diplóide original), e haploidização, a qual resulta de uma série de não disjunções, sendo que um núcleo que contém um cromossomo a menos é instável e pode, através de novas não disjunções, ir perdendo outros cromossomos até atingir o estado de $2n-8=8$ cromossomos (AZEVEDO, 1972).

Dados da literatura têm descrito que as espécies de *Aspergillus japonicus* são ótimas produtoras de várias enzimas de interesse biotecnológico, como as pectinases (SEMENOVA *et al.*, 2003), β -frutofuranosidase (CHEN, 1998; WHANG e ZHOU, 2006), β -glucosidase (DECKER *et al.*, 2000), celulasas (SANYAL *et al.*, 1988), tanases

(BRADDOO *et al.*, 1997), fitases (MALLER *et al.*, 2010), lipases (VORA *et al.*, 1988), xilanasas e celulasas (FACCHINI *et al.*, 2011) beta-xilosidasas (WAKYIAMA *et al.*, 2008; SEMENOVA *et al.*, 2009) bem como possíveis produtores de ocratoxina (ABARCA *et al.*, 2004).

1.2 Descrição do amido

O amido é um hidrato de carbono encontrado nas raízes e em algumas sementes de milho, de arroz e de trigo como a principal fonte de carbono no órgão de armazenamento nas células vegetais. Todas as células de plantas são capazes de sintetizar essa substância (LEHNINGER *et al.*, 1993). O amido é constituído basicamente por dois compostos quimicamente muito semelhantes: a amilose e amilopectina. As proporções de amilose e amilopectina variam entre as diferentes espécies de origem e de acordo com o grau de maturação da planta, aparecendo na proporção média de 20% a 22% e 75% a 80%, respectivamente (LASZLO *et al.*, 1986). De acordo com LIMA (2001), a amilose é um polímero linear helicoidal de glicose, solúvel em água, consistindo de mais de 6000 unidades de D-glicose com ligações glicosídicas do tipo α -1,4 (Figura 02).

Figura 02. Estrutura química e conformação espacial da amilose (BOBBIO e BOBBIO, 2003).

O contrário da amilose, a amilopectina é uma macromolécula altamente ramificada (Figura 03), constituída por cadeias lineares mais curtas de ligações α -1,4, contendo 10 a 60 unidades de glicose e cadeias laterais de ligação α -1,6, possuindo 15 a 45 unidades de glicose (VAN DER MAAREL *et al.*, 2002).

Figura 03. Estrutura química da amilopectina, ilustrando as ligações α -1,4 e α -1,6 e a estrutura geral da molécula (Fonte: JACQUES *et al.*, 1999).

Cada amido é único na organização e na estrutura dos seus grânulos e geralmente possui estrutura, propriedade e comportamento limitado. Sendo assim, amidos de origens diferentes não se comportam da mesma maneira. As propriedades dos amidos são determinadas pela estrutura química e molecular dos polímeros e pela quantidade de outros componentes, como os lipídios, proteínas e açúcares.

A estrutura do grânulo é importante para explicar as características funcionais identificadas no amido. Uma maneira indireta que possibilita o entendimento da estrutura física e química dos amidos é a hidrólise enzimática do amido granular (FRANCO *et al.*, 2001). As moléculas de amilose e amilopectina estão arranjadas no grânulo formando uma estrutura de camadas que se superpõem ao redor de um ponto denominado hilo, que pode estar no centro do grânulo ou deslocado lateralmente. As camadas que circundam o hilo são resultantes da deposição de amido de diferentes graus de hidratação, resultantes da presença de amilose ou amilopectina. Devido a isto têm regiões alternadas de alto e baixo índice de refração, densidade, cristalinidade e resistência ao ácido e a enzimas (FRANCO *et al.*, 2001).

A taxa de hidrólise, além do tamanho dos grânulos, também é dependente da origem botânica deste polissacarídeo, do sistema enzimático utilizado, entre outros fatores. Amidos que naturalmente apresentam superfície porosa, como os de milho, são degradados com maior facilidade que aqueles cuja superfície é lisa, como por exemplo, o de mandioca (FRANCO *et al.*, 1998). Em especial, o amido de batata-doce apresenta grânulos com formato arredondado e poligonal, demonstrado na Figura 04, como observado por GARCIA *et al.*, (2002) e LEONEL *et al.*, (2004) e distribuição de tamanho com diâmetro maior variando de 10 a 55 μm , estando concentrada na faixa de 12 a 20 μm (LEONEL *et al.*, 2004) (Figura 04).

Figura 04. Microscopia do amido de batata doce (GARCIA *et al.*, 2002).

Segundo CEREDA (2001) a hidrólise ou sacarificação do amido pode ocorrer por meio de um processo ácido ou enzimático. A hidrólise ácida apresenta como vantagem o tempo de conversão mais curto, porém tem como principais desvantagens a necessidade de neutralização ao final do processo a fim de não inibir a fermentação posterior, a corrosão de equipamentos e geração de açúcares não fermentativos ou fermentescíveis.

Por estas razões, a hidrólise enzimática é o objeto da maior parte dos estudos. Normalmente este processo ocorre em reatores de conversão, com a utilização de enzimas que podem ser de origem vegetal ou microbiana (LEONEL e CEREDA, 2000).

O processo enzimático oferece potencial de redução de custos a longo prazo, pois é possível atingir rendimentos próximos dos estequiométricos e em condições menos críticas de temperatura, pressão e agressividade química, além do processo ser menos poluente (LEATHERS, 2003). No entanto, no estágio de desenvolvimento atual, o processo ainda é economicamente inviável, devido ao elevado custo das enzimas e as elevadas temperaturas de reações empregadas, o que justifica o interesse pelo estudo das variáveis que afetam o processo (RABELO, 2007).

Devido a estes inconvenientes, com o advento de novas fronteiras biotecnológicas, processos alternativos estão sendo desenvolvidos, um dos procedimentos consiste em adicionar micro-organismos que, em condições favoráveis, tornam-se capazes de secretar as enzimas necessárias à sacarificação (ALTINTAS *et al.*, 2002). Outra alternativa inclui a obtenção prévia de amilases, por meio do cultivo de micro-organismos na presença de substratos indutores, e posterior aplicação destas enzimas diretamente sobre o substrato a ser hidrolisado. Esta última configura-se como uma excelente opção, pois além de gerar bons rendimentos em termos de açúcares, propicia a redução de custos de todo o processo.

No entanto, o custo de processamento de matérias-primas amiláceas ainda é elevado nos dias atuais, o que torna os produtos amiláceos não competitivos em relação aos custos dos produtos de outras fontes produzidos industrialmente. Contudo, a adoção de cultivares de alto teor de matéria seca e com elevada produtividade de raízes e ajustes nos processos fermentativos como o uso de enzimas mais eficientes ou modificadas geneticamente pode permitir melhores resultados econômicos, como os obtidos por SILVEIRA (2008).

1.3 Sistema amilolítico

As enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido (HARGER, 1982), as que são capazes de hidrolisar as ligações α -glicosídicas.

Enzimas, de um modo geral, são substâncias naturais envolvidas em todos os processos bioquímicos que ocorrem nas células vivas. A maioria delas são proteínas, as quais consistem em cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas. Servem para catalisar reações bioquímicas, o que significa que aumentam a velocidade da reação sem se deixar afetar pela mesma (NELSON e COX, 2002). Foram descobertas na segunda metade do século 19, e desde então têm sido extensivamente utilizadas em diversos processos industriais, por serem extremamente eficientes e altamente específicas.

Amilases podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de ação ou quanto ao tipo de ligação que hidrolisam. Quanto ao mecanismo de ação, estas enzimas são divididas em duas categorias: endoamilases e exoamilases (GUPTA *et al.*, 2003). As endoamilases hidrolisam o amido de forma aleatória no interior de sua molécula. Essa ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos e, dessa forma, quebram as ligações glicosídicas α -1,4 presentes na parte

interna (endo) das cadeias de amilose ou amilopectina. Já as exoamilases atuam externamente nas ligações dos substratos a partir das extremidades não redutoras, produzindo produtos de baixa massa molecular (GUZTMÁN-MALDONADO e PAREDE-LOPEZ, 1995). Quanto às ligações hidrolisadas, as amilases são principalmente agrupadas em α -amilases (endoamilases), β -amilases (exoamilases), glucoamilases (amiloglucosidases), isoamilases, pululanases e ciclodextrina glicosiltransferases (Figura 05) (CORNELIS, 1987). Como principais enzimas amilolíticas são citadas:

α -amilase (EC 3.2.1.1 1,4- α -D-glucano glucanohidrolase), uma das enzimas muito utilizada, trata-se de uma endoamilase que promove a hidrólise de ligações α -1,4 no interior da cadeia de amilose e de amilopectina, liberando várias cadeias de oligossacarídeos de diversos tamanhos que apresentam α – configuração no C₁. CRABB e SHETTY (1999) constataram que a α -amilase possui uma boa tolerância, sendo que em reações com temperatura de até 100°C a enzima não se desnatura. É utilizada no processo de liquefação do açúcar, na indústria de bebida fermentada e na produção de adesivos, detergentes e ração animal.

β -amilase (EC 3.2.1.2 1,4- α -D-glucano maltohidrolase), uma exohidrolase que hidrolisa a penúltima ligação α -1,4 da extremidade não redutora da cadeia de substrato, causando inversão da configuração anomérica da maltose liberada para a forma β . É essencial na produção de xarope de alto teor de maltose.

α -D-Glucosidase (EC 3.2.1.20 α -D-glucosidase glucohidrolase) ou maltase, trata-se de uma exohidrolase que hidrolisa ligações glicosídicas do tipo α -1,4 e/ou α -1,6 de sacarídeos curtos formados pela ação de outras enzimas amilolíticas capazes de liberar unidades de α -D-glicose, a partir da extremidade não redutora.

Pululanase (EC 3.2.1.41 α -dextrina-6-glucanohidrolase) é uma endoamilase que hidrolisa ligações α -1,6 do polissacarídeo pululano, convertendo-o quase completamente a maltodextrina, podendo também, dar origem a produtos de reação sem pontos de ramificação, quando atua sobre ligações α -1,6 das moléculas de amido, amilopectina e dextrina limite. Essa enzima não exerce nenhum efeito sobre as ligações α -1,4.

Isoamilase (EC 3.2.1.68 glicogênio-6-glucohidrolase) é uma endoamilase desramificadora de amido utilizada na produção de glicose e maltose, a qual hidrolisa

todas as ligações α -1,6 de dextrina β -limite, requerendo, pelo menos, três unidades de glicose na cadeia ramificada para ser capaz de hidrolisá-la.

Exo-(1-4)- α -D-Glucanase, ou exo-maltotetrahidrolase (EC 3.2.1.60 1,4- α -D-glucano maltotetrahidrolase) hidrolisa substratos lineares e ramificados, liberando grande quantidade de maltotetraose pela ação exo da enzima na quarta ligação glicosídica do tipo α -1,4 da extremidade não redutora de α -D-glucanos. Não é capaz de hidrolisar ciclomaltooligossacarídeos. A exo-maltohexahidrolase (EC 3.2.1.98 1,4- α -D-glucano maltohexahidrolase) produz maltohexose pela hidrólise da sexta ligação α -1,4 da extremidade não redutora do α -D-glucano. Não apresenta atividade sobre ciclomaltooligossacarídeos ou pululano, mas dextrinas β -limitante são degradadas originando oligossacarídeos ramificados.

Ciclomalto-dextrina D-Glucotransferase (EC 2.4.1.19. 1,4- α -D-(1-4- α -glucano) transferase (“cycling”)) trata-se de uma exoamilase capaz de hidrolisar amido, por uma série complexa de reações, a oligossacarídeos cíclicos não redutores (ciclodextrinas). É usada na produção de carboidratos cíclicos, os quais são utilizados como agentes farmacêuticos protetores.

Glucamilase (EC 3.2.1.3. 1,4- α -D-glucan glucosidase) ou amiloglicosidase, trata-se de uma exoamilase capaz de hidrolisar ligações glicosídicas do tipo α -1,4, por meio da remoção de sucessivas unidades de glicose, a partir da extremidade não redutora da cadeia, liberando moléculas de D-glicose na conformação β . Essas enzimas também hidrolisam, mas com uma velocidade menor, as ligações α -1,6 e algumas ligações do tipo α -1,3.

Figura 05. Representação esquemática dos mecanismos de ação de diferentes classes de amilases sobre a molécula de amido (GONÇALVES, 2006).

Outras enzimas classificadas como amilases, mas que são pouco relatadas na literatura são as isomaltases (dextrina 6- α -D-glucano hidrolase, EC 3.2.1.10), as quais hidrolisam as ligações α -1,6-D-glicosídicas em isomaltose de dextrinas e as α -glucosidases (α -D-glucosídica, EC 3.2.1.20), que hidrolisam as ligações α -1,4-D-glicose nos terminais não redutores nos resíduos de oligossacarídeos, liberando α -D-glicose (MINAFRA, 2007). Estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza. Apesar de serem derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e micro-organismos, enzimas de origem microbiana são as que apresentam maior demanda industrial. Atualmente, um grande número de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e estas vem substituindo a hidrólise ácida nas indústrias de processamento do amido (PANDEY *et al.*, 2000).

1.4 Processos fermentativos na produção de enzimas microbianas

Segundo JOO e CHANG (2005), a produção industrial de enzimas é frequentemente limitada devido aos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos micro-organismos. Estima-se que por volta de 30 a 40% do custo envolvido na produção de enzimas esteja relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento destes. Portanto, sua otimização é de grande importância para a redução dos custos de produção. A fermentação, sob o ponto de vista biotecnológico, pode ser definida como a transformação de um substrato em um determinado produto pela ação de micro-organismos e pode ser desenvolvida por processos submersos ou sólidos (MITCHELL *et al.*, 2000; SILVA, 2003). A fermentação submersa (FSM) envolve a utilização de fontes de carbono em meios líquidos, enquanto que a fermentação em estado sólido (FES) emprega os mais variados substratos sólidos como fontes de carbono (FELLOWS, 1994).

O meio utilizado deve conter uma fonte de carbono como fonte energética, bem como uma fonte de nitrogênio, que permitam a proliferação celular. Além disso, pode requerer também nutrientes específicos para o crescimento e alguns minerais para a produção de enzimas.

A fermentação submersa é um sistema empregado industrialmente para a produção de uma grande variedade de metabólitos de origem fúngica, com grande importância sócio-econômica (GIBBS *et al.*, 2000). É influenciada por diversos fatores, os quais vão desde o crescimento e obtenção de biomassa até a produção de metabólitos. A FSM é amplamente utilizada, pois permite o controle dos parâmetros físico-químicos

do processo como pH, oxigênio dissolvido e troca de calor e apresenta fácil recuperação das enzimas extracelulares, micélio ou esporos. Ainda, permite que se evite a repressão catabólica pelo controle da fonte de carbono e retirada do produto (VINIEGRA-GONZÁLEZ *et al.*, 2002).

No entanto, os produtos são diluídos e os extratos enzimáticos podem apresentar menor estabilidade (SANDHYA *et al.*, 2005). Um dos maiores inconvenientes desse processo é o fato de gerar grandes volumes de resíduos (ELLIAH *et al.*, 2002).

Em contrapartida, a FES utiliza sólidos em ausência de água livre entre as partículas, embora o substrato possua suficiente umidade para suportar o crescimento e metabolismo dos micro-organismos. Esse processo é mais aplicado para fungos filamentosos, visto que estes crescem na superfície da partícula utilizando o oxigênio presente entre elas e sua estrutura filamentosa permite a penetração no interior, com melhor aproveitamento dos nutrientes nela contidos. A interação entre o fungo e o substrato possibilita a decomposição de substratos sólidos.

O processo requer baixa energia, produz menos resíduo líquido e agrega valor a resíduos sólidos, principalmente os agro-industriais. Por outro lado, o controle dos parâmetros físico-químicos é um processo mais complexo (RAIMBAULT, 1998; PANDEY, 2002). Independentemente do processo utilizado, o sucesso de um processo fermentativo dependerá diretamente do crescimento microbiano e de sua atividade sobre o substrato. Tanto a maneira com que o micro-organismo degrada a partícula quanto o “pool” de enzimas necessário a essa degradação devem ser considerados (SILVA, 2003), bem como os custos do substrato empregado, da incubação e da recuperação da enzima devem ser reduzidos (FELLOWS, 1994).

Após a fermentação, as enzimas extracelulares são recuperadas do meio por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou pela combinação de outros métodos (FELLOWS, 1994). Com o intuito de tornar o processo de hidrólise do amido economicamente competitivo, várias linhagens fúngicas potencialmente produtoras de amilases tem sido isoladas nos últimos anos. Alguns trabalhos têm relatado a produção de diferentes tipos de amilases termoestáveis e termotolerantes, com características físico-químicas bastante diversificadas.

1.5 Amilases na indústria

A biotecnologia clássica começou a se desenvolver quando surgiram as técnicas de microbiologia que permitiram o isolamento e a cultura de cepas puras de micro-organismos de interesse. Bastava, portanto, descobrir que espécies de micro-organismos eram capazes de produzir uma substância desejada e cultivá-las em larga escala para se obter o produto (MONTOR e SOGAYAR, 2003).

Atualmente, a biotecnologia é acompanhada dos estudos sobre o funcionamento, estrutura e utilização, principalmente na indústria, das enzimas obtidas a partir de micro-organismos, o que têm despertado grandes interesses em pesquisadores da área, principalmente por se tratar de um recurso renovável (CRABB e SHETTY, 1999). A tecnologia enzimática e a biocatálise são ferramentas promissoras para a geração de compostos de alto valor agregado e com menor agressão ao meio ambiente.

Dentro deste processo, os fungos filamentosos têm sido usados há séculos como fontes de produção de muitos metabólitos, dentre os quais estão às enzimas. Estes micro-organismos estão envolvidos no processamento de frutas e legumes, na clarificação de sucos de frutas, na extração de café, na produção de adoçantes, além de suas enzimas estarem envolvidas nos processos industriais, em áreas farmacêutica, alimentícia, química, e na produção de papel (VAN DEN HOMBERGH *et al.*, 1997).

Na indústria o interesse por enzimas vem aumentando consideravelmente devido à enorme variedade de aplicações nos diversos setores (JAEGER *et al.*, 1994) como o uso de amilases para diminuir a turbidez e clarificar sucos de frutas ou produção de edulcorantes para refrigerantes, a partir do amido. Na indústria têxtil, celulasas removem restos de celulose do tecido para conferir maciez e também diminuem a viscosidade de sucos. Na indústria papelreira, as xilanases e as amilases são usadas para clarear a polpa de celulose (POLIZELI *et al.*, 2005 e 2009).

A reciclagem de papel usado ganhou impulso nas últimas décadas, devido à severidade da utilização da natureza que está sendo imposta pela indústria de papel em todo o mundo (MOHANDASS e RAGHUKUMAR, 2005). O destintamento é um passo importante no processo de reciclagem e envolve o desalojamento das partículas de tinta da superfície das fibras e, em seguida, a remoção dessas partículas de tinta separadas por flotação, lavagem e etc (IBARRA *et al.*, 2012). A evolução nos processos de eliminação da tinta, têm ajudado imensamente na utilização de fibras secundárias, tais como papel de jornal velho, papéis xerocadas e papéis impressos a laser/jato de tinta para fabricar papéis

brancos. Dos dois tipos de tintas presentes em fibras secundárias, é mais fácil de remover a tinta de impacto, tais como a do papel de jornal ou revista, em comparação com a tinta sem impacto presente em papéis xerocadas ou impressos a laser/jato de tinta. Os métodos convencionais de destintamento utilizam produtos químicos tais como hidróxido de sódio, silicato de sódio, peróxido de hidrogênio, produtos químicos à base de cloro e outros agentes quelantes que são ambientalmente perigosos (MAITY *et al.*, 2012). O destintamento enzimático tem atraído uma enorme atenção, reduzindo o consumo de produtos químicos diminuindo assim o custo do processo e tornando-se ecologicamente amigável (IBARRA *et al.*, 2012). As enzimas podem atuar tanto diretamente na fibra ou na tinta. Diferentes enzimas utilizadas para o destintamento incluem as celulasas, xilanases, pectinases, amilases, lipases, esterases e lacases (CALL e STRETTMATTER, 1992).

O interesse em enzimas deste tipo vem aumentando principalmente no Brasil, que importa toneladas desses produtos. De acordo com dados recentes do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, o Brasil importa a maior parte dos produtos que envolvem preparações enzimáticas e possui uma exportação pouco significativa (RIBEIRO, 2013). Num panorama mundial o mercado de enzimas industriais foi estimado em 3,3 bilhões de dólares em 2010 e deve chegar a mais de 4 bilhões de dólares em 2015 (GURUNG *et al.*, 2013). Fica evidente que o mercado de enzimas industriais é pequeno no país em relação à demanda nacional e global. Portanto, o uso de enzimas como catalisadores em processos industriais é fundamental para obtenção de produtos de alta qualidade com tecnologia limpa, em harmonia com as necessidades do mercado e a preservação do meio ambiente. As enzimas possuem grande importância nos mecanismos celulares e alto potencial de aplicação na substituição dos processos químicos convencionais, sendo, portanto, o principal alvo de estudos em biotecnologia (SILVA e CARREIRO, 2007). Para ser utilizada comercialmente, a enzima deve proporcionar produtos que sejam de melhor qualidade que o produto original, permitir uma melhoria do processo e possibilitar a fabricação de produtos que não estão disponíveis ou que estão disponíveis em pequenas quantidades (ABRAHÃO NETO, 2001).

Para a apresentação deste trabalho se faz necessário esclarecer que os resultados serão divididos em quatro partes: Prospecção de fungos filamentosos para produção de amilase: Padronização das condições de cultura de *Aspergillus japonicus* (Parte 1), otimização das condições de reação da amilase produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus* e avaliação

da ação mutagênica induzida por luz ultravioleta na morfologia, na produção e na estabilidade à temperatura da amilase produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus* (Parte 2), purificação, caracterização e teste de diferentes concentrações de íons na atividade da glucoamilase produzida *Aspergillus japonicus*, determinação do conteúdo de carboidratos, das constantes cinéticas e análise dos aminoácidos que compõem a glucoamilase purificada (Parte 3) e a aplicação da amilase bruta produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus* no processo de branqueamento do papel reciclado (Parte 4).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

Diante do grande potencial de aplicação das amilases na indústria papelreira, para o biobranqueamento da polpa de celulose, este trabalho teve como objetivo principal o estudo sistematizado do sistema amilolítico de fungos filamentosos isolados e identificados que se mostraram bons produtores de amilase, se destacando entre eles o fungo *Aspergillus japonicus*. Teve como objetivos também a utilização de resíduos agro-industriais para produção enzimática e aplicação do extrato bruto no processo de branqueamento do papel reciclado. Além da purificação, caracterização bioquímica e identificação dos aminoácidos que compõem a enzima purificada visando estabelecer a relação filogenética entre *A. japonicus* e os demais fungos do gênero *Aspergillus* utilizados na indústria.

2.2 Objetivos específicos:

- ✓ Prospectar, isolar, selecionar e padronizar o cultivo dos fungos, que foram coletados no município de Itamaraju, BA, bons produtores de enzimas amilolíticas que apresentaram estabilidade térmica;
- ✓ Determinar o pH e a temperatura ótima de reação da amilase e a sua estabilidade em diferentes temperaturas e pH, além de avaliar, em diferentes tempos de exposição, a potencialidade mutagênica da luz ultravioleta e os seus efeitos na morfologia do fungo, na produção e na estabilidade da enzima produzida pelo *Aspergillus japonicus*;
- ✓ Purificar e determinar a temperatura, pH ótimo reacional, a estabilidade em diferentes temperaturas e pH, além de analisar a hidrólise de diferentes substratos e os distintos compostos que causam ativação/inibição da enzima que foi purificada, e também determinar o conteúdo de carboidratos, os parâmetros cinéticos, identificar e analisar os aminoácidos que compõem a glucoamilase purificada.
- ✓ Verificar a capacidade de aplicação da amilase bruta produzida por *Aspergillus japonicus* no processo de branqueamento do papel reciclado.

3.1 Isolamento dos micro-organismos em estudo

Foram coletadas 12 amostras em diversas áreas de campo de diferentes fontes: Furto do cacau afetado pela doença vassoura-de-bruxa, folha de cacau afetada por praga, esterco bovino, caule de limoeiro, fruto de graviola afetado por praga, folhagem em decomposição, cogumelo, grão de café em decomposição, casca de eucalipto, folha de seringueira afetada por praga, palha de coco, casca de jaqueira afetada por fungo. As amostras foram coletadas pela aluna de iniciação científica Luanne Caires da Cruz Souza e foram levadas ao laboratório para que os micro-organismos presentes nestes materiais pudessem ser cultivados. O isolamento dos fungos filamentosos foi realizado pelo método de plaqueamento onde foram inoculadas as cepas repetidamente em placas de Petri contendo meio de cultura constituído por farinha de aveia Quaker® 4% e ágar bacteriológico 2% (EMERSON, 1941) até que não houvesse dúvida de que apenas o fungo desejado estava em crescimento na placa. Posteriormente foram realizados testes de produção amilolítica e o melhor produtor foi o fungo *Aspergillus japonicus*, coletado na estância Ouro e Prata situada no Km 800 da BR 101, Município de Itamaraju, Bahia – Brasil, a partir de folhagem em decomposição.

3.2 Micro-organismo em estudo

A identificação dos fungos bons produtores foi realizada no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil. As cepas foram mantidas no laboratório em meio completo sólido de Aveia. Esses meios foram mantidos inclinados em tubos de ensaios, previamente autoclavados por 15 minutos a 1,5 atm. Os repiques foram realizados periodicamente, sendo mantidos a temperatura ambiente durante uma semana e, posteriormente, guardados em geladeira à 4°C.

3.3 Screening dos fungos filamentosos para atividade amilolítica e manutenção da cepa

Foram realizados testes para selecionar os melhores fungos para a produção de amilase. O screening foi realizado com todos os fungos isolados que foram cultivados em meio sólido, descrito por KHANNA *et al.* (1995) com 1% de amido a 30°C, pH 6,0, em condições estáticas, durante 4 dias. Os bons produtores de amilase foram identificados por meio de análise morfológica e observações microscópicas.

3.4 Inóculos

Para a realização do inóculo, culturas de *Aspergillus japonicus* foram raspadas e os esporos ressuspensos em água destilada esterilizada. Os esporos foram contados em uma câmara de Neubauer, onde se obteve, em média, uma solução que continha $1,77 \times 10^6$ esporos/mL. Um volume de um mililitro desta solução foi inoculado em 25 mL de meio líquido, em Erlenmeyers de 125 mL.

3.5 Meios de cultura líquidos

Foram testados cinco meios de cultura líquidos, sendo eles: CP (PEIXOTO *et al.*, 2003); SR (RIZZATTI *et al.*, 2001); ADAMS (ADAMS, 1990); KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995) e VOGEL (VOGEL, 1964).

Foram preparados 25 mL de cada meio e o pH foi ajustado para 6,0, sendo todos transferidos para um Erlenmeyer de 125 mL. Os meios líquidos depois de prontos foram autoclavados durante 15 minutos a uma pressão de 1,5 atm e a temperatura de 120°C.

3.6 Obtenção da massa micelial e do extrato extracelular

A massa micelial e o extrato extracelular foram obtidos após separação do meio de cultivo através de filtração a vácuo, com auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro Whatman nº1. O filtrado contendo as enzimas extracelulares foi então coletado, visando o estudo do complexo amilolítico extracelular do fungo. A massa micelial foi lavada com dois volumes de água destilada, prensada entre folhas de papel e mantida à 18°C para ser, posteriormente, macerada e ressuspensa em 10 mL de solução tampão de acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. Essa suspensão foi submetida a uma centrifugação a 8.000g durante 15 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante contendo as enzimas intracelulares foi então separado, objetivando-se estudar o complexo amilolítico intracelular do fungo.

3.7 Métodos de determinação da atividade enzimática

3.7.1 Dosagem da atividade enzimática pelo método sacarificante (reação com DNS)

A determinação da atividade enzimática foi realizada, utilizando-se como

substrato o amido Reagen[®], proveniente da fécula de batata, através dos açúcares redutores formados durante a incubação da enzima com o substrato em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. O reagente utilizado foi o DNS (ácido 3',5'-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). A mistura de reação constituiu-se de uma solução de 250 µL de substrato e 250 µL da enzima. Após incubação da mistura, na temperatura ótima de reação (55°C), alíquotas de 100 µL foram retiradas nos tempos desejados e adicionadas em tubos contendo 100 µL de DNS. Posteriormente à coleta de todas as alíquotas, os tubos foram aquecidos em banho, fervendo por 5 minutos e após o resfriamento, adicionou-se 1 mL de água destilada. O branco consistiu de uma alíquota de 100 µL da mistura de reação, adicionada imediatamente a 100 µL de DNS. As leituras foram realizadas a 540 nm em leitor de microplacas. O método foi previamente padronizado por uma curva padrão de glicose (0,1 a 1,0 mg/mL), sendo a unidade de atividade (U) definida como a quantidade de enzima que hidrolisa um µmol de substrato por minuto, nas condições de ensaio. A atividade total (U_{total}) = $\mu\text{mol/mL} \times \text{volume do filtrado}$. A atividade específica foi expressa em U_{total}/mg proteína total do extrato extracelular.

3.7.2 Determinação da atividade segundo reação de acoplamento com glicose oxidase

A quantificação da glicose residual resultante da hidrólise da maltose pela amilase foi determinada pelo método de acoplamento por glicose oxidase descrito por BERGMAYER & BERNT (1974). A glicose oxidase foi obtida a partir de “kits” de análises clínicas (LABTEST do Brasil[®]).

A mistura de reação constituída de 100 µL do substrato maltose 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e 100 µL de amostra enzimática foi incubada na temperatura ótima da enzima (55°C) conforme padronizado em experimentos anteriores. Em tempos pré-determinados ferveu-se a mistura de reação por 5 minutos, sendo os tubos de ensaios vedados com Parafilm[®]. As amostras foram resfriadas, adicionadas de 500 µL do reagente glicose oxidase (LABTEST[®]) e incubadas a 37°C por 30 minutos. O tempo zero de reação, em todos os ensaios constituiu-se, previamente, da enzima fervida, da adição de substrato, assim como os 500 µL do reagente glicose oxidase (LABTEST[®]) e incubação a 37°C por 30 minutos.

A leitura da absorbância foi realizada a 505 nm em leitor de microplacas Packard SpectraCount[™]. Para este método, utilizou-se como unidade de atividade (U) a

quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de glicose por minuto, nas condições de ensaio.

3.8 Dosagens de proteínas

O método que foi utilizado para realizar a dosagem das proteínas obtidas nas soluções intra e extracelulares foi o descrito por BRADFORD (1976), que utiliza 20 mg/mL de albumina de soro bovino como padrão (BSA).

A amostra pura (100 μL) foi acrescida de 1 mL de uma solução preparada anteriormente, composta de 100 mg de Coomassie G-250; 100 mL de Ácido fosfórico 85% e 50 mL de Etanol 95%, e diluídos em 1 L de Água destilada. Após 5 minutos foi feita a leitura no leitor de microplacas Packard a 595 nm e os resultados obtidos foram expressos em mg de proteína/mL de amostra. A proteína total (U totais) = mg totais, ou seja, mg de proteína x volume da amostra ressuspensa.

Este método foi previamente padronizado, em leitor de microplacas, por uma curva de concentração de albumina de soro bovino (BSA). Foi preparado uma solução de BSA 20 mg/mL e a partir desta solução foram feitas diluições seriadas em água para a obtenção das demais concentrações (5,0 mg/mL; 4,5 mg/mL; 4,0mg/mL; 3,5 mg/mL; 3,0 mg/mL; 2,5 mg/mL; 2,0 mg/mL; 1,5mg/mL; 1mg/mL e 0,5mg/mL), tendo um volume total de 100 μL sendo acrescentado tampão acetato de sódio 100 mM para completar este volume.

O branco que continha apenas água, não foi adicionado a albumina de soro bovino (BSA). Após estes procedimentos foi adicionado 1 mL do reagente BRADFORD, e após 5 minutos foi feita a leitura no leitor de microplacas Packard a 595 nm e os resultados obtidos foram expressos em mg de proteína/mL de amostra. A proteína total (U totais) = mg totais, ou seja, mg de proteína x volume da amostra ressuspensa.

3.9 Determinação do tempo de cultivo e condição física para crescimento e produção amilolítica pelo fungo *A. japonicus*

O fungo foi incubado em meio líquido, descrito por KHANNA *et al.* (1995) suplementado com 1% de amido de batata Sigma® como fonte de carbono, a 30°C e pH 6,0. O fungo foi incubado durante um período de 1 a 9 dias, em condições estáticas numa incubadora microbiológica com uma umidade relativa de cerca de 70%, durante 1 a 6 dias em agitação, em um shaker a 120 rpm. Todos os dias, uma amostra de cada

condição (estática e a agitação) foi removida da incubadora, e submetida a uma filtração a vácuo. A atividade enzimática e as proteínas foram quantificadas, segundo os itens 3.7.1 e 3.8 respectivamente com a enzima extracelular.

3.10 O efeito do pH inicial do meio de cultivo na produção da enzima pelo fungo *A. japonicus*

O fungo selecionado foi incubado em meio líquido, descrito por KHANNA *et al.* (1995), suplementado com amido de batata Sigma® 1% como fonte de carbono, a 30°C utilizando os seguintes valores de pH de 3,5; 4,0, 4,5, 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 e 9,5; durante 4 dias de crescimento em condição estática. As amostras foram submetidas à filtração a vácuo. A quantificação da atividade enzimática e de proteínas foi realizada com a enzima extracelular conforme descrito nos itens 3.7.1 e 3.8, respectivamente.

3.11 Efeito da temperatura e de fontes de nitrogênio no crescimento e produção enzimática pelo fungo *A. japonicus*

O fungo foi incubado nas temperaturas de 25°, 30°, 35° e 40°C em meio líquido, descrito por KHANNA *et al.* (1995) com extrato de levedura a 0,1% em cada temperatura experimental e numa segunda parte deste experimento, o fungo foi incubado com as mesmas condições, mas com peptona 0,1% como fonte de nitrogênio em todas as temperaturas, durante 4 dias, sob condições estáticas, com pH 5,5. As amostras foram submetidas à filtração a vácuo. A atividade enzimática e as proteínas foram quantificadas apenas para as amilases extracelulares conforme descrito nos itens 3.7.1 e 3.8, respectivamente.

3.12 Cultivo de *A. japonicus* em diferentes fibras e resíduos alimentícios

A. japonicus foi cultivado em meio líquido descrito por KHANNA *et al.* (1995), contendo as seguintes fontes de carbono na concentração de 1%: farinha de mandioca, flocos de centeio, farinha de aveia, casca e bagaço de laranja, sabugo de milho, milho triturado, farelo de trigo, glicose e casca de amendoim, com 0,1% de peptona no lugar do extrato de levedura, durante 4 dias de crescimento na temperatura de 25°C e com pH 5,5 conforme padronizado em experimentos anteriores. As amostras foram submetidas a uma filtração a vácuo a atividade enzimática e as proteínas extracelulares foram quantificadas conforme descrito nos itens 3.7.1 e 3.8, respectivamente.

3.13 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de amilase por *A. japonicus*

O fungo foi incubado em meio líquido, descrito por KHANNA *et al.* (1995), suplementado com diferentes fontes de carbono na concentração de 1%, em condição estática, durante 4 dias, a 25°C e com pH 5,5. As diferentes fontes de carbono utilizadas foram: amilopectina, amido de milho, glicose, maltose, pectina, amilose de batata, amido de batata Sigma®, rafinose, amido de arroz, amido da Merck™ e amido da Reagen®. O controle utilizado foi composto por meio líquido descrito por KHANNA *et al.* (1995), suplementado com peptona 0,1% e sem nenhuma fonte de carbono adicionada. As amostras foram submetidas à filtração a vácuo e as medições de atividade enzimáticas e de proteínas foram realizadas com a enzima extracelular conforme descrito nos itens 3.7.1 e 3.8, respectivamente.

3.14 Efeito de diferentes concentrações de maltose e amido de batata na produção de amilase por *A. japonicus*

A fim de encontrar a melhor concentração de fonte de carbono no cultivo de *Aspergillus japonicus* foram feitos meios de cultura KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995) usando amido de batata Sigma® e maltose como uma fonte de carbono, cada um dos meios foram preparados em diferentes concentrações que foram de 0,5-2,0% de amido de batata Sigma® e de 0,1-2,0% de maltose. Estes meios foram cultivados durante 4 dias a 25°C de acordo com o que foi padronizado anteriormente.

Depois de quatro dias, o extrato extracelular foi filtrado e a atividade enzimática foi quantificada de acordo com o método descrito por MILLER (1959) conforme descrito no item 3.7.1, este método foi utilizado para a determinação da atividade dos extratos filtrados que foram produzidos nos meios com diferentes concentrações de amido de batata Sigma®.

Os extratos extracelulares com diferentes concentrações de maltose tiveram sua atividade enzimática quantificada de acordo com o método de acoplamento de glicose-oxidase conforme descrito no item 3.7.2.

3.15 Determinação do complexo amilolítico e análise dos carboidratos hidrolisados em cromatografia em camada fina de sílica (TLC)

Para a identificação do tipo de enzima amilolítica extracelular produzido pelo micro-organismo sob estudo foi realizada uma cromatografia ascendente em camada fina de sílica, de acordo com o método descrito por FONTANA *et al.* (1988). Para isso foi

utilizada uma TLC de 10 centímetros x 20 DC-Alufolien Kieselgel 60, sem indicador de fluorescência, da marca Merck.

Glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentaose, na concentração de 1% foram usadas como padrões. As amostras foram incubadas com os substratos de reação amido Reagen[®] e maltose na concentração de 1% na temperatura de 55°C durante um tempo predeterminado de 5, 10 e 20 minutos. Após o fim do tempo predeterminado de reação as amostras foram fervidas durante 5 minutos. É importante observar que o tempo zero foi definido anteriormente pela ebulição da enzima durante 5 minutos e em seguida foram colocados os substratos.

As reações foram aplicadas na TLC totalizando 5 µL de volume aplicado. Duas corridas com uma mistura de butanol, etanol e água (5:3:2) foram feitas na placa e subsequentemente revelada com uma mistura composta por 0,2% de ácido orcinol-ácido sulfúrico-metanol (1:9). A revelação foi realizada por pulverização dessa mistura na placa. Depois de seca, foi levada a incubadora microbiológica com uma temperatura de 100°C, até que aparecesse as bandas correspondentes aos produtos de hidrólise do amido Reagen[®] ou da maltose.

3.16 Mutações morfológicas do fungo *Aspergillus japonicus* induzidas por luz ultravioleta

O fungo foi cultivado no meio sólido KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995), pH 5,5, com amido 1%, incubado a 30°C, por 4 dias. Após o crescimento da cultura os conídios foram raspados e ressuspensos em 10 mL de água destilada. A solução de conídios resultante foi distribuída em uma placa de Petri, e posicionada a 16 cm de luz ultravioleta *germicidal light* G15T8. O controle foi feito com uma cepa que não teve contato com a luz UV. O experimento prosseguiu com a retirada de alíquotas de 5 em 5 minutos, totalizando 40 minutos de exposição. As alíquotas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio sólido KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995) pH 5,5, com amido 1%. Estas foram incubadas a 30°C, por 4 dias. O crescimento e as alterações morfológicas dos fungos foram documentados por imagens digitalizadas.

3.17 Efeito da indução de mutações no fungo *Aspergillus japonicus* visando aumento da produção de amilases

As cepas mutantes foram ressuspensas em 10 mL de água destilada e inoculadas em meios líquidos KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995), pH 5,5, com amido 1%. Após 4

dias de crescimento, a 30°C, a atividade da amilase foi determinada com o reagente DNS e as proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD conforme descrito anteriormente nos itens 3.7.1 e 3.8, respectivamente.

3.18 Efeito da temperatura na atividade da glucoamilase bruta e purificada produzida pelo fungo *A. japonicus*

A temperatura ótima de ensaio da enzima **bruta** foi determinada através da incubação da enzima com o substrato amido Reagen[®] 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 em diferentes temperaturas que foram de 30° a 80°C, com variação de 10°C. A temperatura ótima de ensaio da enzima **pura** foi determinada através da incubação da enzima com o substrato amido Reagen[®] 1% em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 em diferentes temperaturas que foram de 30° a 80°C, com variação de 5°C. As dosagens enzimáticas foram realizadas pela quantificação dos açúcares redutores através de DNS conforme descrito no item 3.7.1.

3.19 Efeito da temperatura na estabilidade da glucoamilase bruta, mutada e purificada produzida pelo fungo *A. japonicus*

Analizou-se a estabilidade da enzima **bruta** em diferentes temperaturas, com o substrato amido Reagen[®] 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, na faixa de 30° a 80°C, com intervalos de 10°C, durante uma hora de incubação, bem como por diferentes tempos nas temperaturas de 40° a 50°C. A dosagem enzimática foi realizada na temperatura ótima de 50°C.

A estabilidade da enzima produzida pelo fungo exposto à **luz ultravioleta** foi analisada com o substrato amido Reagen[®] 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, em diferentes temperaturas, na faixa de 50°C a 60°C, com intervalos de 5°C, durante uma hora de incubação, sendo retiradas alíquotas para dosagem na temperatura ótima de 50°C de 15 em 15 minutos.

A estabilidade da glucoamilase **purificada** foi analisada com o substrato amido Reagen[®] 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, em diferentes temperaturas, variando de 45° a 55°C com intervalos de 5°C durante cinco horas de incubação. A dosagem enzimática foi realizada na temperatura ótima de 65°C.

Manteve-se as enzimas livres de substrato em banho-maria, nas temperaturas e tempos pré-determinados para o processamento da reação. Após o período de incubação, as enzimas foram colocadas em banho de gelo, e em seguida, efetuou-se a incubação das

enzimas com o substrato amido Reagen[®] na concentração de 1% e as dosagens das atividades enzimáticas foram realizadas, de acordo com a metodologia de DNS conforme descrito no item 3.7.1, nas temperaturas ótimas de cada amostra conforme foram anteriormente determinadas.

3.20 Efeito do pH na atividade da glucoamilase bruta e purificada produzida pelo fungo *A. japonicus*

O pH ótimo da atividade da amilase **bruta** foi determinado por uma solubilização do substrato amido Reagen[®] 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, para os pH de 4,0 a 6,0, fosfato de sódio 100 mM para os pH de 6,5 a 7,5 e bicarbonato de sódio 100 mM para os pH 8,0 a 10,0 com intervalos de 0,5.

O pH ótimo da glucoamilase **pura** foi determinado utilizando-se amido Reagen[®] 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, para os pH de 4,0 a 6,0, em intervalos de 0,5 e tampão fosfato de sódio 100 mM para os pH de 6,5 e 7,0. Posteriormente, realizou-se a dosagem enzimática na temperatura ótima da enzima bruta (55°C) e purificada (65°C) que foram anteriormente determinadas, de acordo com a metodologia de DNS conforme descrito no item 3.7.1.

3.21 Efeito do pH na estabilidade da glucoamilase bruta e purificada produzida pelo fungo *A. japonicus*

A estabilidade da amilase **bruta** foi analisada em diferentes pH, incubando-a em tampão acetato de sódio 100 mM, para os pH de 4,0 a 6,0, fosfato de sódio 100 mM para os pH de 6,5 a 7,5 e bicarbonato de sódio 100 mM para os pH 8,0 a 10,0, com intervalos de 0,5 entre eles, durante 1 hora em banho de gelo.

A estabilidade da glucoamilase **pura**, em diferentes valores de pH, foi ensaiada pela incubação dela em tampão citrato de sódio 100 mM, para os pH de 3,0 a 4,0, tampão acetato de sódio 100 mM, para os pH de 4,5 a 5,5, tampão citrato de sódio 100 mM, para o pH 6,0, e tampão fosfato de sódio 100 mM, para o pH de 6,5 até 8,0 com intervalos de 0,5 entre eles, por 5 horas em banho de gelo.

Em seguida, 300 µL de amostra foi removida (Enzima + Tampão) e adicionou-se 300 µL do substrato Amido Reagen[®] 1%, em tampão acetato de sódio 100 mM e pH 5,0, e realizou-se as reações enzimáticas nas temperaturas ótimas da glucoamilase **bruta** e **purificada**, sendo de 55 e 65°C, respectivamente, de acordo com a metodologia de DNS conforme descrito no item 3.7.1.

3.22 Processo de purificação da amilase produzida por *Aspergillus japonicus*

Para os testes de purificação, 1000 mL do extrato bruto da enzima, que foi cultivada em meio líquido descrito por KHANNA *et al.* (1995), com amido Reagen[®] 1% pH 5,5 durante 4 dias, a 25°C, foi dialisado contra água destilada por cerca de 15 horas a 4°C e, em seguida, aplicado em uma coluna de troca iônica DEAE-celulose (17,5 X 2,0 cm) que foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM e em pH 7,5. Após eluição da amostra foi passado um volume de 600 mL do mesmo tampão ("lavagem"), e depois um gradiente contínuo de 200 mL de cloreto de sódio de 0-1 M dissolvido no mesmo tampão para remover as proteínas adsorvidas à resina. Frações de 4 mL/tubo da amostra eluída, do lavado e do gradiente foram recolhidas. Este processo de purificação foi feito com um fluxo contínuo de 4,0 mL/min. O "pool" de atividade amilolítica eluída apenas na primeira e única coluna de filtração que foi a DEAE-celulose, foi combinado, dialisado contra 4 L de água destilada e utilizado no processo de caracterização bioquímica. A amostra pura foi mantida a 4°C.

3.23 Eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A glucoamilase **purificada** produzida por *A. japonicus* teve a sua massa molecular determinada por SDS-PAGE. A eletroforese foi realizada sob um pH alcalino (8.9) na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio) conforme procedimento descrito por LAEMMLI (1970). Foi utilizado um gel de poliacrilamida na concentração de 10% (p/v) polimerizado em placas de vidro (10 x 10 cm). A preparação das amostras foi feita diluindo-a em tampão de amostra com SDS na proporção 1:1, a qual é composta de glicerol 20% (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v) β-mercaptoetanol 10% (v/v) e Tris HCl 0,12 M em pH 6,75. Em seguida, a amostra foi fervida durante 5 minutos. A eletroforese foi realizada a temperatura ambiente em um tampão que consiste de Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1% (p/v) em pH 8,3. A corrente aplicada foi de 40 mA e 120 V. O marcador de massa molecular usado foi o Precision Plus Protein[™] Standards que possui proteínas que vão de 250 e 10 kDa e é produzido pela Bio-Rad[®].

A massa molecular da amilase foi estimada fazendo um gráfico em que foram relacionados logaritmo da massa molecular dos padrões de massa molecular usados e o coeficiente de migração relativa (Rf) da proteína. O Rf foi obtido pela razão da migração da proteína e a coloração do azul de bromofenol obtida no gel.

3.24 Eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE)

Os géis de poliacrilamida foram preparados em condições não-desnaturantes, a fim de verificar o grau de pureza da glucoamilase. Para isto, foi usada a metodologia previamente descrita por DAVIS (1964). A eletroforese foi realizada em um pH alcalino (8,9) em um gel de poliacrilamida a 10% (p/v) polimerizado em placas de vidro (10x10 cm). A amostra foi preparada com 15 µL de enzima, 5 µL de tampão de corrida, 4 µL de azul de bromofenol e 1 µL de glicerol. A eletroforese foi efetuada à temperatura ambiente num tampão consistindo em Tris-HCl 50 mM e glicina 36 mM, sob uma corrente elétrica de 40 mA e 120V.

3.25 Gel atividade

A fim de identificar a atividade amilolítica foi realizada uma eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE) de acordo com o item 3.24. No final da migração da proteína, o gel foi imerso numa solução de amido a 1% (p/v) em tampão de acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, e incubado na temperatura de 55°C durante 2 horas. Subsequentemente, o gel foi imerso em uma solução de iodo e iodeto (I₂ a 10 mM e KI 14 mM), que formam complexos de adsorção com o amido. No caso da amilose que tem conformação helicoidal, a cor azul intensa formada é o resultado de adsorção do iodo (na forma I) nessas cadeias (TEITELBAUM *et al.*, 1980) enquanto que o complexo iodo-amilopectina produz uma cor violeta, sendo de forma irreversível. Assim, o amido presente no gel de poliacrilamida foi corado e onde a enzima amilolítica hidrolisou o amido não há nenhuma coloração.

3.26 Método de coloração por Coomassie e método de coloração por prata

Para a revelação dos géis foi usado o Coomassie Blue, composto por uma solução de 35 mL de ácido fosfórico, 170 g de sulfato de amônio, 500 mL de metanol puro, 2 g de Coomassie Brilliant Blue R-250 e água destilada para completar 1 L de solução. Após a eletroforese, os géis foram incubados em Coomassie Brilliant Blue durante 12 horas e o descoramento foi realizado utilizando uma solução de "destain" que consiste de 65 mL de água destilada, 25 mL de etanol e 8 mL de ácido acético glacial até que as bandas aparecessem. Os géis também foram incubados numa solução de coloração com prata, como descrito por BLUM *et al.* (1987).

3.27 Hidrólise de diferentes substratos amilolíticos pela glucoamilase purificada

A fim de analisar a hidrólise de diferentes substratos pela ação da glucoamilase **purificada** foi realizado um ensaio de atividade enzimática com 1% de cada um dos seguintes substratos: monossacarídeo tal como o metil- α -D-glucopiranosídeo, dissacarídeos tais como a maltose, sacarose e trealose. Polissacarídeos, tais como amido Reagen[®], amido de milho Sigma[®], amido de batata Sigma[®], amido de batata hidrolisado Sigma[®], amido de arroz Sigma[®], glicogênio, amilopectina, amilose, β -ciclodextrina e α -ciclodextrina. Bem como o substrato sintético p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (PNPG- α).

A quantificação da atividade enzimática foi realizada de acordo com a metodologia de DNS como descrito no item 3.7.1, os substratos dissacarídeos, que contém açúcares redutores, foram medidos de acordo com o método de acoplamento de glicose-oxidase como descrito no item 3.7.2, devido à alta coloração provocada no tempo zero da reação quando se utiliza o método de DNS.

3.28 Efeito de agentes químicos na atividade da glucoamilase purificada

Com o intuito de avaliar qual dos agentes ativa e/ou inibe a atividade da glucoamilase **purificada**, foram testados diferentes sais: NaCl; NH₄Cl₂; BaCl₂; MnCl₂.4H₂O; CoCl₂; MgCl₂.6H₂O; CaCl₂; KH₂PO₄; KCl, e Pb(C₂H₃O₂)₂.3H₂O, e também β -mercaptoetanol e EDTA. A quantificação da enzima foi realizada com a combinação das amostras de enzima, em conjunto com os compostos a uma concentração de 5 a 10 mM.

As concentrações de 15 e 20 mM foram usados, além das concentrações de 5 e 10 mM, para os experimentos com o agente químico MnCl₂. As amostras (composto + enzima) foram misturadas com 300 μ L de amido Reagen[®] 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, para a determinação da atividade enzimática. O branco de cada reação foi determinado através da fervura da enzima e, a posterior adição do composto e do substrato amido Reagen[®]. As quantificações de atividade enzimática foram realizadas de acordo com a metodologia de DNS.

3.29 Determinação do conteúdo de carboidratos das enzimas

O conteúdo de carboidrato da amilase **bruta** e da glucoamilase **purificada** foram determinados através do método do fenol-sulfúrico segundo DUBOIS *et al.* (1956).

Consistiu da incubação de 400 μ L enzima adicionada de 10 μ L de uma solução de fenol 80% e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado sob gelo. Após 10 minutos em repouso, esta mistura foi colocada em banho a 30°C por 15 minutos. As leituras da absorbância foram feitas em 490 nm. O método foi padronizado através de uma curva padrão de manose, nas concentrações de 0 a 1,0 mg/mL.

3.30 Determinação das constantes cinéticas

Com o objetivo de analisar os parâmetros cinéticos, K_m e $V_{m\acute{a}x}$, da glucoamilase **purificada** foi utilizado o substrato amido Reagen[®] diluído em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 em 17 diferentes concentrações: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0. Os ensaios foram realizados em 5 diferentes tempos (2, 4, 6, 8, 10 minutos) sob as condições ótimas reacionais estabelecidas em experimentos anteriores (pH 5,0 e 65°C, respectivamente). Os dados coletados foram expressos segundo as representações gráficas de MICHAELIS-MENTEN (1913) e de LINEWEAVER-BURK (1934), com o intuito de avaliar a concordância dos valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ encontrados.

3.31 Identificação dos aminoácidos

A glucoamilase **purificada** foi enviada ao Laboratório de Enzimologia Molecular do CTBE - Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, CNPEM em Campinas - SP, conforme acordo estabelecido. Esta obteve partes sequenciadas por espectrometria de massas, sendo obtidas por ação de tripsina sob as amostras purificadas.

Os resultados foram baseados nos dados obtidos pelo programa “Mascot Search Results”, e a base de dados usada para a identificação da enzima foi a do “National Center of Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.32 Desagregamento do papel e determinação da consistência da polpa celulósica

Para início da metodologia, 200 g de folhas de papel sulfite usadas e de folhas de revista foram desagregadas, cada uma, em 4 L de água utilizando-se um “mixer”, visando a homogeneização da amostra. Após esta homogeneização, a consistência da polpa formada foi determinada. A consistência da polpa é a porcentagem de massa celulósica absolutamente seca a partir da polpa úmida. O objetivo é conhecer esse percentual, cujo valor obtido é utilizado no preparo da polpa para o biobranqueamento.

Para isto, aproximadamente 2 g da amostra homogeneizada foram transferidas para o prato ou placa da balança de umidade do tipo “Moisture Analyzer” produzida pela A&D Weighing. O prato ou placa com a amostra foi colocado na balança que realizou a secagem da amostra a 140°C por 25 minutos quantificando a porcentagem de massa seca existente na amostra. Posteriormente, a quantidade total de polpa de celulose foi pesada e a quantidade total de amostra seca foi determinada.

3.33 Tratamento enzimático da polpa celulósica

Para o tratamento da polpa de celulose foram usadas as amilases produzidas em meio líquido KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995). Foram usadas 10 e 20 g de polpa seca, com pH de 5,5. À polpa, foram adicionadas amilases a 20 U/g polpa seca. As misturas de amilase e polpa celulósica com as consistências pré-determinadas de 14% foram colocadas em sacos de polietileno, vedados e incubados a 55°C, por 180 minutos.

Após este tratamento as polpas foram lavadas com água de torneira em abundância, e realizados testes de alvura. Os resultados foram comparados com análises de amostras contendo a enzima desnaturada por fervura (controle) com o mesmo pH.

3.34 Determinação de alvura da polpa celulósica

Para o ensaio, foram usados somente reagentes de grau analítico reconhecido e água destilada ou de igual pureza, livre de materiais coloridos e íons ferro e cobre. Foi requerida uma quantidade suficiente de celulose para formar no mínimo quatro folhas de ensaio, de gramatura aproximada de 200 g/m² (calculado sob base seca). Para preparação das folhas de ensaios, foi colocada em um béquer uma quantidade suficiente de amostra para formar uma folhinha, adicionado 1 mL de solução de EDTA 5g/l e homogeneizada a suspensão de celulose. O pH da suspensão de celulose foi ajustado entre 4,0 e 5,5. A alvura de celulose não branqueada é afetada pelo pH. Por esta razão, a medida de alvura deve ser realizada sob folhas de ensaios formadas de suspensões com pH entre 4,0 e 5,5.

A suspensão de celulose foi colocada no funil de Büchner, montado com tela de aço e papel de filtro, em seguida acionado o sistema de vácuo para a formação da folhinha. A folhinha foi retirada do funil e colocadas 2 folhas de papel mata-borrão na face inferior e na face superior. Colocou-se três folhas de papel filtro, uma placa de fórmica e 2 folhas no papel mata-borrão. As folhas foram prensadas por aproximadamente 120 segundos a $\pm 0,35$ Mpa, retiradas dos papéis mata-borrão e levadas à estufa, com circulação de ar forçada a $75 \pm 50^\circ\text{C}$ por 20 minutos. Após a secagem, foi retirado o papel de filtro da

amostra, dobrada a folhinha ao meio e outra vez em um quarto, cortou-se com auxílio de uma tesoura para obter 4 folhinhas com tamanho suficiente para cobrir a área de medição.

Expressou-se o fator de reflectância intrínseca média da celulose em percentagem, com aproximação de 0,5% do fator de reflectância conforme Norma ISO 2469-1980, determinação do fator de reflectância no azul difuso (alvura ISO) da celulose, nos aparelhos Datacolor Elrepho 2000, 3000 e Elrepho SE 070R.

3.35 Análises estatísticas

Todos os dados foram realizados de forma independente em triplicata. A média das proteínas e da atividade enzimática foram calculadas a partir das triplicatas e mostraram resultados consistentes. O desvio padrão foi inferido usando-se o Excel 2007, com as médias obtidas anteriormente. A fórmula do desvio padrão utilizada foi:

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

nessa fórmula o **x** representa a média da amostra e o **n** representa o tamanho da amostra.

IV. RESULTADOS

Parte 1

Prospecção de fungos filamentosos para produção de amilase: Padronização das condições de cultura de *Aspergillus japonicus*

(Trabalho publicado no *British Biotechnology Journal* – Apêndice 1)

4.1 Isolamento dos Fungos e Estudo do Crescimento em diferentes temperaturas

Doze amostras foram coletadas a partir de uma área rural no estado da Bahia, Brasil e vinte cepas fúngicas foram completamente isoladas usando meio de cultura sólido de farinha de aveia (EMERSON, 1941) a 30°C (Figura 01). Todos os fungos isolados foram colocados em diferentes temperaturas (30, 35, 40 e 45°C), e todos eles cresceram a 30°C, 3 deles cresceram muito bem a 35°C, mas oito deles apresentaram crescimento lento nesta condição. Em geral, o crescimento dos fungos diminuiu a 40°C, exceto pelo fungo 5D, que mostrou alterações morfológicas na sua esporulação, bem como no crescimento. Curiosamente, a 45°C apenas o fungo denominado 5B foi capaz de crescer, mas, nas temperaturas de 30, 35 e 40°C, ele obteve apenas um pequeno crescimento. O fungo 4A (Figura 06) mostrou um crescimento micelial máximo depois de 48 horas a 30, 35 e 40°C, ocupando toda a placa, sendo, portanto considerado um fungo termotolerante. Além disso, os fungos 3B e 6B mostraram um grande crescimento a 30°C e 35°C, e um pequeno crescimento a 40°C, o que é característico de fungos mesófilos (MADIGAN *et al.*, 2003). O menor crescimento a 30°C, foi observado com o fungo 10A. Os fungos 12B, 12F, 8A, 7A, 3A, e 8B mostraram um grande crescimento a 30°C e 35°C, mas não cresceram a 40°C e 45°C, já os fungos 12A, 11A, 5B, 5A, 9A, 9E, 12E, e 5H obtiveram um bom crescimento apenas a 30°C e não foi possível verificar crescimento em outras temperaturas. Estes dados mostraram que a maior parte desses fungos são mesófilos (MADIGAN *et al.*, 2003).

Figura 06. Crescimento dos fungos isolados em diferentes temperaturas com meio de cultura sólido.

Como mostrado na Tabela 01, alguns fungos apresentaram um grande crescimento: 11A, 4A, 7A e 6B, tendo um halo com tamanho igual ou superior a 2,5 cm. Porém, o fungo 11A, não demonstrou um bom crescimento a 35°C, assim como os fungos 7A e 6B que obtiveram um ligeiro decréscimo em seu crescimento nesta temperatura, com um halo em torno de 1,0 centímetro. O fungo 4A manteve o crescimento, apresentando um halo com 3,0 cm a 40°C. O fungo 6B apresentou um halo de crescimento de cerca de 1,0 cm a 40°C, mas a 45°C não apresentou crescimento. A partir destes resultados pode-se concluir que a maioria dos fungos isolados são mesófilos e alguns deles podem ser considerados como termotolerantes, porque crescem a temperaturas mais elevadas do que aquelas descritas na literatura (MADIGAN *et al.*, 2003). Esses dados foram importantes para mostrar alguns aspectos relacionados com a biologia e fisiologia dos fungos filamentosos e também demonstram a necessidade de determinar a temperatura ótima para o crescimento de fungos com o objetivo de sua aplicação biotecnológica.

Tabela 01. Análise do crescimento dos halos (cm) dos fungos cultivados durante 48 horas.

Fungos	Crescimento do halo micelial (cm)			
	30°C	35°C	40°C	45°C
12 B	1.00	1.00	0.30	0.00
12 A	1.00	0.00	0.00	0.00
6 D	2.30	1.10	0.80	0.00
11 A	2.80	1.00	0.30	0.00
10 A	0.50	0.00	0.00	0.00
5 B	1.00	0.30	0.30	2.00
5 A	1.00	0.30	0.50	0.00
3 B	2.50	2.00	0.30	0.00
9 A	1.50	0.30	0.30	0.00
4 A	3.00	3.00	3.00	0.00
9 D	1.00	0.30	0.30	0.00
12 F	1.30	1.00	0.00	0.00
8 A	1.40	1.00	0.30	0.00
7 A	1.60	1.40	0.30	0.00
12 E	2.00	0.50	0.00	0.00
3 A	2.50	0.50	0.30	0.00
5 D	1.90	1.00	2.00	0.00
5H	2.50	0.30	0.00	0.00
6 B	2.90	2.80	0.80	0.00
8 B	1.80	1.00	0.00	0.00

4.2 Screening dos fungos filamentosos

A seleção dos micro-organismos que produzem bons níveis de enzimas amilolíticas, constituiu-se um passo importante deste trabalho. Para isso, foram realizadas fermentações submersas utilizando o meio líquido descrito por KHANNA *et al.* (1995), em condições estáticas a 30°C por 4 dias, com pH inicial 6,0. Analisando a Tabela 02, é possível verificar que os fungos 12E e 6B apresentaram a maior produção de amilase ($47,93 \pm 1.94$ e $42,73 \pm 2.06$ U/mL, respectivamente). Após o “screening” somente os fungos com níveis de produção mais elevados de amilase foram identificados por análise morfológica. Além disso, é possível dizer que, de acordo com a Tabela 2, as amilases produzidas pelo fungo 6B causaram a acidificação do meio, o que implica que essas enzimas tenham atividade amilolítica máxima em pH baixo. As enzimas produzidas pelo fungo 12E causaram um ligeiro decréscimo no pH o que implica que essa amilase tenha uma atividade enzimática máxima entre o pH 5,0 e 6,0.

Tabela 02. Determinação do pH final e das amilases intra e extracelulares produzidas por *A. japonicus*.

Fungo	pH	Atividade Enzimática (U/mL)		Proteínas (mg/mL)	
		Intracelular	Extracelular	Intracelular	Extracelular
12 B	2.45	1.77 (± 0.12)	1.65 (± 0.32)	0.51 (± 0.06)	0.14 (± 0.04)
12 A	5.25	1.46 (± 0.10)	0.82 (± 0.05)	0.19 (± 0.03)	0.09 (± 0.02)
6 D	3.20	0.69 (± 0.07)	1.14 (± 0.22)	1.15 (± 0.20)	0.06 (± 0.01)
11 A	2.22	7.11 (± 0.50)	12.38 (± 0.87)	0.94 (± 0.07)	0.13 (± 0.02)
10 A	3.65	0.76 (± 0.05)	0.12 (± 0.01)	0.78 (± 0.10)	0.24 (± 0.04)
5 B	4.98	0.82 (± 0.03)	0.63 (± 0.04)	0.50 (± 0.02)	0.18 (± 0.02)
5 A	3.85	3.04 (± 0.32)	0.57 (± 0.02)	0.15 (± 0.03)	0.12 (± 0.01)
3 B	2.62	1.01 (± 0.21)	1.58 (± 0.07)	0.20 (± 0.08)	0.21 (± 0.03)
9 A	3.40	0.88 (± 0.07)	6.15 (± 1.29)	0.34 (± 0.04)	0.14 (± 0.02)
4 A	2.90	3.11 (± 0.14)	14.47 (± 3.85)	0.21 (± 0.01)	0.15 (± 0.04)
9 D	3.0	2.03 (± 0.11)	3.11 (± 1.03)	0.18 (± 0.05)	0.23 (± 0.02)
12 F	2.52	1.90 (± 0.04)	7.04 (± 2.87)	0.33 (± 0.12)	0.18 (± 0.07)
8 A	5.55	3.42 (± 0.32)	7.04 (± 1.46)	0.09 (± 0.02)	0.31 (± 0.10)
7 A	3.23	4.06 (± 0.17)	2.47 (± 0.68)	0.23 (± 0.03)	0.23 (± 0.06)
12 E	5.45	38.09 (± 1.23)	47.93 (± 1.94)	0.59 (± 0.04)	0.29 (± 0.02)
3 A	5.55	2.34 (± 0.63)	3.49 (± 0.13)	0.24 (± 0.06)	0.10 (± 0.05)
5 D	2.43	3.15 (± 0.05)	6.15 (± 0.82)	0.34 (± 0.11)	0.14 (± 0.05)
5H	3.62	1.39 (± 0.19)	11.04 (± 1.16)	0.21 (± 0.07)	0.05 (± 0.01)
6 B	3.05	9.33 (± 1.76)	42.73 (± 2.06)	0.52 (± 0.02)	0.18 (± 0.04)
8B	3.26	5.65 (± 0.40)	7.93 (± 0.80)	0.09 (± 0.03)	0.10 (± 0.07)

O desvio padrão médio foi de ± 0.65 para a atividade enzimática e de ± 0.05 para as proteínas. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

De acordo com os resultados da Tabela 02, os fungos 12E e 6B, foram considerados os melhores produtores de amilase, os quais foram identificados por análise morfológica como *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus japonicus* Saito, respectivamente. Entretanto, *A. parasiticus* apresentou 37 % a mais de proteína extracelular do que *A. japonicus*, além disso, sabe-se também que ele apresenta toxicidade de acordo com OKOTH *et al.*, (2012) e, portanto, foi descartado, já que um dos possíveis alvos de aplicação deste trabalho poderia ser na indústria de alimentos. Deste modo, *A. japonicus* foi o fungo escolhido para os estudos posteriores, uma vez que nenhuma informação sobre a produção de toxinas tenha sido relatada na literatura de acordo com SPADARO *et al.*, (2012). Além disso, não existem muitos estudos sobre as aplicações das enzimas produzidas por *A. japonicus* nas indústrias, o que é o foco deste estudo.

4.3 Teste de diferentes meios de cultura para a produção de amilases pelo fungo *Aspergillus japonicus*

Foram realizadas fermentações submersas em cinco diferentes meios líquidos. A incubação foi feita na temperatura de 30°C e pH 6,0, sob condições estáticas, durante 4 dias de crescimento. Os meios CP (PEIXOTO *et al.*, 2003), KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995) e SR (RIZZATTI *et al.*, 2001) mostraram-se os melhores para a produção amilolítica pelo fungo *Aspergillus japonicus* (Tabela 03). O meio CP apresentou maior capacidade de induzir a produção de amilase pelo fungo, porém, levou também à produção de valores elevados de proteína por *A. japonicus*, o que diminuiu a atividade específica da amilase por ele produzida. Portanto, o meio KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995) foi selecionado, então, para a produção de amilase por *A. japonicus*, devido à menor quantidade de proteínas no filtrado, o que leva a uma atividade específica mais elevada e que facilita uma futura purificação da enzima por meio de procedimentos de cromatografia. A percentagem de atividade da amilase extracelular, em comparação com as atividades intracelulares foi de 95,5 % para o meio de KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995), 88 % no meio de CP e 87,5 % no meio SR (Tabela 03). A proteína secretada pelos fungos no meio de cultura é um parâmetro positivo para a aplicação industrial, uma vez que a enzima extracelular pode ser facilmente extraída e a maceração celular não é necessária. Portanto, o meio líquido KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995) foi escolhido como a melhor composição para a produção de amilase por *A. japonicus* apresentando menor quantidade de proteínas, tornando-se um resultado importante para executar processos cromatográficos que visam uma futura purificação da enzima.

Tabela 03. Produção de amilase pelo fungo *A. japonicus* utilizando diferentes meios de cultura

	Enzimas Extracelulares		Enzimas Intracelulares	
	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas (mg/mL)
SR	45.96 (± 0.76)	0.48 (± 0.06)	6.51 (± 0.43)	0.20 (± 0.02)
CP	46.82 (± 0.43)	0.69 (± 0.08)	6.27 (± 0.10)	0.30 (± 0.05)
VOGEL	37.67 (± 1.20)	0.21 (± 0.03)	4.88 (± 0.54)	0.34 (± 0.04)
ADAMS	29.45 (± 1.09)	0.21 (± 0.03)	2.71 (± 0.32)	0.23 (± 0.03)
KHANNA	46.35 (± 0.87)	0.25 (± 0.01)	2.24 (± 0.43)	0.13 (± 0.02)

O desvio padrão médio foi de ± 0.61 para a atividade enzimática e de ± 0.03 para as proteínas. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.4 Determinação do tempo de cultivo e condição física para crescimento e produção amilolítica pelo fungo *A. japonicus*

Após a padronização do meio de cultura, se fez importante verificar se o tempo de incubação (4 dias) e as condições físicas do cultivo (estático) que vinham sendo utilizadas eram as mais apropriadas para a produção amilolítica por *A. japonicus*. Para isso, o fungo foi incubado em meio de KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995) suplementado com amido de batata Sigma® 1 % como fonte de carbono, a 30°C e pH 6,0, durante um período de 1 a 9 dias numa estufa microbiológica (condição estática), com uma umidade relativa de cerca de 70 %, e por um período de 1 a 6 dias em “Shaker” (120 rpm, condição de agitação).

A atividade enzimática no meio em agitação demonstrou um decréscimo no 5º dia de experimento o que justificou a interrupção do experimento no 6º dia. Comparando as duas condições físicas, foi possível observar que a produção de amilase foi maior no estado estático, mas o fungo manteve aproximadamente a mesma atividade extracelular desde o 4º até o 9º dia de crescimento, sendo que os níveis máximos de atividade amilolítica foram observados no 4º dia de crescimento, sendo de 44.65 ($\pm 0,49$) U/mL, ao passo que na condição de agitação o máximo de produção de amilase foi obtida no 5º dia (35,85 U/mL $\pm 0,32$). A porcentagem de atividade enzimática extracelular em condições estáticas, com 4 dias de crescimento, foi de 75 %, enquanto que a atividade intracelular

foi de 25 % (Figura 07). De acordo com esses resultados, a condição estática e 4 dias de crescimento foram selecionados como ideais para a produção de amilase por *A. japonicus*.

Figura 07. Tempo de crescimento e produção amilolítica pelo fungo *A. japonicus* em condição (A) Estática e (B) Agitação.

A média do desvio padrão foi de ± 0.51 para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.5 Efeito do pH sobre a produção enzimática por *A. japonicus*

Verificou-se a influência do pH inicial do meio de cultivo para a produção de amilases por *A. japonicus* que foi cultivado por 4 dias em condição estática, a 30°C. Observou-se que o pH 5,5 foi o melhor pH inicial para a produção de amilase. No entanto, é importante mencionar que, em todos os meios de cultivo, o pH final foi cerca de 2,5-3,0, e a enzima não perdeu a sua atividade neste intervalo de pH. Dos pH 3,5 a 8,5, a atividade da amilase se manteve elevada, e a atividade máxima foi observada com o pH 5,5. Nenhuma queda significativa da atividade enzimática foi observada após este valor de pH, o que sugere uma maior tolerância em diferentes pH (Figura 08). De acordo com OYELEKE *et al.*, (2011), a atividade elevada de amilase em vários pH sugere uma natureza de aplicação ampla da amilase identificada.

Figura 08. Efeito do pH na produção de amilase por *A. japonicus*. A variação de pH considerada foi de 3.0 a 9.5.

A média do desvio padrão foi de ± 0.54 para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.6 Efeito da temperatura e de fontes de nitrogênio no crescimento e produção enzimática pelo fungo *A. japonicus*

Os níveis mais elevados de amilase foram observados quando o fungo foi cultivado a 25°C. A adição de peptona, em vez de extrato de levedura resultou num ligeiro aumento da atividade, o que sugere que as fontes de nitrogênio testadas não têm um efeito muito significativo sobre a produção da amilase.

No que se refere à temperatura, o fungo incubado a 25°C mostrou uma alta atividade amilolítica, sendo que os níveis enzimáticos foram 50% maiores do que as amilases produzidas quando o fungo foi incubado a 40°C (Figura 09). De acordo com MADIGAN *et al.*, (2003) correlacionando a temperatura de crescimento e produção com o local de colheita, pode-se dizer que *A. japonicus*, que foi isolado a partir de solo, tendo uma temperatura ótima de crescimento e produção próxima da temperatura ambiente, pode ser considerado um micro-organismo mesófilo e suas enzimas extracelulares podem ser termotolerantes, resultado este que foi confirmado, durante a fase de caracterização enzimática.

Figura 09. Efeito da temperatura e da fonte de nitrogênio no crescimento e na produção enzimática do fungo *A. japonicus*

A média do desvio padrão foi de ± 0.76 para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.7 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de amilase por *A. japonicus*

Amidos de muitas fontes são frequentemente utilizados nas indústrias alimentícias. Com o objetivo de estudar o efeito repressor ou indutor das fontes de carbono para a produção de amilase por *A. japonicus*, o fungo foi incubado em meio líquido KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995) suplementado com diferentes fontes de carbono 1 % em condições estáticas, durante 4 dias, a 25°C. Um meio idêntico sem suplementação de fonte de carbono foi usado para comparar a atividade.

No que se refere à atividade enzimática (U/mL), pode-se inferir que as fontes de carbono que proporcionaram a maior produção de amilase, quando comparado com o meio sem suplementação de fonte de carbono foram: amido de batata Sigma® (7,46 vezes), maltose (7,26 vezes), amido de arroz (6,90 vezes). O amido da Merck™, a glicose e o amido da Reagen® apresentaram em média 6,62 vezes mais atividade do que o meio sem suplementação. O amido de milho, a amilopectina e a amilose de batata apresentaram, em média, 5,02 vezes mais atividade do que o meio sem fonte de carbono. Outras fontes de carbono, como rafinose e pectina, tiveram cerca de 4 vezes mais atividade do que o meio sem fonte de carbono. O elevado nível de amilase com glicose pode ser atribuído ao esgotamento da fonte de carbono no meio depois de quatro dias, resultando num crescimento limitado e na secreção de enzima constitutiva (Tabela 04). Estes resultados são particularmente interessantes, dado que, amido de batata e maltose

puderam induzir a síntese de amilase em quantidades elevadas. Neste trabalho também foi possível observar o crescimento e produção de amilase por *A. japonicus*, no meio de cultura sem fonte de carbono (que foi utilizado como controle), porém com um crescimento e produção enzimática bem menores quando comparados com os meios contendo fontes de carbono, provando assim, que o fungo utiliza as fontes de carbono como indutoras para a produção da enzima, e que provavelmente, o crescimento do fungo e a produção da enzima neste meio sem fonte de carbono ocorreu devido ao fato de existirem sais, proteínas e vitaminas do próprio meio de cultura, derivados de peptona, que podem ser utilizados pelo fungo. Assim, neste experimento, verificou-se uma excelente produção de enzima quando *A. japonicus* foi cultivado em diferentes fontes de carbono, que são utilizados na indústria alimentícia, sendo um resultado interessante do ponto de vista da aplicação industrial, porque estas fontes são utilizadas na produção de pão e levaram a uma excelente indução da síntese de amilase por *A. japonicus*.

Tabela 04. Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de amilase por *A. japonicus*.

Fontes de carbono	Enzimas extracelulares	
	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas (mg/mL)
Controle	7.15 (± 0.48)	0.06 (± 0.02)
Amilopectina	34.59 (± 1.15)	0.15 (± 0.03)
Amido de Milho	41.80 (± 2.03)	0.12 (± 0.02)
Glicose	44.04 (± 1.13)	0.18 (± 0.04)
Maltose	51.92 (± 0.58)	0.36 (± 0.06)
Pectina	16.20 (± 0.74)	0.32 (± 0.03)
Amilose de Batata	31.44 (± 1.57)	0.11 (± 0.05)
Amido de Batata Sigma®	53.38 (± 0.12)	0.32 (± 0.07)
Rafinose	24.08 (± 1.09)	0.12 (± 0.02)
Amido de Arroz	49.40 (± 0.35)	0.15 (± 0.01)
Amido da Merck TM	48.46 (± 1.23)	0.22 (± 0.03)
Amido da Reagen [®]	49.72 (± 0.18)	0.41 (± 0.08)

O desvio padrão médio foi de ± 0.88 para a atividade enzimática e de ± 0.04 para as proteínas. A dosagem enzimática dos meios contendo maltose foi realizada pelo método de acoplamento de glicose-oxidase conforme descrito no item 3.7.2. Os demais substratos

obtiveram sua atividade enzimática determinada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.8 Cultivo do fungo *A. japonicus* em diferentes fibras e resíduos alimentícios

A fim de verificar a produção de amilase utilizando fibras e resíduos alimentícios, o fungo *A. japonicus* foi cultivado em meio líquido KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995) constituído por 1% de farinha de mandioca, flocos de centeio, farinha de aveia, casca e bagaço de laranja, sabugo de milho, milho triturado, farelo de trigo, glicose e casca de amendoim, por 4 dias, em condições estáticas, a 25°C com pH 5,5. Verificou-se que, quando cultivado em casca e bagaço de laranja, flocos de centeio e glicose a amilase extracelular produzida por *A. japonicus* hidrolisou o substrato amido, apresentando, em média, uma atividade de 38,82 U/mL. Em contraste, a menor hidrólise do substrato amido foi observado com a amilase produzida sobre a farinha de mandioca, farinha de aveia, sabugo de milho, milho triturado, farelo de trigo e casca de amendoim que obtiveram, em média, 7,14 U/mL (Tabela 05).

A amilase produzida por *A. japonicus* quando cultivado em casca e bagaço de laranja, o substrato amido foi hidrolisado em níveis elevados, sendo de $45,40 \pm 1,13$ U/mL (Tabela 05).

Assim, conclui-se que a amilase extracelular, produzida pelo fungo termotolerante *A. japonicus*, em meio suplementado com 1 % das fontes de carbono: amido Merck™, glicose, amido Reagen®, amido de arroz, amido de milho, maltose, amido de batata Sigma®, casca e laranja de bagaço tem um grande potencial enzimático de ação em indústrias, especialmente na indústria de alimentos.

Tabela 05. Efeito da suplementação de resíduos industriais no crescimento e na produção amilolítica pelo fungo *A. japonicus*.

Resíduos	Enzimas Extracelulares	
	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas (mg/mL)
Controle	3.70 (± 0.32)	0.06 (± 0.02)
Farinha de Mandioca	3.96 (± 0.12)	0.11 (± 0.05)
Sabugo de Milho	10.20 (± 0.41)	0.14 (± 0.03)
Milho Triturado	2.67 (± 0.09)	0.09 (± 0.01)
Glicose	42.60 (± 0.98)	0.23 (± 0.08)
Farinha de Aveia	6.90 (± 1.02)	0.18 (± 0.06)
Casca e Bagaço de Laranja	45.40 (± 1.13)	0.20 (± 0.07)
Casca de Amendoim	7.90 (± 0.54)	0.11 (± 0.05)
Flocos de Centeio	28.46 (± 0.89)	0.16 (± 0.04)
Farelo de Trigo	14.69 (± 0.65)	0.21 (± 0.02)

O desvio padrão médio foi de ± 0.61 para a atividade enzimática e de ± 0.04 para as proteínas. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

Parte 2

Otimização das condições de reação da amilase produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus*. Mutação induzida por luz ultravioleta na morfologia, na produção e na estabilidade à temperatura da amilase produzida pelo fungo

Aspergillus japonicus

4.9 Efeito da temperatura na atividade da amilase produzida pelo fungo *A. japonicus*

Nesse experimento o micro-organismo foi cultivado em meio KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995) com fonte de carbono amido de batata Sigma® 1% sob condição estática, durante quatro dias, a 25°C.

A dosagem da atividade amilolítica total foi realizada em diferentes temperaturas, de 30°C a 80°C (com intervalos de 10°C), segundo o método de DNS. Em experimentos posteriores foram realizadas novas dosagens com a variação de 5°C quando obteve-se a enzima já purificada.

O efeito da temperatura em uma reação enzimática é observado, inicialmente, através do aumento da velocidade de formação do produto, decorrente da interação enzima-substrato. No entanto, há uma temperatura limite para cada enzima e acima da qual visualiza-se, gradativamente, a desnaturação protéica pelo calor. A temperatura em que os níveis enzimáticos são máximos muitas vezes é denominada de “temperatura ótima”. Entretanto, o “ótimo” aparente de temperatura é o resultado de dois processos: o aumento usual na velocidade de reação e o aumento da desnaturação térmica da enzima acima de uma temperatura crítica (LEHNINGER *et al.*, 2008).

Observou-se que a temperatura onde se obteve a máxima atividade da amilase produzida em meio suplementado com amido foi de 50°C além disso, entre as temperaturas de 60° – 70°C a atividade enzimática manteve-se em torno de 95% e quando submetida a 80°C obteve uma atividade de 56%.

Vale a pena ressaltar que a atividade amilolítica não obteve uma diferença significativa em relação às temperaturas de 50°, 60° e 70°C que foram de 100%, 99,8% e 97%, respectivamente (Figura 10).

Figura 10. Efeito da temperatura na atividade da amilase produzida por *A. japonicus*.

A atividade enzimática 100% foi de 38,97 U/mL. A média do desvio padrão foi de $\pm 2,73\%$ para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.10 Efeito do pH na atividade da amilase produzida pelo fungo *A. japonicus*

Para a determinação do efeito do pH na atividade amilolítica, os extratos enzimáticos foram incubados com substrato amido 1% em tampão acetato de sódio para os pH de 4,0 a 6,0, fosfato de sódio para os pH de 6,5 a 7,5 e bicarbonato de sódio para os pH de 8,0 a 10,0 com intervalos de 0,5.

Verificou-se que o pH 5,5 foi o melhor pH para a atividade amilolítica produzida por *A. japonicus*. Observou-se uma queda brusca da atividade amilolítica em pH 7,0 queda esta que reduziu a atividade enzimática em 48%. Entretanto, vale citar que a amostra enzimática bruta manteve mais de 70% da sua atividade na faixa de pH de 4,0 a 6,5 (Figura 11).

Pode-se inferir, a partir dos resultados analisados acima, que a amilase extracelular produzida pelo fungo termotolerante na fonte de carbono amido de batata Sigma® 1%, possui sua atividade máxima no pH 5,5. Uma das vantagens das enzimas amilolíticas possuírem pH baixo é que nesses pH observa-se a redução da formação de subprodutos que podem ser indesejáveis, tal como a maltulose, visto que o objetivo deste trabalho é a formação, apenas, de glicose como subproduto para a aplicação enzimática

na indústria alimentícia. A maltulose normalmente forma-se quando o processo ocorre em pH elevado (LIU & XIU, 2008).

Figura 11. Efeito do pH na atividade da amilase produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus*.

A atividade enzimática 100% foi de 46,39 U/mL. A média do desvio padrão foi de $\pm 1.90\%$ para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.11 Determinação da estabilidade à temperatura da amilase produzida pelo fungo *A. japonicus*

Para a determinação da estabilidade térmica os extratos enzimáticos extracelulares foram incubados em diferentes temperaturas variando de 30° a 80°C, com intervalos de 10°C, durante uma hora. Transcorrido o tempo de incubação, alíquotas destes extratos foram retiradas e colocadas em gelo. Pode-se observar uma excelente termoestabilidade em relação à amilase produzida pelo fungo *A. japonicus*. Foi possível observar que após uma hora de incubação, a atividade manteve-se em torno de 90% nas temperaturas de 30° a 50°C, constatando-se uma queda na atividade enzimática na temperatura de 60°C de cerca de 50%, após uma hora de reação (Figura 12).

Figura 12. Determinação da estabilidade enzimática em diferentes temperaturas, durante uma hora de reação.

A atividade enzimática 100% foi de 46,46 U/mL. A média do desvio padrão foi de $\pm 1.91\%$ para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

Objetivando analisar o comportamento da enzima produzida frente às temperaturas de 40°C, 50°C e 60°C, durante diferentes tempos de incubação previamente determinados, as amostras foram colocadas em gelo e a atividade enzimática foi quantificada. Quanto à estabilidade a 50°C constatou-se um aumento de 80% após 15 minutos de incubação, no qual no final de 60 minutos foi constatada a melhor atividade enzimática. Visualizou-se, a partir da temperatura de 60°C uma queda na atividade chegando a 50% após 1 hora de incubação.

Nas temperaturas de 40°C e 50°C a enzima manteve um aumento contínuo de atividade enzimática ao longo do tempo de incubação, havendo declínio apenas a partir da temperatura de 60°C e chegou à desnaturação na temperatura de 70°C, portanto não houve atividade amilolítica. (Figura 13). Foi possível observar que a amilase produzida por *A. japonicus* se trata de uma enzima bastante estável, provavelmente devido ao fato de ser uma glicoproteína, característica esta observada dentro do gênero de *Aspergillus* por COUTINHO & REILLY (1997).

É importante destacar que procedimentos em temperaturas elevadas são comuns dentro da indústria, com isto as enzimas termoestáveis apresentam numerosas possibilidades de aplicação, sendo, portanto amplamente utilizadas nesses processos (VIHINEN e MÄNTSÄLÄ, 1989).

Figura 13. Determinação da estabilidade da amilase produzida por *A. japonicus* em diferentes tempos de incubação, nas temperaturas de 40, 50 e 60°C.

A atividade enzimática 100% foi de 52,98 U/mL. A média do desvio padrão foi de $\pm 1.87\%$ para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.12 Determinação da estabilidade ao pH da amilase produzida pelo fungo *A. japonicus*

Com o objetivo de estudar a estabilidade ao pH em relação às atividades amilolíticas extracelulares foi preparado meio de cultura KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995) com amido como fonte de carbono. Os meios foram incubados sob condição estática durante 4 dias, a 25°C.

O extrato enzimático, foi incubado em tampão acetato de sódio 100 mM durante uma hora, nos pH de 4,0 a 10,0, com intervalos de 0,5 entre estes. Decorrido este tempo, alíquotas deste extrato foram retiradas e então foi realizado o ensaio enzimático.

A enzima produzida pelo fungo termotolerante *A. japonicus* crescido em meio com amido de batata Sigma® como fonte de carbono manteve uma atividade alta de

aproximadamente 95% nos pH de 4,0 a 6,0, nos pH de 6,5 à 9,0 verificou-se uma leve queda na atividade amilolítica mas mesmo assim ela se manteve por volta de 50%, já no pH 9,5 ainda se mantinha 40% de atividade e no pH 10,0 houve uma queda brusca chegando a desnaturação da enzima. (Figura 14). Estes resultados são condizentes aos encontrados na literatura, visto que as amilases apresentam estabilidade na faixa ácida até pH 7,0 (JAMES & LEE, 1997).

A alta faixa de pH observada pode ser uma vantagem segura às indústrias, visto que um menor ajustamento do pH seria necessário entre os tratamentos sequenciais das enzimas amilolíticas.

Figura 14. Determinação da estabilidade enzimática à diferentes pH, durante uma hora de reação da amilase produzida pelo fungo *A. japonicus*. A atividade enzimática 100% foi de 45,91 U/mL. A média do desvio padrão foi de $\pm 2,07\%$ para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.13 Mutação induzida por luz ultravioleta na morfologia do fungo *Aspergillus japonicus*

O fungo *Aspergillus japonicus* foi exposto à luz ultravioleta em diferentes tempos, e foi possível observar poucas mudanças morfológicas quando comparados ao controle. Porém a partir de 30 minutos de exposição foi possível observar que o número de colônias contaminantes aumentava progressivamente com o aumento de exposição, chegando a contaminação quase que total da placa com a cultura fúngica no tempo de 40 minutos.

Este fungo foi muito difícil de recuperar sem contaminações, demonstrando assim, que a partir de 30 minutos de exposição à luz ultravioleta, o fungo ficava vulnerável por causa da queda de resistência da colônia.

Paralelamente a isto, foi possível observar uma diminuição gradativa no número de colônias que cresciam devido ao aumento do tempo de exposição à luz ultravioleta. Este resultado mostrou que houve uma (i) diminuição da resistência do fungo, assim como (ii) uma diminuição do crescimento deste e (iii) um aumento de colônias invasoras na placa.

Além disso, o fungo demonstrou (iv) uma ligeira modificação na sua coloração de esporos quando ainda não maduros - coloração levemente amarelada, sugerindo alteração na formação de pigmentos que poderiam levar a uma maior vulnerabilidade ao meio ambiente. Este fato não foi observado no controle (Figura 15).

Figura 15. Diferenças morfológicas de crescimento do fungo *A. japonicus* quando exposto em diferentes tempos à luz ultravioleta.

4.14 Efeito da indução de mutações no fungo *Aspergillus japonicus* visando aumento da produção de glucoamilases

Após a exposição do fungo *Aspergillus japonicus* à luz Ultravioleta *germicidal light* G15T8, em diferentes tempos, as cepas mutantes foram ressuspensas em 10 mL de água destilada e inoculadas em meios líquidos KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995), pH

5,5, com amido 1%. Após 4 dias de crescimento, a 30°C, a atividade da amilase foi determinada com o reagente DNS e as proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976).

A produção de amilase pelo fungo *Aspergillus japonicus* demonstrou uma grande resistência à exposição na luz Ultravioleta *germicidal light* G15T8 em diferentes tempos, podendo-se verificar que a amilase produzida pelo fungo manteve, praticamente, durante todos os tempos uma atividade bem próxima da verificada no controle. Nos tempos de 30 e 35 minutos de exposição à luz ultravioleta, as atividades da amilase se assemelharam quase inteiramente à atividade da amilase produzida pelo fungo que não obteve contato com a luz ultravioleta (99,6-99,7%). Nos demais tempos de exposição, a produção enzimática teve apenas uma pequena queda. A quantificação de proteínas demonstrou que houve um aumento nos níveis proteicos em relação ao tempo de exposição, que foi considerável quando comparado ao controle, obtendo o pico de produção no tempo de 15 minutos de exposição à luz ultravioleta, tempo este que foi onde a produção da amilase foi a segunda menor quando comparada com os outros tempos de experimento (**Tabela 06**). Quando se analisa a atividade específica – relação da atividade com a proteína micelial é constatada uma diminuição de produção de glucoamilase em relação ao controle.

Tabela 06. Atividade enzimática, porcentagem de atividade e quantidade de proteínas produzidas pelos fungos que foram expostos a luz ultravioleta em diferentes tempos

Tempo de exposição (Minutos)	Atividade Enzimática (U/mL)	Porcentagem de Atividade (%)	Proteína (mg)
Controle	49,61 (± 0.69)	100	0,08 (± 0.01)
5	48,39 (± 0.32)	97,5	0,09 (± 0.02)
10	45,8 (± 0.23)	92,3	0,11 (± 0.08)
15	43,5 (± 0.12)	87,6	0,18 (± 0.05)
20	41,8 (± 0.87)	84,2	0,13 (± 0.09)
25	46,9 (± 0.56)	94,5	0,15 (± 0.04)
30	49,4 (± 0.90)	99,6	0,12 (± 0.07)
35	49,5 (± 0.21)	99,7	0,17 (± 0.07)
40	44,5 (± 0.43)	89,7	0,13 (± 0.05)

O desvio padrão médio foi de ± 0.54 para a atividade enzimática e de ± 0.06 para as proteínas. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS e as proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD conforme descrito anteriormente nos itens 3.7.1 e 3.8, respectivamente.

4.15 Estabilidade à temperatura da glucoamilase produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus*

Analizou-se a estabilidade da enzima produzida pela cepa controle e as mutadas na faixa de 50°C a 60°C, com intervalos de 5°C, durante uma hora de incubação sendo retiradas alíquotas para dosagem de 15 em 15 minutos. Manteve-se a enzima solúvel livre de substrato em banho-maria, nas temperaturas e tempos pré-determinados para o processamento da reação. Após o período de incubação, as enzimas foram colocadas em banho de gelo, e em seguida, efetuou-se a dosagem da atividade enzimática na temperatura ótima, segundo metodologia de DNS.

Foi possível observar pelos perfis de estabilidade à temperatura (Figura 16A) que a atividade inicial do controle foi maior do que a da amilase mutada durante todo o experimento, mas a amilase produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus* exposto à luz ultravioleta apresentou uma estabilidade levemente menor do que a apresentada pela

amilase controle (Figura 16B). A amilase da cepa mutada foi totalmente estável durante 60 minutos à 50°C, mas a 55°C esta se manteve estável por aproximadamente 30 minutos, resultados estes que se assemelham aos encontrado com a glucoamilase do fungo não mutado. Entretanto, a enzima do fungo não mutado se mostrou estável durante aproximadamente 45 minutos na temperatura de 60°C, ao contrário da amilase produzida pelo mutante que se mostrou menos estável nesta temperatura, demonstrando um declínio de atividade logo nos primeiros 15 minutos de experimento.

Através dos experimentos de mutação foi possível comprovar que as mutações adquiridas não levaram a um aumento na atividade de amilase, como idealizado, além do que a enzima produzida pela cepa mutante não foi mais estável em temperaturas mais altas (60°C). Nas demais temperaturas analisadas no experimento, sabe-se que o perfil enzimático não foi alterado significativamente. Conclui-se também que o fungo é bastante resistente à luz ultravioleta, um agente mutagênico, já que foram necessários dois *rounds* de exposição de 45 minutos para se observar alterações morfológicas em *A. japonicus*.

Figura 16. (A) Estabilidade da enzima à diferentes temperaturas em diferentes tempos, produzida pelo fungo sem exposição à luz ultravioleta. (B) Estabilidade da enzima a diferentes temperaturas em diferentes tempos, produzida pelo fungo que foi exposto a luz ultravioleta. O desvio padrão médio foi de ± 0.73 para a atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito anteriormente no item 3.7.1.

Parte 3

Purificação, ativação por Cloreto de Magnésio, determinação das propriedades funcionais e análise dos aminoácidos que compõem uma nova glucoamilase produzida em fermentação submersa por *Aspergillus japonicus*

(Trabalho será submetido no *Journal of Basic Microbiology* em 2015)

4.16 Diferentes concentrações de amido de batata e maltose no cultivo de *A. japonicus*

Os resultados demonstraram uma grande produção de amilase em baixas concentrações de amido de batata Sigma® (Tabela 07) e maltose (Tabela 08) como fontes de carbono. As concentrações entre 0,5 e 1,0 são as mais apropriadas para a síntese de amilases em cultura com amido de batata Sigma® (Tabela 07) e as concentrações entre 0,5 e 0,75 são as mais apropriadas para induzir a síntese de amilase no cultivo com maltose (Tabela 08). Em concentrações superiores a 1%, dos dois substratos, foi possível observar uma grande diminuição da atividade enzimática e uma diferença significativa sobre o crescimento do micro-organismo. Assim, concluiu-se que 0,5% de maltose e 1% de amido de batata podem induzir com maior eficiência a síntese de amilase pelo fungo *A. japonicus*.

Tabela 07. Diferentes concentrações de amido de batata como fonte indutora da produção de amilase por *A. japonicus*

Concentrações Amido de Batata (%)	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade Espec. (U/mg)
0,5	36,14 (± 0.52)	0,24 (± 0.08)	150,58
0,75	38,13 (± 0.38)	0,19 (± 0.05)	192,57
1,0	47,48 (± 1.23)	0,18 (± 0.03)	256,64
1,25	20,81 (± 0.65)	0,20 (± 0.06)	102,51
1,5	14,34 (± 0.48)	0,24 (± 0.04)	58,53
2,0	11,99 (± 0.24)	0,47 (± 0.07)	25,03

O desvio padrão médio foi de ± 0.58 para a atividade enzimática e de ± 0.05 para as proteínas. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS e as proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD conforme descrito anteriormente nos itens 3.7.1 e 3.8, respectivamente.

Tabela 08. Diferentes concentrações de maltose como fonte indutora da produção de amilase por *A. japonicus*

Concentrações	Atividade	Proteínas	Atividade Espec.
Maltose	Enzimática	(mg/mL)	(U/mg)
(%)	(U/mL)		
0,1	12,74 (± 1.38)	0,10 (± 0.03)	117,96
0,25	28,76 (± 0.32)	0,10 (± 0.02)	287,60
0,5	47,36 (± 1.51)	0,09 (± 0.01)	498,52
0,75	32,79 (± 0.89)	0,09 (± 0.02)	364,33
1,0	2,29 (± 0.76)	0,05 (± 0.02)	45,8
1,25	4,41 (± 0.85)	0,03 (± 0.01)	113,07
1,5	6,47 (± 0.45)	0,03 (± 0.02)	196,06
2,0	6,99 (± 0.88)	0,02 (± 0.01)	349,50

O desvio padrão médio foi de ± 0.88 para a atividade enzimática e de ± 0.01 para as proteínas. A dosagem enzimática foi realizada através do método de GOD e as proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD conforme descrito anteriormente nos itens 3.7.1 e 3.8, respectivamente.

4.17 Determinação de complexo amilolítico e análise carboidratos hidrolisados utilizando cromatografia em placa delgada de sílica (TLC)

Verificou-se que quando se usa amido Reagen® 1% no tempo zero, não houve formação de produtos de hidrólise (Figura 17A). Isto é porque a amostra de enzima foi fervida antes de ser colocada com o substrato, provando que amilase foi desnaturada e houve apenas o amido de batata Sigma® na reação, que é um polissacarídeo portanto não é capaz de migrar na placa de sílica. A amilase, que foi produzida pelo fungo *A. japonicus* no meio KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995) com amido de batata Sigma® na concentração de 1%, foi subsequentemente sujeita a reação com o substrato amido Reagen® 1% e apenas glicose como produto foi obtido, como pode ser observado na migração da placa de sílica (Figura 17A). Quando a amilase de *A. japonicus* foi submetida a reação com maltose na concentração de 1% em primeiro lugar, no tempo zero, observou-se que a amostra migrou sobre a placa de sílica (Figura 17B), visto que é um dissacarídeo e, portanto, é capaz de migrar na placa de sílica permanecendo no mesmo nível que a maltose utilizada como controle o que prova que o substrato era efetivamente a maltose. Durante o tempo de incubação da amilase com 1% de maltose, pôde-se observar a degradação e a formação de glicose (Figura 17B).

Figura 17. Cromatografia em placa delgada de sílica da amilase produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus* cultivado em meio KHANNA com amido de batata Sigma®, incubada em 5, 10 e 20 minutos com (A) Amido Reagen® 1% (B) e com maltose 1%. O padrão é referente aos marcadores que são: glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentaose, representados pelos números 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente.

4.18 Purificação da amilase produzida por *Aspergillus japonicus*

As amostras, foram dialisadas, e posteriormente aplicadas em uma coluna de cromatografia de troca iônica DEAE-celulose, equilibrada com tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,5. Frações de 4 mL por tubo foram coletadas para realizar o ensaio enzimático e a leitura a 280 nm. Com este procedimento, apenas um pico com a atividade da amilase foi separado. Este único pico aderiu fracamente à resina e, além dele, não houve nenhum outro pico de eluição com a aplicação do gradiente linear de 200 mL de NaCl (0-1 M) (Figura 18). As frações com atividade da amilase foram reunidas em um "pool" para a determinação da atividade específica que passou de 228,82 U/mg para 301,76 U/mg confirmando a hipótese de que a enzima está mais concentrada no extrato eluído pela coluna. Um volume final de 100 ml foi coletado com uma recuperação de 85,96% e um fator de purificação de 1,32 vezes (Tabela 09). Subsequentemente o "pool" enzimático foi aplicado em SDS-PAGE e PAGE para análise de pureza e também para a caracterização bioquímica.

Figura 18. Distribuição de proteínas (•) e atividade da glucoamilase () depois de eluição em cromatografia de troca iônica DEAE - celulose. (—) Gradiente de NaCl.

A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS e as proteínas foram determinadas pelo método de BRADFORD conforme descrito anteriormente nos itens 3.7.1 e 3.8, respectivamente.

Tabela 09. Purificação da glucoamilase extracelular de *Aspergillus japonicus*

Etapas de Purificação	Proteínas (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)	Purificação (Vezes)
Extrato Bruto	0,20 ($\pm 0,02$)	45,64 ($\pm 1,23$)	228,82	100	1
DEAE-Celulose	0,13 ($\pm 0,04$)	39,23 ($\pm 2,45$)	301,76	85,96	1,32

4.19 Grau de pureza da amostra

Com o objetivo de analisar a pureza da amostra após o procedimento de purificação cromatográfica, foi realizada a análise eletroforética da atividade da enzima no gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes, pH 8,9. Como a amostra foi absorvida em DEAE-celulose, aparentemente ela tem uma carga negativa, por isso é necessário utilizar um gel de poliacrilamida PAGE 10% em pH 8,9.

Pode ser verificado que a glucoamilase produzida por *A. japonicus*, após processos cromatográficos, mostrou apenas uma banda em gel SDS-PAGE 10% revelado com Coomassie Brilliant Blue (Figure 19A), uma banda quando revelado com nitrato de

prata BLUM *et al.*, (1987) (Figura 19B) e uma banda de atividade em gel PAGE 10% revelado com iodo (TEITELBAUM *et al.*, 1980) (Figura 19C).

Pode-se concluir que a enzima produzida em amido de batata Sigma® 1%, foi purificada utilizando uma coluna de cromatografia de troca aniônica em DEAE-celulose.

4.20 Determinação da massa molecular

A massa molecular da glucoamilase pura produzida pelo fungo termotolerante *Aspergillus japonicus* em meio KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995) com amido de batata 1%, foi determinada num gel de poliacrilamida de condições desnaturantes na concentração de 10% (SDS-PAGE), pH 8,9, e a revelação foi realizada por Coomassie Brilliant Blue e nitrato de prata.

Através da reta obtida pela migração de marcadores moleculares multiplicada pela distância até o fronte, foi feita a estimativa da massa molecular da enzima em estudo. A glucoamilase pura produzida em meio suplementado com amido de batata Sigma® como fonte de carbono obteve uma massa molecular aproximada de 72 kDa (Figura 19D).

Figura 19. Eletroforese e representação da massa molecular da glucoamilase produzida por *A. japonicus*. SDS-PAGE 10% (A) corado com azul brilhante de Coomassie e (B) corado com nitrato de prata, (C) PAGE 10% e (D) a determinação da massa molecular por SDS-PAGE. O Rf foi calculado pela relação entre a migração da proteína e o fronte azul de bromofenol.

4.21 Efeito do pH sobre a reação da glucoamilase purificada

A máxima atividade da glucoamilase foi no pH 5,0 (Figura 20), o que difere dos resultados anteriores obtidos com a enzima no seu estado bruto, onde o pH ótimo foi padronizado como 5.5. Houve uma diminuição acentuada da atividade amilolítica no pH 7,0. A enzima manteve mais do que 90% da sua atividade nos pH de 4,5 a 5,5 e continuou mantendo no pH 6,0 mais de 70% da sua atividade.

Pode inferir-se a partir dos resultados acima analisados que a glucoamilase extracelular purificada produzida por *A. japonicus* em amido de batata Sigma® 1%, tem uma atividade máxima a pH 5,0.

Figura 20. Efeito do pH na atividade da glucoamilase produzida pelo fungo *A. japonicus*. A atividade enzimática 100% foi de 48,42 U/mL. A média do desvio padrão foi de $\pm 1.62\%$ para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.22 Estabilidade ao pH da Glucoamilase purificada

A enzima manteve cerca de 90% da sua atividade no pH 5,0 nos primeiros 30 minutos, mas quando completada uma hora de experimento foi possível observar que atividade caiu para cerca de 85% no pH 5,0. É possível observar que na primeira hora do experimento a glucoamilase se manteve estável em todos os pH testados mantendo 70% de sua atividade relativa, exceto no pH 8,0, em que após uma hora de experimento, houve uma queda nítida atingindo aproximadamente 65% da atividade relativa (Figura 21 A).

Já com duas horas de experimento os pH 5,0 e 6,0 mantiveram uma atividade relativa de 60%, enquanto que os pH 7,0 e 8,0 obtiveram atividades abaixo de 45%. Com 5 horas de experimento, houve um aumento surpreendente na atividade da glucoamilase na faixa de pH de 3,0 a 6,0. No pH 4,0 e 5,0 foi possível observar um aumento próximo a 85% na sua atividade relativa. Nos pH 7,0, e 8,0 foi observado uma diminuição de 35%, e 15%, respectivamente, na atividade relativa da glucoamilase. Após 28 horas de incubação, o pH de 3,0 a 4,0 apresentava mais do que 90% de sua atividade relativa sendo que no pH 4,0 a glucoamilase atingiu aproximadamente o valor de 100% de sua atividade relativa quando comparada ao controle. Nos de pH 5,0 a 6,0 a glucoamilase apresentou mais do que 80% de sua atividade relativa no pH 7,0 ela obteve 40% de sua atividade relativa. Já no pH 8,0 a glucoamilase obteve apenas 10% de sua atividade relativa, supondo que ela estava perto de sua desnaturação (Figura 21 B).

Figura 21. Determinação da estabilidade da glucoamilase nos pH de 3.0 a 8.0 nos tempos de 0, 30, 60 minutos e (A) nos tempos de 120, 300 e 1680 minutos (B).

A atividade enzimática 100% foi de 43,56 U/mL. A média do desvio padrão foi de $\pm 2.34\%$ para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.23 Efeito da temperatura na reação da glucoamilase purificada

A determinação da atividade enzimática da amilase foi realizada em diferentes temperaturas de 30°C a 80°C (5°C de intervalo). Observou-se à temperatura de 65°C a máxima atividade da glucoamilase, resultado este que difere dos resultados obtidos com

a amilase no extrato bruto o qual foi padronizado em experimentos anteriores e apresentou temperatura ótima de 55°C. Nas temperaturas entre 55 - 65°C a glucoamilase manteve cerca 95-100% da sua atividade e à temperatura de 70°C a glucoamilase purificada manteve a sua atividade relativa superior a 75%, mas quando submetida a 80°C, a glucoamilase purificada apresentou 23% de sua atividade relativa (Figura 22).

Figura 22. Efeito da temperatura na atividade da glucoamilase produzida pelo fungo *A. japonicus*.

A atividade enzimática 100% foi de 49,09 U/mL. A média do desvio padrão foi de $\pm 1.81\%$ para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.24 Estabilidade à temperatura da glucoamilase purificada

Pode ser observada uma excelente termoestabilidade da glucoamilase purificada. Aparentemente, depois de uma hora e meia de incubação a glucoamilase manteve cerca de 90% de sua atividade na temperatura de 45°C. Na temperatura de 50°C, após uma hora de incubação, a glucoamilase manteve cerca de 80% da sua atividade, mas apresentou uma queda de 50% da sua atividade depois de uma hora e meia de experimento. Finalmente, à temperatura de 55°C observou-se uma diminuição de cerca de 90% da atividade enzimática após uma hora de incubação (Figura 23).

Figura 23. Determinação da estabilidade da glucoamilase em diferentes temperaturas durante 5 horas de reação.

A atividade enzimática 100% foi de 45,79 U/mL. A média do desvio padrão foi de $\pm 1.73\%$ para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.25 Hidrólise de diferentes substratos amilolíticos

Este experimento teve como objetivo analisar a capacidade da glucoamilase purificada de hidrolisar substratos diferentes e analisar a "preferência" da enzima purificada para diferentes substratos com cadeias ramificadas ou não. O substrato mais susceptível à ação da glucoamilase purificada foi a amilopectina com um aumento de aproximadamente 20% dos produtos gerados quando comparados ao controle (Tabela 10). A enzima mostrou uma excelente capacidade para degradar o amido de arroz Sigma®, amido de batata Sigma® e o glicogênio, tendo, respectivamente, 101, 94 e 93% de sua atividade relativa quando comparada a atividade apresentada pela enzima na presença do Amido Reagen® que foi utilizado como controle sendo a atividade relativa de 100%. No entanto, quando utilizado como substrato a trealose, α e β -ciclodextrina e metil- α -D-glucopiranosídeo, nenhuma atividade enzimática foi observada. Verificou-se que a enzima não hidrolisou o substrato p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (PNPG- α), que é um substrato sintético que indica a presença de α -glucosidases (Tabela 10).

Tabela 10. Hidrólise de diferentes substratos pela glucoamilase produzida pelo fungo *A. japonicus*

Substrato (1%)	Atividade Enzimática (U/mL)
Amilose	4,80 (± 1.38)
Amilopectina	45,72 (± 0.78)
Amido de Batata Sigma®	36,08 (± 0.48)
Amido de Milho Sigma®	26,62 (± 1.64)
Amido de Arroz Sigma®	39,03 (± 1.12)
Amido de Batata Hidrolisado Sigma®	29,03 (± 1.90)
Sacarose	3,64 (± 0.87)
Trealose	0 (± 0.0)
Maltose	32,79 (± 0.98)
Alfa - Ciclodextrina	0 (± 0.0)
Beta – Ciclodextrina	0 (± 0.0)
Metil - alfa - D - glucopiranosídeo	0 (± 0.0)
Glicogênio	35,77 (± 0.67)
p-nitrofenil glucopiranosídeo (pNPG)	-
Amido Reagen®	38,41 (± 1.43)

- Ausência de atividade enzimática

A atividade enzimática 100% é representada pela reação da enzima com o Amido Reagen®.

A média do desvio padrão foi de $\pm 0,80$ para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.26 Diferentes concentrações de íons, EDTA e 2-mercaptoetanol sobre a atividade da glucoamilase purificada

A enzima purificada apresentou uma pequena ativação na concentração de 5 mM para todos os íons testados, na concentração de 10 mM de apenas quatro compostos (MnCl_2 , KCl, $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, e 2-mercaptoetanol) levaram a uma ativação de 65, 9, 18 e 11%, respectivamente (Tabela 11). Apenas na presença do sal MnCl_2 a glucoamilase purificada apresentou uma ativação considerável atingindo 51% na presença de 5 mM e

65% na presença de 10 mM deste sal. Por esta razão, os testes foram realizados apenas com o sal MnCl_2 , na concentração de 15 mM, em que mostrou uma pequena redução da atividade relativa chegando a 21%. Na concentração de 20 mM de MnCl_2 a atividade relativa caiu para 6% (Figura 24). O controle é correspondente ao ensaio enzimático realizado sem a adição de qualquer composto utilizado neste experimento.

Tabela 11. Efeito de diferentes sais, EDTA e 2-mercaptoetanol na atividade da glucoamilase de *A. japonicus*

Compostos	Atividade Relativa (%)	
	5 mM	10 mM
Controle	100 (± 2.65)	100 (± 2.67)
MnCl_2	151,21 (± 1.43)	165,66 (± 2.07)
EDTA	112,80 (± 0.98)	90,56 (± 1.23)
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	113,41 (± 1.24)	99,86 (± 1.61)
CoCl_2	150,00 (± 1.67)	98,63 (± 1.09)
KCl	116,46 (± 1.83)	109,57 (± 1.15)
BaCl_2	126,82 (± 1.19)	94,80 (± 1.93)
NaCl	140,65 (± 1.38)	95,75 (± 1.72)
$\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	117,68 (± 1.78)	118,19 (± 1.82)
CaCl_2	139,02 (± 1.10)	100,82 (± 1.61)
NH_4Cl_2	115,65 (± 1.03)	99,86 (± 1.30)
Kh_2Po_4	115,85 (± 1.35)	92,06 (± 1.41)
2-Mercaptoetanol	138,21 (± 1.93)	111,08 (± 1.77)

A atividade enzimática 100% (controle) foi de 40,34 U/mL. A média do desvio padrão foi de $\pm 1.57\%$ para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

Figura 24. Efeito da adição de MnCl_2 nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 mM para a atividade da glucoamilase em relação ao controle que não recebeu qualquer adição de sais.

A atividade enzimática 100% (controle) foi de 40,34 U/mL. A média do desvio padrão foi de $\pm 1.24\%$ para atividade enzimática. A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

4.27 Determinação do conteúdo de carboidratos da enzima

Verificou-se a natureza glicoprotéica da amilase bruta e purificada que foi produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus*, o qual foi inoculado em meio suplementado com amido de batata Sigma® 1%, através do método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) de acordo com o descrito em Material e Métodos.

O conteúdo de carboidrato foi estimado em 15% para a enzima bruta produzida pelo fungo e 5,5% para a glucoamilase pura produzida pelo fungo, em meio suplementado com amido de batata Sigma®. Pode-se inferir que o conteúdo de carboidratos da enzima bruta é elevado pelo fato de o meio de cultura possuir muitos carboidratos que são usados como fonte de carbono.

4.28 Determinação das constantes cinéticas

Este experimento teve como objetivo analisar parâmetros de cinética enzimática, bem como a eficiência catalítica da enzima.

A faixa de concentração de substrato testada foi estabelecida a partir de uma revisão bibliográfica quanto aos parâmetros cinéticos de glucoamilases obtidas de fungos do mesmo gênero. O tempo reacional de 2 minutos foi escolhido para a coleta de dados, uma vez que neste tempo foi verificado previamente que a enzima não alcançou o seu estado de saturação e dessa forma os valores de atividade específica correspondem às velocidades iniciais. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram estimados em 0,59 mg/mL e 308,01 U/mg, respectivamente (Tabela 12 e 13 e Figuras 25 A e B).

Tabela 12. Valores da velocidade inicial nas diferentes concentrações de substrato em 2 minutos de reação.

[S] (mg/mL)	V (U/mg)
0,05	8,66
0,1	43,66
0,2	68,66
0,3	83,33
0,4	110,33
0,5	143,66
0,8	189,33
0,9	203,33
2	253,66
3	270,33
4	280,67
5	290,66
6	295,22
7	295,55

A dosagem enzimática foi realizada através do método de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos.

Figura 25. (A) Velocidade máxima da amilase em diferentes concentrações de substrato com 2 minutos de reação, utilizando a representação gráfica de MICHAELIS-MENTEN, (1913). (B) Representação gráfica de LINEWEAVER-BURK, (1934) ou duplo recíproco.

Tabela 13. Constantes cinéticas da glucoamilase pura produzida pelo fungo termotolerante *Aspergillus japonicus* em meio suplementado com amido de batata Sigma® 1%.

Substrato	$V_{\text{máx.}}$ (U/mg de proteína)	K_m (mg/mL)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m (s^{-1} $mg^{-1}mL^{-1}$)
Amido Reagen®	308,01	0,59	369,58	626,40

4.29 Análise proteica para identificação da glucoamilase

As proteínas purificadas foram enviadas ao Laboratório de Enzimologia Molecular do CTBE - Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, CNPEM em Campinas – SP onde tiveram seus aminoácidos identificados por análise comparativa com outros gêneros e espécies de fungos produtores de glucoamilase. A análise dos aminoácidos da enzima purificada produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus*, foi feita pelo programa “Mascot Search Results”, e a base de dados usada para

a identificação da enzima foi a do “National Center of Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Com a análise foi possível observar que a enzima realmente se tratava de uma amilase por obter identidade com o domínio de ligação ao amido existente no fungo *Neosartorya fischeri* NRRL 181, (número de acesso XP_001264149.1), Além disso, a identificação dos aminoácidos da amilase em estudo produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus*, demonstrou também identidade com as glucoamilases produzidas pelos fungos de *Aspergillus niger*., *Aspergillus nidulans* FGSC A4, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus ficuum* e *Penicillium chrysogenum* (Tabela 14).

Tabela 14. Análise comparativa dos aminoácidos da glucoamilase produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus* com aminoácidos de diferentes espécies de fungos com 100% de identidade.

Fungos	Sequência	Número de acesso	Identidade	% de identidade e cobertura dos peptídeos
<i>A. nidulans</i>	K.ETDGSIVWESDPNR.S	XP_680671.1	Superfamília das CBM 20	100%
<i>A. niger</i>	K.FNVDETAYTGSWGRPQR.D	3EQA_A	Glucoamilase	100%
<i>A. awamori</i>	K.FNVDETAYTGSWGRPQR.D	BAD06004.1	Glucoamilase	100%
<i>A. ficuum</i>	K.FNVDETAYTGSWGRPQR.D	AAT58037.1	Glucoamilase	100%
<i>N. fischeri</i>	K.KETDGSVIWESDPNR.S	XP_001264149.1	Superfamília das CBM 20	100%
<i>P. chrysogenum</i>	K.DLTWSYAALLSAARR.E	BAC82551.1	Glucoamilase	100%

Pode-se concluir ainda que o fungo *Aspergillus japonicus* localiza-se proximamente ao fungo *Aspergillus nidulans* FGSC A4, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus ficuum* e o *Aspergillus niger*, estando mais próximo filogeneticamente dos fungos *Aspergillus niger* e o fungo *Aspergillus ficuum*.

Conforme já existente na literatura, as glucoamilases pertencem a uma família em comum, sendo esta família chamada de GH15. Portanto, a enzima identificada como glucoamilase que foi produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus* é integrante da família GH15 que é o único grupo das glucoamilases até agora estudado. Sendo assim foi possível estimar e relacionar, através da construção de um fenograma a sequência das glucoamilases já estudadas.

O fungo *Aspergillus japonicus* situa-se entre os fungos *Aspergillus ficuum* e o fungo *Aspergillus niger* por estar proximamente situado na árvore filogenética do gênero (Figura 26).

Figura 26. Fenograma construído com base nas glucoamilases que foram similares no processo de identificação com a glucoamilase produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus*. Os números de acesso dos fungos no NCBI são *A. nidulans* FGSC A4 (XP_680671.1), *A. niger* (3EQA_A), *A. awamori* (BAD06004.1), *A. ficuum* (AAT58037.1) e *P. chrysogenum* (BAC82551.1). A análise filogenética foi feita no programa CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

Parte 4

**Aplicação da amilase produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus* no
processo de branqueamento do papel reciclado**

4.30 Tratamento enzimático das polpas celulósicas

4.30.1 Desagregamento do papel e determinação da consistência da polpa celulósica

Utilizou-se duas amostras de 600 g de cada, sendo uma de folhas de papel sulfite usado e outra de folhas de revistas velhas, cada uma foi desagregada em 4 litros de água utilizando-se um “mixer”, após a homogeneização da amostra, a porcentagem de polpa seca que continha na amostra total foi determinada sendo de 30% de polpa seca para o papel e 31% de polpa seca para a revista. Posteriormente este valor obtido foi utilizado no preparo da polpa para o biobranqueamento.

3.30.2 Efeito do tratamento enzimático das polpas celulósicas com a amilase extraída do fungo *Aspergillus japonicus*

A aplicação de enzimas no biobranqueamento de polpa de celulose vem sendo amplamente estudada há anos, visando principalmente a preservação do meio ambiente e alcançar uma forma sustentável alternativa aos produtos químicos, uma vez que os processos convencionais utilizam compostos organoclorados e esses quando não são devidamente tratados podem ser a causa de desequilíbrio e poluição ambiental (VILKARI *et al.*, 1994). A enzima utilizada neste experimento apresentava uma atividade de 50,37 U/mL. Após o tempo de incubação da enzima com as amostras de papel, as amostras foram lavadas conforme descrito em matérias e métodos e foram prensadas formando “bolachas” (Figura 27A) as quais foram usadas para realizar a medição da alvura (Figura 27B e 27C). O tratamento da polpa celulósica apresentou resultados satisfatórios demonstrando a capacidade de glucoamilase produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus* de auxiliar no processo de branqueamento do papel reciclado.

Figura 27. (A) “Bolachas” de papel reciclado prensado formadas após a aplicação da enzima. (B e C) aparelho de medição da alvura.

3.30.3 Determinação de Alvura da polpa celulósica

Os parâmetro utilizados para avaliar a atuação das enzimas sobre a polpa de celulose neste trabalho foi a análise da alvura da polpa. Sempre comparado com a polpa sem tratamento enzimático (controle).

Foram realizados diferentes tratamentos enzimáticos nas polpas, utilizando-se de celulase comercial, íon MnCl_2 e variando-se a quantidade de polpa seca testada em cada um dos experimentos (Figura 28).

Com os resultados, observou-se um aumento na alvura em todos os experimentos. Foi utilizada uma polpa controle sem nenhum tratamento para comparação. A ação da amilase na hidrólise do amido presente na polpa foi comprovada, proporcionando no primeiro tratamento utilizando 20 U de enzima em 10 e 20 g secas de polpa de papel sulfite por 180 minutos, uma eficiência de 22,2 e 15,06% respectivamente, para a polpa de celulose do papel sulfite tratada com a enzima bruta produzida pelo fungo *A. japonicus*, eficiência de 26,67 e 20% respectivamente, para a polpa de celulose do papel sulfite tratada com a amilase produzida por *A. japonicus* junto com a celulase comercial, 30,56 e 25,56% respectivamente, para a polpa tratada com a amilase produzida por *A. japonicus* junto com a celulase comercial e com o íon MnCl_2 (Figura 28A). No tratamento enzimático utilizando-se 20 U de enzima em 10 e 20 g secas de polpa de papel de revista com 180 minutos de incubação a 55°C, os resultados mostram uma eficiência 22,34 e 17% respectivamente, para a polpa de celulose do papel de revista tratada com a enzima bruta produzida pelo fungo *A. japonicus*, eficiência de 27 e 22% respectivamente, para a polpa de celulose do papel de revista tratada com a amilase produzida por *A. japonicus* junto com a celulase comercial, 30 e 25% respectivamente, para a polpa tratada com a amilase produzida por *A. japonicus* junto com a celulase comercial e com o íon MnCl_2 (Figura 28B). Em se tratando de eficiência sobre a alvura, quando comparados os tratamentos, é possível observar que quando utilizadas 10 g secas de papel sulfite e revista, os resultados de alvura são mais expressivos se comparados aos resultados com 20 g de polpa seca de papel sulfite e revista. Foi possível notar também, uma leve preferência da enzima pelo papel de revista, demonstrando timidamente resultados um pouco melhores do que aqueles apresentados quando foi utilizado o papel sulfite, resultado este que pode indicar a ativação da enzima por algum metal pesado que se faz presente nesses tipos de papéis produzidos.

Não houveram diferenças significativas na eficiência da enzima sobre as polpas tratadas, porém, foi observada uma eficiência maior quando utilizada uma quantidade menor de polpa tratada, podendo-se inferir que quando a quantidade de enzima disponível é maior a capacidade de branqueamento do papel também aumenta.

Figura 28. Alvura relativa do papel (A) sulfite e (B) do papel de revista. O controle não foi tratado com amilase, as demais amostras foram tratadas com 20 U/g de polpa seca, incubadas por 180 minutos, 55°C e pH 5,5.

As amilases 1 e 2 referem-se a amostra da amilase utilizada sob a forma de duplicata. A Alvura Relativa 100% (controle) do papel de revista foi de 70,38 ($\pm 0,38$) e do papel sulfite de 68,01 ($\pm 1,12$). A média do desvio padrão foi de $\pm 1,22\%$ para a alvura do papel de revista e de $\pm 0,88\%$ para a alvura do papel sulfite. As determinações das alvuras foram realizadas conforme descrito no item 3.39 de material e métodos.

4.31 Determinação de amilase residual e açúcares redutores no filtrado da polpa de celulose tratada

Para avaliar a ocorrência de perda de enzima ou a possibilidade de reutilizar o filtrado das polpas de celulose tratadas com as enzimas em novo biobranqueamento, após o tratamento enzimático das polpas tratadas, com 20 U/g de polpa seca, sendo a atividade da enzima utilizada de 50,37 U/mL, foram recolhidos os filtrados e realizada dosagem enzimática nos mesmos. Os filtrados das polpas tratadas durante 180 minutos apresentaram um baixo teor residual de amilase. Das 20 U iniciais da enzima aplicadas

no papel, restaram apenas 4,5 e 6,4 U de amilase quando aplicada na celulose de papel sulfite e 6,3 e 5,8 U de amilase quando aplicada em celulose de papel de revista (Figura 29). Os açúcares redutores que compunham os filtrados do papel sulfite e da revista foram quantificados através do método colorimétrico de DNS conforme descrito no item 3.7.1 de material e métodos. O filtrado de ambas as amostras se mostrou com uma quantidade maior de açúcares redutores quando comparado com o controle (filtrado da enzima fervida reagida com papel). O controle da celulose de papel sulfite apresentou 0,106 U/mL de açúcares redutores enquanto que a amostra 1 apresentou 0,273 e a amostra 2 apresentou 0,329 U/mL, o controle da celulose de papel de revista apresentou 0,131 U/mL enquanto que a amostra 1 apresentou 0,237 U/mL e a amostra 2 apresentou 0,228 U/mL, o que nos leva a crer que a enzima foi capaz de hidrolisar o amido existente e transformá-lo em glicose (Figura 30).

Figura 29. Amilase inicial (50,37 U/mL), e amilase residual, nos filtrados das polpas após 180 minutos de incubação a 55°C no biobranqueamento.

Figura 30. Quantidade de açúcares redutores presentes nos filtrados das amostras.

As enzimas são especialmente interessantes na exploração industrial de fontes naturais renováveis e ainda apresentam uma vantagem sobre processos químicos, sendo mais seguras para o meio ambiente, mais específicas e fáceis de serem controladas (FAGERSTRÖM, 1995).

A escolha da enzima a ser utilizada em uma determinada indústria deve atender as necessidades da mesma, ou seja, facilitar os processos fermentativos.

Processos industriais demandam grandes quantidades da enzima de interesse, sendo que esta deverá apresentar o máximo de atividade e, para tanto, inicialmente deve-se definir qual o fungo que melhor produz esta enzima. Foram testados 28 fungos com morfologias diferentes a fim de se obter um bom produtor de amilase. Foram realizados também testes em diferentes temperaturas com o objetivo de encontrar fungos termofílicos/termotolerantes. Verificou-se que alguns fungos tiveram bom crescimento em altas temperaturas, sendo assim possível classificar estes fungos como micro-organismos termófilos de acordo com MADIGAN *et al.*, (2003) que classificaram os micro-organismos de acordo com a sua temperatura de crescimento: psicrófilos (temperaturas baixas), mesófilos (temperaturas medianas), termófilos (temperaturas elevadas) e hipertermófilos (temperaturas muito elevadas). Além disso, apenas os fungos termófilos têm a excepcional capacidade de crescer em temperaturas elevadas, mas não em temperaturas mais baixas. Porém, estes fungos não tiveram um nível significativo de produção amilolítica, desde que apenas 2 fungos tiveram uma boa produção da enzima selecionada mas não tiveram crescimentos significativos às altas temperaturas. Estes fungos foram o 6B e o 12E, que foram identificados como *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus parasiticus* respectivamente. O fungo *Aspergillus parasiticus* tem produção de toxinas de acordo com OKOTH *et al.*, (2012) e, por este motivo foi logo descartado do estudo, sendo então, selecionado o fungo *Aspergillus japonicus* para continuação dos estudos. Também é descrito na literatura que a espécie *A. japonicus* produz diversas enzimas como, por exemplo, pectinases (TEIXEIRA *et al.*, 2000; SEMENOVA *et al.*, 2003), β -xilosidases (WAKYIAMA *et al.*, 2008; PEDERSEN *et al.*, 2007), celulasas (KUNDU *et al.*, 1988) e fitases (PROMDONKOY *et al.*, 2009). Após a definição do fungo deve-se otimizar o meio de cultura cujo micro-organismo será inoculado.

Observou-se que o micro-organismo em estudo, *A. japonicus*, obteve os maiores níveis de atividade amilolítica extracelular no meio KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995), CP (PEIXOTO *et al.*, 2003) e SR (RIZZATTI *et al.*, 2001). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por RIZZATTI *et al.*, (2001) nos quais o meio KHANNA

foi utilizado para a produção de xilanase pelo fungo *A. phoenicis* e FACCHINI *et al.*, (2011) que utilizou o meio de SR para a produção de CMCase e xilanase pelo fungo *A. japonicus*. Além disso, foi possível observar que as amilases produzidas pelo fungo *A. japonicus* levaram a uma acidificação do pH final do meio de cultura. Estes resultados podem ser explicados pela produção de ácido oxálico, que tem propriedades quelantes e podem aumentar a disponibilidade de íons de metais, tais como o ferro e o cálcio (DUTTON & EVANS, 1996). Alternativamente, a formação de ácido oxálico pode estar envolvida na competição biológica (ROSLING *et al.*, 2004) para facilitar a atividade da enzima na formação da glicose a partir da hidrólise do substrato, uma vez que o pH ótimo da enzima situa-se entre 5 e 6. A produção de ácido oxálico por fungos é mais eficiente nos pH 5 a 8, e está completamente ausente abaixo de pH 3,0 (DUTTON & EVANS, 1996). Outro importante ácido produzido por fungos é o ácido cítrico, que tem a mesma função do ácido oxálico. Sua produção começa no pH 3,0 e é ótima apenas abaixo de pH 2,0 (ANDERSEN *et al.*, 2009). Assim a acidificação do meio é causada pela produção de metabólitos secundários (ácidos) que é um fenômeno importante para a sobrevivência do fungo.

O tempo de incubação de um micro-organismo possui uma alta influência na produção enzimática, uma vez que, a incubação por um período curto pode não resultar na produção máxima das enzimas amilolíticas, visto que, o micro-organismo provavelmente encontra-se na fase de crescimento vegetativo, assim como, a manutenção da cultura por um longo período pode levar ao esgotamento dos nutrientes, acarretando um declínio no crescimento e na produção enzimática (PELCZAR *et al.*, 1996).

A produção amilolítica máxima ocorreu com 4 dias de crescimento, em cultivo estacionário à 25°C. Vale ressaltar que após o 4º dia de crescimento o fungo em estudo manteve uma produção amilolítica bastante alta até o ultimo dia de experimento em condição estática, tendo assim uma grande importância industrial. Já na agitação, a cultura apresentou um crescimento menor com níveis enzimáticos mais baixos quando comparados àqueles obtidos na condição estática. Estes resultados podem ser explicados com base no stress que é causado quando o fungo é cultivado em condição de agitação, uma vez que esta condição torna a formação de micélio mais difícil, porque os esporos não se agrupam facilmente resultando em “pellets”, necessitando, assim, de períodos mais longos para crescer e secretar a enzima para o meio externo. Além disso, a agitação durante a fermentação pode inibir a formação do ácido láctico prolongando o tempo de fermentação e, eventualmente, diminuindo a atividade enzimática. A agitação também

pode provocar a incorporação de ar no sistema, interferindo com a dinâmica da fermentação (AGUIRRE-EZKAURIATZA *et al.*, 2008). Quanto ao pH final do meio, observou-se uma variação de 6,0 que foi o pH inicial no dia do inóculo, para 2,5 – 3,0 após 3 dias de crescimento, e esse pH final se manteve durante todos os dias de teste de tempo de crescimento. Estes resultados, porém, estão em desacordo com os resultados obtidos por MICHELIN *et al.*, (2008) em que o fungo *Paecilomyces variotii* atingiu máximo crescimento após 3 dias em meio SR com pH 6,0 e a 40°C, com uma atividade amilolítica máxima no 8º dia de crescimento em agitação.

Os níveis extracelulares observados foram bastante expressivos em todos os experimentos realizados, sendo que em todos eles foram utilizados meios suplementados com amido 1%. Esses resultados foram interessantes, uma vez que, a secreção de amilases é vantajosa do ponto de vista industrial, já que elimina o processo de maceração celular e extração enzimática.

Uma das mais importantes propriedades dos micro-organismos é a sua habilidade em adaptar-se a ambientes extremos, nos quais fatores como pH, temperatura e concentração de sal, ultrapassam os valores daqueles considerados como padrões para a maioria dos organismos (LASA E BERENGUER, 1993).

O pH ótimo inicial observado para a amilase produzida pelo fungo *A. japonicus* foi de 5,5 quando inoculado em meio KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995) com fonte de carbono amido 1%, mas o fungo em estudo manteve uma alta atividade enzimática desde o pH inicial de 3,5 até o pH de 8,5, demonstrando-se assim tolerante tanto à altos valores de pH assim como baixos valores de pH.

Este resultado difere um pouco, com os relatados por FACCHINI *et al.*, (2011), que utilizou *Aspergillus japonicus* para a produção de xilanases e de CMCases que foram melhores produzidas com o pH inicial do meio de cultivo em 6,0 e 7,0, respectivamente. No entanto, é importante mencionar que, em todos os meios de cultivo, o pH final foi cerca de 2,5-3,0, e a enzima não perdeu a sua atividade neste intervalo de pH. Estes resultados podem ser comparados com os relatados por MAKTOUF *et al.*, (2013) que estudou uma amilase produzida por *Bacillus sp* e que obteve atividade máxima com o pH 5,0. OYELEKE E ODUWOLE (2009) também relataram resultados similares quando estudaram uma amilase produzida por *Bacillus subtilis* que apresentou alta atividade enzimática em um intervalo de pH 6-8. OYELEKE *et al.*, (2010) estudaram uma amilase produzida por *Aspergillus niger* com uma atividade máxima no mesmo pH, mas nos pH

de 4-7 o fungo também demonstrou alta produção de amilase, assim como foi obtida neste estudo.

Procedimentos em temperaturas elevadas são comuns dentro da indústria, com isso as enzimas termoestáveis apresentam numerosas possibilidades de aplicação, sendo, portanto amplamente estudadas (VIHINEN E MÄNTSÄLÄ, 1989).

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que afetam o crescimento e a sobrevivência dos micro-organismos. Cada organismo apresenta uma temperatura mínima, abaixo da qual é incapaz de crescer, uma temperatura ótima, em que o crescimento ocorre rapidamente, e uma temperatura máxima, acima da qual ocorre a morte microbiana. A temperatura ótima de crescimento de um organismo sempre se encontra mais próxima da temperatura máxima do que da temperatura mínima (MADIGAN *et al.*, 2003).

Nesse sentido, o efeito da temperatura de cultivo sobre a síntese de amilase e o crescimento micelial do fungo *A. japonicus* foi estudado incubando-se o micro-organismo de 25 a 40°C. Em fermentação com meio líquido KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995), houve crescimento em temperaturas entre 25 e 40°C e foi possível, dessa forma, observar que a melhor temperatura de crescimento e produção foi 25°C.

Este resultado é consistente com o descrito na literatura, em que diz que *A. japonicus* produz altas quantidade de enzima à temperatura ambiente, por exemplo, podemos citar a produção de pectinases segundo TEIXEIRA *et al.*, (2000), que utilizou a temperatura de 30°C como temperatura de crescimento e produção pelo fungo *A. japonicus*. Podemos citar também a produção de β - xilosidase estudada por WAKYIAMA *et al.*, (2008) o qual também utilizou 30°C como temperatura de crescimento e produção pelo fungo *A. japonicus*. BINUPRIYA *et al.*, (2006) em seus estudos também relataram que a cepa de *A. japonicus* cresce à temperatura ambiente (27°C e 28°C). O estabelecimento de uma temperatura ótima de cultivo na produção de enzimas por micro-organismos é prática rotineira neste tipo de estudo e a temperatura ideal está evidentemente relacionada às características de cada micro-organismo.

O aproveitamento de resíduos industriais ou de processamento do amido, os quais contêm quantidades residuais suficientes para esse fim, constitui uma das alternativas mais viáveis. Isso porque, resíduos agroindustriais são substratos alternativos para a produção de amilases e seu uso para esse fim auxilia a solução dos problemas de poluição que o descarte dos mesmos pode causar no meio ambiente.

Com base nisso, utilizou-se vários açúcares como fontes indutoras e repressoras da produção amilolítica pelo micro-organismo em estudo, sendo estas fontes utilizadas na panificação. Os maiores níveis extracelulares foram observados quando os meios foram suplementados com amido de batata Sigma®, maltose e amido de arroz, na concentração de 1%. Esses resultados foram particularmente interessantes, uma vez que, fontes que são utilizadas na fabricação de pães obtiveram uma excelente ação de indução da síntese de amilases pelo *A. japonicus*. Além disso, é importante mencionar que a ação de indução de síntese amilolítica verificada por maltose é mediada por um sistema de transporte deste dissacarídeo por permeases. Os genes requeridos para a produção da enzima amilolítica usando maltose são encontrados no locus MAL (MAL 1, MAL 4 e MAL 6). Análises físicas e genéticas de MAL mostraram que cada locus ativo inclui três genes que provavelmente codificam as proteínas de transporte de maltose (NEEDLEMAN *et al.*, 1984).

O mesmo foi observado por AGGER *et al.*, (2002) em ensaios com recombinantes de *A. nidulans*, cuja utilização de 50% de maltose no meio de cultura proporcionou o aumento na produção de α -amilase e a repressão da expressão de glucoamilase, resultado da rápida degradação de maltose à glicose, concluindo que, o melhor indutor na produção de α -amilase foi o amido.

Dados verificados nesse trabalho corroboram também com os estudos de DÍAZ *et al.*, (2003) com produção de β -amilase por *Xanthophyllomyces dendrorhous* alcançando altos níveis de atividade enzimática quando o fungo foi inoculado em meio com amido, como indutor, sendo o mesmo efeito observado com maltose.

KATHIRESAN E MANIVANNAN (2006) observaram que os níveis mais elevados de α -amilase produzida por *Penicillium fellutanum* foram obtidos com o cultivo em meio suplementado com maltose, seguido de xilose e D - glicose como fonte de carbono. Assim, os resultados obtidos por pesquisadores citados são semelhantes aos observados com a amilase produzida por *A. japonicus*. GIANNESI *et al.*, (2006) verificaram que a fonte de carbono maltose e o amido induziram a produção de α -glicosidase por *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* mas a sacarose atuou inibindo a produção amilolítica. Dessa forma, os resultados obtidos pelos pesquisadores citados são similares ao observado com a produção de amilase pelo *A. japonicus*. Durante o desenvolvimento deste trabalho foi observado uma excelente produção enzimática usando fontes de carbono complexas e pouco onerosas. A amilase produzida por *A. japonicus* quando cultivado em casca e bagaço de laranja, hidrolisou o substrato amido em níveis elevados.

FACCHINI *et al.*, (2011) relataram o mesmo resultado em seu estudo onde *A. japonicus* produziu um bom nível de xilanase ($31,59 \pm 0,17$ U/ g) utilizando-se como fonte de carbono a casca de laranja o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho. Um resultado semelhante também foi verificado por TEIXEIRA *et al.*, (2011) que utilizou enzimas pectinolíticas para processar suco de Cupuaçu e diminuir a quantidade de resíduos descartados usando uma pectinase produzida por *Aspergillus japonicus* durante o processamento do suco de Cupuaçu. Estes são resultados especialmente interessantes para aplicação industrial no ramo alimentício, isto porque, atualmente, o fornecimento de misturas enzimáticas (xilanase, fosfolipase, amilase, glicose oxidase) em conjunto com emulsificantes (polissorbato, DATEM) é uma prática comum para corrigir a qualidade das farinhas nos moinhos que produzem pré-misturas para pães, bolos e biscoitos e, principalmente, o pão francês, substituindo os antigos oxidantes químicos como o bromato e a azodicarbonamida. Assim, a aplicação da enzima em cereais está cada vez mais promissora nos dias de hoje, assim como no processamento da moagem do trigo e do milho durante a produção da farinha e no uso de seus derivados (palhas, farelos) na produção de bicompostíveis.

Uma das maneiras de se aumentar a velocidade de uma reação química é elevar a temperatura, resultando numa maior energia cinética das moléculas e, portanto, maior número de choques entre a enzima e o substrato (LEHNINGER *et al.*, 2008).

Quando a temperatura ótima da enzima foi analisada observou-se que a temperatura onde se obteve a máxima atividade amilásica foi a de 50°C, resultado este que corrobora com os da literatura onde se encontra que a temperatura ótima para as α -glucosidases varia de 35°C a 65°C, de acordo com OKUYAMA *et al.*, (2005). Os dados de temperatura ótima encontrados para as amilases estudadas nesse trabalho foram aproximadamente iguais também para α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Pichia burtonii* (WANDERLEY *et al.*, 2004 e TAKEUCHI *et al.*, 2006). Assim como, foi o mesmo verificado para a α -amilase isolada de *Streptomyces gulbargensis* que obteve sua temperatura ótima entre 45-50°C (SYED *et al.*, 2009). Entretanto, MISHRA E MAHESHWARI, (1996), observaram que a temperatura ótima da α -amilase e da glucoamilase produzida pelo *Thermomyces lanuginosus* foi de 50°C, sendo o mesmo valor verificado para a amilase em estudo. YANG E LIU, (2004) estudaram uma α -amilase produzida pelo fungo *Thermobifida fusca* que obteve a máxima produção enzimática na temperatura de 60°C valor este que também foi verificado para a α -glucosidase de *Chaetomium thermophilum* (GIANNESI *et al.*, 2006) e que diferem dos encontrados neste estudo.

Verificou-se que o pH 5,5 foi o melhor pH para a atividade amilolítica da amilase produzida por *A. japonicus*. Na literatura muitas α -glucosidases de diversas fontes exibem pH ótimo de atividade que variam de 4,5 a 7,0 (GIANNESI *et al.*, 2006). Dados estes que discordam dos obtidos quando foi estudada uma α -amilase de *Pichia burtonii* que possuiu um pH ótimo de 5,0 (TAKEUCHI *et al.*, 2006). Estudos realizados por AQUINO *et al.*, (2001) corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, onde observaram um pH ótimo para a glucoamilase com amido e maltose como substrato, de 5,5. Ainda, PEIXOTO *et al.*, (2003) verificaram que o pH e temperatura ótimo de uma amilase produzida por *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* foram 5,0 e 65°C respectivamente, dados esses similares aos verificados nos experimentos com *A. japonicus*. SILVA E PERALTA (1998) verificaram o efeito do pH em uma glucoamilase quando utilizaram amido como substrato em tampão McIlvaine, e obtiveram a máxima atividade enzimática entre o pH 4,5 – 5,5, mas a atividade foi substancialmente detectada em valores de pH na faixa de 3,5 até 6,5 assim como foi observado neste trabalho.

Em relação à estabilidade da amilase produzida por *A. japonicus* foi possível observar que após uma hora de incubação, a atividade manteve-se em torno de 90% nas temperaturas de 30° a 50°C, constatando-se uma queda na atividade enzimática na temperatura de 60°C de cerca de 50%, após uma hora de reação, este resultado obtido foi bastante parecido, quando comparado com a estabilidade térmica da α -amilase de *S. thermophilum*, que foi estável apenas por uma hora à 50°C, e decaiu com uma meia vida com aproximadamente 25 minutos à 55°C, e 12 minutos à 60°C (AQUINO *et al.*, 2003). Nas temperaturas de 40 e 50°C foram observados aumentos da atividade, os quais foram evidenciados anteriormente por BENASSI, (2006) em amilases produzidas pelo fungo *A. phoenicis*. Em geral, as enzimas retêm suas propriedades térmicas quando são expressas em hospedeiros mesófilos, indicando que estas características são determinadas geneticamente, dado que explica a relativa estabilidade das amilases de *Paecilomyces variotii* em temperaturas elevadas (50° - 60°C), assim como em uma ampla faixa de pH (2,5 – 7,0) conforme foi demonstrado por MICHELIN *et al.*, (2008). PEIXOTO *et al.*, (2003) constataram resultados parecidos com os deste estudo quando observaram que houve uma atividade superior a 50%, depois de 120 minutos à 60°C, sendo que, na temperatura de 65°C, a amilase mostrou-se instável, contudo, com a adição de amido (1%) na reação, as enzimas não sofreram inativação térmica. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de as amilases fúngicas serem glicoproteínas com conteúdo de carboidratos variando entre 5 e 20% na forma de glicose, glucosamina, manose e etc.

Estas enzimas possuem regiões ricas em treoninas e serinas que são ideais para *O*-glicosilação, no qual os carboidratos estão unidos por uma ligação glicosídica (JAMES e LEE, 1997). Assim os arranjos de resíduos de carboidratos e proteínas podem conferir algumas propriedades para as amilases, como estabilidade térmica e resistência à proteólise. A remoção dos carboidratos reduz a estabilidade e a atividade da enzima (MICHELIN *et al.*, 2008), resultado este comprovado nos experimentos de avaliação da quantidade de carboidratos da enzima bruta e purificada. Além disso, os carboidratos são de grande importância na manutenção da estrutura tridimensional de várias proteínas, variando muito a sua quantidade dentre as diferentes classes de proteínas. Conclui-se, então, que as amilases produzidas possuem uma alta termoestabilidade, sendo uma característica fundamental para seu uso em processos industriais.

A amilase de *A. japonicus* manteve uma atividade de aproximadamente 95% nos pH de 4,0 a 6,0, resultado este que corrobora com os encontrados por HUA *et al.*, (2014) que estudaram uma glucoamilase purificada produzida por *Bispora sp*, a qual apresentou-se estável em uma ampla faixa de pH (2,0 à 5,0) mantendo 60% de sua atividade máxima em uma hora de experimento. Nos pH de 6,5 à 9,0 a amilase de *A. japonicus* demonstrou uma leve queda na atividade amilolítica mas mesmo assim ela se manteve por volta de 50%. Resultados semelhantes foram reportados por SINGH *et al.*, (2014) que estudaram uma α -amilase produzida por *Streptomyces sp* que demonstrou alta estabilidade dos pH 3,0 à 8,0 mantendo 88% de sua atividade relativa, porém, no pH 9,0 ela obteve uma queda acentuada apresentando apenas 37,98% de sua atividade relativa durante 30 minutos de experimento. Já no pH 9,5 a amilase de *A. japonicus* ainda mantinha 40% de atividade e no pH 10,0 houve uma queda brusca chegando a desnaturação da enzima, resultados estes que discordam dos obtido por ABDUL MANAS *et al.*, (2014) que estudaram uma amilase maltogênica produzida por *Bacillus lehensis* que manteve 80% de sua atividade relativa quando exposta durante 30 minutos no pH 10.

Após a caracterização bioquímica da amilase bruta produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus*, foi analisada a capacidade mutagênica da luz ultravioleta germicidal light G15T8 sob o fungo, o qual foi exposto em diferentes tempos a esta luz. *A. japonicus* se mostrou um fungo extremamente resistente à luz ultravioleta, não demonstrando grandes alterações morfológicas quando exposto até 40 minutos de luz ultravioleta. Além disso, estes resultados são interessantes para a comunidade acadêmica e científica da área da saúde, visto que contradizem a literatura, onde está documentado

por UEKI *et al.*, (2008), que 15 minutos de exposição à luz Ultravioleta *germicidal light* G15T8 é suficiente para esterilizar os locais de trabalho.

A atividade da glucoamilase produzida pelo fungo mutado não sofreu grandes alterações quando comparada à atividade da enzima produzida pelo fungo não mutado, provando assim a grande resistência do fungo em estudo e a estabilidade da produção de glucoamilase pelo fungo *Aspergillus japonicus*, mesmo depois de um longo tempo de exposição ao agente mutagênico.

A estabilidade da enzima produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus*, que foi exposto à luz ultravioleta, com relação à temperatura se mostrou levemente menor quando comparada com a estabilidade da enzima produzida pelo fungo sem exposição à luz ultravioleta, porém manteve-se o perfil das amilases produzidas tanto pelo fungo não mutado como pelo fungo mutado, podendo-se assim inferir que a amilase produzida tanto pelo fungo que sofreu mutação como pelo fungo que não sofreu mutação possuem o mesmo padrão de estabilidade o que nos leva a crer que a amilase, produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus* mutado, foi muito pouco afetada, demonstrando assim uma resistência do fungo na produção de amilase, sem sofrer grandes alterações em sua sequência de aminoácidos.

O fungo *A. japonicus* produziu níveis elevados de amilase quando cultivado com amido de batata Sigma® e em maltose 1% como fontes de carbono. Os ensaios com as amilases que foram produzidas nas diferentes concentrações destas fontes de carbono mostraram uma atividade elevada tanto na presença do amido Reagen® como da maltose como substratos. Quando as enzimas produzidas em amido de batata Sigma® foram colocadas na presença do amido Reagen® como substrato, a atividade da enzima produzida nas concentrações de 0,5 e 0,75% de amido de batata Sigma® foi elevada atingindo uma produção máxima quando o fungo foi cultivado em amido de batata Sigma® 1,0%.

MAALEJ *et al.* (2014) relataram o mesmo resultado em seu estudo, onde o aumento da concentração de amido de batata aumentou a produção de amilase e a atividade máxima foi obtida na presença de 1% de substrato. Quando a maltose foi utilizada, a atividade amilolítica mais elevada foi observada na concentração de 0,5 e 0,75%. Resultados semelhantes foram observados por LU *et al.*, (2010), que mostrou um alto nível de indução da produção de glucoamilase no cultivo em maltose, sendo identificada como a proteína extracelular mais abundante produzida por *Aspergillus niger* em um estudo de proteoma.

Quando as concentrações de fonte de carbono (amido de batata Sigma® e maltose) ultrapassaram 1%, foi observado um declínio acentuado na produção de amilase e uma queda do crescimento do fungo *A. japonicus*, corroborando com os resultados de MAALEJ *et al.* (2014) que usou 1,5 e 2% de amido de batata e observou uma rápida diminuição da produção de enzimas, embora a biomassa se mantivesse praticamente constante. Isto difere dos resultados encontrados neste trabalho, onde a biomassa teve uma grande queda, o que pode ser explicado pela degradação, durante a fermentação, de amido por α -amilases, resultando na acumulação de grandes quantidades de açúcar redutor, o que levou a um aumento da concentração de açúcares e, por conseguinte, a repressão catabólica das α -amilases (MORKEBERG *et al.*, 1995). No entanto, em nossos experimentos não foi detectada a presença de α -amilases, portanto a diminuição da atividade amilolítica e o crescimento do fungo, podem ser explicados pelo excesso de fonte de carbono, que pode reprimir a indução da produção da enzima amilolítica. MESBAH E WIEGEL (2014) encontraram resultados ligeiramente diferentes sobre a concentração de amido solúvel necessária para a repressão da produção de amilase por *Amphibacillus sp*, a qual teve sua atividade inibida por concentrações de amido solúveis superiores a 0,3%.

No experimento com a cromatografia em camada delgada de sílica os produtos de hidrólise da amilase com maltose e amido Reagen® foram analisados e foi observado apenas a formação de glicose, em ambos os substratos, no perfil de degradação. Este fato caracteriza a presença de uma glucoamilase ou α -glucosidase. Isto porque os α -amilases hidrolisam amido para formarem glicose e malto-oligossacarídeos, fato que não foi observado na TLC. De acordo com FAIJES E PLANAS (2007), glucosidases têm sido extensivamente estudadas devido à ação de catalise para a síntese de oligo e polissacarídeos. Assim, a amilase bruta produzida pelo fungo termotolerante *A. japonicus* em meio com 1% de amido de batata Sigma® demonstrou a degradação de compostos amilolíticos (maltose, oligossacarídeos e amidos), até a formação de apenas glicose, indicando a presença de uma glucoamilase.

Os testes realizados com a amilase de *A. japonicus* em extrato bruto em diferentes concentrações de maltose e amido de batata Sigma® e na cromatografia em camada delgada de sílica mostraram que estas enzimas têm um grande potencial para aplicação em processos biotecnológicos. A glucoamilase hidrolisou eficientemente as duas fontes de carbono com uma elevada atividade e uma grande quantidade de glicose formada.

O extrato bruto, produzido em amido de batata Sigma® 1%, foi purificado utilizando cromatografia de eluição de troca iônica (DEAE-celulose). No final do passo de purificação foi possível determinar o grau de recuperação de 85,96% e um fator de purificação de 1,32 vezes, quando comparado com o extrato enzimático bruto. SILVA *et al.*, (2009) relataram resultados semelhantes em uma purificação de uma glucoamilase produzida por *Aspergillus niveus*, em que foi obtida uma recuperação de 87,1% e um fator de purificação de 1,5 vezes.

A fase seguinte foi a de eluição e consistiu na caracterização da pureza da glucoamilase em gel de poliacrilamida sob condições não desnaturantes (PAGE) e desnaturantes (SDS-PAGE). Em ambos os géis, a glucoamilase aparece pura e mostrou atividade em gel polimerizado 10% com amido solúvel. A caracterização em condições desnaturantes (SDS-PAGE) também foi importante para estimar a massa molecular que foi de cerca de 72 kDa. TEOTIA *et al.*, (2001) relatou uma glucoamilase purificada a partir de *A. niger* que foi purificada usando apenas um passo de purificação, assim como foi observado no presente trabalho, utilizando a precipitação de afinidade com alginato e esta glucoamilase apresentou uma massa molecular de 78 kDa o que corrobora a massa molecular encontrado para glucoamilase produzida por *A. japonicus*.

O pH ótimo de atividade da glucoamilase purificada do fungo *A. japonicus* foi de 5,0. Isto está de acordo com o descrito na literatura. Enzimas purificadas e identificadas como glucoamilases produzidas por linhagens de *A. terreus* mostraram atividade ótima em pH 4,0 e 5,0 (ALI E HOSSAIN, 1991; GHOSH E CHATTERJEE, 1991), respectivamente. BAGHERI *et al.* (2014) encontraram uma glucoamilase produzida por *A. niger* que mostrou a atividade máxima em pH 5,0, esses dados corroboram os encontrados neste trabalho.

A atividade da glucoamilase foi ácida-alcalina tolerante e manteve-se estável durante 1 hora em uma gama de pH 3,0-7,0 mantendo 70% da sua atividade relativa. BENASSI *et al.*, (2014) também relataram uma glucoamilase produzida por *Aspergillus phoenicis* que era totalmente estável na faixa de pH de 3,0 a 6,0, durante 1 hora e que está totalmente de acordo com os resultados encontrados para a glucoamilase de *Aspergillus japonicus*. Em 2 horas de experimento, houve uma diminuição na atividade da glucoamilase, mas ela manteve aproximadamente 65% da sua atividade relativa nos pH 4,5 a 6,0 e cerca de 45% nos pH 3,0; 3,5; 4,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0. Em 5 horas de experimento, a atividade relativa se manteve 70, 75, 80, 85, 85, 90, e 75% nos pH 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0, respectivamente, em outros valores de pH houve um declínio

acentuado na atividade. Com 28 horas de experimento, a atividade manteve-se estável na gama de pH de 3,0-6,0 mostrando um valor acima de 80%, e atingiu 100% de atividade relativa, no pH 4,0. Vale ressaltar que antes das 28 horas de experimento, a atividade relativa havia diminuído consideravelmente nos tempos de 1, 2 e 5 horas, mas depois de 28 horas de experimento, a atividade aumentou novamente, atingindo valores ainda mais altos do que os encontrados na reação inicial. Esses dados são interessantes porque demonstram que a enzima tem uma ampla faixa de estabilidade em pH ácido em tempos diferentes sendo um requisito extremamente importante para a aplicação industrial em processos com grandes variações de pH. A glucoamilase também demonstrou uma estabilidade alcalina, mas apenas em uma hora de incubação sendo este um resultado importante para a aplicação biotecnológica também. Além disso, o fato de que a enzima teve uma atividade relativa mais elevada após 28 horas do que 1 hora de experimento na incubação de pH ácido, pode-se inferir que depois de um certo tempo a glucoamilase tornou-se adaptada ao pH em questão e adquiriu a capacidade de catalisar o substrato com eficiência ainda maior do que antes chegando a níveis de atividade relativa próximos aos do controle.

A temperatura ótima para a atividade da glucoamilase produzida por *A. japonicus* foi de 65°C. Esta temperatura ótima está de acordo com os resultados apresentados em vários outros artigos, como a glucoamilase mutante purificada que foi produzida originalmente pelo fungo *Aspergillus awamori* e foi expressa em *Saccharomyces cerevisiae* e mostrou uma temperatura ótima de 65°C (PAVEZZI *et al.*, 2011), a mesma que foi padronizada pelo presente trabalho. SILVA *et al.* (2009) relataram uma glucoamilase produzida por *Aspergillus niveus* que apresentou a sua atividade ótima na temperatura de 65°C, sendo esta a temperatura ótima a mesma encontrada neste trabalho.

A glucoamilase estudada manteve 95% da sua capacidade hidrolítica após 90 minutos a 45°C e após 150 minutos a enzima ainda mantinha, aproximadamente, 70% da sua capacidade de hidrólise. Na temperatura de 50°C, a enzima manteve 80% da sua capacidade hidrolítica após 60 minutos de experimento; após 120 minutos a enzima mantinha ainda 50% da sua atividade relativa e, após 150 minutos a glucoamilase ainda mostrava 40% de sua atividade relativa. A 55°C, a enzima retinha apenas 30% da sua capacidade hidrolítica em 30 minutos de experimento e em 60 minutos, a glucoamilase tinha apenas 10% da atividade relativa chegando a desnaturação em 90 minutos de incubação nesta temperatura. Estes dados diferem dos obtidos por SILVA *et al.* (2009), em que a glucoamilase obtida do fungo *A. niveus* manteve 100% da sua capacidade

hidrolítica após 240 minutos de experimento a 60°C. De acordo com ZAHA E ZEIKUS, (1989), as glucoamilases de *Aspergillus* são mais termoestáveis, com uma atividade máxima nas temperaturas entre 50 e 55°C, sendo rapidamente inativadas às temperaturas próximas de 60°C, o que está de acordo com os resultados apresentados neste trabalho. Estes resultados são de interesse, porque eles aumentam o potencial para a aplicação desta enzima purificada em processos que requerem temperaturas elevadas.

A glucoamilase de *A. japonicus* mostrou uma excelente capacidade de hidrolisar substratos diferentes. O substrato mais susceptível à hidrólise da glucoamilase foi amilopectina possuindo uma atividade de 45,72 U/mL. A enzima apresentou uma excelente capacidade de hidrolisar diferentes substratos e apresentou alta afinidade para amido de arroz Sigma®, amido Reagen®, amido de batata Sigma®, glicogênio e maltose. Outro fato curioso é que esta glucoamilase prefere substratos com cadeias ramificadas, o que indica que a enzima seja realmente uma glucoamilase. Por outro lado, a falta de atividade quando na presença de α -PNPG e sacarose indica que a enzima não é uma α -glucosidase. Uma evidência adicional de que a enzima produzida por *A. japonicus* seja uma glucoamilase, foi a liberação de glicose como produto final da hidrólise do amido e da maltose na TLC. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por BENASSI *et al.* (2014), que estudou uma glucoamilase produzida por *Aspergillus phoenicis* e obteve apenas a formação de glicose à partir da hidrólise do amido na TLC, o que caracteriza esta enzima como uma glucoamilase. SILVA *et al.* (2009) encontraram uma α -glucosidase produzida por *Aspergillus niveus* que hidrolisou p-nitrofenil α -D-glucopiranosídeo e alguns polissacarídeos, como a amilose. Estes resultados discordam dos dados apresentados neste trabalho. Segundo MARÍN *et al.* (2006) estes tipos de enzimas podem ser convencionalmente classificados de acordo com a especificidade ao substrato.

De acordo com AQUINO *et al.* (2003) muitas amilases fúngicas descritas na literatura são ativadas por íons metálicos. A glucoamilase de *A. japonicus* foi incubada com diferentes íons metálicos e mostrou ativação com todos os íons na concentração de 5 mM. Houve uma ativação significativa da enzima quando incubada com 10 mM de MnCl_2 ; $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 2-mercaptoetanol e KCl. A ativação máxima observada foi na concentração de 10 mM de MnCl_2 em que a atividade relativa foi 65% acima da atividade controle, nas concentrações de 15 e 20 mM a glucoamilase mostrou uma diminuição, mas ainda manteve 21 e 6% de atividade relativa acima do controle. MICHELIN *et al.* (2008) relataram resultados semelhantes em seus estudos com uma

glucoamilase produzida pelo fungo termotolerantes *Paecilomyces variotii*, que foi ativada principalmente por íons metálicos de manganês corroborando com os resultados encontrados neste trabalho. A α -amilase de *A. niveus*, que foi estudada por SILVA *et al.*, (2013), demonstrou uma ativação de 80% acima da sua atividade relativa na presença de MnCl₂ na concentração de 1 mM, o que difere dos resultados obtidos no presente trabalho. É importante notar que o quelante EDTA causou uma leve ativação da enzima chegando a 12% acima da atividade relativa quando na concentração de 5 mM. É possível inferir que a baixa concentração de EDTA tem pouca capacidade de interferência na ação dos íons que estão presentes no extrato enzimático purificado e que gerariam uma inibição enzimática. Em geral, a glucoamilase não foi drasticamente inibida pelos íons metálicos testados em baixas concentrações, mas também foi interessante notar a baixa inibição mostrada para todos os íons testados na concentração de 10 mM. Em contrapartida, OLIVEIRA *et al.* (2010) relatou uma amilase de duas espécies de *Rhizobia* (R-926 e R-991), em que as atividades foram inibidas por todos os íons metálicos testados. A glucoamilase também mostrou uma ativação na presença de Pb(C₂H₃O₂)₂.3H₂O nas concentrações de 5 e 10 mM. É importante notar que a enzima amilolítica foi também ativada por cálcio na concentração de 5 mM, o que é muito importante, uma vez que o cálcio é um agente estabilizador utilizado em alguns processos industriais de acordo com NEGI E BANERJEE (2010). Os dados da literatura têm mostrado que muitas amilases fúngicas são dependentes de alguns íons metálicos, os quais facilitam a interação entre os sítios catalíticos da enzima com o respectivo substrato, aumentando assim a formação de produto, tal fato foi também observado no presente trabalho.

O conteúdo de carboidratos foi estimado 15% para a enzima bruta produzida pelo fungo e 5,5% para a enzima pura produzida pelo fungo, em meio suplementado com amido de batata, resultado este semelhante com o obtido por SILVA *et al.* (2009), o qual obteve α -glucosidases a partir de *Aspergillus niveus* com 4% de conteúdo de carboidratos; corrobora também com os resultados obtidos para glucoamilases de *Neurospora crassa* determinado em 5,1% por SPINELLI *et al.*, (1996).

Estudos cinéticos das glucoamilases produzidas pelo fungo *A. japonicus* demonstraram que, com o substrato amido Reagen®, a enzima apresentou uma grande afinidade, proporcionando um valor Km de 0,59 mg/mL. Resultado este que corrobora com os verificados para α -glucosidases de *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* que também apresentaram uma grande afinidade ao amido solúvel (GIANNESI *et al.*, 2006), estão também de acordo com os resultados verificados por SILVA *et al.*, (2009),

que obtiveram glucoamilases de *Aspergillus niveus*, as quais apresentaram um Km de 0,32 mg/mL no amido solúvel. Entretanto, LEE *et al.*, (2008), relataram uma glucoamilase de *A. niger* que apresentou Km de 1,48 mg/mL, sendo um pouco diferente do relatado neste trabalho.

A análise dos aminoácidos da glucoamilase purificada produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus* demonstraram identidade com a proteína do domínio de ligação em amido existente no fungo *Neosartorya fischeri* NRRL 181, de acordo com COUTINHO E REILLY, (1997); CHIBA, (1997); JANECEK E SEVÍK, (1999) e SAUER *et al.* (2000), amilases de micro-organismos são compostos de dois domínios de ligação, um domínio catalítico e um domínio de ligação ao amido, conectado por um ligante *O*-glicosídico.

Quanto ao domínio catalítico, as α -amilases são proteínas de estrutura $(\beta-\alpha)_8$ barril, enquanto que a glucoamilase adota a forma de $(\alpha-\alpha)_6$, estando o sítio ativo no seu centro. O domínio de ligação ao amido, responsável pela habilidade de uma amilase ligar e hidrolisar o amido consiste de vários segmentos de fitas β formando uma estrutura em β -barril aberta na lateral e distorcida, sendo que em glucoamilases, este é formado por um conjunto de 8 fitas β em uma dobra característica dos domínios de ligação ao amido.

A análise dos aminoácidos da glucoamilase também demonstrou haver identidade entre a glucoamilase produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus* e as glucoamilases de *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* FGSC A4, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus ficuum* e *Penicillium chrysogenum*. A similaridade apresentada bem como os dados obtidos, anteriormente, para especificidade ao substrato, nos permitiu concluir que a enzima em estudo trata-se de uma glucoamilase (3.2.1.3. 1,4- α -D-glucano glucohidrolase), resultado este que corrobora com os obtidos por SILVA *et al.* (2009), que obteve uma glucoamilase produzida por *Aspergillus niveus*, que também possuía homologia com a glucoamilase produzida por *Aspergillus niger*.

Algumas diferenças nas propriedades das enzimas são comumente descritas em diferentes linhagens. Um alto grau de variabilidade genética pode ser uma característica de um organismo vivendo em diferentes habitats (JOHNSON, 1979), o que explica as diferenças existentes entre enzimas iguais, porém, de organismos diferentes.

A glucoamilase em seu estágio bruto quando aplicada no processo de branqueamento do papel de revista e sulfite para reciclagem demonstrou uma alta capacidade de branqueamento elevando as alvuras acima do controle em todos os experimentos realizados, tanto ela sozinha quanto em associação com uma celulase comercial, com íon metálico $MnCl_2$ e com os dois juntos. Resultados semelhantes foram

observados por GUPTA *et al.* (2015), onde obtiveram uma porcentagem de branqueamento de 11,8% e 6,15%, acima da alvura controle quando aplicaram xilanase e lacase em papel de jornal velho e polpa de papel Kraft, respectivamente. É importante notar que as porcentagens obtidas por GUPTA *et al.* (2015) foram abaixo das obtidas neste trabalho onde foram usadas 20 U da enzima em 10 e 20 g secas de polpa de papel sulfite obtendo uma eficiência de 22,2 e 15,06% com a amilase, 26,67 e 20,00% com amilase + celulase comercial, 30,56 e 25,56% com a amilase + celulase comercial + íon $MnCl_2$, respectivamente. No tratamento enzimático utilizando-se das mesmas condições em polpa de papel de revista os resultados mostram uma eficiência de 22,34 e 17% com a amilase, 27 e 22% com a amilase + celulase comercial, 30 e 25% com a amilase + celulase comercial + íon $MnCl_2$. VIRK *et al.*, (2013) obtiveram um máximo aumento na alvura quando aplicaram uma combinação de xilanase e lacase em polpa de revista (8,3%), polpa de impressão a jato (4,1%), polpa de impressão a laser (3,1%) e polpa de papel xerocado (1,9%). Sendo que estas enzimas foram mais eficazes na remoção da tinta de impacto, visto que esta tinta não está fundida ao papel e é facilmente removida no processo de destintagem. A tinta sem impacto é fundida no papel, por isto ela é não-dispersiva sendo difícil de remove-la (MOHANDASS E RAGHUKUMAR 2005). Este resultado está em acordo com o resultado observado neste trabalho, onde foi possível observar uma eficiência um pouco maior da enzima no destintamento do papel de revista, sendo um tipo de tinta de impacto, o que pode ser explicado pela possível ativação da enzima por algum metal pesado, possivelmente o chumbo (HEFFRON *et al.*, 1979) que já foi provado ser capaz de levar a ativação da enzima em experimentos anteriores, e que é constituinte da tinta deste tipo de papel, além disso, os valores observados no trabalho de VIRK *et al.*, (2013) estão abaixo dos valores obtidos no presente trabalho.

MOHANDASS E RAGHUKUMAR, (2005) estudaram a bactéria marinha *Vibrio alginolyticus* que quando foi cultivada em meio nutritivo suplementado com amido, o sobrenadante da cultura livre de células pôde efetivamente levar ao destintamento da polpa de papel impresso com jato de tinta. A bactéria apresentou uma atividade amilolítica de 49 U/mL e foi possível observar que amilase eficazmente ajudou a retirar as partículas de tinta da polpa de papel impresso a jato de tinta. Este resultado é semelhante ao resultado encontrado neste trabalho, onde a amilase apresentou 50,37 U/mL de atividade e foi capaz de levar ao destintamento do papel sulfite que foi impresso por jato de tinta quando exposta durante 180 minutos ao papel.

Através dos resultados obtidos, pôde-se chegar à conclusão de que:

1. É importante a prospecção de fungos filamentosos do ambiente e a padronização das condições físicas e químicas para o seu crescimento e produção enzimática. O sistema amilolítico é preferencialmente produzido por micro-organismos, e a amilase tem grande e importantes aplicações industriais. O uso de resíduos industriais, os quais contêm quantidades residuais suficientes de nutrientes e fontes de carbono, é uma das muitas alternativas viáveis. Os resíduos agroindustriais são substratos alternativos para a produção de amilase, e seu uso para essa finalidade ajuda a resolver os problemas de poluição que são causados pelo descarte desses resíduos no meio ambiente. Entre os 20 fungos testados, *A. japonicus* exibiu os melhores resultados. Observou-se que ele é um micro-organismo termotolerante que cresce a aproximadamente 40°C e produz elevados níveis de amilase. O cultivo do fungo e a produção de amilase foram padronizadas neste trabalho. Fontes nutricionais com uma composição mais complexa atuaram como indutores da produção de amilase. Os dados obtidos a partir da amilase de *A. japonicus* sugerem uma possível capacidade para aplicação biotecnológica, já que ela é capaz de degradar fontes de carbono alternativas que são comumente considerados resíduos pelas indústrias. Estes resultados, em larga escala podem ser utilizados nas indústrias de alimentos para a produção de glicose, a partir de resíduos, através da aplicação da amilase produzida por *A. japonicus*;

2. A amilase de *A. japonicus* apresenta um grande potencial biotecnológico devido a boa produção enzimática, além de apresentar elevada temperatura ótima (55-70°C) e estabilidade a 60°C durante até 60 minutos mantendo a T₅₀ neste intervalo de tempo. A enzima apresentou uma ampla faixa de pH ótimo de ensaio (4,0-6,0) e estabilidade até o pH 7,0 durante 60 minutos mantendo a T₅₀ neste intervalo de tempo. Além disso, o fungo demonstrou-se resistente a luz ultravioleta, resultado que contradiz a literatura, portanto, as amilases secretadas em meio de cultivo com amido de batata Sigma® foram caracterizadas com propriedades distintas das demais descritas na literatura;

3. A amilase de *Aspergillus japonicus* se trata de uma enzima com características desejáveis para aplicação em processos biotecnológicos. As amilases secretadas em meio de cultura com 1% de amido de batata Sigma® foram purificadas em

apenas um passo cromatográfico na coluna de eluição DEAE-celulose e as glucoamilases purificadas foram caracterizadas com propriedades diferentes das outras enzimas descritas na literatura. A glucoamilase apresentou um pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de na faixa de 55-65°C além de excelente estabilidade a diferentes temperaturas e um pH preferencialmente ácido. A glucoamilase também mostrou excelente ativação, principalmente com o íon $MnCl_2$, notando que o chumbo também foi capaz de aumentar a atividade da glucoamilase, resultado este interessante em futuras aplicações no branqueamento do papel reciclado de revistas e jornais, que possuem tintas que constituem chumbo em suas formulações.

4. A quantidades de carboidratos da amilase bruta e da glucoamilase purificada foram quantificadas exibindo 15% para a enzima bruta e 5,5% para a glucoamilase pura produzida pelo fungo, em meio suplementado com amido de batata Sigma®. Além disso, a glucoamilase demonstrou uma alta afinidade ao substrato amido Reagen® quando as suas constantes cinéticas foram determinadas. Os aminoácidos da glucoamilase purificada foram identificados e apresentaram semelhança de 100% com glucoamilases produzidas pelos fungos de *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* FGSC A4, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus ficuum* e *Penicillium chrysogenum*. Com isso, foi possível determinar que a glucoamilase produzida pelo fungo *Aspergillus japonicus* situa-se filogeneticamente entre as glucoamilases dos fungos *Aspergillus ficuum* e do fungo *Aspergillus niger* por estar proximoamente situado na árvore filogenética do gênero. Sendo estes dados importantes para a utilização biotecnológica e industrial desta enzima;

5. A glucoamilase estudada possui características que a torna interessante objeto de estudo, com potencial aplicação nos processos de biobranqueamento de polpa de celulose para produção e reciclagem de papel. O fungo *A. japonicus* apresentou uma grande produção e melhor efeito no biobranqueamento com pouca quantidade de enzima por grama de polpa seca. Os resultados apresentados abriram a possibilidade de estudos posteriores, tanto com enfoque acadêmico, como a purificação enzimática em outras colunas de eluição, cristalização, modelagem molecular, como também, permitiram especular a utilização destas enzimas no biobranqueamento de polpa de celulose, para a produção e reciclagem de papel.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F.J. (2004) Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 86 33–49.
- ABDUL MANAS, N. H.; PACHELLES, S.; MAHADI, N. M.; ILLIAS, R. M. (2014) The characterisation of an alkali-stable maltogenic amylase from *Bacillus lehensis* G1 and improved malto-oligosaccharide production by hydrolysis suppression. *PLoS One.*, 99 106481.
- ABRAHÃO NETO, J. Algumas aplicações de enzimas. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Org.). (2001) *Biotecnologia industrial*. 1. ed. São Paulo: *Edgard Blücher.*, 3.
- ADAMS, P. R. (1990) Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. *Mycopatol.*, 112 35-37.
- AGGER, T.; PETERSEN, J.B.; O'CONNOR, S.M.; MURPHY, R.L.; KELLY, J.M. & NIELSEN, J. (2002) Physiological characterization of recombinant *Aspergillus nidulans* strains with different creA genotypes expressing *A. oryzae* α -amylase. *J. Biotechnol.*, 92 279–285.
- AGUIRRE-EZKAURIATZA E. J.; GALARZA-GONZÁLEZ M. G.; URIBE-BUJANDA, A. I.; RÍOS-LICEA, M.; LÓPEZ-PACHECO, F.; HERNÁNDEZ-BRENES, C. M.; ALVAREZ, M. M. (2008) Effect of mixing during fermentation in yogurt manufacturing. *J. Dairy Sci.*, 91 4454-4465.
- Ali, S. & Hossain, Z. (1991) Characteristics for glucoamilase from *Aspergillus terreus*. *J. App. Bacteriol.*, 71 144-146.
- ALTINTAS M. M.; ÜLGEN K. Ö.; KIRDAR B.; ÖNSAN Z. I.; OLIVER S. G. (2002) Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors. *Enz. Micro. Tech.*, 31 640-647.
- ANDERSEN, M. R.; LEHMANN, L.; NIELSEN, J. (2009) Systemic analysis of the response of *Aspergillus niger* to ambient pH. *Genome Biol.*, 10 R47.
- AQUINO, A. C. M. M.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. (2003) Studies on a thermostable α -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61 323-328.
- AQUINO, A. C. M. M.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. (2001) Thermostable glicose-tolerant glucoamilase produced by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Folia Microbiol.*, 46 11–16.
- AZEVEDO, J. L. (1972) O Ciclo Parassexual em Fungos. *Rev. Microbiol.*, 3 157-168.
- BAGHERI, A.; KHODARAHMI, R.; MOSTAFAIE, A. (2014). Purification and biochemical characterization of glucoamilase from a newly isolated *Aspergillus niger*, relation to starch processing. *Food Chem.*, 15 161-270.
- BENASSI, V. M. (2006) Estudo de amilases produzidas pelo fungo termotolerante *Aspergillus phoenicis*. Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto – USP, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

- BENASSI, V. M.; PASIN, T. M.; FACCHINI, F. D.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. (2014) A novel glucoamylase activated by manganese and calcium produced in submerged fermentation by *Aspergillus phoenicis*. *J. Basic. Microbiol.*, 54 333-339.
- BERGMEYER, H. U.; & BERNT, E. (1974) Methods of enzymatic analysis. Edited by H. Bergmeyer. *Verla-Chimie-Academic Press.*, New York, 3 1205-1215.
- BINUPRIYA, A. R.; SATHISHKUMAR, M.; SWAMINATHAN, K.; JEONG, E. S.; YUN, S. E.; PATTABI S. (2006) Biosorption of metal ions from aqueous solution and electroplating industry wastewater by *Aspergillus japonicus*: Phytotoxicity Studies Bull. *Environ. Contam. Toxicol.*, 77 219–227.
- BLACKWELL, M. (2011) The fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? *Am. J. Bot.*, 98 426-38.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. (1987) Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electro.*, 8 93-99.
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *A. Biochem.*, 72 248-254.
- BRADDOO, S.; GUPTA, R.; SAXENA, R. K. (1997) Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. *Process Biochem.*, 32 135-139.
- CALL, H. P.; & STRETTMATTER, G. (1992) Application of lignolytic enzymes in the paper and pulp industry recent results. *Papier J.*, 46 32–36.
- CEREDA, M. P. (2001) Potencial das tuberosas americanas. Simpósio Nacional sobre as culturas do inhame e do Ceará. *Venda Nova do Imigrante*. Anais. Espírito Santo.
- CHEN, W. C. (1998) Medium improvement for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* *Process Biochem.*, 33267-271.
- CHIBA, S. (1997) Molecular mechanism in α -glucosidase and glucoamylase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61 1233-1239.
- CORNELIS, P. (1987) Microbial amylases. *Microbiol. Scienc.*, 4 342-343.
- COUTINHO, P. M.; REILLY, P. J. (1997) Glucoamylase structural, functional and evolutionary relationships. *Proteins: Struct. Func. Gen.*, 29 334-347.
- CRABB, W. D.; & SHETTY, J. K. (1999) Commodity scale production of sugars from starches. *Ecol. Ind. Microbiol.*, 2 252-256.
- DAVIS, B. J. (1964) Disc electroforesis II. Methods and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Sci.*, 121 404–427.
- DECKER, C. H., VISSER, J., SCHREIER, P. (2000) β -Glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physic-chemical and biocatalytic properties *J. Agric. Food Chem.*, 48 4929-4936.
- DÍAZ, A.; SIEIRO, C. & VILLA, T.G. (2003) Production and partial characterization of β -amylase by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 36 203-207.

- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28 350-356.
- DUTTON, M. V.; & EVANS, C. S. (1996) Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Can. J. Microbiol.*, 42 881-895.
- ELLAIAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. (2002) Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochem.*, 38 615-620.
- EMERSON, R. (1941) An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*. *Lloydia*, 4 77-144.
- FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; BENASSI, V. M.; FREITAS, L. A. P.; REIS, R. A.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. (2011) Optimization of fibrolytic enzyme production by *Aspergillus japonicus* C03 with potential application in ruminant feed and their effects on tropical forages hydrolysis. *Bioprocess Biosys. Eng.*, 34 1027-1038.
- FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; REIS, V. R. A.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; REIS, R. A.; POLIZELI, M. L. T. M. (2011) Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed. *Bioprocess Biosys. Eng.*, 34 347-355.
- FAGERSTRÖM, R. (1995) Studies on the debranching activity of fungal glucoamylases. Primalco Ltd. Biotec R & D, Helsinki and Department of Biochemistry, University of Helsinki. *Academic Dissertation.*, 83.
- FAIJES, M.; & PLANAS, A. (2007) In vitro synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases. *Carbohydr. Res.*, 342 1581-1594.
- FELLOWS, P. (2007) Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Prácticas. Zaragoza: Editorial Acribia., 1994 172-177.
- FONTANA, J. D.; GEBARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, C. R.; JOHNSON, K. G. (1988) α -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. *Methods Enzymol.*, 160 560-571.
- FRANCO, C. M. L.; CIACCO, C. F.; TAVARES, D. Q. (1998) The structure of waxy cornstarch: effect of granule size. *Starch/Stärke.*, 50 193-198.
- GAMS, W.; CHRISTENSEN, M.; ONIONS, A. H.; PITT J. I.; SAMSON. R. A. (1985) Infrageneric taxa of *Aspergillus*. *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*: New York: Plenum Press., 55-62.
- GARCIA, A. C. D. B.; & LEONEL, M. (2002) Análises microscópicas de grânulos de amido de mandioca, batata doce, biri e tioba. IN: Reunião científica em ciências agrárias do legado, 9, Botucatu, 2002. Anais. Botucatu: UNESP., 21-25.
- GHOSH, A.; CHATTERJEE, B.; DAS, A. (1991) Purification and characterization of glucoamilase of *Aspergillus terreus* NA-1970 mutant. *J. Appl. Bacteriol.*, 71 162-169.

- GIANNESI, G. C.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. (2006) A novel α -glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* that converts maltose into trehalose: Purification and partial characterisation of the enzyme. *Process Biochem.*, 8 1729-1735.
- GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. (2000) Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 20 17-48.
- GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORRÊA, B. (1999) Biologia dos Fungos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM F.; GOMPERTZ, O. F.; & CANDEIAS, J. A. N. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu., 3 365-397.
- GONÇALVES, A. Z. L. (2006) Produção de α -amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada). Rio Claro: Universidade Estadual Paulista.
- GOUKA, R. J.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. (1997) Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47 1-11.
- GUARRO, J.; GENNÉ, J.; STCHIGEL, M. (1999) Developments in Fungal Taxonomy. *Clin Microbiol Ver.*, 12 454–500.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. (2003) Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.*, 38 1599-1616.
- GUPTA, V.; GARG, S.; CAPALASH, N.; GUPTA, N.; SHARMA, P. (2015) Production of thermo-alkali-stable laccase and xylanase by co-culturing of *Bacillus* sp. and *B. halodurans* for biobleaching of kraft pulp and deinking of waste paper. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 5 947-56.
- GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. (2013) broader view: microbial enzymes and their relevance industries, medicine, and beyond. *Biomed. Res Int.*, 329121.
- GUZMÁN-MALDONADO, H.; & PAREDES-LÓPEZ, O. (1995) Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. *Critic. Rev. Food Sci. Nutri.*, 35 373-403.
- HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. (1982) Amilase Fúngica. In: *Bioquímica das Fermentações*, 56p.
- HEFFRON, C. L.; REID, J. T.; HASCHEK, W. M.; TELFORD, J. N.; STOEWSAND, G. S.; BACHE, C. A.; WSZOLEK, P. C.; LISK, D. J. (1979) Toxicologic studies with sheep fed colored magazines and newsprint. *Cornell Vet.*, 4 356-63.
- HUA, H.; LUO, H.; BAI, Y.; WANG, K.; NIU, C.; HUANG, H.; SHI, P.; WANG, C.; YANG, P.; YAO, B. (2014) A thermostable glucoamylase from *Bispora* sp. MEY-1 with stability over a broad pH range and significant starchhydrolysis capacity. *PLoS One.*, 9(11): e113581.

- IBARRA, D.; MONTE, M. C.; BLANCO, A.; MARTINEZ, A. T.; MARTINEZ, M. J. (2012) Enzymatic deinking of secondary fibers: cellulases/hemicellulases versus laccase-mediator system. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39 1–9.
- ICHINOSE, S.; TANAKA, M.; SHINTANI, T.; GOMI, K. (2014) Improved α -amylase production by *Aspergillus oryzae* after a double deletion of genes involved in carbon catabolite repression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98 335-343.
- JACQUES, K.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (1999) The alcohol textbook. 3. ed. Nottingham: *Nottingham Press.*, 386.
- JAEGER, K. E.; RASANC, S.; DIJSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 15 29-63.
- JAMES, J. A.; LEE, B. H. (1997) Glucoamylases: microbial sources, industrial applications and molecular biology – a review. *J. Biochem.*, 21 1–52.
- JANECEK, S.; & SEVCÍK, J. (1999) The evolution of starch-binding domain. *FEBS Letters.*, 456 119-125.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.*, 40 2931 - 2944.
- JOHNSON, E. J. (1979) Thermophilic genetics and the genetic determinants of thermophily: in strategies of microbial life in extreme environments. *Weinheim: Verlag Chemie.*, 471-487.
- JOO, H. S.; CHANG, C. S. (2005) Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochem.*, 40 1263-1270.
- KAR, S.; RAY, R. C.; MOHAPATRA, U. B. (2008) Alpha-amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 in solid state fermentation using response surface methodology (RSM). *Pol. J. Microbiol.*, 57 289-296.
- KATHIRESAN, K.; & MANIVANNAN, S. (2006) α -amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *Afr. J. Biotechnol.*, 5 829-832.
- KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. (1995) Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11 242-243.
- KLICH, M.A.; & PITT, J. I. (1988) A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their telemorphs. Published by Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing.
- KUMAR, D.; MUTHUKUMAR, M.; GARG, N. (2012) Kinetics of fungal extracellular alpha-amylase from *Fusarium solani* immobilized in calcium alginate beads. *J. Environ. Biol.*, 33 1021-1025.
- KUNDU, R. K.; DUBE, S.; DUBE, D. K. (1988) Extracellular cellulolytic enzymes system of *Aspergillus japonicus* : 3. Isolation, purification, characterization of multiple forms of endoglucanase. *Enzyme Microb. Technol.*, 10.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227, 680-685.

- LASA, I.; & BERENGUER, J. (1993) Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. *Microbiol. Sem.*, 9 77-89.
- LASZLO, H.; BASSO, L. M.; COELHO, C. M. L. (1986) Química de alimentos. São Paulo: Nobel., 98p.
- LEATHERS, T.D. (2003) Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi, *FEMS Yeast Res.*, 3 133-140.
- LEE, C. K.; LE, Q. T.; KIM, Y. H.; SHIM, J. H.; LEE, S. J.; PARK, J. H.; LEE, K. P.; SONG, S. H.; AUH, J. H.; LEE, S. J.; PARK, K. H. (2008) Enzymatic synthesis and properties of highly branched rice starch amylose and amylopectin cluster. *J. Agric. Food Chem.*, 56 126–131.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. (1993) Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York., 2^oed.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. (2008) Principles of Biochemistry, Worth Publishers, New York., 5^oed
- LEONEL, M.; & CEREDA, M. P. (200) Avaliação da concentração de pectinase no processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca para obtenção de etanol. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 36 3-35.
- LEONEL, M.; GARCIA, A. C. D. B.; REIS, M. M. (2004) Caracterização físico-química e microscópica de amidos de batata-doce, biri, mandioca e taioba e propriedades de expansão após modificação fotoquímica. *Braz. J. Food Technol.*, 7 129-137.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (2001) Biotecnologia Industrial. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda., 3 598.
- LINEWEAVER, H.; & BURK, D. (1934) The determination of Enzyme Dissociation Constanto. *J. Amer. Chem. Soc.*, 56 658.
- LIU, X.; & XIU, Y. (2008) A novel raw starch digesting α -amylase from newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. *Bioresour. Technol.*, 99 4315-4320.
- LU, X.; SUN, J.; NIMTZ, M.; WISSING, J.; ZENG, A. P.; RINAS, U. (2010) The intra and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. *Microb. Cell. Fact.*, 20 9-23.
- MAALEJ, H.; AYED, H. B.; GHORBEL-BELLAAJ, O.; NASRI, M.; HMIDET, N. (2014) Production and biochemical characterization of a high maltotetraose (G4) producing amylase from *Pseudomonas stutzeri* AS22. *BioMed. Res. International.*, 2014 11.
- MADIGAN, M.; MARTINKI, J. M.; PARKER, J. (2003) Brock Biology of microorganisms. *P. Hall.*, 10^a Ed.
- MAITY, C.; GHOSH, K.; HALDER, S. K.; JANA, A.; ADAK, A.; DAS MOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. (2012) Xylanase isozymes from the newly isolated *Bacillus* sp. CKBx1D and optimization of its deinking potentiality. *Appl Biochem Biotechnol.*, 5 1208-19.

- MAKTOUF, S.; KAMOUN, A.; MOULIS, C.; REMAUD-SIMEON, M.; GHRIBI, D.; CHAABOUNI, S. E. (2013) A new raw-starch-digesting α -amylase: production under solid-state fermentation on crude millet and biochemical characterization. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 23 489-498.
- MALLER, A.; DAMASIO, A. R. L.; SILVA, T. M.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. (2010) Potential application in animal feed of phytase produced from agro-industrial residues by *Aspergillus japonicus*. *J. Biotechnol.*, 150 514-514.
- MARÍN, D.; LINDE, D.; LOBATO, M. F. (2006) Purification and biochemical characterization of an α -glucosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Yeast.*, 23, 117-125.
- MESBAH, N. M.; & WIEGEL, J. (2014) Halophilic alkali and thermostable amylase from a novel polyextremophilic *Amphibacillus* sp NM-Ra2. *Int. J. Biol. Macromol.*, 70 222-229.
- MICHAELIS, L.; & MENTEN, M. L. (1913) Die Kinetik der Investinwirkung. *Bioch. Z.*, 49 333.
- MICHELIN, M.; RULLER, R.; WARD, R. J.; MORAES, L. A. B.; JORGE, J. A.; TERENZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. (2008) Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by thermotolerant fungus *Paecilomyces variotii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35 17-25.
- MILLER, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31 426-428.
- MINAFRA, C.B. (2007) Produção e suplementação com α -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM203 na dieta de frangos de corte de 21 anos de idade. 2007. 124 f. Tese (Doctor Scientiae). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- MISHRA,.; & MAHESHWART, R. (1996) Amylases of thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: their purification, properties, action on starch and response to heat. *J. Biosc.*, 21 657-672.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. (2000) New developments in solid state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochem.*, 35 1211-1225.
- MOHANDASS, C.; & RAGHUKUMAR, C. (2005) Biological deinking of inkjet-printed paper using *Vibrio alginolyticus* and its enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32 424-429.
- MONTOR, W. R.; & SOGAYAR, M. C. I. (2003) Insetos como biofábricas de proteínas humanas. *Ciência Hoje*, Rio de Janeiro, RJ, SBPC, 33.

- MORKEBERG, R.; CARLSEN, M.; NIELSEN, J. (1995). Induction and repression of α -amylase production in batch and continuous cultures of *Aspergillus oryzae*. *Microbiol.*, 141 2449–2454.
- NEEDLEMAN, R. B.; KABACK, D. B.; DUBIN, R. A.; PERKINS, E. L. ROSENBERG, N. G.; SUTHERLAND, K. A.; FORREST, D. B.; MICHELS, C. A. (1984) MAL6 of *Saccharomyces*: a complex genetic locus containing three genes required for maltose fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81 2811-2815.
- NEGI, S.; & BANERJEE, R. (2010). Study of conformational changes in glucoamylase of *Aspergillus awamori* nakazawa in presence of denaturants through CD-spectroscopy. *Bioresour. Technol.*, 101 7577–7580.
- NELSON, D. L.; & COX, M. M. (2002). Lehninger princípios de Bioquímica. Ed. Sarvier, São Paulo., 3 100-103.
- OKOTH, S.; NYONGESA, B.; AYUGI, V.; KANG'ETHE, E.; KORHONEN, H.; JOUTSJOKI, V. (2012) Toxigenic potential of *Aspergillus* species occurring on maize kernels from two agro-ecological zones in Kenya. *Toxins (Basel)*, 4 991-1007.
- OKUYAMA, M.; TANIMOTO, Y.; ITO, T.; ANZAI, A.; MORI, H.; KIMURA, A. (2005) Purification and characterization of the hyper-glycosylated extracellular α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Enz. Microbiol. Technol.*, 37 472-480.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. (2010). Partial characterization of amylases of two indigenous central amazonian Rhizobia strains. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 53 35–45.
- OYELEKE, S. B.; EGWIN, E. C.; AUTA, S. H. (2010) Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. *J. Microbiol. Antimicrob.*, 2 2141-2307.
- OYELEKE, S. B.; ODUWOLE, A. A. (2009) Production of amylase by bacteria isolated from a cassava dumpsite in minna, Nigerstate, *Nigeria. Afr. J. Microbiol. Res.*, 3 143-146.
- OYELEKE, S. B.; OYEWOLE, O. A.; EGWIM, E. C. (2011) Production of protease and amylase from *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* using *Parkia biglobossa* (Africa Locust Beans) as substrate in solid state fermentation. *Adv. Life Sc.*, 1 49-53.
- PANDEY, A. (2002) Solid-state fermentation Biochemical. *Eng. J.*, 3636 1-4.
- PANDEY, A.; NIGAN, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D; MOHAN, R. (2000) Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31 135-152.
- PAPAGIANNI, M. (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. Review. *Biotechnol. Adv.*, 22 189-259.
- PAVEZZI, F. C.; CARNEIRO, A. A.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; ALVES-PRADO, H. F.; FERREIRA, H.; MARTINS, P. M.; GOMES, E.; DA SILVA, R. (2011). Influence of different substrates on the production of mutant thermostable glucoamylase in submerged fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 163, 14-24.

- PEDERSEN, M.; LAURITZEN, H. K.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S. (2007) Identification of thermostable β -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.*, 29 743–748.
- PEIXOTO, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. (2003) *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. *Int. Microbiol.*, 6 269-273.
- PELCZAR JR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. (1996) Microbiologia, Conceitos e Aplicações. vol. 1. Segunda Edição. São Paulo: Markron Books.
- POLIZELI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIN, D. S. (2005) Review: Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67 577-591.
- POLIZELI, M. L. T. M. (2009) Properties and comercial application of xylanases from fungi. In: Mycotechnology: current trends and future prospects, RAI, M.K. (editor), I.K. International Publisher, New Delhi, chapter 4 82-108.
- PROMDONKOY, P.; TANG, K.; SORNLAKE, W.; HARNPICHARNCHAI, P.; KOBAYASHI, R. S.; RUANGLEK, V.; UPATHANPREECHA, T.; VESARATCHAVEST, M.; EURWILAICHITR, L.; TANAPONGPIPAT, S. (2009) Expression and characterization of *Aspergillus* thermostable phytases in *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 290 18–24.
- PUTZKE, J.; & PUTZKE, M. T. L. (2002) Os Reinos dos Fungos Vol. 2. Ed. da Universidade de Santa Cruz do Sul. Santa Cruz do Sul, RS.
- RABELO, S. C. (2007) Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. 2007. 150 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- RAIMBAULT, M. (1998) General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *J. Biotechnol.*, 1 174-188.
- RAPER, K. B.; & FENNELL, D. I. (1965) The genus *Aspergillus*. The Willians & Wilkins Company, Baltimore.
- RIBEIRO J. (2013) MDIC lança estudo que busca atrair investimentos para setor de alimentação de animais de produção. Disponível: <<http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/noticia.php?area=2¬icia=12146>>. Acessado em 31 de Outubro.

- RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. (2001) Purification and properties of a thermostable extracellular α -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 26 156-160.
- ROSLING, A.; LINDAHL, B. D.; TAYLOR, A. F.; FINLAY, R. D. (2004) Mycelial growth and substrate acidification of ectomycorrhizal fungi in response to different minerals. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 47 31-37.
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. (1995) Introduction to food-borne fungi. *Centraalbureau Voor Schimmelcultures.*, 4.
- SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. (2005) Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem.*, 40 2689–2694.
- SANTOS, A. S. R. (2013) Biodiversidade, bioprospecção, conhecimento tradicional e o futuro da vida, 2001. Disponível em: www.ccuac.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html. Acesso em 08 de Novembro.
- SANYAL, A.; KUNDU, R. K.; SINHA, S. N.; DUBE, D. K. (1988) Extracellular cellulolytic enzyme system of *Aspergillus japonicus*: 1. Effect of different carbon sources. *Enz. Microb. Technol.*, 10 85-90.
- SAUER, J.; SIGURSKJOLD, B. W.; CHRISTENSEN, U. FRANDSEN, T. P.; MIRGORODSKAYA, E.; HARRISON, M.; ROEPSTORFF, P.; SVENSSON, B. (2000) Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1543 25-293.
- SEMENOVA, M. V.; DRACHEVSKAYA, M. I.; SINITSYNA, O. A.; GUSAKOV, A. V.; SINITSYN, A. P. (2009) Isolation and properties of extracellular beta-xylosidases from fungi *Aspergillus japonicus* and *Trichoderma reesei*. *Biochem.*, 74 1002-1008.
- SEMENOVA, M. V.; GRISHUTIN, S. G.; GUSAKOV, A. V.; OKUNEV, O. N.; SINITSYN, A. P. (2003) Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochem.*, 68 559-569.
- SILVA, C. M.; & CARREIRO, S. C. (2007) Avaliação da atividade enzimática de leveduras isoladas de polpas de frutas e substratos vegetais. In: Encontro Nacional de Estudantes de Engenharia de Alimentos, 11, Salvador. Anais do ENEEALI. Salvador: [s.n.].
- SILVA, R. N.; MONTEIRO, V.N.; ALCANFOR, J.D.X.; ASSIS, E. M.; ASQUEIRI, E.R. (2003) Comparação de métodos para determinação de açúcares redutores e totais de mel. *Cien. Tecnol. Alim.*, 23. Campinas-SP.
- SILVA, T. M.; MALLER, A.; DAMÁSIO, A. R. L.; MICHELIN, M.; WARD, R. J.; HIRATA, I. Y.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. (2009) Properties of a purified thermostable glucoamylase from *Aspergillus niveus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36 1439–1446.

- Silva, T. M.; Damásio, A. R.; Maller, A.; Michelin, M.; Squina, F. M.; Jorge, J. A.; Polizeli, M. L. T. M. (2013) Purification, partial characterization, and covalent immobilization-stabilization of an extracellular α -amylase from *Aspergillus niveus*. *Folia Microbiol. (Praha)*, 58 495-502.
- Silva, T. M.; Michelin, M.; Damásio, A. R. L.; Maller, A.; Almeida, F. B.; Ruller, R.; Ward, R. J.; Rosa, J. C.; Jorge, J. A.; Terenzi, H. F.; Polizeli, M. L. T. M. (2009) Purification and biochemical characterization of a novel alpha-glucosidase from *Aspergillus niveus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96 569-578.
- SILVA, W. B.; & PERALTA, R. M. (1998) Purification and characterization of a thermostable glucoamilase from *Aspergillus fumigatus*. *Can. J. Microbiol.*, 44 493-497.
- SILVEIRA; M. A. (2008) Álcool Combustível - Série Indústria em Perspectiva. Batata-doce: Uma Nova Alternativa para a Produção de Etanol, 1 109-122.
- SINGH, R.; KUMAR, V.; KAPOOR, V. (2014) Partial purification and characterization of a heat stable α -amylase from a thermophilic actinobacteria, *Streptomyces sp.* MSC702. *Enz. Res.*, 2014 106363.
- SMITH, G. M. (1955) Botânica Criptogâmica. Lisboa. *Fundação Calouste Gulbenkian*, 2 527p.
- SPADARO, D.; PATHARAJAN, S.; LORÈ, A.; GARIBALDI, A.; GULLINO, ML. (2012) Ochratoxigenic black species of *Aspergilli* in grape fruits of northern Italy identified by an improved PCR RFLP procedure. *Toxins (Basel)*, 4 42-54.
- SPINELLI, B. B. L.; POLIZELI, M. L.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A. (1996) Biochemical characterization of glucoamylase from hiper producer exo-1 mutant strain of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 138 173-177.
- SYED, D. G.; AGASAR, D.; PANDEY, A. (2009) Production and partial purification of a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36 189-194.
- TAKEUCHI, A.; SHIMIZY-IBUKA, A.; NISHIYAMA, Y.; MURA, K.; OKADA, S.; TOKUE, C.; ARAI, S. (2006) Purification and characterization of an α -amylase of *Pichia burtonii* isolated from the traditional starter "Murcha" in Nepal. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 3019-3024.
- TEITELBAUM, R. C.; RUBY, S. L.; MARKS, T. J. (1980) A resonance Raman/Iodine Mossbauer investigation of the strach-iodine structure. Aqueous solution and iodide vapor preparations. *J. Amer. Chem. Soc.*, 102 3322-3328.
- TEIXEIRA, M. F. S.; FILHO, J. L. L.; DURÁN, N. (2000) Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586 *Braz. J. Microbiol.*, 31 286-290.
- TEIXEIRA, M. F.; ANDRADE, J. S.; FERNANDES, O. C.; DURÁN, N.; DE LIMA FILHO, J. L. (2011) Quality attributes of cupuaçu juice in response to treatment with crude enzyme extract produced by *Aspergillus japonicus* 586. *Enz. Res.*, 2011 494813.

- TEOTIA, S.; LATA, R.; KHARE, S. K.; GUPTA, M. N. (2001) One-step purification of glucoamylase by affinity precipitation with alginate. *J. Mol. Recognit.*, 14 295-299.
- TREVISAN, H. C. (2004) “Lipases”. In: SAID, S.; & PIETRO, R.C.L.R. *Enzimas como agente Biotecnológico*. 1. ed. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 115-135.
- UEKI, S. Y. M.; CHIMARA, E.; YAMAUCHI, J. U.; LATRILHA, F. O.; SIMEÃO, F. C. S.; MONIZ, L. L.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; TELLES, M. A. S. (2008) Monitoramento em cabine de segurança biológica: manipulação de cepas e descontaminação em um laboratório de micobactérias. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 44 263-269.
- VAN DEN HOMBERGH, J. P. T. W.; VAN DE VONDERVOORT, P. J. I.; FRAISSINET-TACHET, L.; VISSER, J. (1997) *Aspergillus* as host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends Biotechnol.*, 15 256-263.
- VAN DER MAAREL, M. J.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotechnol.*, 94 137 – 155.
- VARALAKSHMI, K. N.; KUMUDINI, B. S.; NANDINI, B. N.; SOLOMON, J.; SUHAS, R.; MAHESH, B.; KAVITHA, A. P. (2009) Production and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore. *Pol. J. Microbiol.*, 58 29-36.
- VIHINEN, M.; & MÄNTSÄLÄ, P. (1989) Microbial amylolytic enzymes (Review). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 24 329–418.
- VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. (1994) Xylanases in bleaching, from an idea to the industry. *FEMS Microbiol.*, 13 335-350.
- VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; RÓMEROGOMES, S. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. (2002) Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng. J.*, 36 43 1-11.
- VIRK, A. P.; PURI, M.; GUPTA, V.; CAPALASH, N.; SHARMA, P. (2013) Combined enzymatic and physical deinking methodology for efficient ecofriendly recycling of old newsprint. *PLoS One.*, 8 72346.
- VOGEL, H. F. (1964) Distribution of lysine pathway among fungi: evolutionary implications. *Am. Nat.*, 98 435-446.
- VORA, K.A.; BHANDARE, S.S.; PRADHAN, R.S.; AMIN, A.R.; MODI, V.V. (1988) Characterization of extracellular lipase produced by *Aspergillus japonicus* in response to *Calotropis gigantea* latex. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 10 465-472.
- WAKYIAMA, M.; YOSHIHARA, K.; HAYASHI, S.; OHTA, K. (2008) Purification and properties of an extracellular beta-xylosidase from *Aspergillus japonicus* and sequence analysis of the encoding gene. *J. Biosci. Bioeng.*, 106 398-404.
- WANDERLEY, K. J.; TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P.; ULHOA, C. J. (2004) Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 231 165-169.

- WHANG; & ZHOU. (2006) Isolation and identification of a novel *Aspergillus japonicus* JN19 producing β -fructofuranosidase and characterization of enzyme. *J. Food. Biochem.*, 30 641–658.
- YANG, C. H.; & LIU, W. H. (2004) Purification and properties of a maltotriose-producing α -amylase from *Thermofibida fusca*. *Inst. Microbial. Technol.*, 35 254-260.
- ZAHA, C. B.; & ZEIKUS, G. (1989) Microbial glucoamylases: biochemical and biotechnological features. *Starch Staerke.*, 41 57-64.

MEIOS DE CULTURA

Meio Sólido Completo de Aveia para manutenção da cepa de *Aspergillus japonicus*

- Aveia 4,0 g
- Ágar bacteriológico 2,0 g
- Água destilada qsp 100 mL

Os meios foram previamente autoclavados por 15 minutos a 1,5 atm e colocados em tubos de ensaios mantidos inclinados para aumentar a superfície de cultivo.

Meio Carvalho-Peixoto (PEIXOTO *et al.*, 2003)

- Amido 1,5 g
- Extrato de levedura 0,8 g
- KH_2PO_4 0,3 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g
- Água destilada qsp 100 mL

Meio Segatto-Rizzatti (RIZZATTI *et al.*, 2001)

- Soluções de sais de SR [20x] 5 mL
- Peptona 0,02 g
- Extrato de levedura 0,45 g
- Amido 1 g
- Água destilada qsp 100 mL

Meio Adams (ADAMS, 1990)

- Amido 1 g
- Extrato de levedura 0,2 g
- KH_2PO_4 0,1 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g
- Água destilada qsp 100 mL

Meio KHANNA (KHANNA *et al.*, 1995)

- Solução de sais de KHANNA [20x] 5 mL

• Extrato de levedura	0,1g
• Amido	1 g
• Água destilada qsp	100 mL

Meio Líquido completo Vogel (VOGEL, 1964).

• Solução de biotina	50 µL
• Soluções de Sais de Vogel [50x]	2 mL
• Amido	1 g
• Água destilada qsp	100 mL

SOLUÇÕES**Soluções utilizadas nos meios de cultura****Soluções de sais de SR [20x]**

• $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,24 g
• KH_2PO_4	0,3 g
• $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 g
• Água destilada qsp	100 mL

Solução de sais de KHANNA [20x]

• NH_4NO_3	2 g
• KH_2PO_4	1,3 g
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,362 g
• KCl	0,098 g
• $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,007 g
• $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0138 g
• $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,0066 g
• $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,0062 g
• Água destilada qsp	100 mL

Solução de Biotina

- Biotina 5 mg
- Etanol 50 % 100 mL

Solução de Sais de Vogel [50x]

- Citrato de sódio pentaidratado 150 g
- NH_4NO_3 100 g
- KH_2PO_4 250 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 10 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 5 g
- Solução de traços de elementos 5 mL
- Clorofórmio 2 mL
- Água destilada qsp 1000 mL

Solução de Traços de Elementos

- Ácido cítrico monoidratado 5 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 5 g
- $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 1 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,25 g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g
- H_3BO_3 0,05 g
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g
- Clorofórmio 0,2 mL
- Água destilada qsp 100 mL

SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA SDS GEL DE POLIACRILAMIDA**Corante Coomassie Blue**

- Coomassie Blue R 250 2,5 g
- Metanol 450 mL
- Ácido acético glacial 100 mL
- Água Milli Q 450 mL

Solução descorante

- Metanol 450 mL
- Ácido acético glacial 100 mL
- Água Milli Q 450 mL

Tampão de corrida SDS 10 X

- Tris 25 mM
 - Glicina 192 mM
 - SDS 0.1%
- pH = 8,3

Tampão de amostra 2X

- Tris/HCl pH 6,8 100 mM
- SDS 4 %
- Azul de bromofenol 0,2 %
- Glicerol 20 %

SDS Gel 10% (SDS-PAGE)

- H₂O destilada 1,675 mL
- 1,5 M Tris pH = 8,8 1,25 mL
- SDS 10% 50 µL
- Bis/Acrilamida 30% 2,0 mL
- Persulfato de amônio 10% 25 µL
- TEMED 2,5 µL

Preparo Bis/Acrilamida:

- Acrilamida 29,2 g
- Bis-acrilamida 0,8 g
- H₂O milli Q q.s.p. 100 mL

Gel de Empilhamento 5 %

- H₂O destilada 2,1 mL
- 1,5 M Tris pH = 6,8 0,38 mL
- SDS 10% 30 µL
- Bis/Acrilamida 30% 0,5 mL
- Persulfato de amônio 10% 30 µL
- TEMED 3 µL

British Biotechnology Journal
4(4): 482-498, 2014

SCIENCEDOMAIN international
www.sciencedomain.org

Prospecting Filamentous Fungi for Amylase Production: Standardization of *Aspergillus japonicus* Culture Conditions

T. M. Pasin¹, V. M. Benassi¹, E. A. Moreira², J. A. Jorge³
and M. L. T. M. Polizeli^{3*}

¹Department of Immunology and Biochemistry, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

²Department of Biology, Academic Center of Claretian Batatais, SP, Brazil.

³Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors TMP, VMB, EAM and MLTMP performed the first draft of the manuscript and he was responsible for the literature searches. Author JAJ performed the design of some experiments. Authors VMB and MLTMP managed the analyses of the study. Author MLTMP was responsible by the study and collaborated in the final writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Original Research Article

Received 1st November 2013

Accepted 18th February 2014

Published 31st March 2014

ABSTRACT

Aims: Prospecting different filamentous fungi for high production of amylases in standard conditions for future application in biotechnology industries.

Methodology: Samples were collected in different field areas in the state of Bahia, Brazil, for isolating filamentous fungi. Fungi were grown in Petri dishes in a culture medium containing 4% Quaker® oatmeal and 2% bacteriological agar. Fungi screening was carried out in liquid medium containing 1% starch at 30°C and pH6.0 under static conditions for 4 days. Proteins and enzyme activities were determined by Bradford and DNS methods, respectively. A submerged fermentation was performed with different liquid media in order to obtain the best growth composition and enzyme production for the selected fungus. Several conditions such as time course of inactivation, pH, temperature, carbon and nitrogen sources were determined in the culture medium with the aim of

*Corresponding author. Email: polizeli@foclp.usp.br

improving amylase production and fungi growth. Various fibers and food residues were used as enzymatic inducers in a way to assess potential integration of this enzyme, producing microorganisms in the food industry.

Results: *A. japonicus* proved to be the best degrader of fibers and food residues. After 4 days, *A. japonicus* enzyme production was maximal, with 44.65(±0.49) U/ml under static conditions. The maximal enzyme activity was obtained at pH 6.0, retaining its activity even at a higher pH. The optimum temperature was 25°C. The best carbon source was potato starch and the best food residues were orange bagasse and bark for the enzyme production by *A. japonicus*.

Conclusion: The results suggest that *A. japonicus* is a good amylase producer for the degradation of fibers and food residues, indicating that it might become important for the food industry, bringing value to what is known as waste these days.

Keywords: Agro-industrial; food residues; isolation; screening; starch; waste.

1. INTRODUCTION

Enzyme technology and bio-catalysis are promising tools for generating compounds with a high aggregated value. The interest in enzymes has increased in Brazil, which imports tons of these products. Enzymes have a large variety of applications in different industries. The global market for industrial enzymes was estimated at 3.3 billion dollars in 2010 and it is expected to reach more than 4 billion dollars by 2015 [1]. Amylases are the second largest group of enzymes used all over the world. They are widely used in biotechnology industries in starch saccharification processes, such as in textile industries, food and animal feed, detergents, fermented beverages and distilleries. In addition, they also have potential application in pharmaceutical, refined chemical and bakery industries [1]. They can also be applied in recycling and paper production as well as in the juice industry, where they are used to clarify and decrease turbidity [2]. Amylase production has been reported in several different fungi species such as *Fusarium solani* [3], *Aspergillus oryzae* [4], *Aspergillus niger* [5] and *Streptomyces erumpens* [6].

The main amylolytic enzymes are as follows: α -amylase (EC3.2.1.1; 1,4- α -D-glucan glucan hydrolase), which promotes the hydrolysis of α -1,4 within the chain of amylose and amylopectin, releasing several oligosaccharide chains of different sizes that have an α -configuration at C1. Mariani et al. [7] studied an α -amylase produced by *Aspergillus niger* and reported that it was thermostable in reactions involving temperatures reaching 100°C. These kinds of enzymes are used in the sugar liquefaction process, in the fermented drink industry, and in the production of adhesives, detergents and animal feed. Glucoamylase (EC 3.2.1.3; 1, 4- α -D-glucan glucanhydrolase) or amyloglucosidase is also an extremely interesting biotechnological enzyme. It is an exoamylase that is capable of hydrolyzing the α -1,4 glycosidic linkages through the successive removal of glucose units from then on-reducing end of the chain, releasing molecules of D-glucose in the β -conformation. These enzymes also hydrolyze the α -1,6 and some α -1,3 bonds but this process rarely occurs. According to recent data from the Ministry of Development, Industry and Foreign Trade, Brazil imports most of the products involving enzymatic preparations [8], as it is evident that the market for industrial enzymes is small in the country compared with global demand.

The use of enzymes as catalysts in industrial processes is crucial to obtain high-quality products with clean technologies in harmony with the technological needs of the market and the environmental preservation.

Thus, the aim of this work was to prospect various filamentous fungi isolated from different sources, seeking the maximal production of amylases. Among the diverse isolated fungi, a filamentous fungus, identified as *Aspergillus japonicus* Saito has demonstrated to be an amylase producer in liquid Khanna medium [9]. Earlier, this fungus exhibited high potential to xylanase, cellulose [10] and phytase [11] production.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Isolation of the Microorganisms

Twelve samples were collected from different sources, which include cocoa fruit affected by pests (sample nº 1), cocoa leaf affected by pests (sample nº 2), cattle compost (sample nº 3), lemon trunk (sample nº 4), soursop fruit affected by pests (sample nº 5), decomposing foliage (sample nº 6), mushroom (sample nº 7), decaying coffee bean (sample nº 8), bark of eucalyptus (sample nº 9), rubber tree leaf affected by pests (sample nº 10), coconut straw (sample nº 11) and bark of jack fruit tree affected by fungi (sample nº 12). All the samples were obtained in the state of Bahia, Brazil. Samples of these materials were taken to the laboratory so that the microorganisms present in them could be cultivated in solid culture medium. The isolation of filamentous fungi was performed by the pour plating method, in which the strains were repeatedly inoculated in Petri dishes containing solid culture medium that was composed by 4% Quaker® oatmeal and 2% bacteriological agar [12] to which commercial veterinary pentabiotic Fort Dodge® was added. This procedure was repeated until there was just one fungus growing on the dish with no contamination. After that, the strains were placed at different temperatures (30, 35, 40 and 45°C), to check the temperature dependence of fungal growth.

2.2 Screening of Microorganisms for Amylolytic Activity and Strain Maintenance

Tests were carried out to select the best fungi for amylase production. The amylase screening was performed with all the fungi isolated and grown in liquid medium described by Khanna medium [9] to which 1% starch was added at 30°C, pH 6.0, under static conditions for 4 days in order to obtain the best amylase producer. The protein and enzyme activity was determined by Bradford [13] and DNS [14] methods, respectively. The screening revealed two fungi as the best amylase producers. After the screening, only the higher amylase producers were identified using morphological analysis and microscopic observations. The identification was carried out at Departamento de Micologia of Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil. The strains were maintained in our laboratory in slants of solid culture medium that was composed by 4% Quaker® oatmeal and 2% bacteriological agar [12]. In intervals of 15 days, spores of *A. japonicus* were transferred into new plates containing the same culture medium. Samples of the fungus were kept at - 80°C in a solution of 20% glycerol and/or at 4°C in silica.

2.3 Inoculum and Composition of Different Liquid Culture Media

Cultures of *A. japonicus* were scraped and spores were re-suspended in sterile distilled water. The spores were counted in a Neubauer chamber and a solution containing 1.77×10^5 spores/mL was obtained. A volume of one milliliter of this solution was inoculated in 25mL of liquid medium in Erlenmeyer flasks of 125mL. Five liquid culture media were tested: CP medium [15]; SR medium [16]; Adams medium [17]; Khanna medium [9] and Vogel medium [18]. The pH was adjusted to 6.0. After being prepared, all the liquid media were

autoclaved for 30 minutes at 1.5 atm and 120°C. The best medium was chosen for the subsequent determinations mentioned.

2.4 Obtaining Mycelial Mass and the Extracellular Enzymes

The mycelial mass was obtained after its separation from the culture medium by vacuum filtration using a Büchner funnel and whatman filter paper no 1. The filtrate was used as an extracellular enzyme source. The mycelial mass was washed with two volume of distilled water, pressed between paper sheets, maintained at -18°C and further macerated and resuspended in 10 mL of 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0. This suspension was subjected to centrifugation at 8000xg, for 15 minutes, at 4°C. The supernatant containing the intracellular enzymes was then separated with a view to study the intracellular amylolytic complex of the fungus.

2.5 Measurements of Protein and Enzyme Activity

The proteins present in the intracellular and extracellular samples were determined by the Bradford method [13] using bovine serum albumin as a standard. The readings were performed in a spectrophotometer at 595 nm and the results were expressed in mg/mL. The amylase activity was determined by the quantification of the reducing sugars formed during the enzyme incubation with the substrate soluble starch 1% in sodium acetate buffer 100mM pH 5.5 at 55°C using 3,5-dinitrosalicylic, DNS [14]. The reaction consisted of 250 µl of substrate and 250 µL of the enzyme. Aliquots of 100 µL were removed after 10 minutes of the reaction and added to test tubes containing 100 µL of DNS [14]. After that, the tubes were immersed in a boiling water bath for 5 min, after which they were allowed to cool and 1 mL of distilled water was added. The absorbance for all the test tubes was measured at 540 nm in a spectrophotometer [19]. The blank consisted of 100 µL of the reaction mixture, which was immediately added to 100 µL of DNS. The method was previously standardized using glucose (0.1 to 1.0 mg/mL). The activity unit (U) was defined as the amount of enzyme that hydrolyzes one µmol of soluble starch per minute under the assay conditions.

Total activity (total U) = µmol/mL x filtrate volume. The specific activity was expressed in total U/total mg protein of the extracellular extract.

2.6 Time Course and Physical Condition for Growth and for Amylolytic Production by the Selected Fungus

The fungus was incubated in liquid medium described by Khanna medium [9] that was supplemented with 1% soluble starch as carbon source, at 30°C and pH 6.0. The fungus was incubated for a period of 1 to 9 days under static conditions in a microbiological incubator and for 1 to 6 days under stirring condition in a shaker (120 rpm), with a relative humidity of around 70%. Every day, one sample of each, static and stirring condition was removed from the incubator and subjected to vacuum filtration. The protein and enzymatic measurements were performed with the extracellular enzyme.

2.7 Effect of pH on the Enzyme Production by *A. japonicus*

The selected fungus was incubated in liquid medium described by Khanna medium [9] that was supplemented with 1% soluble starch as carbon source, at 30°C using the following pH values of 3.5; 4.0; 4.5; 5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5; 8.0; 8.5; 9.0 and 9.5 for 4 days under static

condition. Samples were subjected to vacuum filtration. The protein and enzymatic measurements were performed with the extracellular enzyme.

2.8 Effect of Temperature and Nitrogen Sources on the Growth and Production of Amylolytic Enzyme by *A. japonicus*

The fungus was incubated using the following temperature values: 25, 30, 35 and 40°C in liquid medium described by Khanna medium [9] with 0.1% yeast extract at each experimental temperature and in a second part of the experiment, the fungus was incubated with the same conditions but with 0.1% peptone as a nitrogen source at all tested temperatures for 4 days, under static condition, pH 5.5. Samples were subjected to vacuum filtration as described. The protein and enzymatic measurements were performed with the extracellular enzyme.

2.9 Effect of Different Carbon Sources on the Amylase Production

The fungus was incubated in liquid medium described by Khanna medium [9] that was supplemented with 1% of different carbon sources under static conditions for 4 days, at 25°C and pH 5.5. The different carbon sources used were as follows: amylopectin, corn starch, glucose, maltose, pectin, potato amylose, potato starch, raffinose, rice starch and starch MerckTM, starch Reagen®. The control used was composed by the liquid medium described by Khanna medium [9] that was supplemented with 0.1% peptone and no carbon source was added. Samples were subjected to vacuum filtration and protein and enzymatic measurements were performed with the extracellular enzyme.

2.10 Cultivation of the Selected Fungus in Fiber and Food Residues

The selected fungus was cultivated in liquid medium described by Khanna medium [9] consisting of one of the following carbon sources at the concentration of 1% cassava flour, rye flakes, oat flour, bark and orange bagasse, corn cob, corn mashed, wheat bran, glucose or peanut hulls for 4 days, under static conditions, at 25°C and pH 5.5. Samples were subjected to vacuum filtration and protein and enzymatic measurements were performed with the extracellular enzyme.

2.11 Statistical Analysis

All data were independently performed in triplicate. The mean was calculated from these triplicates. The standard deviation was performed using Excel 2007.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Isolation and Temperature-dependence Study of the Filamentous Fungi

Twelve samples were collected from a specific rural area of the state of Bahia, Brazil, and twenty fungal strains were entirely isolated using solid culture medium at 30°C (Fig.1). All the isolated fungi were maintained at different temperatures (30, 35, 40 and 45°C), and all of them grew at 30°C; 3 of them grew very well at 35°C but 8 of them exhibited slow growth in this condition; in general, the fungal growth diminished at 40°C, except by 5D, which showed morphological changes in sporulation as well as in growth. Interestingly, at 45°C, only the fungus named 5B was able to grow but at 30, 35 and 40°C, minimal growth was observed.

Thus, it is possible to classify this fungus as a thermophilic microorganism, as Madigan et al. [20] classified microorganisms according to their growth temperature: psychrophilic (low temperatures), mesophilic (median temperatures), thermophilic (high temperature) and hyper thermophilic (high temperatures). Furthermore, only thermophilic fungi have the exceptional ability to grow at high temperatures but not at lower temperatures. Fungus 4A Fig.1 exhibited maximum mycelial growth after 48 hours at 30, 35 and 40°C, occupying the entire dish and so, it may be considered a thermotolerant fungus. Besides, fungi 3B and 6B exhibited immense development at 30°C and 35°C and minimal growth at 40°C, which is characteristic of mesophilic fungi [20]. The least growth at 30°C was observed for fungus 10A. Fungi 12B, 12F, 8A, 7A, 3A and 8B exhibited immense growth at 30°C and 35°C, but did not grow at 40°C and 45°C. Fungi 12A, 11A, 5B, 5A, 9A, 9D, 12E and 5H exhibited good growth only at 30°C and it was not possible to verify their growth in other temperatures. These data showed that most of these fungi are mesophilic [20].

Fig. 1. Growth of the isolated fungi at different temperatures on solid culture medium

As shown in Table 1, some fungi exhibited immense growth: 11A, 4A, 7A and 6B for which the halo size was greater than 2.5cm. Fungus 11A did not exhibit good growth at 35°C; whereas fungi 7A and 6B exhibited minimal growth at this temperature, though with a slight decrease, with a halo around 1.0 cm. Fungus 4A maintained the growth, showing a halo with 3.0 cm, at 40°C. Fungus 6B grew with its halo reaching about 1.0 cm at 40°C but it presented no growth at 45°C. Based on these results it can be inferred that the majority of

the isolated fungi are mesophilic and some of them can be considered thermotolerant, because they grow at higher temperatures than those reported in the literature [20]. These data are important while highlighting some aspects with regard to the biology and physiology of filamentous fungi and they also demonstrate the need to determine the optimum temperature for fungal growth, which is the aim of biotechnological applications.

Table1. Analysis of the halo length (cm) of the fungi cultivated in 48 hours

Fungi*	Mycelial halo length (cm)			
	30°C	35°C	40°C	45°C
12B	1.00	1.00	0.30	0.00
12A	1.00	0.00	0.00	0.00
6D	2.30	1.10	0.80	0.00
11A	2.80	1.00	0.30	0.00
10A	0.50	0.00	0.00	0.00
5B	1.00	0.30	0.30	2.00
5A	1.00	0.30	0.50	0.00
3B	2.50	2.00	0.30	0.00
9A	1.50	0.30	0.30	0.00
4A	3.00	3.00	3.00	0.00
9D	1.00	0.30	0.30	0.00
12F	1.30	1.00	0.00	0.00
8A	1.40	1.00	0.30	0.00
7A	1.60	1.40	0.30	0.00
12E	2.00	0.50	0.00	0.00
3A	2.50	0.50	0.30	0.00
5D	1.90	1.00	2.00	0.00
5H	2.50	0.30	0.00	0.00
6B	2.90	2.80	0.80	0.00
8B	1.80	1.00	0.00	0.00

*References of these numbers are in Methods item 2.1.

3.2 Screening of the Filamentous Fungi

The selection of microorganisms that produce good levels of amylolytic enzymes constituted an important step. For this purpose, submerged fermentations were performed using the liquid medium described by Khanna medium [9] under stationary conditions at 30°C for 4 days, with an initial pH of 6.0. Analyzing Table 2, it was found that fungi 12E and 6B exhibited higher amylase production (47.93 and 42.73 U/mL, respectively). After the screening, only the higher amylase producers were identified by morphological analysis as cited in the "Methods" section. Furthermore, it is possible to say that according to Table 2, the amylases produced by fungi 6B caused the acidification of the medium, implying that they have maximum amylolytic activity at low pH, as the enzymes produced by fungi 12E caused a slight decrease in the pH of the extract, indicating that the amylase has maximum enzymatic activity between pH 5.0 and 6.0. These results can be explained by the oxalic acid production that has chelating properties and may increase the availability of metal ions such as iron and calcium [21]. Alternatively, oxalic acid formation may be involved in biological competition [22], facilitating the enzyme activity for the glucose formation from the hydrolysis of the substrate, as the optimal pH of the enzyme is between 5 and 6. Oxalic acid production by fungi is most efficient at a pH from 5 to 8 and is completely absent below pH 3.0 [22]. Another important acid produced by fungi is citric acid, which has the same function

of oxalic acid; its production begins at pH 3.0 and is optimal just below pH 2.0 [23]. Therefore, media acidification is caused by secondary metabolites (acids) production, which serves as an important phenomenon for fungus to survive.

Table 2. Determination of final pH quantification and determination of extra- and intracellular amylases produced by the isolated fungi

Fungus	Enzyme Activity (U/mL)			Protein (mg/mL)	
	pH	Intracellular	Extracellular	Intracellular	Extracellular
12B	2.45	1.77 (±0.12)	1.65 (±0.32)	0.51 (±0.06)	0.14 (±0.04)
12A	5.25	1.46 (±0.10)	0.82 (±0.05)	0.19 (±0.03)	0.08 (±0.02)
6D	3.20	0.69 (±0.07)	1.14 (±0.22)	1.15 (±0.20)	0.06 (±0.01)
11A	2.22	7.11 (±0.50)	12.38 (±0.87)	0.94 (±0.07)	0.13 (±0.02)
10A	3.65	0.76 (±0.05)	0.12 (±0.01)	0.78 (±0.10)	0.24 (±0.04)
5B	4.98	0.82 (±0.03)	0.63 (±0.04)	0.50 (±0.02)	0.18 (±0.02)
5A	3.85	3.04 (±0.32)	0.57 (±0.02)	0.15 (±0.03)	0.12 (±0.01)
3B	2.62	1.01 (±0.21)	1.58 (±0.07)	0.20 (±0.08)	0.21 (±0.03)
9A	3.40	0.88 (±0.07)	6.15 (±1.29)	0.34 (±0.04)	0.14 (±0.02)
4A	2.90	3.11 (±0.14)	14.47 (±3.85)	0.21 (±0.01)	0.15 (±0.04)
9D	3.0	2.03 (±0.11)	3.11 (±1.03)	0.18 (±0.05)	0.23 (±0.02)
12F	2.52	1.90 (±0.04)	7.04 (±2.87)	0.33 (±0.12)	0.18 (±0.07)
8A	5.55	3.42 (±0.32)	7.04 (±1.48)	0.09 (±0.02)	0.31 (±0.10)
7A	3.23	4.06 (±0.17)	2.47 (±0.68)	0.23 (±0.03)	0.23 (±0.08)
12E	5.45	38.09 (±1.23)	47.93 (±1.94)	0.59 (±0.04)	0.29 (±0.02)
3A	5.55	2.34 (±0.63)	3.49 (±0.13)	0.24 (±0.06)	0.10 (±0.05)
5D	2.43	3.15 (±0.05)	6.15 (±0.82)	0.34 (±0.11)	0.14 (±0.05)
5H	3.62	1.39 (±0.19)	11.04 (±1.16)	0.21 (±0.07)	0.05 (±0.01)
6B	3.05	9.33 (±1.78)	42.73 (±2.06)	0.52 (±0.02)	0.18 (±0.04)
8B	3.26	5.65 (±0.40)	7.93 (±0.80)	0.09 (±0.03)	0.10 (±0.07)

These results represent mean and the standard deviations.

According to the results of Table 2, fungi 12E and 6B, which are considered the best amylase producers were identified by morphological analysis as *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus japonicus* Saito, respectively. Although *A. parasiticus* presented 37% more extracellular protein than did *A. japonicus*, it also exhibited toxicity according to Okoth et al. [23] and thus, it was discarded, as one of the target applications of this work is the food industry. Thus, *A. Japonicus* was the chosen fungus for further studies, as no information related to its toxin production has been reported in the literature according to Spadaro et al. [24], as has been shown for *A. parasiticus*. In addition, there are not many studies about the applications of *A. Japonicus* enzymes in industries, which is the purpose of this study.

This species produces black colonies with a white mycelium. Its mycelium is dense, basal, with the absence of exudates and soluble pigment. This fungus is completely covered by black or dark brown spores, with a round shape, occasionally elliptical and uniseriate.

3.3 Testing Different Culture Media

A submerged fermentation was performed in five different liquid media. The incubation temperature was 30°C and pH 6.0, under static conditions, for 4 days of growth. The CP, Khanna and SR liquid media exhibited better amylolytic production compared with other media. These results were similar to those of Rizzatti et al. [16], who used Khanna medium to produce xylanase from *A. phoenicis* and to those of Facchini [25], who used the SR medium for the production of CMCase and xylanase from *A. japonicus*. The CP medium

presented high protein values, which diminished the specific amylase activity. Khanna medium was selected to follow amylase production by *A. japonicus* because of the lower quantity of proteins in the filtrate, offering a high specific activity, which facilitated further enzyme purification studies by chromatography procedures. The percentage of extracellular amylase activities compared with the intracellular activities was 95.5% for the Khanna medium, 88% for the CP medium and 87.5% for the SR medium (Table 3). The protein secreted by the fungi on the culture medium is a positive parameter for industrial application, as the extracellular enzyme can be easily extracted and the cellular maceration is not necessary. The liquid medium described by Khanna medium [9] was selected as the best composition for amylase production with *A. Japonicus* presenting a lower quantity of proteins, thus making it an important result to perform chromatographic processes while aiming at future enzyme purification.

Table 3. Enzyme production using different culture media

Media	Extracellular Enzymes		Intracellular Enzymes	
	Enz. Activ (U/mL)	Prot. (mg/mL)	Enz. Activ (U/mL)	Prot. (mg/mL)
SR	45.96(±0.78)	0.48(±0.06)	6.51(±0.43)	0.20(±0.02)
CP	46.82(±0.43)	0.69(±0.08)	6.27(±0.10)	0.30(±0.05)
Vogel	37.67(±1.20)	0.21(±0.03)	4.88(±0.54)	0.34(±0.04)
Adams	29.45(±1.09)	0.21(±0.03)	2.71(±0.32)	0.23(±0.03)
Khanna	46.35(±0.87)	0.25(±0.01)	2.24(±0.43)	0.13 (±0.02)

These results represent mean and the standard deviations. The mean standard deviations were ± 0.61 for the enzyme activity and ± 0.03 for the protein.

3.4 Time Course and Physical Condition for the Growth of *A. japonicus* and for Amylolytic Production

After standardizing the medium, it was important to verify whether the incubation time and the physical conditions of the cultivation that had been used (4 days) and physical condition (static) were appropriate. For this purpose, *A. japonicus* was incubated in Khanna medium that was supplemented with 1% soluble starch which served as carbon source, at 30°C and pH 6.0 for a period of 1 to 9 days in a microbiological incubator (static condition) and for a period of 1 to 6 days in a shaker (120 rpm, stirring condition), with a relative humidity of around 70%. The enzymatic activity in the stirring condition decreased after 5 days and was not necessary for the experiment, because these results were obtained for approximately 6 days of growth. While comparing the two physical conditions, it was possible to observe that the amylase production was higher in the static condition, but the fungus maintained approximately the same extracellular activity from 4 to 9 days of growth, with the maximum levels being on the fourth day of growth 44.65 (±0.49) U/mL; while in the stirring condition, the maximum amylase production was obtained on the fifth day (35.85 U/mL ± 0.32). The percentage of extracellular enzymatic activity in the static condition, with 4 days of growth, was 75%, whereas the intracellular activity was 25% (Fig. 2). These results can be explained by the stress caused when the fungus is grown in the stirring condition; this condition makes the mycelium formation more difficult, because it cannot be easily grouped, thus resulting in pellets and requiring longer periods of time to grow and secrete the enzyme to the external medium. Furthermore, the stirring during fermentation can inhibit lactic acid formation, thus extending the fermentation time and possibly altering the quality of the enzyme. Stirring may also cause the incorporation of air into the system, interfering with the fermentation dynamics, which is an anaerobic event [26]. These data were observed in this experiment. These results are in disagreement with those obtained by Michelin [27], in which the fungus *Paecilomyces variotii* reached its maximum growth after 3 days of growth in SR

medium [16] (pH 8.0), at 40°C, with maximum extracellular amylolytic activity on the 8th day of growth. According to these results and the stirring problem observed, the static condition and 4 days of growth were selected as being the ideal ones for the amylase production by *A. japonicus*.

Fig. 2. Time course of amylolytic production in (A) static and (B) stirring conditions. The mean standard deviations were of ± 0.51 .

3.5 Effect of pH on the Enzyme Production by *A. japonicus*

The influence of the initial pH of the medium for the production of amylases by *A. japonicus* that were cultivated for 4 days in static condition at 30°C was verified. It was observed that pH 5.5 was the best initial pH for amylase production. Results slightly differed from the ones reported by Facchini [25], who used *Aspergillus japonicus* for the production of xylanases and CMCase and who standardized 6.0 and 7.0 as the best initial pHs for the cultivation of the fungus, thus aiming at the production of these enzymes. However, it is important to mention that in all cultures the final pH was around 2.5–3.0 but the enzyme did not lose its activity during this pH range. These results can be compared with those reported by Maktouf et al. [28], who studied an amylase produced by *Bacillus* sp and obtained maximal activity at pH 5, which efficiently hydrolysed starch and yielded glucose as the end product. From pH 3.5 to 8.5, enzyme activity was maintained high and maximum activity was obtained at pH 5.5. No significant decay was observed after this pH value, which suggested a higher tolerance in different pH (Fig. 3). Oyeleke and Oduwole [29] reported similar findings when they studied an amylase produced by *Bacillus subtilis* that exhibited activity in a pH range of 6–8. Oyeleke et al. [30] found an amylase with maximum activity in *A. niger* at pH 5; whereas at pH 4–7, the fungus also exhibited amylase production similar to the amylase obtained in this study. The vast activity of amylase at various pH suggests the wide application nature of the amylase identified [31].

Fig. 3. Effect of pH on amylase production. The pH range considered was from 3.0 to 9.5

The mean standard deviation was ± 0.54 for the enzyme activity

3.6 Effect of Temperature and Nitrogen Sources on the Growth and Production of the Amylolytic Enzyme by *A. japonicus*

Higher amylase levels were observed in cultures grown at 25°C. The addition of peptone instead of yeast extract resulted in a slight increase in activity, suggesting that the nitrogen sources tested did not have a significant effect on amylase production.

With regard to the temperature, the cultures incubated at 25°C exhibited higher amylase activity, with the enzymatic levels being 50% greater than the amylases synthesized at 40°C (Fig. 4). This result is consistent with that described in the literature, in which *A. japonicus* produces higher enzymatic activity at room temperature; for example, we can mention the production of pectinases according to Teixeira et al. [32], who used 30°C as growth temperature, and the production of β -xylosidase according to Wakiyama et al. [33], who also used 30°C. Binupriya et al. [34] also reported on the strain of *A. japonicus* grown at room temperature (27°C and 28°C). According to Madigan et al. [20], who correlated the temperature with the collection site, it could be said that *A. japonicus* which was isolated from the soil has excellent temperature close to room temperature growth; it is considered a mesophilic microorganism and its extracellular enzymes can be seen as being thermotolerant, which will be confirmed in the future during the characterization stage.

Fig. 4. Effect of temperature and nitrogen source on the cultivation of *A. japonicus*
The mean standard deviation was ± 0.76 .

3.7 Effect of Different Carbon Sources on Amylase Production

Starches from many sources are frequently used in food industries. With an aim to study the repressor or inducer effect of carbon sources on amylase production, *A. japonicus* cultures were prepared in Khanna medium that was supplemented with 1% of different carbon sources and incubated under static conditions for 4 days, at 25°C. An identical medium without the supplementation of an additional carbon source was used to compare the activity.

With regard to the enzymatic activity (U/mL), it could be inferred that the carbon source which provided the highest amylase production when compared with the medium without the supplementation of carbon source was potato starch (7.46-fold), maltose (7.26-fold) and rice starch (6.90-fold). Starch from Merck™, glucose and starch from Reagen® exhibited on an average 6.62-fold more activity than the medium without supplementation; whereas corn starch, potato, amylopectin and amylose exhibited on an average 5.02-fold more activity than the medium without carbon source. Other carbon sources, such as raffinose and pectin, had about 4-fold more activity than the medium without carbon source. The high amylase level may be attributed to the exhaustion of this compost in the medium after four days, resulting in limited growth and in the secretion of constitutive enzyme (Table 4).

These results are particularly interesting, as starch potato and maltose can induce the synthesis of amylase in high amounts. The action of amylolytic synthesis induction verified by maltose is mediated by a transport system of this disaccharide by permeases. The genes required for the amylolytic enzyme production using maltose are found in the locus MAL (MAL 1, MAL 4 and MAL 6). Physical and genetic analyses of MAL have shown that each active locus includes three genes which probably encode the maltose carrier proteins [35]. According to Kathiresan and Manivannan [36], the highest activity levels of α -amylase

produced by *Penicillium fellutanum* were obtained with the cultivation in a medium that was supplemented with maltose, followed by xylose and D-glucose serving as carbon sources. Thus, the results obtained by the cited researchers are similar to those observed with the amylase produced by *A. japonicus*. Giannesi et al. [37] found that the carbon sources maltose and starch induced α -glucosidase production by *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* as well as sucrose inhibited the amylolytic enzyme production. In the present work, the growth and amylase production by *A. japonicus* in culture medium without carbon source (that was used as control) was also observed to prove that the fungus was using the carbon source as an inducer for enzyme production; fungus growth and enzyme production probably occurred due to the fact that there are salts, proteins and vitamins in the culture medium, derived from peptone, which can be utilized by the fungus. Thus, in this experiment, excellent enzyme production was verified when *A. japonicus* was grown in carbon sources that are used in the food industry; this was an interesting result from the industrial application point of view, because these sources are used in bread production and exert an excellent effect, inducing the synthesis of amylase by *A. japonicus*.

Table 4. Effect of carbon sources on amylase produced by *A. japonicus*

Carbon Sources	Extracellular Enzymes	
	Enzyme Activity	Proteins
Control	7.15 (± 0.48)	0.08 (± 0.02)
Amylopectin	34.59 (± 1.15)	0.15 (± 0.03)
Corn Starch	41.80 (± 2.03)	0.12 (± 0.02)
Glucose	44.04 (± 1.13)	0.18 (± 0.04)
Maltose	51.92 (± 0.58)	0.38 (± 0.06)
Pectin	18.20 (± 0.74)	0.32 (± 0.03)
Potato Amylose	31.44 (± 1.57)	0.11 (± 0.05)
Potato Starch	53.38 (± 0.12)	0.32 (± 0.07)
Raffinose	24.08 (± 1.09)	0.12 (± 0.02)
Rice Starch	49.40 (± 0.35)	0.15 (± 0.01)
Starch Merck™	48.46 (± 1.23)	0.22 (± 0.03)
Starch Reagen®	49.72 (± 0.18)	0.41 (± 0.08)

The mean standard deviations were ± 0.88 for enzyme activity and ± 0.04 for the protein.

3.8 Cultivation of the Fungus *A. japonicus* in Fiber and Food Residues

In order to check the amylase production using fiber and food residues, *A. japonicus* was cultivated in Khanna liquid medium consisting of 1% cassava flour, rye flakes, oat flour, bark and orange bagasse, corn cob, corn mashed, wheat bran, glucose or peanut hulls, for 4 days, under static conditions, at 25°C. It was verified that when grown on orange bark and bagasse, rye flakes and glucose, the extracellular amylase produced by *A. japonicus* hydrolysed the substrate starch, presenting on an average an activity of 38.82 U/mL. In contrast, the lower hydrolysis of this same substrate was observed with the amylase being produced on cassava flour, oat flour, corn cob, corn mashed, wheat bran and peanut hulls, which had, on an average, 7.14 U/mL (Table 5).

The amylase produced by *A. japonicus* grown on orange bark and bagasse hydrolysed the starch with high levels (45.40 $\pm$ 1.13 U/mL) (Table 5). Facchini et al. [25] reported the same result in their study, where *A. japonicus* produced a good level of xylanase (31.59 $\pm$ 0.17 U/g) on orange bark, which corroborates the results obtained in this work. A similar result was also verified by Teixeira et al. [38], who used pectic enzymes to process "Cupuaçu" juice and diminished the amount of waste discharged using a pectinase produced by

Aspergillus japonicus during the "Cupuaçu" juice processing. Thus, it was concluded that the extracellular amylase, produced by the thermotolerant *A. japonicus*, in medium which was supplemented with 1% of the tested carbon sources: starch Merck™, glucose, starch Reagen®, rice starch, corn starch, maltose, potato starch, orange bark and bagasse has a great potential for the action of enzymes in industries, especially the food industry. This is because, currently, the supply of enzyme blends (xylanase, phospholipase, amylase and glucose oxidase) in conjunction with emulsifiers (polysorbate, DATEM) is a common practice which is used to correct the flour quality in mills that produce pre mixtures for bread, cakes, and cookies, mainly French bread, replacing the old chemical oxidants such as bromate and azodicarbonamide. Therefore, the enzyme application in cereals is becoming more promising nowadays, as well as the wheat milling and corn processing during flour production and use of by products (straws, brans) in biofuel production.

Table 5. Supplementation effect of industrial residues on the growth of *A. japonicus*, and the activity of the enzyme

Media	Extracellular Enzymes	
	Mean Enzyme Activity (U/mL)	Mean Protein (mg/mL)
Control	3.70 (±0.32)	0.06 (± 0.02)
Cassava Flour	3.96 (±0.12)	0.11 (± 0.05)
Corn Cob	10.20 (±0.41)	0.14 (± 0.03)
Corn Mashed	2.67 (±0.09)	0.09 (± 0.01)
Glucose	42.60 (±0.98)	0.23 (± 0.08)
Oat Flour	6.90 (±1.02)	0.18 (±0.08)
Orange bark and Bagasse	45.40 (±1.13)	0.20 (±0.07)
Peanut Hulls	7.90 (±0.54)	0.11(±0.05)
Rye Flakes	28.48 (±0.89)	0.18(±0.04)
Wheat Bran	14.69 (±0.65)	0.21(±0.02)

The mean standard deviation was ± 0.61 for enzyme activity and ± 0.04 for the protein.

4. CONCLUSION

This work demonstrated the importance of prospecting filamentous fungus from the environment and the standardization of physical and chemical conditions for its growth and amylase production. The amylolytic system is preferentially produced by microorganisms, and amylase has important and wide industrial applications. The use of industrial waste, which contains sufficient residual quantities of nutrients and carbon sources is one of the most viable alternatives. Agro-industrial wastes are alternative substrates for amylase production, and their use for this purpose helps in solving the pollution problems that are caused by the disposal of these wastes into the environment. Among all tested fungi, *A. japonicus* exhibited the best results. It was observed that it is a thermotolerant microorganism that grows to approximately 40°C and produces high levels of amylase. The fungus cultivation and amylase production were standardized in this work. Nutritional sources with more complex composition acted as an inductor of amylase production. The data obtained from *A. japonicus* amylase suggest a possible ability for biotechnological application, as it degraded alternative carbon sources that are commonly considered waste by the industries. These results, on a large scale can be used in food industries for the production of glucose from the residues by the application of amylase produced by *A. japonicus*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the National System for Research on Biodiversity (Sisbiota-Brazil, CNPq 563260/2010-8/FAPESP nº 2010/52322-3). J.A.J. and M.L.T.M.P. are research fellows of CNPq. T.M.P. and V.M.B. recipients of FAPESP Fellowships. EAM is recipient of the CNPq / PIBIC Fellowship. The authors thank Ricardo Alarcon and Mauricio de Oliveira for technical assistance and Mariana Cereia for English support.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. A broader view: microbial enzymes and their relevance industries, medicine, and beyond. *Biomed. Res. Int.* 2013;329121.
2. Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C. *Enzyme Technology*. New Delhi: Asiatech Publishers; 2005.
3. Kumar D, Muthukumar M, Garg N. Kinetics of fungal extracellular alpha-amylase from *Fusarium solani* immobilized in calcium alginate beads. *J. Environ. Biol.* 2012;33:1021-1025.
4. Ichinose S, Tanaka M, Shintani T, Gomi K. Improved α -amylase production by *Aspergillus oryzae* after a double deletion of genes involved in carbon catabolite repression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014;98:335-343.
5. Varalakshmi KN, Kumudini BS, Nandini BN, Solomon J, Suhas R, Mahesh B, Kavitha AP. Production and characterization of alpha-amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore. *Pol. J. Microbiol.* 2009;58:29-38.
6. Kar S, Ray RC, Mohapatra UB. Alpha-amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 in solid state fermentation using response surface methodology (RSM). *Pol. J. Microbiol.* 2008;57:289-296.
7. Mariani DD, Lorde G, Balatti AP. Influencia del amaranto en la producción de α -amilasa empleando *Aspergillus niger* NRRL 3112. *Rev. Arg. Microbiol.* 2000;32:185-189.
8. Ribeiro J. MDIC lança estudo que busca atrair investimentos para setor de alimentação de animais de produção. Accessed October, 31st, 2013. Available: <http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/noticia.php?area=2¬icia=12146>. Brazil
9. Khanna P, Sundari SS, Kumar NJ. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1995;11:242-243.
10. Facchini FDA, Vici AC, Benassi VM, Freitas LAP, Reis RA, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli MLTM. Optimization of fibrolytic enzyme production by *Aspergillus japonicus* C 03 with potential application in ruminant feed and their effects on tropical forages hydrolysis. *Bioprocess Biosys. Eng.* 2011;34:1027-1038.
11. Maller A, Damasio ARL, Silva TM, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli MLTM. Potential application in animal feed of phytase produced from agro-industrial residues by *Aspergillus japonicus*. *J. Biotechnol.* 2010;150:514-514.
12. Emerson R. An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*. *Lloydia*. 1941;4:77-144.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *A. Biochem.* 1976;72:248-254.

14. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 1959;31:426-428.
15. Peixoto SC, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli MLTM. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. *Int. Microbiol.* 2003;6:269-273.
16. Rizzatti ACS, Jorge JA, Terenzi HF, Rechia CGV, Polizeli MLTM. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2001;26:156-160.
17. Adams PR. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. *Mycopathol.* 1990;112:35-37.
18. Vogel HF. Distribution of lysine pathway among fungi: evolutionary implications. *Am. Nat.* 1984;98:435-446.
19. Oyewole OA, Oyeleke SB, Dauda BEN, Emiade S. Production of amylase and protease enzymes by *Aspergillus niger* and *Penicillium frequentans* isolated from Abattoir Effluent. *Microbiol. J.* 2011;1:174-180.
20. Madigan M, Martinko JM, Parker J. Brock Biology of microorganisms. P. Hall. 2003; 10th Ed.
21. Rosling A, Lindahl BD, Taylor AF, Finlay RD. Mycelial growth and substrate acidification of ectomycorrhizal fungi in response to different minerals. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2004;47:31-37.
22. Andersen MR, Lehmann L, Nielsen J. Systemic analysis of the response of *Aspergillus niger* to ambient pH. *Genome Biol.* 2009;10:R47.
23. Okoth S, Nyongesa B, Ayugi V, Kang'ethe E, Korhonen H, Joutsjoki V. Toxigenic potential of *Aspergillus* species occurring on maize kernels from two agro-ecological zones in Kenya. *Toxins (Basel)*. 2012;4:991-1007.
24. Spadaro D, Patharajan S, Lorè A, Garibaldi A, Gullino ML. Ochratoxigenic black species of *Aspergilli* in grape fruits of northern Italy identified by an improved PCR RFLP procedure. *Toxins (Basel)*. 2012;4:42-54.
25. Facchini FDA, Vici AC, Reis VRA, Jorge JA, Terenzi HF, Reis RA, Polizeli MLTM. Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed. *Bioprocess Biosys. Eng.* 2011;34:347-355.
26. Aguirre-Ezkauriatza EJ, Galarza-González MG, Uribe-Bujanda AI, Ríos-Licea M, López-Pacheco F, Hernández-Brenes CM, Alvarez MM. Effect of mixing during fermentation in yogurt manufacturing. *J Dairy Sci.* 2008;91:4454-4465.
27. Michelin M, Ruller R, Ward RJ, Moraes LAB, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli MLTM. Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by thermotolerant fungus *Paecilomyces variotii*. *J. Ind. Microbiol. & Biotechnol.* 2008;35:17-25.
28. Maktouf S, Kamoun A, Moulis C, Remaud-Simeon M, Ghribi D, Chaabouni SE. A new raw-starch-digesting α -amylase: production under solid-state fermentation on crude millet and biochemical characterization. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2013;23:489-498.
29. Oyeleke SB, Oduwole AA. Production of amylase by bacteria isolated from a cassava dumpsite in minna, Nigerstate, Nigeria. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2009;3:143-146.
30. Oyeleke SB, Egwin EC, Auta SH. Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. *J. Microbiol. Antimicrob.* 2010;2:2141-2307.
31. Oyeleke SB, Oyewole OA, Egwin EC. Production of protease and amylase from *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* using *Parkia biglobosa* (Africa Locust Beans) as substrate in solid state fermentation. *Adv. Life Sc.* 2011;1:49-53.
32. Teixeira MFS, Filho JLL, Durán N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Braz. J. Microbiol.* 2000;31:286-290.