UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

“Diversidade do potencial amilolítico de fungos filamentosos: purificação e caracterização de
uma glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis*”

Paula Zaghetto de Almeida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP,
como parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: BIOLOGIA COMPARADA

RIBEIRÃO PRETO -SP

2015

PAULA ZAGHETTO DE ALMEIDA

“Diversidade do potencial amilolítico de fungos filamentosos: purificação e caracterização de uma glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis*”

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP,
como parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: BIOLOGIA COMPARADA
Orientadora: Prof.^a 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.

ALMEIDA, Paula Zaghetto de

Diversidade do potencial amilolítico em fungos filamentosos: purificação e caracterização de uma glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis*. Ribeirão Preto, 2015.

137 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Comparada

Orientador: Polizeli, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes

1. Glucoamilase. 2. Fungo filamentoso. 3. Enzimologia. 4. *Aspergillus brasiliensis*. 5. Amilase.

Nome: ALMEIDA, Paula Zaghetto de

Título: Diversidade do potencial amilolítico em fungos filamentosos: purificação e caracterização de uma glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis*

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Biologia Comparada.

Aprovado em:

Banca Examinadora

_____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

_____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

_____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Marco e Nanci pelo amor, apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida.

Aos meus irmãos Renata e André pela amizade e confiança.

A meus avôs, tios e primos pelo convívio e afeto.

A Prof.^a Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli por me receber em seu laboratório. Agradeço aos ensinamentos, paciência e disponibilidade.

Agradeço ao Prof. Dr. João Atílio Jorge pelas colaborações e esclarecimento de dúvidas.

Agradeço a todos os colegas de laboratório pela amizade e convivência. Em especial agradeço a Marita, Josana e Paulo pelo auxílio nos experimentos.

Aos técnicos Mariana, Maurício e Ricardo pelo suporte prestado.

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	9
Lista de figuras	11
Lista de abreviaturas.....	14
Lista de símbolos.....	15
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Biodiversidade.....	19
1.2 Identificação molecular de fungos.....	19
1.3 Amido e as amilases.....	20
1.4 Estrutura molecular das glucoamilase.....	23
1.4.1 A divisão evolutiva das glucoamilases.....	24
1.5 O gênero <i>Aspergillus</i>	27
1.5.1 <i>Aspergillus brasiliensis</i>	28
1.6 O gênero <i>Rhizopus</i>	28
1.6.1 <i>Rhizopus oryzae</i>	29
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivos gerais.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Coleta e isolamento dos fungos.....	31

3.2	Pré-seleção dos fungos amilolíticos.....	31
3.3	Seleção das linhagens produtoras de amilases em fermentação líquida.....	32
3.4	Condições de cultivo.....	32
3.5	Manutenção das cepas em laboratório.....	35
3.6	Identificação dos fungos.....	35
3.6.1	Extração de DNA.....	36
3.6.2	Amplificação por PCR.....	36
3.7	Obtenção do extrato bruto.....	37
3.8	Determinação da atividade enzimática.....	38
3.9	Determinação de proteínas totais.....	38
3.10	Extração das enzimas intracelulares do meio líquido.....	39
3.11	Análise filogenética por ITS.....	39
3.12	Efeito da temperatura na produção enzimática.....	41
3.13	Efeito do pH inicial na produção enzimática.....	41
3.14	Produção de amilases em diferentes tempos de cultivo.....	41
3.15	Efeito da fonte de carbono na produção enzimática.....	41
3.16	Análise dos produtos da ação enzimática sobre o amido em cromatografia de camada delgada (TLC).....	42
3.17	Caracterização do perfil de proteínas em gel de eletroforese (SDS-PAGE).....	42
3.17.1	Coloração com Coomassie Brilhante Blue.....	43
3.17.2	Coloração com Blue Silver.....	43
3.18	Caracterização de atividade enzimática em gel de eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE).....	43

3.19	Estabilidade de pH e temperatura das amilases.....	44
3.20	Efeito da temperatura e pH na atividade enzimática.....	44
3.21	Efeito de sais, agente redutor e agente quelante atividade enzimática.....	45
3.21.1	Efeito da Acarbose.....	45
3.21.2	Efeito do EDTA.....	45
3.22	Purificação por eletroeluição.....	45
3.23	Determinação de massa molecular por gel SDS-PAGE.....	46
3.24	Identificação da proteína purificada por Espectrometria de Massas.....	47
3.25	Determinação do conteúdo de carboidratos por fenol-sulfúrico.....	47
3.26	Efeito do produto na atividade enzimática da glucoamilase purificada.....	47
3.27	Dicroísmo Circular.....	48
3.28	Modelagem.....	48
3.29	Determinação do ponto isoelétrico (PI).....	48
3.30	Determinação das constantes cinéticas.....	49
3.31	Filogenia entre glucoamilases de diferentes fungos filamentosos.....	49
3.32	Imobilização da glucoamilase.....	50
3.32.1	Imobilização em DEAE-Sepharose com Polietilenoglicol-4000.....	50
3.32.2	Imobilização em Agarose-BrCN.....	50
3.32.3	Planejamento de misturas com o derivado DEAE-PEG.....	51
3.33	Reprodutibilidade.....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO: I- Isolamento, seleção e identificação.....	52
4.1	Isolamento das linhagens.....	52
4.2	Seleção das linhagens.....	54

4.3	Identificação dos fungos selecionados.....	57
4.4	Análise filogenética por ITS.....	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO: II - Otimização do cultivo e caracterização do extrato bruto.....	64
4.5	Seleção de meio de cultivo para a produção de amilases.....	64
4.6	Temperatura ideal de cultivo.....	67
4.7	Efeito do pH inicial na produção de amilases.....	69
4.8	Produção de amilases em diversos tempos de cultivo.....	71
4.9	Perfil de proteínas do extrato bruto.....	73
4.10	Efeito de diferentes fontes de carbono no meio da cultivo na produção de amilases.....	74
4.11	Análise dos produtos de reação por cromatografia de camada delgada (TLC).....	76
4.12	Determinação da influência do pH e temperatura na atividade enzimática.....	78
4.13	Estabilidade ao pH.....	84
4.14	Estabilidade à temperatura.....	85
4.15	Efeito de compostos iônicos, agente quelante e redutor na atividade enzimática.....	86
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO: III- Purificação, caracterização e imobilização da glucoamilase de <i>Aspergillus brasiliensis</i>	89
4.16	Purificação de uma glucoamilase de <i>A. brasiliensis</i> por eletroeluição.....	89
4.17	Identificação da proteína purificada por espectrometria de massas.....	91
4.18	Conteúdo de carboidratos.....	92
4.19	Análise dos produtos de reação da glucoamilase purificada por cromatografia de camada delgada (TLC).....	94
4.20	Influência da temperatura e pH na atividade da glucoamilase purificada.....	94
4.21	Estabilidade ao pH.....	95

4.22	Estabilidade à temperatura.....	96
4.23	Ação de compostos estimulatórios e inibitórios sobre atividade enzimática.....	97
4.24	Dicroísmo Circular e Modelagem.....	101
4.25	Teste de presença de CBM (<i>carbohydrate-binding modules</i>).....	102
4.26	Determinação do ponto isoelétrico (pI).....	104
4.27	Constantes cinéticas da glucoamilase.....	105
4.28	Análise filogenética de glucoamilases de diferentes fungos.....	106
4.29	Imobilização.....	107
4.30	Planejamento de misturas com a glucoamilase de <i>A. brasiliensis</i> imobilizada em DEAE-PEG.....	109
5	CONCLUSÃO.....	115
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
APÊNDICE A	Identificação morfológica dos fungos selecionados.....	131
APÊNDICE B	Alinhamento da região do ITS de fungos filamentosos.....	132
APÊNDICE C	Alinhamento das sequências de aminoácidos de glucoamilases de fungos filamentosos.....	134
APÊNDICE D	Predição computacional de estrutura secundária.....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 —	<i>Primers</i> e ciclos para PCR.....	37
Tabela 2 —	Fungos utilizados nas análises filogenética e seus respectivos números de identificação do GenBank.....	40
Tabela 3 —	Sequências utilizadas para a construção do cladograma baseado na sequência da glucoamilase.....	49
Tabela 4 —	Ensaio utilizado para a construção do planejamento de misturas.....	51
Tabela 5 —	Materiais coletados, locais de coleta e fungos isolados de cada amostra.....	53
Tabela 6 —	Teste de crescimento em placa.....	55
Tabela 7 —	Atividade enzimática do extrato bruto fermentativo dos fungos isolados.....	56
Tabela 8 —	Homologias encontradas com a ferramenta nucleotide blast do NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>) para os fungos 6B e 8A.....	58
Tabela 9 —	Produção de amilases por <i>A. brasiliensis</i> e pesos úmidos e secos.....	65
Tabela 10 —	Produção intracelular e secreção extracelular de amilases (Unidades totais e %) por <i>A. brasiliensis</i>	65
Tabela 11 —	Produção de amilases por <i>R. oryzae</i> e pesos úmidos e secos.....	66
Tabela 12 —	Produção intracelular e secreção extracelular de amilases (Unidades totais e %) por <i>R. oryzae</i>	67
Tabela 13 —	Produção enzimática de <i>A. brasiliensis</i> em diferentes temperaturas.....	68
Tabela 14 —	Efeito da temperatura de cultivo de <i>R. oryzae</i> na produção enzimática.....	69
Tabela 15 —	Influência do pH na produção de amilases por <i>A. brasiliensis</i>	70
Tabela 16 —	Influência do pH na produção de amilases por <i>R. oryzae</i>	71
Tabela 17 —	Efeito do tempo de cultivo na produção enzimática de <i>A. brasiliensis</i>	72

Tabela 18 —	Efeito do tempo de cultivo na produção enzimática de <i>R. oryzae</i>	73
Tabela 19 —	Valores utilizados para a construção do delineamento experimental.....	78
Tabela 20 —	Ensaio utilizado para a construção de delineamento experimental para as enzimas de <i>A. brasiliensis</i>	78
Tabela 21 —	Análise de variância do modelo para <i>Aspergillus brasiliensis</i>	80
Tabela 22 —	Ensaio utilizado para a construção de delineamento experimental para as enzimas de <i>R. oryzae</i>	81
Tabela 23 —	Análise de variância do modelo para <i>Rhizopus oryzae</i>	84
Tabela 24 —	Efeito de compostos na atividade enzimática de <i>Aspergillus brasiliensis</i> e <i>Rhizopus oryzae</i>	87
Tabela 25 —	Purificação por eletroeluição.....	91
Tabela 26 —	Estrutura primária deduzida.....	92
Tabela 27 —	Efeito de sais, agente quelante e agente redutor na atividade enzimática de <i>Aspergillus brasiliensis</i>	99
Tabela 28	Efeito inibitório da acarbose.....	99
Tabela 29 —	Constantes cinéticas da glucoamilase purificada em diferentes substratos.....	106
Tabela 30 —	Imobilização em DEAE e BrCN.....	108
Tabela 31 —	Planejamento de misturas do derivado DEAE-PEG.....	111
Tabela 32 —	Equações do modelo do planejamento de misturas.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 —	Estrutura do amido.....	21
Figura 2 —	Estrutura tridimensional de amilases.....	22
Figura 3 —	Divisão dos domínios na glucoamilase de <i>A. niger</i>	24
Figura 4 —	Mecanismo de catálise da glucoamilase.....	25
Figura 5 —	Evolução das sequências de glucoamilase a partir de um ancestral comum bacteriano obtido de uma análise de máxima parcimônia.....	27
Figura 6 —	Representação esquemática do sistema de eletroeluição.....	46
Figura 7 —	Fungos isolados crescidos em meio aveia 30°C por 72 horas.....	54
Figura 8 —	Atividade amilolítica (U/mL) dos fungos isolados.....	56
Figura 9 —	Eletroforese de DNA dos fungos 6B e 8A.....	57
Figura 10 —	Sequência consenso obtida com os <i>primers</i> ITS1 e ITS4 para o fungo 6B.....	59
Figura 11 —	Sequência consenso obtida com os <i>primers</i> β -tubulina <i>forward</i> e <i>reverse</i> para o fungo 6B.....	59
Figura 12 —	Sequência consenso obtida com o uso dos primers de calmodulina <i>forward</i> e <i>reverse</i> para o fungo 6B.....	60
Figura 13 —	Sequência consenso obtida com os primers ITS1 e ITS4 para o fungo 8A.....	60
Figura 14 —	Microscopia óptica dos fungos selecionados.....	61
Figura 15 —	Dendograma de máxima verossimilhança mostrando a relação entre alguns <i>Aspergillus</i> e <i>Rhizopus</i> produtores de amilases.....	63
Figura 16	Atividade amilolítica do extrato bruto extracelular de <i>A. brasiliensis</i> e <i>R. oryzae</i> em diferentes temperaturas.....	68

Figura 17 —	Efeito do pH inicial do cultivo de <i>A. brasiliensis</i> e <i>R. oryzae</i> na secreção de amilases extracelulares e seu efeito no pH final.....	70
Figura 18 —	Atividade amilolítica extracelular e pH final do meio de cultivo de <i>A. brasiliensis</i> e <i>R. oryzae</i>	72
Figura 19 —	Perfil das proteínas do extrato bruto extracelular de <i>Aspergillus brasiliensis</i> e <i>Rhizopus oryzae</i> em diferentes tempos de fermentação.....	74
Figura 20 —	Efeito de diversas fontes de carbono na secreção de amilases extracelulares de <i>A. brasiliensis</i>	75
Figura 21 —	Efeito de diversas fontes de carbono na secreção de amilases extracelulares de <i>R. oryzae</i>	75
Figura 22 —	Produtos de reação da fermentação de <i>Aspergillus brasiliensis</i> e <i>Rhizopus oryzae</i> com diferentes fontes de carbono.....	77
Figura 23 —	Diagrama de Pareto para o fungo <i>Aspergillus brasiliensis</i>	79
Figura 24 —	Representação gráfica de superfície de resposta ao pH e temperatura para a atividade amilolítica do extrato bruto de <i>Aspergillus brasiliensis</i>	80
Figura 25 —	Diagrama de Pareto para o fungo <i>Rhizopus oryzae</i>	82
Figura 26 —	Representação gráfica de superfície de resposta ao pH e temperatura para a atividade amilolítica do extrato bruto de <i>Rhizopus oryzae</i>	83
Figura 27 —	Estabilidade ao pH das amilases de <i>A. brasiliensis</i> e <i>R. oryzae</i>	85
Figura 28 —	Estabilidade à temperatura do extrato bruto de <i>A. brasiliensis</i> e <i>R. oryzae</i>	86
Figura 29 —	Perfil de purificação por eletroeluição.....	89
Figura 30 —	Géis da glucoamilase purificada de <i>Aspergillus brasiliensis</i>	90
Figura 31 —	Determinação do tamanho molecular da proteína purificada.....	91
Figura 32 —	Sítios previstos de O-glicosilação na glucoamilase de <i>A. brasiliensis</i>	93

Figura 33 —	Sítios previstos para N-glicosilação na glucoamilase de <i>A. brasiliensis</i>	93
Figura 34 —	TLC com produtos de reação da glucoamilase purificada.....	94
Figura 35 —	Efeito da temperatura e pH na atividade enzimática da glucoamilase purificada de <i>A. brasiliensis</i>	95
Figura 36 —	Estabilidade ao pH da glucoamilase de <i>A. brasiliensis</i>	96
Figura 37 —	Estabilidade à temperatura da glucoamilase de <i>Aspergillus brasiliensis</i>	97
Figura 38 —	Inibição da atividade da glucoamilase purificada com $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5mM em diferentes concentrações de agente quelante EDTA.....	100
Figura 39 —	Efeito de diferentes concentrações de glucose sobre a atividade enzimática..	100
Figura 40 —	Espectro de absorção por dicroísmo circular da glucoamilase de <i>Aspergillus brasiliensis</i>	101
Figura 41 —	Modelo computacional para a glucoamilase de <i>A. brasiliensis</i>	102
Figura 42 —	Presença de SBD na glucoamilase de <i>A. brasiliensis</i>	103
Figura 43 —	Determinação do ponto isoelétrico.....	105
Figura 44 —	Cladograma construído a partir da sequência da glucoamilase de diferentes fungos.....	107
Figura 45	Estabilidade térmica dos derivados comparados a enzima livre.....	108
Figura 46 —	Ciclos de reuso enzima adsorvida em DEAE-PEG.....	109
Figura 47 —	Superfície de resposta da ação do derivado DEAE-PEG em diferentes tempos de hidrólise com amido, amilose e amilopectina como substratos.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

BrCN	Brometo de Cianogênio
DEAE	Dietilaminoetil
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pI	Ponto Isoelétrico
SBD	<i>Starch Bindig Domain</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilenediamina
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Ampère
C	Celsius
g	Grama
<i>g</i>	Gravidade
kb	Quilobase
kDa	QuiloDalton
L	Litro
m	Mili
M	Mol
nm	Nanômetros
U	Unidade enzimática
V	Volts
μ	Micro

RESUMO

ALMEIDA, P.Z. Diversidade do potencial amilolítico de fungos filamentosos: purificação e caracterização de uma glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis*. 2015. 137 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O Brasil apresenta cerca de 10 a 17,6% da biodiversidade mundial e apenas uma fração dela é conhecida. Os fungos filamentosos são bons produtores de enzimas e despertam um grande interesse biotecnológico. O amido é o principal carboidrato de reserva das plantas. Dentre as enzimas amilolíticas estão as glucoamilases, que catalisam a hidrólise das ligações α -1,4 e α -1,6 das extremidades da cadeia do amido liberando glucose. Neste trabalho foram isolados 25 fungos filamentosos de amostras de materiais em decomposição da Mata Atlântica. Dos micro-organismos com alta atividade amilolítica foram selecionados e identificados *Aspergillus brasiliensis* e *Rhizopus oryzae*. Foi realizada a otimização do cultivo e caracterização das amilases do extrato bruto de ambos os fungos. Após a obtenção destes dados foi selecionado *A. brasiliensis*, pois, sua amilase é mais termoestável e ainda não reportada na literatura. Após purificação a enzima foi identificada como glucoamilase, a qual é monomérica com 69 kDa e contém aproximadamente 21% de carboidratos. Apresenta um domínio de ligação ao amido na porção terminal e estrutura secundária rica em α -hélice. Sua atividade ótima ocorre em pH 4,5 a 60°C, seu pI é de 3,21, pode ser ativada com a adição de Mn^{2+} , e é inibida por glucose em concentrações maiores que 0,1 M. A glucoamilase apresenta excelente estabilidade ao pH e boa estabilidade a temperatura (a 50°C mantém 67% de atividade após 7 horas; a 55°C a meia vida é de 147 minutos). Com amido de batata a enzima apresentou as seguintes constantes cinéticas (K_m 2,21 mg/mL; $V_{m\acute{a}x}$ 155 U/mg; k_{cat} 179 s^{-1} ; k_{cat}/K_m 81,06). A glucoamilase foi imobilizada em DEAE-PEG com ativação de 12 vezes e possibilidade de reuso de 10 vezes com perda de apenas 31% de atividade. O derivado demonstrou maior facilidade para hidrolisar a amilopectina do que a amilose. Também foi realizada uma análise de *neighbor joining*, que agrupou a glucoamilase de *A. brasiliensis* próxima às glucoamilases de espécies de *Aspergillus*, que são consideradas as mais derivadas.

Palavras Chave: Glucoamilase. Fungo filamentoso. Enzimologia. *Aspergillus brasiliensis*. Amilase.

ABSTRACT

ALMEIDA, P.Z. Diversity of amylolytic potential in filamentous fungi: purification and characterization of a glucoamylase from *Aspergillus brasiliensis*. 2015. 137 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Brazil holds about 10-17.6% of the world's biodiversity and just a percentage of it is known. Filamentous fungi are enzyme producers that have great biotechnological application. Starch is the main reserve carbohydrate in plants. Among the amylolytic enzymes there are the glucoamylases, that catalyze the hydrolysis of α -1,4 and α -1,6 linkages of the end of starch chains, and releases glucose. In this research 25 filamentous fungi from Atlantic forest decaying material samples were isolated. Among microorganisms with high amylolytic activity *Aspergillus brasiliensis* and *Rhizopus oryzae* were selected and identified. The cultivation parameters were optimized and the enzymes of crude extract were characterized. Considering the previous data *Aspergillus brasiliensis* was selected because its amylases are more thermostable and it has not been described in the literature yet. After purification the enzyme was identified as a glucoamylase, which is monomeric with 69 kDa and about 21% of carbohydrates in its composition. The enzyme has a starch binding domain in the terminal position and its secondary structure is rich in α -helix. The optimum pH for glucoamylase activity is 4.5, the temperature is 60°C and its pI is 3.21. The enzyme can be activated by the addition of Mn^{+2} , and inhibited in concentrations above 0,1M glucose. The glucoamylase has an excellent pH stability and a good temperature stability (at 50°C 67% of the activity was retained after 7 hours; at 55°C its half-life was 147 minutes). The best kinetic values were obtained with potato starch (K_m 2.21 mg/mL; V_{max} 155 U/mg; k_{cat} 179 s⁻¹; k_{cat}/K_m 81,06). The glucoamylase was immobilized on DEAE-PEG, with an activation of 12 times and enzyme reuse 10 times with just 31% loss of its activity. The immobilized enzyme has a greater activity on amylopectin than amylose. A neighbor joining analysis with glucoamylases from filamentous fungi species was made and *Aspergillus brasiliensis* glucoamylase was grouped close to the glucoamylases of *Aspergillus* species, which are considered the most derivative.

Keywords: Glucoamylase. Filamentous fungi. Enzymology. *Aspergillus brasiliensis*. Amylase.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biodiversidade

O Brasil possui uma enorme extensão territorial, grande variedade de biomas, e com isso apresenta cerca de 10 a 17,6% da biodiversidade mundial. Estima-se que o país possua pelo menos 2 milhões de espécies diferentes, e que no entanto são conhecidas apenas 10% delas. As taxas de perda de biodiversidade estão em valores acima de 10 vezes o aceitável. A taxa de degradação dos biomas é altíssima, sendo o mais preocupante deles a Mata Atlântica, que é constituída de apenas 7% de sua cobertura original (LEWINSOHN;PRADO, 2005; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2002; ROCKSTRÖM *et al.*, 2009).

Estimativas de diversidade de fungos apontam para a existência de 611.000 espécies de fungos (MORA *et al.*, 2011) até cerca de 10 milhões de espécies (CANNON, 1997) presentes em nosso planeta. Segundo o *Dictionary of fungi* (KIRK *et al.*, 2008) são conhecidos e descritos 97.330, isto é, menos de 16% do número total de espécies da estimativa mais conservadora. Tais micro-organismos ocupam diversos ambientes, tais como solo, água, materiais orgânicos em decomposição e plantas. Dessa forma, ao colonizar diversos substratos, os fungos, evolutivamente, apresentam uma grande diversidade de enzimas que possibilitam que estes extraiam nutrientes do meio em que habitam (GOUKA *et al.*, 1997).

1.2 – Identificação molecular de fungos

Dentre os principais produtores de amilases estão os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*. Segundo Silva *et al.* (2011) a maioria das espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* seção *Nigri* pode ser identificada em nível de espécie com o sequenciamento do gene de β -tubulina como descrito por Glass e Donaldson (1995). Em casos em que a diferenciação entre espécies não é possível deve-se, então, utilizar o gene de calmodulina de acordo com Hong *et al.* (2006).

Henry *et al.* (2000) utilizaram com sucesso as regiões 1 e 2 do ITS (*Internal Transcribed Spacer*) para identificar diferentes espécies de *Aspergillus*. Ao revisar as formas mais utilizadas de identificação deste mesmo gênero de fungos Geiser *et al.* (2007) apontaram o sequenciamento do gene de β -tubulina como técnica molecular mais comum.

Lv *et al.* (2012) isolaram cepas presentes na fermentação do arroz e identificaram com sucesso dentre outros fungos, espécies de *Aspergillus* (14 isolados) e *Rhizopus* (11 isolados), utilizando como ferramenta molecular a região ITS1-ITS4. Kim *et al.* (2011) isolaram fungos presentes em alimento fermentado de soja e identificaram espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus* utilizando os *primers* ITS1-ITS4 e Bt2a – Bt2b (β -tubulina), sendo que, para *Rhizopus* só a sequência do ITS foi amplificada.

Nagao *et al.* (2005) identificaram espécies patogênicas de *Rhizopus* utilizando PCR multiplex baseada nas regiões do ITS. Abe *et al.* (2006) demonstraram que regiões do rDNA podem ser utilizadas para identificação de espécies do gênero *Rhizopus* ao propor uma filogenia baseada nas regiões ITS1-5.8S-ITS2, 18S e 28S (D1/D2).

JANG *et al.* (2012) identificaram com sucesso espécies de *Rhizopus* utilizando as regiões ITS1-5.8S-ITS2. Alvarez *et al.* (2009) utilizando os *primers* ITS4 e ITS5 identificaram espécies do mesmo gênero, confirmando a identificação morfológica.

1.3. Amido e as amilases

O amido é o principal carboidrato de reserva das plantas, sendo o segundo carboidrato mais abundante na natureza. Está presente no milho, batata, trigo e arroz, que constituem parte importante da alimentação humana. Ele pode ser hidrolisado gerando maltose, glucose e xaropes de oligossacarídeos (VIELLE; ZEIKUS, 2001).

Foram produzidos 75 milhões de toneladas de amido em 2012, e é prevista a produção de 85 milhões de toneladas pra 2015. Boa parte deste amido é convertido em xaropes e adoçantes (AGRANA RESEARCH e INNOVATION CENTER).

O amido é formado por dois polímeros de glucose, a amilose e a amilopectina (**figura 1**). O primeiro não é ramificado e é formado por longas cadeias de D-glucose com ligações α -

1,4. Já amilopectina é altamente ramificada, suas unidades de glucose são unidas por ligações α - 1,4 nas cadeias lineares e α - 1,6 nos pontos de ramificação (NELSON; COX, 2011).

Figura 1. Estrutura do amido (a) amilose; (b) amilopectina. Modificado de Corradini *et al.* (2005).

A composição do amido, bem como seu nível de cristalização varia de acordo com sua fonte botânica. Segundo manuscrito de Waterschoot *et al.* (2015), em milho a quantidade de amilose varia de 23-28%; em mandioca 18 a 24%; em trigo 25 a 26%; em arroz 4 a 21%; batata de 17 a 27%. A morfologia e tamanho dos grânulos de amido também variam bastante, os grânulos de amido de milho são descritos como redondos ou poligonais e tem de 5-50 μ m de diâmetro; o amido de mandioca possui formato redondo ou truncado e diâmetro de 3-32 μ m; os grânulos de amido de trigo são redondos ou lenticulares e possuem de 2 a 35 μ m; já o amido de batata é descrito como oval ou redondo e possui 10 a 110 μ m de diâmetro; os grânulos do amido de arroz são poligonais e variam de 3 a 8 μ m de diâmetro (WATERSCHOOT *et al.*, 2015).

A hidrólise do amido é acelerada pelas amilases, que em sua maioria pertencem à família 13 das glucosil hidrolases. Estas enzimas apresentam estrutura em forma de barril, denominado de barril (β/α)₈ ou barril TIM (por ser primeiramente descrito na enzima da via glicolítica triose-isomerase), como apresentado na **figura 2 (a e b)**. Todas as amilases possuem resíduos de ácido aspártico e o ácido glutâmico no sítio catalítico, correspondente a asp-206, glu-230 e asp-270 da TAKA-amilase A (CANTAREL *et al.*, 2009; VAN DER MAAREL *et al.*, 2002).

Sabe-se que nem todas as amilases são homólogas, e que por convergência apresentam estrutura em barril TIM (exceto glucoamilase) e sítios de ligação com o substrato (SBD – *Starch Bindig Domain*) ligados ao carboxi-terminal bastante parecidos. A β -amilase pertence à família

14 das glucosil transferases, já a glucoamilase pertence à família 15 das glucosil transferases, além disso, seu formato é de barril (α/α)₆ (**figura 2c**) (JANEČEK, 1999).

Figura 2. Estrutura tridimensional de amilases. (a) α -amilase GH13 de *Aspergillus oryzae* (b) β -amilase GH14 da soja (c) Glucoamilase GH15 de *Aspergillus awamori*. Modificado de Janeček (2009).

As amilases apresentam grande potencial biotecnológico e são amplamente utilizadas nas indústrias têxteis, de papel e celulose, de detergentes, de panificação, farmacêutica e de bebidas, constituindo cerca de 30% do total de enzimas comercializadas (GUPTA *et al.*, 2003; VAN DER MAAREL *et al.*, 2002). Hidrólises enzimáticas são vantajosas ao serem comparadas à hidrólise química, pois apresentam um rendimento teórico de 100%, além de não formarem subprodutos indesejáveis (BALLESTEROS *et al.*, 2002). Essas enzimas ainda podem ser usadas para o reaproveitamento de resíduos agroindustriais como cascas e fibras (CRUZ *et al.*, 2011).

As amilases podem ser divididas em:

- α -amilase (E.C. 3.2.1.1; α -1,4 glucano 4-glucanohidrolase) age exclusivamente nas ligações α -1,4 presentes no interior da cadeia da amilose e amilopectina liberando maltooligossacarídeos (PANDEY *et al.*, 2000a).

- α -glucosidase (EC 3.2.1.20) age nas extremidades não redutoras do amido, hidrolisa as ligações α -1,4 liberando unidades de α -D-glucose (VIHINEN; MÄNTSÄLÄ, 1989).
- β -amilase (E.C 3.2.1.2; α -1,4 glucano-maltohidrolase), atua nas ligações α -1,4 das extremidades não redutoras da cadeia de amido liberando unidades de maltose (HARGER *et al.*, 1982).
- Isoamilase (E.C. 3.2.1.68; glicogênio-6-glucanohidrolase,) hidrolisa as ligações α -1,6 do amido em ramificações com, no máximo, três unidades de glucose (ANTO *et al.*, 2006).
- Pululanase (α -dextrina 6-glucosidase, E.C.3.2.1.41), amilase desramificante que age nas ligações α -1,6 do pululano (polissacarídeo linear composto por maltotrioses unidas por ligações α -1,6), liberando maltotrioses (ANTO *et al.*, 2006).
- Glucoamilases (E.C. 3.2.1.3 glucan 1,4- α -glucosidase) são exo-amilases que liberam monômeros de β -D-glucose do final não redutor do amido. Elas são capazes de hidrolisar as ligações α -1,4, e em uma velocidade muito menor, as ligações α -1,6 da cadeia do amido (HIROMI *et al.*, 1966).

1.4 Estrutura molecular das glucoamilases

Existe uma vasta literatura sobre glucoamilases microbianas, a maioria de fonte eucariótica, nas quais, possivelmente, a glicosilação favorece a estabilidade, rigidez da molécula e a secreção extracelular (KUMAR; SATYANARAYANA, 2009).

A estrutura da glucoamilase pode ser dividida em três partes: domínio catalítico, *linker* e domínio de ligação ao amido (SBD) conforme demonstrado na **figura 3**.

Figura 3. Divisão dos domínios na glucoamilase de *A. niger*. Retirado de Coutinho (1997) em <http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/nte/heyde/www.public.iastate.edu/_pedro/glase/glase.html> Acesso em 02/2015.

A estrutura cristalina de *A. awamori* var. *X100* demonstrou que seu domínio catalítico é composto por 13 α -hélices, das quais 12 formam um $(\alpha/\alpha)_6$ -barril, 6 deles internos e 6 externos, que formam uma espécie de funil em volta do sítio ativo que é composto por 6 α -hélices bastante conservadas (COUTINHO; REILLY, 1997).

O mecanismo de hidrólise aceita envolve: a) transferência de próton para o oxigênio de um catalisador ácido geral para ligação glicosídica do amido; b) formação de um íon oxocarbenio e um ataque nucleofílico da água auxiliado por um catalisador básico geral (**figura 4**). O mecanismo de catálise da glucoamilase implica na inversão da configuração do carbono anomérico (MCCARTER; WITHERS, 1994; SAUER *et al.*, 2000).

Figura 4. Mecanismo de catálise da glucoamilase. Exemplo de mecanismo de catálise, a base E400 (topo) e o ácido E179 (abaixo) de catálise na hidrólise do substrato envolvendo inversão na configuração do carbono anomérico. Retirado de Sauer *et al.* (2000).

A região do *linker*, localizada entre o domínio catalítico e o SBD é altamente O-glicosilada. Em *A. awamori* ela é compreendida entre os resíduos 472-508, a remoção de alguns desses resíduos afetam gravemente a secreção e termoestabilidade da enzima (LIBBY *et al.*, 1994).

O SBD é essencial para a degradação do amido granular, porém, tem pouca influência na hidrólise do amido solúvel. Ele reconhece e se liga ao final das cadeias dupla hélice da amilose que estão expostas na superfície dos grânulos de amido. Dessa forma imobiliza as cadeias de amilose e leva a sua circularização, o que facilita a ação do domínio catalítico (MORRIS *et al.*, 2005).

O SDB é composto por dois sítios (sítio 1 e sítio 2) independentes estrutural e funcionalmente, eles estão localizados um perpendicularmente ao outro. Ambos os sítios funcionam na ausência do outro sítio, porém, apenas com os dois sítios funcionando perfeitamente a modificação da estrutura da amilose é completa. O sítio 1 está mais fortemente relacionado com o reconhecimento inicial das porções terminais da molécula de amilose e o sítio 2 com uma ligação mais estreita com a cadeia amilósica, levando a sua circularização (GIARDINA *et al.*, 2001; SOUTHALL *et al.*, 1999).

As glucoamilases possuem uma grande importância industrial, sendo aplicadas na produção de glucose a partir do amido, xaropes de milho com alto teor de glucose, na indústria de panificação, produção de álcool e bebidas. Elas são utilizadas tanto livres como imobilizadas

e são provenientes em sua maioria de fungos filamentosos. (JAMES; LEE, 1997; PANDEY *et al.*, 2000b).

Apesar de representar uma pequena fatia no mercado de enzimas, as enzimas imobilizadas possuem grande potencial para emprego industrial por terem maior estabilidade, pH e temperatura ótimos mais favoráveis, permitem o reuso em mais de um processo, fácil separação do produto final, além da possibilidade da imobilização de mais de uma enzima necessária no processo em um mesmo suporte, aumentando desta forma os rendimentos (DICOSIMO *et al.*, 2013).

1.4.1 Divisão evolutiva das glucoamilase

Coutinho e Reilly (1997) dividiram as glucoamilase em 7 famílias de acordo com sua história evolutiva. Estas subfamílias são: *Clostridium* (bacteriana), *Methanococcus* (Archaea); *Arxula* (levedura); *Saccharomyces* (levedura); *Saccharomycopsis* (levedura); *Rhizopus* (fungo filamentoso) e *Aspergillus* (fungo filamentoso).

A subfamília *Aspergillus* corresponde a de glucoamilase com *design* mais eficiente. A filogenia construída (**figura 5**) sugere que um SBD primitivo, exemplificado pela glucoamilase de *Corticium rolfii* (que não tem uma ligação dissulfeto interna e possui um *gap* em um dos sítios de ligação ao carboidrato) passou por uma evolução em estágios. *Hormoconis resinae*, que é mais derivado, possui uma ligação dissulfeto no SBD e uma estrutura em cone em volta do sítio catalítico. *Linkers* mais longos e maior quantidade de O-glicosilação no cone são encontrados em *Neurospora crassa* e *Humicola grisea* var. *thermoidea*, com variação na posição de uma das cisteínas envolvidas na ligação dissulfeto do SBD. Uma região de *linker* um pouco menor é encontrada em *Aspergillus oryzae*, e em *Aspergillus terreus*, este último possui uma maior quantidade de O-glicosilações e também possui sítios de N-glicosilação. As glucoamilases dos demais *Aspergillus* da árvore da **figura 5**, que podem ser considerados os mais derivados, possuem um *linker* um pouco menor, também bastante glicosilado, e divergem pouco entre si (COUTINHO; REILLY, 1997).

Figura 5. Evolução das sequências de glucoamilase a partir de um ancestral comum bacteriano obtido de uma análise de máxima parcimônia. As espécies estão indicadas em *itálico*, já as subfamílias de glucoamilase em **negrito**. Domínio catalítico em cinza escuro; SBD cinza médio, *Linker* em cinza claro; outros domínios em preto; Glucoamilase presa a parede celular é representada pela barra vertical. Retirado de Coutinho e Reilly (1997).

1.5 O gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729 por um padre e biólogo italiano Pier Antonio Micheli. Ele atribuiu o nome *Aspergillus* ao gênero por achar seu formato parecido com um asperge (instrumento utilizado para borrifar água benta) (MICHELI, 1729¹ apud AINSWORTH, 1976).

Segundo GEISER *et al.* (2007) estão descritas aproximadamente 250 espécies de fungos do gênero *Aspergillus*, e este número tende a crescer conforme a descoberta de novas espécies, bem como, com o aprimoramento da descrição das mesmas.

¹ MICHELI, P.A. Nova Plantarum Genera. Florentiae. 1721

Aspergillus é um dos grupos mais conhecidos e estudados. São organismos prevalentes na natureza, de fácil cultivo em laboratório e de importância econômica. A maioria das espécies são especializadas em degradar os polímeros constituintes das plantas, mas, também podem ser encontrados em substratos diversos como por exemplo esterco e tecidos de mamíferos (MACHIDA; GOMI, 2010).

As glucoamilases de *Aspergillus* são amplamente estudadas e comercializadas. Seu pH ótimo varia de 3,5 a 5, sua temperatura ótima varia de 40 a 65°C (KUMAR e SATYANARAYANA, 2009; PANDEY *et al.*, 2000b).

1.5.1 *Aspergillus brasiliensis*

O fungo filamentoso do gênero *Aspergillus* espécie *brasiliensis* foi descrito em 2007 por Varga *et al.* Suas colônias possuem coloração branca nos primeiros dias, que muda para marrom escuro e então preto. Seus conídios variam de 3,5 a 4,5 µm, a vesícula de 30 a 40 µm, e a esclerótica é encontrada em apenas algumas cepas e variam de 1 a 1,5 µm e possuem a coloração branca (VARGA *et al.*, 2007).

Já foi descrita a produção de uma β-xilosidase termoestável produzida por *A. brasiliensis*, que possui um pH ótimo de 5 e uma temperatura ótima de 75°C (PEDRESEN *et al.*, 2007), também foi descrita uma epóxido hidrolase enantiosseletiva, que possui um pH ótimo de 6 e temperatura de 30°C (BELOTI *et al.*, 2013). Coutinho *et al.* (2014) reportaram que *A. brasiliensis* é capaz de solubilizar fosfatos na presença de carbono. Manikandan *et al.* (2010) reportaram dois casos de ceratite causados por este fungo. Miyazaki *et al.* (2011) expressaram, com sucesso, a α-glucosidase I de *A. brasiliensis* em *S. cerevisiae*.

1.6 O gênero *Rhizopus*

Os fungos do gênero *Rhizopus* são ubíquos, encontrados em matéria vegetal, pães e frutas em decomposição, fezes, solo, raízes. Também podem ser patógenos humanos

(RICHARDISON, 2009). O gênero *Rhizopus* possui micro-organismos bastante utilizados na produção de alimentos fermentados em países da Ásia (HESSELTINE, 1983).

Muitas espécies pertencentes a este gênero já foram descritas, mas, este número foi bastante reduzido após algumas revisões. Shipper (1984) baseando-se nas características morfológicas dividiu as espécies de *Rhizopus* em três grupos: grupo *stolonifer*; *oryzae*; grupo *microsporus*.

1.6.1 *Rhizopus oryzae*

A espécie *Rhizopus oryzae* é tratada por Gryganskyl *et al.* (2010) como Complexo *Rhizopus oryzae*, um conjunto de espécies bastante similares. Existe um grande número de sinônimos para a espécie e sua classificação ainda é confusa (DOLATABODI *et al.*, 2014, GRYGANSKYL *et al.*, 2010; SHIPPER, 1984).

R. oryzae é bastante utilizado para a produção de comidas e bebidas alcólicas na Indonésia, China e Japão; utilizado industrialmente na produção de ácidos orgânicos e enzimas; importante causador de micoses (DOLATABODI *et al.*, 2014).

2 – OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivos o isolamento, seleção e identificação de novas linhagens de fungos filamentosos do litoral paulista produtores de amilases; escolha da melhor condição de cultivo submerso; caracterização das amilases presentes no extrato bruto; purificação de uma amilase; caracterização de seus principais aspectos bioquímicos; imobilização e classificação de sua glucoamilase levando em conta seus aspectos filogenéticos.

2.2 Objetivos específicos

- Isolamento, seleção e identificação de fungos filamentosos produtores de amilases;
- Otimização das condições de cultivo e caracterização das amilases em extrato bruto;
- Purificação, caracterização e imobilização de uma glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta e isolamento dos fungos

Foram isolados fungos filamentosos presentes em materiais em decomposição coletados na Mata Atlântica do litoral paulista. Os materiais coletados foram armazenados em tubos de penicilina esterilizados. Os locais foram georreferenciados por GPS (*Global Positioning System*), sendo determinadas a altitude, longitude, altura e precisão. Também foram anotadas a data, horário e temperatura ambiente no momento da coleta.

Para isolamento foi adotada a técnica de plaqueamento após diluições sucessivas, onde suspensões do material em decomposição, contendo traços de pentabiótico veterinário, foram inoculadas em placas de Petri com meio de aveia (farinha de aveia 4%; ágar bacteriológico 2%, glucose 0,5%). As placas foram incubadas a 30°C, e após o desenvolvimento as cepas fúngicas foram purificadas através de repiques sucessivos e diferenciadas de acordo com suas características macroscópicas (cor, textura, esporos e mudança da coloração do meio de cultura).

3.2. Pré-seleção dos fungos amilolíticos

Os fungos selecionados foram inoculados em placas de Petri com meio Czapek (WISEMAN, 1975) e amido a 1%. O diâmetro das colônias foram medidos a cada 24 horas durante 3 dias.

3.3. Seleção das linhagens produtoras de amilases em fermentação líquida

Uma suspensão aquosa de conídios foi obtida junto às culturas isoladas por raspagem da superfície da cultura com alça de platina e adição de 10 mL de água destilada. Parte dessa suspensão de conídios (1 mL) foi vertida em 25 mL de meio CP (PEIXOTO *et al.*, 2003).

3.4. Condições de cultivo

O processo fermentativo em meio líquido ocorreu em frascos Erlenmeyer de 125 mL em um volume total de 25 mL para os experimentos de otimização das condições de cultivo. Vários meios líquidos foram testados: Khanna (KHANNA *et al.*, 1995), CP (PEIXOTO *et al.*, 2003), SR (RIZZATTI *et al.*, 2001) e Vogel (VOGEL, 1964) com pH 6,5 a 30°C, utilizando inicialmente amido solúvel a 1%. Foram inoculados 10^5 conídios por mL de meio. O crescimento ocorreu em estufa bacteriológica ou *shaker* durante um período de 3 dias.

Meio Vogel (VOGEL, 1964)

Sais de Vogel [50x].....	2 mL
Solução de biotina.....	20 µL
Amido.....	1 g
Água destilada.....	100 mL
Solução de biotina	
Biotina.....	0,05 g
Etanol 50%.....	100 mL

Sais de Vogel [50x]

CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,5 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .5H ₂ O.....	15 g
KH ₂ PO ₄	20 g
NH ₄ NO ₃	10 g
MgSO ₄	1 g
Solução de elementos traços.....	0,5 mL
Clorofórmio.....	0,5 mL
Água destilada.....	100 mL

Elementos traço

C ₆ H ₈ O ₇ . H ₂ O.....	5 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	5 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄).6H ₂ O.....	1 g
CuSO ₂ .H ₂ O.....	0,25 g
MnSO ₄ .H ₂ O.....	0,05 g
H ₃ BO ₃	0,05 g
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O.....	0,05g
Clorofórmio.....	1 mL
Água destilada.....	95 mL

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

Solução de sais de Khanna [20x].....	5 mL
Extrato de levedura.....	0,1 g
Amido.....	1 g
Agua destilada.....	100 mL

Sais de Khanna [20x]

NH ₄ NO ₃	2 g
KH ₂ PO ₄	1,3 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,36 g
KCl.....	0,098 g
ZnSO ₄ .H ₂ O.....	0,007 g
MgSO ₄ .H ₂ O.....	0,013 g
Fe ₂ (SO ₄).6H ₂ O.....	0,0066 g
CuSO ₂ .7H ₂ O.....	0,0062 g
H ₂ O.....	100 mL

Meio SR (RIZZATTI *et al.*, 2001)

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

Sais SR [20x]

MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,24 g
KH ₂ PO ₄	0,3 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g
Água destilada.....	100 mL

Meio CP (PEIXOTO *et al.*, 2003)

Extrato de levedura.....	0,8 g
--------------------------	-------

KH ₂ PO ₄	0,3 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
Amido.....	1 g
Água destilada.....	100 mL

3.5 Manutenção das cepas em laboratório

A manutenção rotineira das cepas em laboratório foi realizada em tubos estéreis contendo 5 mL de meio de aveia sólido. Repiques periódicos foram realizados e as cepas foram mantidas em estufa a 30°C, por aproximadamente dez dias, as quais em seguida, foram transferidas para geladeira, onde ficaram conservadas. A manutenção de todo o acervo de fungos isolados foi realizada em sílica gel, onde uma suspensão de esporos foi preparada em 5 mL de solução de leite Molico desnatado (10g/100 mL de água destilada). Desta suspensão, aproximadamente 0,5 mL foram misturados a 6 g de silicagel branca 1-4 mm contida em tubos de ensaio (16 x 100 mm) vedados com rosca. Três tubos foram armazenados para cada cultura. Todos os passos foram conduzidos de forma asséptica.

Os fungos isolados também foram preservados em ultrafreezer. As cepas foram cultivadas em placa de Petri com meio sólido por cerca de 7 dias. Parte do micélio com meio de cultura foi recortado e colocado em criotubos, contendo glicerol 20% estéril e congelados a -80°C.

3.6 Identificação dos fungos

Dentre os fungos isolados durante a execução do projeto foram selecionados os dois melhores produtores de amilases. Segundo sua morfologia eles foram classificados como pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*. Para identificar a espécie do fungo isolado do gênero *Aspergillus* utilizou-se os *primers* ITS1-ITS4, calmodulina e β -tubulina. (WHITE, 1990;

GLASS; DONALDSON, 1995; BALAJEE *et al.*, 2009). Para *Rhizopus sp.* foi utilizado apenas o par de *primers* ITS1-ITS4.

3.6.1 Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em meio SR (RIZZATTI *et al.*, 2001) e incubados em agitação por 24 horas à 30°C. Após o crescimento, o micélio foi filtrado em papel filtro estéril e macerado com nitrogênio líquido. O micélio então foi distribuído em eppendorfs e foi adicionado 750 µL de tampão de extração (SDS 1%, EDTA 0,05 M). A mistura foi incubada por 20 minutos a 65°C centrifugada por 15 minutos a 18.407 x g e a 4°C.

O sobrenadante foi separado e adicionado igual quantidade de fenol-clorofórmio (1:1) agitado por inversão. Após isso, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 18.407 x g, ao sobrenadante foram adicionados 10% de seu volume de RNase (10mg/mL). Após incubação por 20 minutos a 35°C adicionou-se solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) na mesma quantidade da amostra. A mistura foi então centrifugada por 10 minutos, 18.407 x g e o sobrenadante recuperado.

O processo foi repetido com a adição de clorofórmio 100%. Ao sobrenadante adicionou-se 10% de seu volume em acetado de sódio 3 M e foi incubado por 40 minutos em banho de gelo. Após esse processo foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado e a amostra permaneceu em freezer (-20°C) overnight. Após esse tempo a amostra foi centrifugada a 18.407 x g por 10 minutos. O precipitado formado foi lavado com 1 mL de etanol 100% gelado, seguido de centrifugação 18.407 x g por 10 minutos e, em seguida, lavado por 2 vezes com etanol 70% gelado. O álcool foi descartado e o precipitado seco em estufa (50°C) por 15 minutos. Este foi finalmente ressuspensionado em 50 µL de água milliQ a 55°C.

A qualidade do DNA genômico foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/V), corado com brometo de etídio 0,1% em tampão TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a 100V por 60 minutos. O DNA foi visualizado sob luz UV e as imagens foram obtidas pelo transiluminador L-Pix, Loccus Biotecnologia.

3.6.2 Amplificação por PCR

A reação de PCR foi composta por 33 µL de água Milli Q, 5 µL de tampão MgCl 10x (Sigma), 4 µL de MgCl₂ (Sigma), 4 µL de desoxirribonucleotídeos – dNTPs- (Sigma), 1 µL de

cada *primer* (**tabela 1**), 1 µL da enzima Taq DNA polimerase (JumpStart, Sigma) e 1 µL de DNA genômico.

Após a amplificação as amostras foram purificadas utilizando o kit Illustra™ - GFX™ - GE. O sequenciamento foi realizado no Hemocentro de Ribeirão Preto. A identificação das espécies foi realizada utilizando-se a ferramenta “nucleotide blast” do Genbank. Para análise do alinhamento das sequências utilizou-se o programa BioEdit – Sequence Alignment Editor.

Tabela 1. *Primers* e ciclos para PCR

<i>Primer</i>	Sequências	Ciclos
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3'	Desnaturação inicial: 2 minutos a 95°C; 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C e extensão final de 5 minutos a 72°C
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
BT2a	5'-GGTAACCAAATGGTGCTGCTTTC-3'	Desnaturação inicial: 2 minutos a 94°C; 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57°C e 2 minutos a 72°C e extensão final de 5 minutos a 72°C
BT2b	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'	
cf1	5'-GCCGACTCTTTGACYGARGAR-3'	Desnaturação inicial: 2 minutos a 95°C; 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C e extensão final de 5 minutos a 72°C
cf4	5'-TTTYTGATCATRAGYTGGAC-3'	

3.7 Obtenção do extrato bruto

As culturas, após crescimento em condições determinadas, foram filtradas a vácuo com auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro. Para ensaios enzimáticos o filtrado foi dialisado contra água destilada por uma noite a 4°C.

3.8 Determinação da atividade enzimática

A atividade amilásica foi quantificada pela liberação de açúcares redutores utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS (MILLER, 1959). Um volume de 50 µL extrato bruto enzimático foi incubado a 60°C com 50 µL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 5,5) contendo amido 1% durante 5 minutos. A reação foi paralisada com 100 µL de DNS e então a amostra foi fervida por 5 minutos. Finalmente adicionou-se 1 mL de água destilada. A leitura ocorreu em leitor de placas a 540 nm. O branco da reação foi composto pela enzima desativada por DNS e o substrato.

Para cálculo da atividade enzimática foi construída uma curva padrão com amostras em concentrações de 0 a 4 µmol de glucose em 100 µL de água destilada. A partir dos valores de absorbância e concentração de glucose foi feita a correlação linear obtendo-se a equação da reta como $Abs = 0,26 \cdot \mu\text{mol de glucose}$. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor, por minuto, nas condições de ensaio. A quantidade de unidades totais foi determinada pela multiplicação da atividade enzimática (U/mL) pelo volume em mL do extrato bruto ou enzima purificada.

3.9 Dosagem de proteínas totais

A medida de proteínas totais foi feita de acordo com BRADFORD (1976). Um volume de 100 µL de amostra enzimática foi incubada em temperatura ambiente com 1 mL do reagente de Bradford por 5 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm. A curva padrão foi realizada com soro albumina bovina nas concentrações de 0 a 0,1 mg/mL. A partir dos valores de absorbância e concentração de proteína obteve-se uma correlação linear com uma equação da reta com $Abs = 3,48 \cdot \text{concentração de proteína em mg/mL}$.

3.10 Extração das enzimas intracelulares do meio líquido

O micélio obtido dos cultivos foi lavado em água destilada, prensado em papel de filtro para retirar o excesso de água e pesado para obtenção da massa úmida. Para a obtenção do extrato bruto, o micélio foi macerado com areia (1:1) em gral de porcelana mantido no gelo. A areia utilizada foi previamente tratada com ácido sulfúrico por 12 horas, enxaguada com água destilada e seca em estufa a 100°C. O macerado foi então ressuspense em 10 mL de solução tampão e então centrifugado a 11.952 x g durante 15 minutos, a 4°C, para remoção da areia e dos restos celulares. O sobrenadante obtido, chamado de extrato bruto micelial, foi utilizado para a determinação da atividade amilolítica intracelular.

3.11 Análise filogenética por ITS

Foram realizadas análises filogenéticas com o *Rhizopus oryzae* e *Aspergillus brasiliensis* com o propósito de situar e comparar estas espécies com as principais espécies dos gêneros de *Rhizopus* e *Aspergillus* produtoras de glucoamilases encontradas na literatura. As análises filogenéticas utilizaram os fragmentos das regiões 1 e 2 do *Internal Transcribed Spacer* (ITS1 e ITS2). As sequências foram retiradas do GenBank e estão demonstradas na **tabela 2**. Um alinhamento múltiplo de sequências (AMS) foi gerado com as regiões ITS utilizando MUSCLE 3.6 (Edgar, 2004) (**Apêndice B**) e um dendograma não enraizado baseado no AMS foi gerado utilizando-se o “Molecular Evolutionary Genetics Analysis” 5.2 (MEGA 5.2) (TAMURA *et al.*, 2011). A árvore filogenética foi baseada no método da Máxima Verossimilhança com robustez de 1000 réplicas não paramétricas de *bootstrap*. A taxa de similaridade entre as sequências foi demonstrada em porcentagem levando em consideração o número de bases conservadas e a quantidade total de bases alinhadas.

Tabela 2. Fungos utilizados nas análises filogenética e seus respectivos números de identificação do GenBank

Fungo	GenBank	Referência
<i>Rhizopus oryzae</i>	AF115725.1	Chiang <i>et al.</i> , (1998) ²
<i>Rhizopus delemar</i>	JN943002.1	Voigt, (2011) ³
<i>Rhizopus niveus</i>	DQ641284.1	Liu <i>et al.</i> , (2006) ⁴
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	AF115721.1	Chiang <i>et al.</i> , (1998) ²
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	FJ717684.1	Oliveira <i>et al.</i> , (2010)
<i>Aspergillus oryzae</i>	JX429926.1	Pirota <i>et al.</i> , (2012) ⁵
<i>Aspergillus flavus</i>	DQ683124.1	Bagyalakshmi <i>et al.</i> , (2007)
<i>Aspergillus nidulans</i>	AF455505.1	Buzina <i>et al.</i> , (2003)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	KC142152.1	Nazir <i>et al.</i> , (2012) ⁶
<i>Aspergillus awamori</i>	DQ235784.1	Li <i>et al.</i> , (2005) ⁷

² CHIANG,B.Y.T.; LIOU,G.Y.; YUAN,G.F. A phylogenetic study of the *Rhizopus microsporus* group using rDNA sequencing. 2008.

³ VOIGT, K. The internal transcribed spacer as a universal DNA barcode marker for Fungi. 2011.

⁴ LIU,X.Y.; ZHENG, R.Y; HUANG, H. Molecular studies on *Rhizopus* (I): Relationships among species based on ITS rDNA and pyrG gene.2006.

⁵ PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. D. S.; FONSECA, R. F; PAIXAO, D. A. A.; BALEEIRO, F.; NETO, V. B.; FARINAS, C. S. Enhanced production of xylanases by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions, 2012.

⁶ NAZIR,K.H.M.N.H.; DURAIRAJ,P.; HASSAN,J.; YUN,H. Internal transcribed spacer (ITS) based identification of *Aspergillus fumigatus* from feed sample. 2012.

⁷ LI, Y.; LU,J; FANG,H. *Aspergillus awamori* produces xylanase. 2005.

3.12 Efeito da temperatura na produção enzimática

Para determinar a temperatura ideal de crescimento os fungos foram cultivados a 25, 30, 35 e 40°C durante 72 horas no meio de cultivo e condição selecionados previamente.

3.13 Efeito do pH inicial na produção enzimática

Para determinar o efeito do pH na produção enzimática os fungos foram cultivados em pH inicial de 6,5 a 8,5 para *Aspergillus brasiliensis* e de 5,5 a 7,5 para *Rhizopus oryzae*.

3.14 Produção de amilases em diferentes tempos de cultivo

Os fungos foram cultivados nas condições selecionadas nos experimentos anteriores por 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas para seleção do tempo de maior produção enzimática.

3.15 Efeito da fonte de carbono na produção enzimática

Para a determinação do efeito da fonte de carbono na produção de amilases foram utilizados os seguintes substratos na concentração de 1% (m/v) no meio de cultura: glucose, amido solúvel, maltose, farelo de trigo, milho moído, farinha de aveia Quaker, e cevada (resíduo da produção de cerveja tipo “Vixnu”).

3.16 Análise dos produtos da ação enzimática sobre o amido em cromatografia de camada delgada (TLC)

A – Extrato bruto: Para a determinação dos produtos da reação enzimática 50 μ L do extrato bruto provenientes dos cultivos com diferentes fontes de carbono foi incubado com 50 μ L de amido solúvel 1% em tampão citrato de sódio pH 5,5. A reação foi paralisada por fervura após 20 minutos.

B – Glucoamilase Purificada: 50 μ L da enzima purificada foi incubada com 50 μ L de amido solúvel 1% em tampão citrato de sódio pH 4,5, 60°C por 0,5, 1, 2 e 24 horas. A reação foi paralisada por fervura.

Os produtos formados pela hidrólise do amido com o extrato bruto e a glucoamilase purificada foram analisados em cromatografia de camada delgada (TLC –Merck 25 *aluminium sheets* 20x20 cm sílica gel 60). Foram aplicados 5 μ L de cada produto de reação e também 5 μ L de padrão contendo glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentose (0,1% m/v). A placa foi então colocada em uma cuba de vidro contendo solução n-butanol, etanol e água destilada (5:3:2). A corrida foi desenvolvida duas vezes. Para a revelação a placa foi borrifada com uma solução com 18 mL de metanol, 2 mL de ácido sulfúrico e 0,04 g de orcinol, e então, revelada em estufa a 100°C por aproximadamente 5 minutos (até o aparecimento das bandas).

3.17 Caracterização do perfil de proteínas em gel de eletroforese (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas ocorreu segundo o método descrito por LAEMMLI (1970). Os géis de acrilamida foram utilizados na concentração de 8% com gel de empilhamento na concentração de 5%, e foram polimerizados em placas de vidro (7,2x10,2 cm). As amostras foram preparadas com tampão de amostra (glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,002% e Tris 0,12 M, pH 6,75) na proporção de 1:1 e então fervidas por 5 minutos. A eletroforese ocorreu em tampão tris-glicina com 0,1% de SDS no pH 8,3 durante cerca de 2 horas a 120 V.

3.17.1- Coloração com Coomassie Brilhante Blue

Para revelação os géis foram corados em uma solução contendo 0,05 g. de coomassie brilhante blue, 90,8 mL de metanol 50% e 9,2 mL de ácido acético. Para descorar e revelar as bandas o gel foi lavado com solução de água 650 mL, metanol 250 mL e ácido acético 80 mL.

3.17.2- Coloração com Blue Silver

Para coloração com Blue Silver foi seguindo o protocolo descrito por Candiano *et al.* (2004). O gel foi primeiramente lavado em água destilada por 3 vezes para retirar os resíduos de SDS, então o gel foi fixado em solução de ácido fosfórico 2% e metanol 50% por 2 horas. Após este período o gel foi lavado em água destilada por 2 vezes de 20 minutos, e então colocado em contato com o corante Blue Silver de 6 a 24 horas. Após a coloração o gel foi rapidamente lavado com água destilada para aumentar a nitidez das bandas.

3.18 Caracterização de atividade enzimática em gel de eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE)

A eletroforese em condições não desnaturantes foi realizada conforme o protocolo de Davis (1964). Os géis de acrilamida foram utilizados na concentração de 8% e polimerizados em placas de vidro (7,2x10,2 cm). As amostras foram preparadas com tampão de amostra (glicerol 5%, 5 µL de azul de bromofenol e 15 µL de amostra). A eletroforese ocorreu em tampão tris-glicina no pH 8,9 durante cerca de 2 horas a 100V.

Para determinar a atividade amilolítica das proteínas presentes no gel este foi incubado em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4 por 20 minutos a 50°C por 4 vezes. Após esta lavagem o gel foi mantido em solução de amido solúvel 1% em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4 a 60°C por 2 horas. Após este período as bandas foram reveladas em solução de iodo (I₂ 1%; KI 1,5%).

3.19 Estabilidade da amilase ao pH e à temperatura

Para verificação da estabilidade ao pH do extrato bruto da glucoamilase purificada as amostras foram incubadas em tampão McIlvaine na faixa de 2,5 a 8 por 24 horas em temperatura ambiente (25°C).

Para análise da estabilidade à temperatura o extrato bruto foi incubado nas temperaturas de 50, 60, 70 e 80°C de 10 até 300 minutos.

Para a análise da estabilidade à temperatura da glucoamilase purificada a amostra em água foi incubada a 50, 55, 60, 65 e 70°C por até 420 minutos.

Para a determinação da atividade residual foi realizada uma dosagem enzimática antes do início do experimento, e está foi considerada como 100%. As dosagens durante o experimento foram realizadas com tampão citrato de sódio 0,5 M. O tempo de meia vida foi considerado como o tempo em que a enzima apresenta 50% da atividade inicial.

3.20 Efeito da temperatura e pH na atividade enzimática

A-Extrato bruto: Para determinar a temperatura e pH ideais para a reação enzimática foi realizado um delineamento experimental 2^2 com 3 repetições de ponto central com significância a $p < 0,5\%$. As análises foram realizadas no software Statistica 12. Foram utilizados tampões citrato de sódio 50 mM na faixa de pH entre 3,5 e 7,5 e temperatura entre 40 e 80°C.

B-Glucoamilase Purificada: A enzima purificada foi incubada em tampão citrato de sódio 50 mM com 1% de amido em pHs de 3 a 5,5 e temperaturas de 55, 60 e 65°C por 5 minutos e então a atividade dosada por DNS (MILLER, 1959).

3.21 Efeito de sais, agente redutor e agente quelante atividade enzimática

Foram testados, tanto para o extrato bruto como para a glucoamilase purificada, os efeitos dos compostos NH_4F , NaH_2PO_4 , ZnCl_2 , $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, BaCl_2 , NH_4Cl , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, NaBr , CaCl_2 , NaCl , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, β -mercaptoetanol e EDTA. Tais compostos foram adicionados na reação e no branco de modo a obter concentrações de 2 e 5 mM.

3.21.1 Efeito da acarbose

A enzima purificada foi incubada com 50 μM de acarbose (potente inibidor de glucoamilases) para confirmar seu efeito inibitório sobre a glucoamilase de *A. brasiliensis*.

3.21.2 Efeito do EDTA

A glucoamilase purificada e ativada com $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5 mM foi incubada em diferentes concentrações de EDTA (0 a 10 mM), para determinar de forma mais precisa a influência do agente quelante em sua atividade.

3.22 Purificação por eletroeluição

Em um primeiro passo o extrato bruto por concentrado por ultrafiltração em membrana de 30 kDa e então uma amostra de 300 μL com glicerol 5%, bromofenol 0,1% e tampão de corrida 10% foi aplicada na eletroeluição.

A eletroeluição foi realizada a 4°C seguindo os princípios de eletroforese não desnaturante (PAGE) descrita por Davis (1964), composta por um gel de contenção 12% no conector de vidro e um gel de separação 8% em um tubo de 1 x 12 cm. A corrida foi realizada a 40 mA e 300 V por aproximadamente 8 horas (até ser detectada a amilase nos tubos do coletor) conforme o esquema da **Figura 6**.

Figura 6. Representação esquemática do sistema de eletroeluição: 1- Fonte 300V; 2- Funil de separação contendo tampão tris-HCl pH 8,3; 3- Cuba com cátodo; 4- Cuba com ânodo; 5- Tubo contendo gel de separação 8%; 6- conector de vidro contendo gel 12% e membrana de diálise; 7- Coletor de frações.

3.23 Determinação do peso molecular por gel SDS-PAGE

Para a determinação do peso molecular da enzima já purificada foi construído um gráfico de dispersão com o coeficiente de migração das proteínas do marcador em cm (RF) x o log do peso molecular do marcador. A partir deste, foi construída uma equação da reta para determinar o peso da glucoamilase estudada.

3.24 Identificação da proteína purificada por Espectrometria de Massas

Para a identificação da enzima purificada a banda presente no gel SDS-PAGE foi recortada e enviada para análise no CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol). A enzima foi digerida com tripsina e analisada por ESI-QUAD-TOF. A partir dos fragmentos gerados foi possível comparar ao genoma do fungo presente na base de dados do JGI - *Joint Genome Institute* (<http://genome.jgi.doe.gov/Aspbr1/Aspbr1.home.html>) e determinar a sequência de aminoácidos da glucoamilase identificada.

3.25 Determinação do conteúdo de carboidratos por fenol-sulfúrico

O conteúdo de carboidratos da glucoamilase purificada foi dosado pelo método do fenol-sulfúrico de acordo com Dubois *et al.* (1956). Para o ensaio 400 µL da glucoamilase pura foi misturada com 10 µL de fenol 80% e 1 mL de ácido sulfúrico em banho de gelo. Após 10 minutos em repouso a solução foi deixada em temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida lida em espectrofotômetro a 490 nm. Para a construção da curva padrão foram utilizadas soluções de manose de 0-100 µg/mL, e assim obteve-se a equação $Abs = 0,0102.x \mu g/mL$.

3.26 Efeito do produto de hidrólise na atividade enzimática da glucoamilase purificada

Para determinar a influência de glucose na atividade enzimática a dosagem ocorreu pelo método de descoloração do iodo segundo Jones e Verner (1967). O ensaio foi composto por 250 µL de amido solúvel 1%, 150 µL de tampão citrato de sódio 100 mM pH 4,5 e 100 µL da enzima purificada. Ao tampão foram adicionadas diferentes quantidades de glucose, de forma com que a concentração final na mistura variasse de 0,05 M até 0,5 M. A reação ocorreu na temperatura de 60°C por diferentes tempos. A reação foi paralisada com 500 µL de ácido

acético 1 M e corada com 500 µL de solução de iodo (iodo 0,2% e iodeto de potássio 2%). Foi adicionado então 10 mL de água destilada a solução e então realizada a leitura em espectrofotômetro a 620 nm.

3.27 Dicroísmo Circular

Para análise da estrutura secundária da glucoamilase em estudo foi utilizado o espectropolarímetro Jasco 810 (JASCO Inc., Tokyo, Japan) nos comprimentos de onda de 190 a 250 nm (UV distante). Foi utilizada uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 mm. A amostra proteica foi dialisada contra água destilada e estava na concentração aproximada de 0,04 mg/mL. Foram coletados um total de 12 espectros.

3.28 Modelagem

Foi realizada a modelagem computacional da enzima de acordo com sua estrutura primária predita utilizado a ferramenta online Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (KELLEY; STERNBERG, 2009).

3.29 Determinação do ponto isoelétrico (pI)

O ponto isoelétrico da enzima pura foi determinado de acordo com O'Farrel *et al.* (1977). O gel de poliacrilamida 5% foi polimerizado em tubos juntamente com anfólitos de pH do 2,5 ao 5. Foi então realizada uma corrida a 500 V por 5 horas em 3 géis simultaneamente. Um dos géis foi corado com blue silver e os outros dois foram fatiados de meio em meio centímetro.

Um destes foi utilizado para detectar a atividade enzimática em cada fragmento de gel e o outro utilizado para dosar o pH após as fatias ficarem *overnight* em solução de KCl 25 mM.

3.30 Determinação das constantes cinéticas

As constantes cinéticas k_m (mg/mL), $V_{m\acute{a}x}$ (mol.min⁻¹/U.mg⁻¹), k_{cat} (s⁻¹) e k_{cat}/k_m (s⁻¹/mg.mL⁻¹) foram calculadas para diferentes tipos de amido: amido de arroz (Sigma), amido de milho (Sigma), amido de batata (Sigma) e amido de batata (Reagen). Para os cálculos de k_m e $V_{m\acute{a}x}$ utilizou-se o software Sigrafw (LEONE *et al.*, 2005). Para o cálculo do k_{cat} foi utilizada a fórmula $k_{cat} = V_{m\acute{a}x}/E$ considerando a enzima com peso molecular de 69000 Da.

3.31 Filogenia entre glucoamilases de diferentes fungos filamentosos

Para a construção do cladograma as sequências de aminoácidos dos diferentes fungos foram retiradas da base de dados do NCBI conforme a **tabela 3**. As sequências foram alinhadas (**Apêndice C**) e analisadas no software MEGA 6.06. A análise utilizada foi a *Neighbor Joining* com o teste *Bootstrap* com 1000 repetições e o modelo *Dayhoff* para substituições.

Tabela 3. Sequências utilizadas para a construção do cladograma baseado na sequência da glucoamilase

Fungo	Número de acesso NCBI	Referência
<i>A. niger</i>	30025851	Zhong <i>et al.</i> , (1994)
<i>A. awamori</i>	336454472	Pavezzi <i>et al.</i> (2011)
<i>A. ficuum</i>	49237635	Chen <i>et al.</i> ⁸
<i>A. shirousami</i>	217817	Shibuya <i>et al.</i> (1990)
<i>A. oryzae</i>	1160313	Hata <i>et al.</i> (1991)
<i>Rhizopus oryzae</i>	218035	Ashikari <i>et al.</i> (1986)

⁸ - CHEN, D.; MA, L.; CHEN, X.; GAN, R. e JIA, X. *Aspergillus ficuum* (Reichardt) Henninas 3.432 glucoamylase.

3.32 Imobilização da glucoamilase

Para a imobilização da enzima o extrato bruto foi clarificado com o uso de carvão ativado. Para cada mL de extrato bruto, 5 mg de carvão foi adicionado sob agitação em banho de gelo. Após 5 minutos a mistura foi filtrada em papel filtro e centrifugada a $11.952 \times g$ durante 10 minutos, sendo este processo repetido até a completa remoção do carvão, dando origem ao extrato clarificado. Para cada 1g de resina utilizada na imobilização foram utilizados 100 mL de extrato clarificado.

3.32.1 – Imobilização em DEAE-Sepharose com Polietilenoglicol-4000

Para a imobilização a resina de troca iônica Dietilaminoetil -Sepharose (DEAE-Sepharose) foi ativada em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7. O mesmo tampão foi adicionado ao extrato clarificado. A resina foi adicionada ao extrato e então incubada em câmara fria em agitador de rolos por cerca de 1 hora. Após este tempo o derivado (resina + enzima imobilizada) foi filtrado, lavado com tampão e então adicionado à solução de polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) 30% para aumento da estabilidade, e incubado novamente em câmara fria sob agitação *overnight*. No dia seguinte, o derivado foi novamente filtrado e lavado com tampão e finalmente utilizado para os ensaios enzimáticos.

3.32.2 Imobilização em Agarose-BrCN

A agarose ativada com brometo de cianogênio estabelece uma ligação covalente unipontual com a enzima. Para ativação do composto 1g de BrCN foi hidratado com 50mL água destilada com pH ajustado entre 2 e 3 e agitado por 1 hora em câmara fria. Após esse período a Agarose-BrCN foi filtrada e a ela adicionado 100 mL de extrato clarificado em pH 7. A imobilização ocorreu em câmara fria por 1 hora. Posteriormente o derivado foi filtrado e incubado com etalonamina pH 8, *overnight*. Finalmente o derivado foi filtrado e lavado com tampão e então utilizado para as dosagens enzimáticas.

3.32.3 – Planejamento de misturas com o derivado DEAE-PEG

Para determinar a que substrato a glucoamilase imobilizada tem mais facilidade para hidrolisar realizou-se um planejamento de misturas com o amido e suas duas cadeias constituintes: a amilose e a amilopectina.

Cada ensaio foi composto por diferentes misturas na concentração do substratos (**Tabela 4**). Foi utilizado 5 mL de substrato a 0,5% em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,5 com azida sódica 15 mM para evitar a proliferação de bactérias. A cada ensaio foi adicionado meia unidade enzimática de derivado. Foram realizadas 3 repetições de ponto central. Os experimentos foram realizados a 50°C em banho seco com agitação de 500 rpm por 4 horas. Após a retirada de cada ponto a amostra foi fervida por 5 minutos para paralisar a reação. A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959). Os dados foram analisados no software Statistica 12.

Tabela 4. Ensaios utilizados para a construção do planejamento de misturas

Ponto	Concentração na reação em percentagem (Proporção 0-1)		
	Amido	Amilose	Amilopectina
1	0,5 (1)	0 (0)	0 (0)
2	0 (0)	0,5 (1)	0 (0)
3	0 (0)	0 (0)	0,5 (1)
4	0,25 (0,5)	0,25 (0,5)	0 (0)
5	0,25 (0,5)	0 (0)	0,25 (0,5)
6	0 (0)	0,25 (0,5)	0,25 (0,5)
7 - central	0,167 (0,33)	0,167 (0,33)	0,167 (0,33)
8 - central	0,167 (0,33)	0,167 (0,33)	0,167 (0,33)
9 - central	0,167 (0,33)	0,167 (0,33)	0,167 (0,33)

3.33 Reprodutibilidade

Os experimentos foram realizados em triplicada. O desvio padrão corresponde a variação entre as médias de leitura de cada uma das replicatas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO: I - Isolamento, seleção e identificação

4.1 Isolamento das linhagens

A Mata Atlântica é uma das regiões mais ameaçadas do mundo. Os fungos e outros micro-organismos que recobrem o solo e serrapilheira, possibilitam a rápida reabsorção dos nutrientes a manutenção do equilíbrio neste ecossistema. Impactos ambientais alteram a diversidade dos fungos presentes na floresta e consequentemente à ciclagem de nutrientes (FRANKLAND, 1969; PEIXOTO 1991/1992).

As coletas de matéria orgânica em decomposição ocorreram na cidade de Peruíbe – SP (**tabela 5**), na qual a fitofisionomia pode ser classificada em Floresta ombrófila densa de terras baixas, onde prevalecem as famílias vegetais Myrtaceae, Rubiaceae, Fabaceae e Lauraceae (SANCHEZ *et al.*, 1999; VELOSO; RANGEL-FILHO; LIMA, 1991). As temperaturas são elevadas, com médias de 25°C e com precipitação bem distribuída ao longo do ano (SIFESP-SISTEMA DE INFORMAÇÕES FLORESTAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2013).

Segundo Ross e Moroz (1997) na região há um predomínio de cambissolos e neossolos litólicos. O solo em geral é raso, com pH baixo, pouco ventilado, constantemente úmido e recebe pouca luz solar (CARVALHAL *et al.*, 2013). A coleta ocorreu na cidade de Peruíbe-SP, dia 03/02/2013 no horário entre as 11:30 e 14:30. Os locais das coletas estão representados na **tabela 5**, os fungos isolados na **figura 7**. Foram coletados cerca de 5g de cada material.

Tabela 5. Materiais coletados, locais de coleta e fungos isolados de cada amostra

Material coletado	Temperatura (°C)	Precisão GPS (m)	Altitude (m)	Latitude	Longitude	Fungos isolados
Líquen árvore	30	15	11	S-24°22.405'	H047°03.951'	1/9A; 1A; 1B; 1C;1D
Flor	29	15	11	S-24°22.405'	H047°03.951'	2A
Galho	30	15	11	S-24°22.405'	H047°03.951'	3A
Goiaba	29	14	15	S-24°23.705'	H047°04.036'	Nenhum
Folha Verde	26	11	34	S-24°26.462'	H047°04.050'	5A
Samambaia	26	16	34	S-24°26.462'	H047°04.050'	6A; 6B
Líquen raiz	26	16	34	S-24°26.462'	H047°04.050'	7A
Folhíço	26	16	34	S-24°26.462'	H047°04.050'	8A; 8B; 8C
Folha	26	11	2	S-24°24.462'	H047°04.050'	9A; 1/9A
Líquen pedra	29	9	2	S-24°26.054'	H047° 03.437'	10A;10B
Areia	29	10	0	S-24°26.038'	H047°03.450'	11A
Galho	29	9	2	S-24°25.987'	H047°03.440'	Nenhum
Fruto	29	9	34	S-24°25.987'	H047°03.440'	13A
Cogumelo	29	14	5	S-24°25.462'	H047°03.440'	14A; 14B; 14C
Atemóia	29	17	25	S-24°25.916'	H047°03.445'	15A

Figura 7. Fungos isolados crescidos em meio aveia 30°C por 72 horas.

Todos os fungos isolados foram preservados em sílica gel e mantidos em geladeira (4°C) e também foram preservados em glicerol 20% e mantidos em ultrafreezer (-80°C).

4.2 Seleção das linhagens

Para a seleção das linhagens os fungos foram repicados pontualmente em placas de Petri contendo meio Czapek com amido 1%. Os diâmetros das colônias foram medidos durante 3

dias, os resultados se encontram na **tabela 6**. Os fungos 8A, 6B e 2A apresentaram os maiores diâmetros em 3 dias de crescimento.

Tabela 6 Teste de crescimento em placa

Fungo	24 horas	48 horas	72 horas
1/9A	-	-	+
1A	-	-	+
1B	-	+	++++
1C	-	+	+++
1D	-	-	-
2A	-	+++	++++++
2B	-	-	+
3A	-	-	-
5A	-	-	+
6A	-	++	+++
6B	-	++++	++++++
7A	-	++	++
8A	++++++	++++++	++++++
8B	-	-	++
8C	-	+	++
9A	-	-	-
9B	-	-	-
10A	-	+	+
10B	-	-	-
11A	-	+	++
13A	-	-	-
14A	-	+	++
14B	+	+++	+++
14C	+	+++	++++
15A	-	++	+++

Legenda: O diâmetro das linhagens foi determinado como: 0-0,5 (-); 0,6-1,0 (+); 1,1-2,0 (++); 2,1-3,0 (+++); 3,1-4,0 (++++); 4,1-5,0 (+++++); 5,1-6,0 (++++++); $\geq 6,1$ cm (+++++++). Experimento em duplicata.

Para uma seleção mais apurada todos os fungos isolados foram fermentados em 25 mL meio CP contendo amido 1% em pH 6,5, temperatura de 30°C em condições estáticas (**figura 8 e tabela 7**). Os melhores produtores de amilases foram os fungos 6B (3,55 U/mL) e 8A (4,22 U/mL).

Figura 8. Atividade amilolítica (U/mL) dos fungos isolados.

Tabela 7. Atividade enzimática do extrato bruto fermentativo dos fungos isolados

Fungo	Atividade amilolítica extracelular (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)
1/9A	0	0,04	0
1A	0,20	0,03	5,7
1B	0	0,03	0
1C	0,42	0,04	10,7
1D	0,34	0,04	8,6
2A	0,18	0,04	4,6
2B	0,18	0,04	3,9
3A	0,46	0,03	12,9
5A	0,38	0,04	10,2
6A	0,36	0,03	10,3
6B	3,55	0,03	110,8
7A	0,55	0,03	19,5
8A	4,22	0,05	81,4
8B	0,52	0,02	28,1
8C	0,30	0,01	30,6
9A	0,52	0,03	14,3
10A	0	0,04	0
10B	0,13	0,05	2,9
11A	0	0,06	0
13A	0	0,04	0
14A	0,50	0,03	14,2
14B	0,77	0,05	16,2
14C	0	0,04	0
15A	0,33	0,02	13,2

4.3 Identificação dos fungos selecionados

Para identificação dos fungos utilizaram-se técnicas moleculares. O DNA dos fungos foi extraído e amplificado usando *primers* ITS1-4 para ambos e β -tubulina e calmodulina para o 6B, pois houve mais de um fungo considerado homologado apenas com o primeiro *primer* (figuras 9 a 13, tabela 8).

Figura 9. Eletroforese de DNA dos fungos 6B e 8A. A - marcador molecular 1Kb; B - DNA genômico não purificado de 6B; C - DNA genômico não purificado de 8A; D - marcador molecular de 100 pb; E - sequência ITS 1-4 de 6B; F - sequência β -tubulina de 6B; G - sequência de calmodulina de 6B; H - sequência de ITS1-4 de 8A.

Com o sequenciamento das amostras foram obtidas as seguintes sequências de nucleotídeos apresentadas nas **figuras 10, 11 e 12** para o fungo 6B e **figura 13** para o 8A. As sequências obtidas foram confrontadas com a base de dados no NCBI (disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome>), os resultados estão resumidos na **tabela 8**.

Com a sequência da região ITS não foi possível a identificação em nível de espécie, pois, foi acusada homologia de 100% com os fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus*

brasiliensis. Segundo Varga *et al.* (2007), no trabalho em que descrevem a espécie *A. brasiliensis*, tal fungo só pode ser diferenciado de *A. niger* bioquimicamente através da análise de seus metabólitos secundários ou molecularmente utilizando os genes de β -tubulina e calmodulina. Com a análise da sequência destes dois genes foram obtidas homologias de 100% apenas para *Aspergillus brasiliensis*, possibilitando então a identificação da espécie. Uma análise morfológica foi realizada pela micoteca da Faculdade Federal de Pernambuco (**Apêndice A**) e o fungo foi identificado como *Aspergillus niger*, confirmando o descrito por Varga *et al.* (2007) que descreve as espécies como morfológicamente semelhantes.

A região ITS se mostrou suficiente para o fungo 8A, sendo o micro-organismo identificado como *Rhizopus oryzae*. Uma análise morfológica também foi realizada pela equipe da micoteca da Universidade Federal de Pernambuco e confirmou a identificação molecular. Os fungos isolados podem ser vistos em microscopia óptica na **figura 14**.

Os fungos identificados foram adicionados à coleção de fungos filamentosos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da USP-RP com os seguintes números de acesso: CFF124 para *A. brasiliensis* e CFF132 para *R. oryzae*.

Tabela 8. Homologias encontradas com a ferramenta nucleotide blast do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para os fungos 6B e 8A

Fungo	Sequência	Homologia	Score	Valor E	Identidade
6B	ITS 1-4	<i>Aspergillus brasiliensis</i> / <i>Aspergillus niger</i>	894/ 893	0,0/ 0,0	100%/ 100%
	β -tubulina	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	819	0,0	100%
	Calmodulina	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	1201	0,0	100%
8A	ITS 1-4	<i>Rhizopus oryzae</i>	791	0,0	100%

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
ITS1-4 Aspergillus GGGCCCAACCTCCCATCCGTGTCATTGTACCCCTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGTCTGGCCGCGGGGGGGCGCCTCT
      110      120      130      140      150      160      170      180
ITS1-4 Aspergillus CGCCGGAGACCCCAACACGAACCCGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTCGATTGTTTGCAATCAGTTAAACCTTCAACAAT
      210      220      230      240      250      260      270      280
ITS1-4 Aspergillus ATCGATGAAGAACGCGAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTG
      310      320      330      340      350      360      370      380
ITS1-4 Aspergillus GGGGCATGCCGTGCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTGTGTGTTGGTTCGCCGTCCCTCTCTCCGGGGGACG

```

Figura 10. Sequência consenso obtida com os *primers* ITS1 e ITS4 para o fungo 6B.

```

      10      20      30      40      50      60      70
b-tubulina Aspergillus TGGGACATCATCCATCAGGCTATCTCTCTCAGCTTGAGTTCGGATGATGTCCATTGGGTATATGTTGTCGGTATAACA
      110      120      130      140      150      160      170
b-tubulina Aspergillus CAGACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTTCACACCTCTCAATTGGTCAA
      210      220      230      240      250      260      270
b-tubulina Aspergillus CCTGACGCGCAGGATAGTTACAATGGCACTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTTTACTTCAACGAGGTGAGA
      310      320      330      340      350      360      370
b-tubulina Aspergillus ACGACAATATCATCAATGTCCGTGACCACTTCAGCAGGCTAGCGGTAAACAAGTATGTTCCCTCGTGCCGTCCCTCGTTGAT
      410      420      430      440
b-tubulina Aspergillus CCGTCCGTGCCGGTCCCTTTCGGCCAGCTCTCCGCCCGACAA

```

Figura 11. Sequência consenso obtida com os *primers* β -tubulina *forward* e *reverse* para o fungo 6B.

```

      10      20      30      40      50      60      70
Calmodulina Aspergillus TTTGTGAGTGCCCCCTGAATGATCCCGATCGTCCAGAACGATAGCCTATCATCACTGGATCATAACTGATGTACC

      110     120     130     140     150     160     170
Calmodulina Aspergillus GGCGATGGTGGGTGGAATCTGTCCCTTCACGTTTACCTGTAGCGCCCGGACCGACCGAGGATCTCGACAGCCA

      210     220     230     240     250     260     270
Calmodulina Aspergillus ATACTGATATAATGCGGGAATAGGCCAGATCACCAACAAGGAGCTCGGCACCGTCATCGCTCCCTCGGCCAGAAC

      310     320     330     340     350     360     370
Calmodulina Aspergillus CATGATCAACGAGGTTGACGCTGACAACAACGGAAACAATCGACTTCCCCGGTATGTGATAGATCTACACCTCGAAGG

      410     420     430     440     450     460     470
Calmodulina Aspergillus TGACTTTTGCCGCCAGAAATTCCTTACCATGATGGCTCGTAAGATGAAGGACACCGACTCCGAGGAGGAAATCCGTGA

      510     520     530     540     550     560     570
Calmodulina Aspergillus ACAACAATGGTTTCATCTCCGCCGCGGAGTGGCCACGTCATGACCTCCATTGGTGAGAAGCTCACCGACGACGAA

      610     620     630     640     650
Calmodulina Aspergillus GGATCAGGACGGTGACGGCCGCAATTGACTGTATGTTTCTTATTCCCGATG

```

Figura 12. Sequência consenso obtida com o uso dos *primers* de calmodulina *forward* e *reverse* para o fungo 6B.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
ITS1-4 Rhizopus GGGGTAAGTGATTGCTTCTACACTGTGAAAATTGGCTGAGAGACTCAGACTGGTCATGGGTAGACCTATCTGGGGTTTGATCGA

      110     120     130     140     150     160     170     180
ITS1-4 Rhizopus CAGGAGTACCCTTCATAATAAACCTAGAAATTCAGTATTATAAAGTTTAAATAAAAAACAACCTTTTAACAAATGGATCTCTTGGTTC

      210     220     230     240     250     260     270     280
ITS1-4 Rhizopus ACGTAGCAAAAGTGCATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACTCTATGGTTTTT

      310     320     330     340     350     360     370     380
ITS1-4 Rhizopus GCTTCAGTATCATCACAAACCCACACATAACATTGTTTATGTGGTGATGGGTCGCATCGCTGTTTATTACAGTGAGCACCTAA

      410     420
ITS1-4 Rhizopus CTGTCTGGCTTGCTAGGCAGGAATATTA

```

Figura 13. Sequência consenso obtida com os *primers* ITS1 e ITS4 para o fungo 8A.

Figura 14. Microscopia óptica dos fungos selecionados, A e B *Aspergillus brasiliensis*; C e D *Rhizopus oryzae*, (- 50μm; - 100μm), fungos em microcultivo em meio PDA a 30°C. Na figura D as hifas foram coradas com azul de algodão.

Fungos do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus* são frequentemente isolados do bioma da Mata Atlântica. Segundo Domsch *et al.* (2007) a distribuição de fungos está relacionada com o clima, solo, vegetação e a qualidade da matéria orgânica presente. Costa *et al.* (2012), ao isolarem fungos do solo da Mata Atlântica em Recife – PE, teve o gênero *Aspergillus* como o mais frequentemente isolado. Crusius *et al.* (2006) ao isolar fungos da Mata Atlântica em Cubatão-SP isolou 40 Mucorales, sendo dois deles do gênero *Rhizopus*, e um sendo o *Rhizopus oryzae*, e mais 125 fungos Anamorfo, sendo 11 deles do gênero *Aspergillus*. Tornisiello *et al.* (2004) isolaram do solo da região do Banhado-Grande na reserva de Juréia-Itatins, 9 espécies de *Aspergillus*. Crusius e Milanez (1998) isolaram fungos da Mata Atlântica em Paranapiacaba – SP, dentre eles 10 espécies de *Aspergillus* e 6 espécies de *Rhizopus*, incluindo o *R. oryzae*.

Os Ascomicetos, grupo que engloba tanto leveduras quanto fungos filamentosos, como o caso do *Aspergillus brasiliensis*, são conhecidos pelo seu papel na decomposição de matéria vegetal morta, se reproduzem por reprodução assexuada pela formação de conídios através de mitose ou sexuadamente pela formação dos ascósporos haplóides (MADIGAN *et al.*, 2010). Segundo Varga *et al.* (2007) *Aspergillus brasiliensis* libera em seu meio de cultivo aurasperona B, pirofeno, tenidol A e B, ácido di-hidrocarolico, 14-epi-14-hidroxi-10,23-di-hidro-24,25-dehidroaflavinina, 10,23-di-hidro-24,25-de-hidro-aflavinina.

Os Zigomicetos, grupo filogeneticamente mais basal que os Ascomicetos, são amplamente conhecidos pelo seu papel na deterioração de alimentos, são cenocíticos, isto é, multinucleados, possuem reprodução assexuada com a formação de esporângios e sexuada com a formação de gametângios haplóides (MADIGAN *et al.*, 2010). O fungo *Rhizopus oryzae* é utilizado na produção do tradicional tempeh, alimento a base de soja de origem Indonésia (GYÖRGY *et al.*, 1964). A Comissão Européia aprova o uso de α -amilase, endo- β -glucanase, amiloglucosidase, α -glucosidase, pectinase e celulasas obtidas a partir do *Rhizopus oryzae* para a aplicação na indústria alimentícia (EUROPEAN COMMISSION, 2012).

4.4 Análise filogenética por ITS

Foi realizada uma análise filogenética baseada nas regiões de ITS 1-2 (*Internal Transcribed Spacer*) para a comparação entre espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* que são boas produtoras de amilases com as espécies identificadas no presente trabalho. As sequências foram retiradas do GenBank e alinhadas (**Apêndice B**) utilizando MUSCLE 3.6.

A partir do alinhamento construiu-se um dendograma não enraizado (**figura 15**) que demonstra a proximidade entre espécies. A análise do alinhamento mostrou uma similaridade entre as sequências de *A. nidulans* e *A. fumigatus* de 64,5%, 69,8% entre *A. brasiliensis* e *A. awamori*, 71,1% entre *A. oryzae* e *A. flavus*. A alta taxa de similaridade entre as espécies de *Aspergillus* pode ser observada na topologia dos grupos monofiléticos entre estes fungos. Estes dados estão de acordo com o trabalho de Castrillo *et al.* (2012) onde *A. brasiliensis* e *A.*

awamori fazem parte do mesmo clado e em Geiser *et al.* (2000) onde demonstraram que *A. oryzae* e *A. flavus* formam um grupo parafilético.

R. oryzae e *R. delemar* possuem taxa de similaridade de 72,9% e formam um grupo monofilético, *R. niveus* está próximo de *R. oryzae* e *R. delemar* com alto valor de *bootstrap* (100). Entre os fungos estudados neste trabalho o *R. rhizopodiformis* é o mais singular dentre as espécies por formar um táxon isolado dos outros representantes do gênero *Rhizopus* e possui a menor taxa de similaridade dentre as sequências (49,6% comparado ao *R. delemar*). No entanto, o *R. rhizopodiformis* apresenta a apomorfia necessária para situá-lo próximo aos demais *Rhizopus*. Liou *et al.* (2007) obtiveram resultados semelhantes ao demonstrarem linhagens de *R. rhizopodiformis* em clado separado ao de *R. oryzae*. A relativa distância do *R. rhizopodiformis* entre as principais espécies de *Rhizopus* produtoras de glucoamilases reforça a importância do atual trabalho e mostra a necessidade de obtermos mais informações a respeito deste fungo.

Figura 15. Dendrograma de máxima verossimilhança mostrando a relação entre alguns *Aspergillus* e *Rhizopus* produtores de amilases. Os números apresentam o valor de *bootstrap* para análise de 1000 repetições.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO: II - Otimização do cultivo e caracterização do extrato bruto

4.5 Seleção de meio de cultivo para a produção de amilases

Os fungos selecionados foram fermentados nos meios Khanna (KHANNA *et al.*, 1995), CP (PEIXOTO *et al.*, 2003), SR (RIZZATTI *et al.*, 2001) e Vogel (VOGEL, 1964). Os cultivos foram incubados por 72 horas, a 30°C com o pH inicial de 6,5. O inóculo foi composto de 10^5 esporos por mL de meio de cultura. Os resultados se encontram nas **tabelas de 9 a 12**.

A. brasiliensis teve maior produção no meio SR com fermentação estática, o que representa economia de energia por não necessitar de agitação. O meio SR possui extrato de levedura (0,45%) como principal fonte de nitrogênio, e é o único dos meios testados que leva peptona (0,02%) em sua composição. Os sais do meio são fosfato de potássio monobásico em baixa concentração (0,015%), o sulfato de magnésio heptahidratado (0,012%) e fosfato de amônio monobásico (0,05%), este último também pode ser considerado uma fonte de nitrogênio inorgânico.

No meio SR estático 85,8% das enzimas produzidas por *Aspergillus brasiliensis* foram secretadas para o meio de cultivo, o que é interessante pois as amilases extracelulares apresentam uma maior atividade específica, facilitando processos de purificação, além de não necessitarem de etapas de extração.

Tabela 9. Produção de amilases por *A. brasiliensis* e pesos úmidos e secos

Meio e condição de cultivo	Atividade amilolítica extracelular (U/mL)	Atividade específica extracelular (U/mg)	Atividade amilolítica intracelular (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Peso úmido/seco (g)
Khanna estática	2,5 ($\pm 0,4$)	183,1 ($\pm 43,4$)	1,0 ($\pm 0,5$)	3,6 ($\pm 0,3$)	0,3/0,09
Khanna agitação	2,4 ($\pm 0,9$)	103,8 ($\pm 25,7$)	2,2 ($\pm 0,6$)	5,1 ($\pm 1,8$)	0,4/0,15
Vogel estática	2,0 ($\pm 0,1$)	100,4 ($\pm 8,1$)	1,1 ($\pm 0,1$)	2,6 ($\pm 0,4$)	0,3/0,11
Vogel agitação	0,6 ($\pm 0,7$)	52,9 ($\pm 62,1$)	1,0 ($\pm 0,5$)	3,6 ($\pm 1,2$)	0,4/0,12
SR estática	4,6 ($\pm 0,5$)	134,4 ($\pm 28,8$)	1,9 ($\pm 0,4$)	5,4 ($\pm 0,9$)	0,3/0,11
SR agitação	2,4 ($\pm 0,4$)	80,6 ($\pm 11,7$)	2,1 ($\pm 0,5$)	5,1 ($\pm 1,1$)	0,5/0,17
CP estática	4,0 ($\pm 0,3$)	93,8 ($\pm 10,7$)	1,3 ($\pm 0,5$)	4,2 ($\pm 1,5$)	0,3/0,1
CP agitação	2,6 ($\pm 0,3$)	74,8 ($\pm 16,5$)	2,0 ($\pm 0,2$)	5,1 ($\pm 0,7$)	0,4/0,15

Tabela 10. Produção intracelular e secreção extracelular de amilases (Unidades totais e %) por *A. brasiliensis*

Meio e condição de cultivo	Atividade amilolítica extracelular		Atividade amilolítica intracelular	
	U totais	%	U totais	%
Khanna estática	62,5	86,2	10,0	13,8
Khanna agitação	60,0	73,2	22,0	26,8
Vogel estática	50,0	81,9	11,0	18,1
Vogel agitação	15,0	60,0	10,0	40,0
SR estática	115,0	85,8	19,0	14,2
SR agitação	60,0	74,1	21,0	25,9
CP estática	100,0	88,5	13,0	11,5
CP agitação	65,0	76,5	20,0	23,5

O valor de 100% corresponde a somatória das unidades totais intracelular e extracelular.

R. oryzae teve maior produção de amilases no meio CP em fermentação com agitação (**tabela 11**). O meio CP é o meio com maior concentração de extrato de levedura dentre os testados (0,8%). Na fermentação com meio Vogel sua atividade foi bastante baixa, indicando uma baixa assimilação de nitrogênio inorgânico. Além das fontes de carbono e nitrogênio o meio CP é composto por apenas mais dois sais, o fosfato de potássio monobásico (0,3%), e o sulfato de magnésio heptahidratado (0,05%), ambos em concentrações bem maiores do que a presente no meio SR.

Somente 6,4 % das amilases totais produzidas por *Rhizopus oryzae* (**tabela 12**) permaneceram no interior da célula, logo, o extrato bruto extracelular, que também apresenta atividade específica mais alta, é o ideal para ser utilizado em etapas de purificação e caracterização enzimática.

Tabela 11. Produção de amilases por *R. oryzae* e pesos úmidos e secos

Meio e condição de cultivo	Atividade amilolítica extracelular (U/mL)	Atividade específica extracelular (U/mg)	Atividade amilolítica intracelular (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Peso úmido/seco (g)
Khanna estática	0,07 ($\pm 0,1$)	11,2 ($\pm 12,0$)	0,1 ($\pm 0,01$)	0,8 ($\pm 0,2$)	0,2/0,05
Khanna agitação	0,13 ($\pm 0,1$)	11,2 ($\pm 9,34$)	0,1 ($\pm 0,03$)	0,3 ($\pm 0,01$)	0,1/0,03
Vogel estática	1,6 ($\pm 0,3$)	82,8 ($\pm 10,0$)	0,9 ($\pm 0,2$)	2,9 ($\pm 0,4$)	0,3/0,06
Vogel agitação	1,8 ($\pm 0,2$)	106,8 ($\pm 13,6$)	0,4 ($\pm 0,4$)	1,0 ($\pm 0,9$)	0,2/0,04
SR estática	2,3 ($\pm 0,6$)	58,8 ($\pm 16,3$)	0,4 ($\pm 0,1$)	0,8 ($\pm 0,2$)	0,4/0,08
SR agitação	3,3 ($\pm 0,6$)	73,0 ($\pm 18,6$)	0,3 ($\pm 0,02$)	0,5 ($\pm 0,1$)	0,4/0,09
CP estática	2,8 ($\pm 0,7$)	73,5 ($\pm 13,2$)	0,2 ($\pm 0,08$)	0,4 ($\pm 0,2$)	0,2/0,05
CP agitação	4,1 ($\pm 0,6$)	104,8 ($\pm 31,4$)	0,7 ($\pm 0,2$)	5,1 ($\pm 0,7$)	0,2/0,05

Tabela 12. Produção intracelular e secreção extracelular de amilases (Unidades totais e %) por *R. oryzae*

Meio e condição de cultivo	Atividade amilolítica extracelular		Atividade amilolítica intracelular	
	U totais	%	U totais	%
Khanna estática	1,7	57,4	1,3	42,6
Khanna agitação	3,2	82,3	0,7	17,7
Vogel estática	40,0	81,6	9	18,4
Vogel agitação	45,0	91,8	4	8,2
SR estática	57,5	93,5	4	6,5
SR agitação	83,0	96,5	3	3,5
CP estática	70,0	97,2	2	2,8
CP agitação	102,5	93,6	7	6,4

O valor de 100% corresponde a somatória das unidades totais intracelular e extracelular.

4.6 Temperatura ideal de cultivo

Os fungos foram cultivados em diferentes temperaturas, usando para *A. brasiliensis* o meio SR em condição estática, e para *R. oryzae* o meio de cultivo CP em agitação de 100 rpm. Ambos foram cultivados por 3 dias.

A atividade amilolítica intracelular e extracelular a 30°C foi bastante superior as demais temperaturas testadas (**figura 16; tabela 13**). O fungo também apresentou maior peso seco nesta temperatura, desta forma *A. brasiliensis* pode ser considerado um fungo mesofílico.

O fungo *R. oryzae* apresentou boa produção enzimática e crescimento micelial a 25 e 30°C (**figura 16, tabela 14**). A 40°C o fungo não conseguiu se desenvolver. Desta forma, o fungo pode ser considerado mesofílico e a temperatura de 30°C foi selecionada para a continuidade dos experimentos.

Figura 16. Atividade amilolítica do extrato bruto extracelular de *A. brasiliensis* e *R. oryzae* em diferentes temperaturas.

Tabela 13. Produção enzimática de *A. brasiliensis* em diferentes temperaturas

Temperatura de cultivo	Atividade amilolítica extracelular (U/mL)	Atividade específica extracelular (U/mg)	Atividade amilolítica intracelular (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Peso seco (g)
25	0,2	7,2	0,2	1,3	0,018
30	3,8	198,4	2,5	11,9	0,072
35	1,0	32,4	1,0	5,0	0,053
40	0,9	31,7	0,4	3,0	0,041

Tabela 14. Efeito da temperatura de cultivo de *R. oryzae* na produção enzimática

Temperatura de cultivo	Atividade amilolítica extracelular (U/mL)	Atividade específica extracelular (U/mg)	Atividade amilolítica intracelular (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Peso seco (g)
25	2,3	39,7	1,0	2,4	0,177
30	2,7	46,7	0,9	1,6	0,130
35	1,8	22,3	0,7	2,0	0,096
40	-	-	-	-	-

4.7 Efeito do pH inicial na produção de amilases

Para a determinação do pH inicial ideal os meios de cultivo tiveram seus pH iniciais ajustados entre 6,5 e 8,5 para *A. brasiliensis* e entre 5,5 e 7,5 para *R. oryzae*. Ambos foram cultivados por três dias nas condições previamente selecionadas.

Como mostrado na **figura 17-A**, o pH de 7,5 favoreceu a produção de amilases extracelulares para *Aspergillus brasiliensis*. O pH final em todas as condições testadas apresentou grande queda, o que pode ser explicado pela produção de ácidos cítrico e glicólico por tal micro-organismo (VARGA *et al.*, 2007). As atividades extracelular e intracelular e o peso seco entre os pH de 6,5 a 7,5 foram bastante semelhantes (**tabela 15**), desta forma o pH de 7,5 foi selecionado para a continuidade dos experimentos.

O pH inicial de 6,5 favoreceu a secreção de amilases extracelulares de *R. oryzae* (**figura 17-B**). O pH final em todas as condições de cultivo apresentou um considerável aumento. Tal fato pode ser explicado pela produção de amônia, como demonstrado em *R. oligosporus* por Sparringa e Owens (1999). A produção de amônia pode ter sido favorecida também pela alta concentração de extrato de levedura no meio de cultivo CP (0,8% m/v). Como mostrado na

tabela 16 o pH inicial de 6,5 apresentou maior atividade extracelular, intracelular e maior peso seco, desta forma, sendo selecionado para a continuidade dos experimentos.

Figura 17. Efeito do pH inicial do cultivo de *A. brasiliensis* (A) e *R. oryzae* (B) na secreção de amilases extracelulares e seu efeito no pH final

Tabela 15. Influência do pH na produção de amilases por *A. brasiliensis*

pH inicial do meio de cultivo	Atividade amilolítica extracelular (U/mL)	Atividade específica extracelular (U/mg)	Atividade amilolítica intracelular (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Peso seco (g)
6,5	4,5	240,6	2,4	11,6	0,098
7	4,3	233,5	2,0	8,2	0,094
7,5	4,9	244,3	2,4	9,4	0,095
8	3,8	196,0	2,3	12,2	0,082
8,5	3,5	185,2	2,0	8,2	0,085

Tabela 16. Influência do pH na produção de amilases por *R. oryzae*

pH inicial do meio de cultivo	Atividade amilolítica extracelular (U/mL)	Atividade específica extracelular (U/mg)	Atividade amilolítica intracelular (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Peso seco (g)
5,5	2,2	240,6	0,2	0,7	0,105
6	2,1	233,5	1,4	4,7	0,114
6,5	3,1	244,3	1,2	3,4	0,130
7	1,2	196,0	0,3	2,3	0,094
7,5	0,1	185,2	0,1	0,6	0,017

4.8 Produção de amilases em diversos tempos de cultivo

Para a determinação do melhor tempo de cultivo os fungos foram incubados nas condições previamente selecionadas por 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas.

Como o exposto na **figura 18-A** o tempo de cultivo de 120 horas favoreceu a secreção de enzimas extracelulares de *Aspergillus brasiliensis*, o pH começou a diminuir a partir do segundo dia de fermentação e atingiu seu nível mínimo em 72 horas, ocorrendo discreto aumento nos tempos seguintes. Para o mesmo fungo o tempo experimental de 120 horas (**tabela 17**) apresentou maior atividade intracelular e extracelular, mas o meio incubado por 72 horas apresentou maior atividade específica extracelular, o tempo de 96 horas apresentou maior peso seco. Desta forma o tempo de 120 horas foi selecionado para a continuidade dos experimentos.

Para o fungo *R. oryzae* o tempo de cultivo com maior produção enzimática foi de 96 horas (**figura 18-B**). O pH do meio de cultivo aumentou a partir do segundo dia e após 72 horas apresentou leve aumento de pH. O tempo de cultivo de 96 horas (**tabela 18**) também apresentou maior atividade específica extracelular. O tempo de 24 horas apresentou um número maior de unidades intracelulares. Desta forma foi selecionado o tempo de 96 horas para os próximos experimentos.

Figura 18. Atividade amilolítica extracelular e pH final do meio de cultivo de (A) *A. brasiliensis* e (B) *R. oryzae*.

Tabela 17. Efeito do tempo de cultivo na produção enzimática de *A. brasiliensis*

Tempo de cultivo (horas)	Atividade amilolítica extracelular (U/mL)	Atividade específica extracelular (U/mg)	Atividade amilolítica intracelular (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Peso seco (g)
24	0,7	39,0	0,1	9,4	0,01
48	0,8	47,4	1,8	4,8	0,096
72	3,8	189,1	2,7	11,6	0,086
96	5,5	187,0	1,9	10,3	0,109
120	6,5	171,6	2,8	14,7	0,077
144	6,4	126,5	0,6	3,0	0,049

Tabela 18. Efeito do tempo de cultivo na produção enzimática de *R. oryzae*

Tempo de cultivo (horas)	Atividade amilolítica extracelular (U/mL)	Atividade específica extracelular (U/mg)	Atividade amilolítica intracelular (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Peso seco (g)
24	0,8	32,2	1,8	1,6	0,139
48	1,6	35,9	1,5	1,2	0,140
72	2,6	37,9	0,3	0,9	0,091
96	3,5	45,4	0,5	1,3	0,096
120	3,2	43,6	0,1	0,6	0,082
144	3,2	43,2	0,4	2,5	0,040

4.9 Perfil de proteínas do extrato bruto

Para analisar o perfil de proteínas do extrato bruto foi realizado um SDS-PAGE dos diferentes tempos de fermentação. Um volume de 1 mL de cada tempo da fermentação foi liofilizado, diluído em tampão de corrida e aplicado no gel, que foi corado com coomassie e este ilustrado na **figura 19**.

No gel de eletroforese do extrato de *A. brasiliensis* na amostra obtida em 120 horas (tempo de maior produção de amilases extracelulares) é visível a presença de 3 bandas, as mesmas presentes nos demais tempos de fermentação (**figura 19A**).

No gel de eletroforese do extrato bruto de *R. oryzae*, a amostra obtida em 96 horas (tempo de maior produção de amilases extracelulares) são visíveis 4 bandas, também presentes nas outras amostras obtidas com os demais tempos (períodos) de fermentação (exceto 48 horas). No tempo de 144 horas é possível visualizar um número maior de bandas sugerindo uma maior dificuldade em processos purificação (**figura 19B**).

* No tempo de 24 horas não foi possível visualizar bandas para *R. oryzae*.

Figura 19. Perfil das proteínas do extrato bruto extracelular de *Aspergillus brasiliensis* (A) e *Rhizopus oryzae* (B) em diferentes tempos de fermentação.

4.10 Efeito de diferentes fontes de carbono no meio da cultivo na produção de amilases

Foram testados como fonte de carbono na fermentação na concentração de 1% (m/v) amido, farelo de trigo, maltose, glucose, bagaço de cevada, farelo de milho e farinha de aveia.

Com amido como fonte de carbono para o fungo *A. brasiliensis* foi produzido uma maior quantidade de amilases (**figura 20**), porém com maltose obteve-se uma atividade específica muito maior, o que pode ser vantajoso em processos de purificação.

Figura 20. Efeito de diversas fontes de carbono na secreção de amilases extracelulares de *A. brasiliensis*: A- Atividade amilolítica (U/mL); B- Atividade específica (U/mg)

Para o fungo *Rhizopus oryzae* (figura 21) o amido como fonte de carbono induziu uma maior produção de amilases e maior atividade específica. Os substratos milho moído e farinha de aveia também induziram a produção de grande quantidade de amilases.

Figura 21. Efeito de diversas fontes de carbono na secreção de amilases extracelulares de *R. oryzae*: A - Atividade amilolítica (U/mL); B- Atividade Específica (U/mg).

4.11 Análise dos produtos de reação por cromatografia de camada delgada (TLC)

Para analisar quais os produtos gerados com a hidrólise do amido pelas enzimas do extrato bruto foi realizada uma TLC com extratos obtidos com diferentes fontes de carbono. A reação enzimática ocorreu por 20 minutos e foi paralisada por fervura.

Para o fungo *A. brasiliensis* (**figura 22A**) em todas as condições de cultivo houve uma grande liberação de glucose e pequena liberação de oligossacarídeos, sugerindo uma maior ação de glucoamilases. Mesmo no cultivo com glucose há presença de amilases indicando que essas enzimas são constitutivas.

Também para o fungo *R. oryzae* (**figura 22B**) em todas as condições de cultivo houve uma maior liberação de glucose do que de oligossacarídeos, sugerindo uma maior ação de glucoamilase. Em comparação com *A. brasiliensis*, há uma maior atividade de α -amilase, já que há uma maior liberação de oligossacarídeos do que na reação com o extrato do fungo anterior. Novamente no cultivo apenas com glucose há a presença de amilases indicando que essas enzimas são constitutivas.

Figura 22. Produtos de reação da fermentação de *A. brasiliensis* (A) e *R. oryzae* (B) com diferentes fontes de carbono. As amostras foram aplicadas na seguinte ordem: 1- padrões; 2- substrato (amido 1%); 3- extrato bruto da fermentação com amido; 4- produto da reação da fermentação com amido; 5- extrato bruto da fermentação com farelo de trigo; 6- produto da reação da fermentação com farelo de trigo; 7- extrato bruto da fermentação com maltose; 8- produto da reação da fermentação com maltose; 9- extrato bruto da fermentação com glucose; 10- produto da reação da fermentação com glucose; 11- extrato bruto da fermentação com cevada; 12- produto da reação da fermentação com cevada; 13- extrato bruto da fermentação com milho; 14- produto da reação da fermentação com milho; 14- extrato bruto da fermentação com aveia; 16- produto da reação da fermentação com aveia.

4.12 Determinação da influência do pH e temperatura na atividade enzimática

Para a construção do delineamento experimental foram utilizados os pontos mostrados na **tabela 19**. O delineamento foi composto por 11 ensaios (**tabelas 20 e 22**)

Tabela 19. Valores utilizados para a construção do delineamento experimental

	-1,41	-1	0	1	1,41
pH	3,5	4,09	5,5	6,91	7,5
Temperatura	40	45,82	60	74,18	80

Tabela 20. Ensaios utilizados para a construção de delineamento experimental para as enzimas de *A. brasiliensis*

Temperatura (°C)	pH	Atividade enzimática (U/mL)
45,82 (-1)	4,09 (-1)	3,91
74,18 (+1)	4,09 (-1)	6,87
45,82 (-1)	6,91 (+1)	1,06
74,18 (+1)	6,91 (+1)	0
40 (-1,41)	5,5 (0)	2,69
80 (+1,41)	5,5 (0)	2,75
60 (0)	3,5 (- 1,41)	5,51
60 (0)	7,5 (+1,41)	1,08
60 (0)	5,5 (0)	5,5
60 (0)	5,5 (0)	5,63
60 (0)	5,5 (0)	5,51

Como demonstrado na **figura 22**, são significativos para a construção do modelo experimental o pH linear e quadrático, a temperatura quadrática e a interação entre o pH e a temperatura.

Figura 23. Diagrama de Pareto para o fungo *Aspergillus brasiliensis*.

A atividade enzimática do extrato bruto pode ser demonstrada na seguinte equação:

$$\text{Atividade enzimática (U/mL)} = 5,55 - 1,99.\text{pH} - 1.(T^{\circ}\text{C}.\text{pH}) - 1,42.(T^{\circ}\text{C})^2 - 1,14.(\text{pH})^2$$

Segundo o gráfico de superfície de resposta (**figura 24**) a temperatura de reação ideal está entre aproximadamente 60 e 75°C, o pH entre 3,5 e 5. Após este experimento a temperatura de reação dos demais ensaios passou a ocorrer a 70°C e no pH 4.

Ao substituir os valores correspondentes a 70°C (0,943) e pH 4 (-0,977) obtivemos como resultado atividade de 6 U/mL. Uma reação em triplicata foi realizada nestas condições obtendo-se a atividade de 6,6 U/mL com desvio padrão de $\pm 0,7$, estando desta forma dentro do esperado para o modelo.

Figura 24. Representação gráfica de superfície de resposta ao pH e temperatura para a atividade amilolítica do extrato bruto de *Aspergillus brasiliensis*.

A **tabela 21** demonstra a confiabilidade do modelo, que obteve um r^2 de 0,96, e um F calculado 18,2 vezes maior do que o F tabelado.

Tabela 21. Análise de variância do modelo para *Aspergillus brasiliensis*

Fonte de variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado Médio QM	F _{calculado} QM_R/QM_r	F _{tabelado} F _{95%,} GLR, GLr	R ²
Regressão (R)	51,14	p-1 (4)	12,78	75,17	4,12	0,96
Resíduo (r)	1,19	n-p (7)	0,17			
Total (T)	53,05	n-1 (10)	5,30			

p= número de parâmetros do modelo de primeira ordem

n= número total de ensaios do planejamento

F_{tabelado} com 95% de confiança, $p < 0,05$

% variação explicada (R^2): $SQ_R/SQ_T = 0$ F_{calc.} (QM_R/QM_r) maior que o F_{tab.} no nível de 95% de confiança

Os ensaios utilizados para a construção do delineamento de *R. oryzae* estão na **tabela 22**.

Tabela 22. Ensaios utilizados para a construção de delineamento experimental para as enzimas de *R. oryzae*

Temperatura (°C)	pH	Atividade enzimática (U/mL)
45,82 (-1)	4,09 (-1)	1,6
74,18 (+1)	4,09 (-1)	0,51
45,82 (-1)	6,91 (+1)	0,46
74,18 (+1)	6,91 (+1)	0,03
40 (-1,41)	5,5 (0)	1,12
80 (+1,41)	5,5 (0)	0,47
60 (0)	3,5 (- 1,41)	2,74
60 (0)	7,5 (+1,41)	0
60 (0)	5,5 (0)	2,74
60 (0)	5,5 (0)	2,21
60 (0)	5,5 (0)	2,58

Segundo a **figura 25** são significativos para a construção do modelo a temperatura quadrática e o pH linear e quadrático.

Figura 25. Diagrama de Pareto para o fungo *Rhizopus oryzae*.

A atividade enzimática pode ser prevista conforme a equação abaixo.

$$\text{Atividade enzimática (U/mL)} = 2,52 - 0,68.\text{pH} - 0,96.(\text{T}^{\circ}\text{C})^2 - 0,68.(\text{pH})^2$$

Segundo o gráfico de superfície de resposta (**figura 26**) a temperatura ideal varia entre 50 e 65°C e o pH entre 4 e 5,5. Para os próximos experimentos foi utilizada a temperatura de 60°C e o pH de 4.

Ao substituir na equação os valores correspondentes a pH 4 (-0,977) e temperatura de 60°C (0) obtemos o valor de 2,54 U/mL. Um ensaio em triplicata foi realizado nessas condições e foi obtida uma atividade média de 2,94 U/mL com desvio padrão de $\pm 0,58$, estando então desta forma dentro do esperado pelo modelo.

Figura 26. Representação gráfica de superfície de resposta ao pH e temperatura para a atividade amilolítica do extrato bruto de *Rhizopus oryzae*.

O modelo construído apresenta r^2 de 0,9 e um F calculado 5,9 vezes maior que o F tabelado, confirmando a confiabilidade dos resultados (**tabela 23**)

Tabela 23. Análise de variância do modelo para *Rhizopus oryzae*

Fonte de variação	Soma dos Quadrados SQ	Graus de Liberdade GL	Quadrado Médio QM	F _{calculado} QM _R /QM _r	F _{tabelado} F _{95%, GLR, GLr}	r ²
Regressão (R)	10,85	p-1 (3)	3,62	24,13	4,07	0,90
Resíduo (r)	1,2	n-p (8)	0,15			
Total (T)	12,0	n-1 10)	1,20			

p= número de parâmetros do modelo de primeira ordem

n= número total de ensaios do planejamento

F_{tabelado} com 95% de confiança, $p < 0,05$

% variação explicada (R^2): $SQ_R/SQ_T = O F_{calc.} (QM_R/QM_r)$ maior que o $F_{tab.}$ no nível de 95% de confiança

4.13 Estabilidade ao pH

Após 24 horas em tampão McIlvaine com diferentes pH, o extrato bruto de *A. brasiliensis* (**figura 27**) mantiveram atividade acima de 90% de atividade residual entre os pH 3 e 6,5, e acima de 88% entre os pH 7 e 8. As amilases presentes no extrato bruto de *R. oryzae* mantiveram 100% da atividade entre os pH 3,5 e 8. No pH de 3 mantiveram 91%, no pH 2,5 75% da atividade.

Figura 27. Estabilidade ao pH das amilases de *A. brasiliensis* e *R. oryzae*.

4.14 Estabilidade à temperatura

A estabilidade a temperatura das amilases de ambos os fungos foi analisada em diversos tempos e temperaturas (**figura 28**). A 50°C as amilases *A. brasiliensis* foram completamente estáveis durante 120 minutos do experimento. A 60°C a enzima foi completamente estável por 100 minutos, já a 70°C a meia vida da enzima foi de 32 minutos. As amilases não apresentaram atividade residual após a exposição a 80°C. As amilases de *R. oryzae*, dentre todas as condições testadas, somente apresentaram atividade residual após a exposição a 50°C, sendo que sua meia vida foi de 12 minutos.

Figura 28. Estabilidade à temperatura do extrato bruto de *A. brasiliensis* e *R. oryzae*.

4.15 Efeito de compostos iônicos, agentes quelantes e redutores na atividade enzimática

Foi testada a influência de diversos compostos na atividade amilolítica de ambos os fungos (tabela 24).

Para o fungo *Aspergillus brasiliensis* os íons de prata tiveram grande influência inibitória na atividade enzimática, diminuindo em 42% com 5 mM e em 19% com 2 mM. Os íons de manganês ativaram a atividade em 76% a 5 mM e 60% a 2 mM. Tanto β-mercaptoetanol, que reduz pontes de sulfeto, e EDTA, agente quelante de íons, tiveram baixa influência na atividade enzimática nas condições testadas.

No extrato bruto de *R. oryzae* $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e AgNO_3 tiveram grande efeito inibitório sobre a atividade enzimática a 5 mM. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, BaCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ reduziram consideravelmente a atividade enzimática, em 55, 34 e 42% respectivamente, na concentração de 5mM. Já o íon manganês aumentou a atividade enzimática em 55% a 2 mM e 36% 5 mM. As amilases se mostraram pouco influenciadas pela ação do agente redutor β-mercaptoetanol e o agente quelante EDTA.

Tabela 24. Efeito de compostos na atividade enzimática de *Aspergillus brasiliensis* e *Rhizopus oryzae*

Compostos	Atividade Residual (%)			
	<i>A. brasiliensis</i>		<i>R. oryzae</i>	
	Concentração		Concentração	
	5mM	2mM	5mM	2mM
Nenhum (controle)	100	100	100	100
NH ₄ F	100	84	102	126
NaH ₂ PO ₄	94	92	98	118
ZnCl ₂	103	93	80	139
AlCl ₃ .6H ₂ O	94	93	0	93
AgNO ₃	58	81	0	24
KH ₂ PO ₄	97	102	72	97
CuSO ₄ .5H ₂ O	109	93	45	107
BaCl	107	55	66	114
NH ₄ Cl	104	104	102	109
CoCl ₂ .6H ₂ O	99	113	58	102
MgCl ₂ .6H ₂ O	101	97	97	117
Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	100	94	79	110
KCl	105	91	86	102
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ .3H ₂ O	105	105	107	104
NaBr	101	99	94	127
CaCl	107	105	104	115
NaCl	102	101	88	115
MnCl ₂ .4H ₂ O	176	160	136	155
β-mercaptoetanol	100	100	100	100
EDTA	97	100	89	100

100% equivale a 5,9 U/mL para *A. brasiliensis* e 3,9 U/mL para *R. oryzae*

No trabalho de GUDI *et al.* (2013) o fungo *A. niger* apresenta pH ótimo de 5, estando dentro da faixa considerada ótima para *A. brasiliensis*, temperatura ótima abaixo (45°C), estabilidade ao pH parecida e estabilidade à temperatura (50°C meia vida de 45'; 60°C de 30'; 70°C de 10') inferior a de *A. brasiliensis*. *A. awamori*, que apresenta grande similaridade com *A. brasiliensis* segundo o dendograma (**figura 15**) tem faixa de pH ótimo mais elevado (4,8/5,8), temperatura ótima mais baixa (40/48°C) e menor estabilidade ao pH (6 ao 9) e a temperatura (40% de atividade residual após 30' a 50°C) (PESTANA; CASTILHO, 1985;

PRAKASHAM *et al.* 2007). *A. fumigatus* tem a estabilidade à temperatura (estável a 50°C; 60% de atividade residual após 200' a 60°C) e temperatura ótima (65°C) mais parecida com *A. brasiliensis* dentre os fungos comparados, e sua enzima também não é significativamente afetada por EDTA e β -mercaptoetanol (SILVA; PERALTA, 1998). *A. oryzae* e *A. flavus* também apresentam baixa estabilidade à temperatura se comparados a *A. brasiliensis* (estável a 40°C; meia vida de 20' a 60°C respectivamente) (KOÇ; METIN, 2010; MIAH; UEDA, 1977).

O fungo *R. oryzae* do presente trabalho apresentou resultados parecidos com a cepa da mesma espécie do trabalho de Roch-Hui e Hang (1990) (pH ótimo de 4,8; temperatura ótima de 60°C, estável somente a 40°C, e ao pH 3-8). *R. delemar*, o fungo mais próximo segundo a filogenia construída, apresenta pH ótimo dentro da faixa considerada ótima para *R. oryzae* (4,5) e temperatura ótima mais baixa (40°C) (SOCCOL *et al.*, 1994). *R. niveus* tem pH ótimo em faixa mais alta (4,5-6) e temperatura ótima igual a de *R. oryzae* (60°C) (SAHA; UEDA, 1983). *R. rhizopodiformis*, o fungo mais distante de *R. oryzae* dentre os analisados do mesmo gênero possui temperatura ótima mais alta (65°C) e é considerado um fungo termotolerante, estabilidade de pH inferior (2,5 -7,5 após apenas 2 horas e exposição) e estabilidade de temperatura superior ao fungo do presente trabalho (meia vida de 120' a 50°C) (PEIXOTO *et al.*, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO: III - Purificação, caracterização e imobilização da glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis*

Como a glucoamilase de *A. brasiliensis* se mostrou muito mais estável à temperatura do que a de *R. oryzae* e ainda não se encontra descrita na literatura, deste ponto em diante do trabalho se optou por selecionar *A. brasiliensis* para a continuidade dos experimentos.

4.16 Purificação de uma glucoamilase de *A. brasiliensis* por eletroeluição

Para a purificação da amilase de *A. brasiliensis* foi utilizada a eletroeluição, os resultados da purificação estão na **tabela 25**. O perfil de proteínas e atividade durante o processo podem ser vistos na **figura 29**.

Figura 29. Perfil de purificação por eletroeluição.

Os tubos com atividade amilolítica foram reunidos e dialisados contra água destilada a 4°C por uma noite e então uma amostra foi concentrada e aplicada ao gel SDS-PAGE para constatar a pureza da amostra (**figuras 30 A e B**) e peso molecular da enzima (**figura 31**), e ainda outra amostra foi aplicada em gel não desnaturante PAGE para constatar a atividade amilolítica (**figura 30 C**).

Figura 30. Géis da glucoamilase purificada de *Aspergillus brasiliensis*. A-Marcador de peso molecular; B- Enzima purificada (4 µg) em gel SDS-PAGE 10% corado com Blue Silver; C- Enzima purificada (7 µg) em gel PAGE 10% após incubação com amido e revelação com solução de iodo.

Figura 31. Determinação do tamanho molecular da proteína purificada.

Tabela 25. Purificação por eletroeluição

Etapa	Volume (mL)	Proteína total	Unidades totais	Atividade específica (mg/mL)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato bruto concentrado	0,25	8,27	290,7	35,15	100	1
Pura	31	0,90	65,49	72,33	22,53	2,057

4.17 Identificação da proteína purificada por espectrometria de massas

A proteína presente em banda de SDS-PAGE foi analisada por MS/MS tendo 24% de cobertura. A enzima foi identificada como glucoamilase. Os fragmentos identificados foram comparados com a genoma do fungo presente na base de dados do *Joint Genome Institute*, e dessa forma, sua sequência foi deduzida (**tabela 26**).

Tabela 26. Estrutura primária deduzida

Sequência deduzida de aminoácidos da glucoamilase de <i>Aspergillus brasiliensis</i>
MSFRSLLALSGLVCSGLASVISKRATLDSWLSNEATVARTAILNNIGADGAWVSGA DSGIVVASPSTDNPDYFYTWTRDSGLVIKSLVDLFRNGDTSLLSTIEHYISSQAIQ VSNPSGDLSSGGLGEPKFNVDETA YTG SWGRPQRDGPALRATAMIDFGNWLILTSS QDNGYTSVATDIVWPLVRNDLSYVAQYWNQTGYDLWEEVNGSSFFTIAVQHRAL VEGSAFATAVGSSCSWCDSQAPQILCYLQSFWTGSYILANFDSSRSGKDANTLLGSI HTFDPEAGCDDSTFQPCSPRALANHKEVVDSFRSIYTINDGLSDSEAVAVGRYPEDS YYNGNPWFLCTLA AEQLYDALYQWDKQGELEITDVSLDFFKALYSSAATGTYS SSSTYSSIVDAVKTFADGFVSIVETHAASNGSLSEQFDKSSGEELSARDLTWSYAAL LTANNRRNSVPPSWGETSASSVPGSCVATSASGTYSSTVTVTWSPSIVATGGTTTTT ATTTGSGGVTTSTSKTTTTASKTSTTTSSTCTTPTAVAVTFDLTATTTYGESIYLVGS ISQLGDWDTSDGVALSADKYTSSNPLWYVTVTLPAGESFEYKFIRVESDDTVEWES DPNREYTVPQTCGESTVTVTDTWR

4.18 Conteúdo de carboidratos

O conteúdo de carboidratos da enzima pura foi determinado pelo método descrito por Dubois *et al.* (1956). Foi encontrada uma concentração de 21,07% de carboidratos na glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis*.

Através das ferramentas online NetOGlyc 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) e NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) foram preditas respectivamente os possíveis sítios de O e N-glicosilação (**figuras 32 e 33**). Foi predita grande quantidade de sítios de O-glicosilação sobretudo entre os resíduos 459 e 542. Para N-glicosilação foram previstos 4 sítios, porém, o primeiro sítio de apontado (Asn 117) na **figura 33** possui baixa probabilidade de ser confirmado, pois há um resíduo de prolina logo após a asparagina. A proteína também se ligou totalmente a resina de concanavalina A, confirmando mais uma vez a presença de N-glicosilação.

Segundo Sauer *et al.*, (2000), as glucoamilases são altamente O-glicosiladas na região do *linker* (entre o sítio ativo e o SBD), essas glicosilações desempenham um papel importante na secreção e termoestabilidade da enzima.

Apenas 3 sítios e N-glicosilação aparentam estar conservados nas glucoamilases de diferentes subfamílias, todos localizados no sítio catalítico (COUTINHO; REILLY, 1997). A eliminação do sítio ASN 395 de uma glucoamilase recombinante de *Aspergillus awamori* por Chen *et al.*, (1994), diminuiu a secreção e estabilidade da enzima.

Figura 32. Sítios previstos de O-glicosilação na glucoamilase de *A. brasiliensis*.

Figura 33. Sítios previstos para N-glicosilação na glucoamilase de *A. brasiliensis*.

4.19 Análise dos produtos de reação da glucoamilase purificada por cromatografia de camada delgada (TLC)

Para a análise dos produtos de reação 50 μL da enzima purificada foram misturados com 50 μL de amido 1% em tampão citrato de sódio 50mM pH 4,5 por diversos tempos. A reação foi paralisada por fervura e cerca de 5 μL do produto da reação foi aplicado a TLC. Como é possível visualizar na **figura 34** em todos os tempos apenas detectou-se glucose como produto, confirmando assim mais uma vez a identificação da proteína como uma glucoamilase.

Figura 34. TLC com produtos de reação da glucoamilase purificada. 1-Padrões; 2- Substrato; 3- Tempo 0; 4- 0,5 hora; 5- 1 hora; 6- 2 horas; 7- 24 horas.

4.20 Efeito da temperatura e pH na atividade da glucoamilase purificada

Para a determinação da temperatura e pH ideais para a atividade da glucoamilase purificada foram realizados ensaios nas temperaturas de 55, 60 e 65°C em pH de 3 a 5,5 (**figura 35**). Foi observado que a temperatura de 60°C no pH 4,5 obteve os melhores resultados. No

ensaio anterior com o extrato bruto do fungo a temperatura ótima se encontrava na faixa de 60°C a 75°C, dessa forma, a temperatura de atividade ótima apesar de estar dentro da faixa apontada pelo delineamento experimental apresentou queda, visto que, a 65°C sua atividade diminui consideravelmente. Possivelmente no extrato bruto componentes do meio de cultura, como amido a peptona e o extrato de levedura exercem efeito protetor, ou ainda, traços dos sais do meio presentes mesmo após a diálise ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; KH_2PO_4 ; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) podem alterar a associação do sítio ativo com o substrato.

O pH ótimo nas condições do ensaio segundo o delineamento experimental com o extrato bruto estava na faixa de 3,5 a 5, tal intervalo continua válido para a enzima purificada, que apresenta um pico de atividade no pH 4,5.

Figura 35. Efeito da temperatura e pH na atividade enzimática da glucoamilase purificada de *A. brasiliensis*.

4.21 Estabilidade ao pH

A enzima purificada foi incubada em tampão McIlvaine nos pH de 2,5 a 8 por 24 horas na temperatura de 25°C. Pode-se observar na **figura 36** que a glucoamilase de *A. brasiliensis* apresentou ótima estabilidade em todos os pH testados estando sempre acima dos 80% de

atividade residual. Desta forma a enzima purificada apresentou-se ligeiramente mais estável do que o conjunto de enzimas presentes no extrato bruto.

Figura 36 Estabilidade ao pH da glucoamilase de *A. brasiliensis*.

4.22 Estabilidade à temperatura

Para a determinação da estabilidade à temperatura a enzima pura em solução aquosa foi incubada em banho-maria em diversas temperaturas e tempos, e então, sua atividade residual foi dosada. A 50°C a glucoamilase manteve 67% da atividade após 7 horas de experimento. A 55°C sua meia vida foi de 147 minutos. A 60°C sua meia vida reduziu para 57 minutos. A 65°C sua meia vida foi de 27 minutos, a 70°C a enzima perdeu rapidamente a atividade se desnaturando completamente em cerca de 1 hora. Na temperatura de 50°C as primeiras amostras tiveram atividade residual acima de 100%. A glucoamilase pode ter aglomerado durante a concentração prévia ao processo de purificação e se desaglomerado com o aumento da temperatura no banho-maria, ou ainda, se tornado mais ativa após a exposição prolongada a 50°C (**figura 37**).

A glucoamilase parcialmente purificada de *A. flavus* no trabalho de Koç e Metin (2010) foi estável a 50°C nas 2 horas de experimento, a 60°C sua meia vida foi de apenas aproximadamente 20 minutos. A glucoamilase de *Paecilomyces variotii* no trabalho de Michelin *et al.* (2008) foi estável a 50°C por apenas uma hora, a 55°C sua meia vida foi de 60 minutos e a 60°C de 45 minutos sendo menos termoestável do que a de *A. brasiliensis*. A glucoamilase de *A. niger* no trabalho de Slivinski *et al.* (2011) teve atividade residual superior a 60% após 4 horas a 60°C, desta forma, é mais termoestável do que a glucoamilase do presente trabalho.

Figura 37. Estabilidade a temperatura da glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis*.

4.23 Ação de compostos estimulatórios e inibitórios sobre atividade enzimática

Foi testada a influência de diversos compostos na atividade enzimática (**tabela 27**). O íon Mn^{2+} foi o que apresentou maior influência positiva na atividade enzimática, assim como o que ocorreu com as amilases presentes no extrato bruto, o qual provocou um aumento de 65% na atividade na concentração de 5 mM e 57% na concentração de 2 mM. O efeito do β -mercaptoetanol e EDTA foi baixo em ambas concentrações.

A **figura 38** ilustra a ação do agente quelante EDTA na enzima ativada por $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5 mM. A atividade diminuiu conforme a concentração de EDTA foi elevada, chegando próximo a 50% de atividade residual com EDTA 10 mM, confirmando a necessidade de íons metálicos para a completa ativação da glucoamilase e sugerindo que a glucoamilase é uma metaloproteína.

Também foi testada a influência da concentração do produto na ação da enzima (**figura 39**). A dosagem da atividade ocorreu pelo método da descoloração do iodo (JONES; VERNER, 1967). Até a concentração de glucose 0,1 M a atividade pouco se alterou, não indicando inibição pelo produto. Em concentrações maiores de glucose a inibição se tornou expressiva, sendo que com glucose 0,5 M após 6 horas de reação apenas 23% do amido foi hidrolisado, em contraste, 83% do amido foi hidrolisado no experimento controle (sem adição de glucose).

Também foi testado o efeito inibitório da acarbose na atividade enzimática (**tabela 28**). Em uma concentração 50 μM a enzima foi completamente inibida. A acarbose é o mais forte inibidor da glucoamilase G1 de *A. niger* segundo Svensson e Sierks (1992), seu $K_d < 6 \times 10^{-12}$ M, ela tem alta afinidade para o sítio ativo e também se liga ao SBD.

Tabela 27. Efeito de sais, agente quelante e agente redutor na atividade enzimática de *Aspergillus brasiliensis*

Compostos	Atividade residual (%)	
	5 mM	2 mM
Nenhum (controle)	100	100
NH ₄ F	98,31	97,34
NaH ₂ PO ₄	97,99	87,78
ZnCl ₂	95,95	90,58
AlCl ₃ .6H ₂ O	105,94	87,03
AgNO ₃	86,92	84,99
KH ₂ PO ₄	100,57	90,47
CuSO ₄ .5H ₂ O	104,01	106,16
BaCl	111,31	100,14
NH ₄ Cl	90,90	87,24
CoCl ₂ .6H ₂ O	109,06	92,29
MgCl ₂ .6H ₂ O	89,72	77,47
Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	96,06	75,21
KCl	87,24	90,15
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ .3H ₂ O	96,70	84,13
NaBr	80,58	79,29
CaCl	97,56	79,08
NaCl	97,02	104,87
MnCl ₂ .4H ₂ O	165,47	157,84
FeCl ₃	97,67	99,06
HgCl ₂	79,29	79,94
Na ₂ SO ₄	94,44	97,99
β-mercaptoetanol	96,27	88,96
EDTA	91,01	85,31

100% representa 7,1 U/mL

Tabela 28. Efeito inibitório da Acarbose

	U/mL
Controle	7,1
Acarbose 50 µM	0

Figura 38. Inibição da atividade da glucoamilase purificada com $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5mM em diferentes concentrações de agente quelante EDTA.

Figura 39. Efeito de diferentes concentrações de glucose sobre a atividade enzimática.

4.24 – Dicroísmo Circular e Modelagem

Para a investigação da estrutura secundária foi realizado um estudo de dicroísmo circular da enzima purificada. Como mostrado na **figura 40** a estrutura secundária da glucoamilase é rica em α -hélice. Segundo a modelagem computacional da enzima (**figura 41**) foi prevista uma estrutura secundária com 37% de α -hélice e 14% de β -conformação, confirmando mais uma vez, que a estrutura secundária da enzima é rica em α -hélice. A predição da estrutura secundária em detalhes se encontra no **Apêndice D**.

A modelagem da enzima ocorreu por homologia, sendo então baseada na estrutura da glucoamilase de *Hypocrea jecorina*/ *Trichoderma reesei* considerada a mais compatível com a de *A. brasiliensis*, foi possível obter uma cobertura de 92% com 100% de confiabilidade.

Figura 40. Espectro de absorção por dicroísmo circular da glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis*. A- Espectros padrão das conformações secundárias (retirado de NELSON; COX, 2011); B- Espectro da glucoamilase de *A. brasiliensis*.

Figura 41. Modelo computacional para a glucoamilase de *A. brasiliensis*.

4.25 Teste de presença de CBM (*carbohydrate-binding modules*)

Para detectar a presença de CBM ou SDB (Starch-Binding Domain) foi realizada simultaneamente a eletroforese de dois géis PAGE, sendo que apenas um deles continha amido 0,1%. A corrida aconteceu em câmara fria com a cuba em banho de gelo para evitar a hidrólise do amido. Pode-se observar na **figura 42A** que a proteína teve uma migração significativamente menor no gel contendo amido, confirmando assim, o resultado do NCBI-blast (**figura 42B**) que indica a presença do CBM 20 no C-terminal da molécula.

O SDB em glucoamilases está relacionado com a ligação e posterior clivagem do amido cru (SOUTHALL *et al.*, 1999). Segundo Morris *et al.* (2005) o SDB que está posicionado no C-terminal na maioria das glucoamilases fúngicas, quando se liga à amilose imobiliza suas cadeias, e dessa forma, facilita posterior ligação e hidrólise pelo sítio catalítico.

O SDB da glucoamilase de *A. niger*, e provavelmente a de *A. brasiliensis*, possui dois sítios (sítio 1 e sítio 2) que são funcional e estruturalmente diferentes. O sítio 1 está relacionado

com o reconhecimento inicial da molécula e o sítio 2 com uma ligação mais forte, levando então, a circularização da cadeia de amilose. Ambos os sítios se ligam ao substrato mesmo quando na ausência do outro sítio, porém, somente com os dois sítios ativos é possível provocar mudanças estruturais na molécula de amilose (GIARDINA *et al.*, 2001).

Figura 42 Presença de SBD na glucoamilase de *A. brasiliensis*. A- Gel de acrilamida PAGE sem amido (1) e com amido 0,1% (2); B – Domínios conservados na estrutura da glucoamilase de *A. brasiliensis* segundo a ferramenta blast do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.26 Determinação do ponto isoelétrico (pI)

O ponto isoelétrico (pI) foi determinado através de eletroforese, na qual, três géis contendo anfólitos de pH 2,5 a 5 foram submetidos simultaneamente a 500 V por 5 horas. Dois dos géis foram fatiados de 0,5 em 0,5 cm para a determinação do pH e atividade enzimática em cada fração (**figura 43A**). O terceiro gel foi corado com blue silver (**figura 43B**). A banda correspondente a proteína purificada migrou até o pH 3,21, sendo este então, seu ponto isoelétrico. O pI teórico também foi calculado pelo site http://web.expasy.org/compute_pi/ conforme Bjellqvist *et al.* (1993), no qual leva em conta apenas a estrutura primária da proteína. O resultado foi de 4,28.

O resultado obtido pela eletroforese foi ligeiramente mais baixo em relação a alguns fungos do mesmo gênero encontrados na literatura. O pI da glucoamilase de *A. oryzae* obtida de cultivo submerso é de 4,2; a obtida de cultivo em estado sólido é de 3,9 (HATA *et al.*, 1997). A enzima de *A. niveus* tem pI 3,8 (SILVA *et al.*, 2009), já a glucoamilase comercial (Daizyme) de *A. niger* apresenta ponto isoelétrico de 3,47 (SUTTHIRAK *et al.*, 2005).

Figura 43 Determinação do ponto isoelétrico. A- pH e atividade encontradas em cada fração do gel fatiado; B- Glucoamilase corada com blue silver.

4.27 – Constantes cinéticas da glucoamilase

As constantes cinéticas foram dosadas utilizando diferentes tipos de amido solúvel como substrato (**Tabela 29**). O km mais baixo obtido foi com o amido de batata - Sigma (2,21 mg/mL) já o mais alto valor foi obtido com o amido de milho (20,84 mg/mL) que em contra ponto também obteve o maior $V_{máx}$ ($6,6 \cdot 10^{-3}$ mol/min). As constantes cinéticas dos amidos de batata diferiram significativamente dependendo da marca do reagente. Dependendo da fonte do amido sua composição de amilose e amilopectina variam, bem como sua viscosidade, solubilidade, presença de fosfatos e capacidade de ligação com a água, explicando a variação de valores obtidos na cinética (SINGH *et al.*, 2003). O arroz possui os menores grânulos de amido dentre as fontes testadas, seu grânulos são poligonais e variam de 3 a 8 μm de diâmetro, (WATERSCHOOT *et al.*, 2015).

A glucoamilase de *A. niveus* descrita por Silva *et al.* (2009) tem uma maior afinidade pelo amido de batata, com um K_m de 0,32 mg/mL, porém possui um menor *turnover*, com um k_{cat} de 14,2 s⁻¹ e uma menor especificidade com um k_{cat}/K_m de 44,4. A glucoamilase de *A. niger* descrita por Riaz *et al.* (2012) possui K_m mais baixo (0,23 mg/mL), $V_{máx}$ e k_{cat} superiores, respectivamente 283 U/mg e 343 s⁻¹. A glucoamilase da cepa de *A. niger* do trabalho de Gudi *et al.* (2013) possui um K_m de 0,1 mg/mL e um $V_{máx}$ de 161 U/mg, semelhante ao obtido neste trabalho com amido de batata. A enzima de *Paecilomyces variotii* possui um K_m de 4,1 mg/mL para amido Sigma e 3,8 mg/mL para amido Reagen, sendo superior ao K_m de *A. brasiliensis*, seu k_{cat} foi inferior aos obtidos neste trabalho, com 36,6 s⁻¹ (amido Sigma) e 41,7 s⁻¹ (amido Reagen), e um k_{cat}/K_m de 11 para ambos os amidos (MICHELIN *et al.*, 2008). A glucoamilase de *Fusarium solani* apresenta um k_{cat} de 217 s⁻¹ ao amido solúvel, sendo comparável ao de *A. brasiliensis*, um K_m de 1,6 mg/mL e um k_{cat}/K_m 136, tendo uma maior especificidade ao substrato (BATHII *et al.*, 2007).

Tabela 29. Constantes cinéticas da glucoamilase purificada em diferentes substratos

Substrato	K_m (mg/mL)	$V_{máx}$ (mol.min ⁻¹ / U.mg ⁻¹)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m (s ⁻¹ .mg ⁻¹ .mL)
Amido arroz (Sigma)	2,73	5,17.10 ⁻³ / 178,23	205	75,12
Amido milho (Sigma)	20,82	6,6. 10 ⁻³ /227,84	265	12,58
Amido Batata (Sigma)	2,21	4,51.10 ⁻³ /155,76	179	81,06
Amido Batata (Reagen)	3,05	4,46.10 ⁻³ /161,72	186	50,98

4.28 Análise filogenética de glucoamilase de diferentes fungos

Foi feito uma análise de *neighbor joining* com sequências de glucoamilase de alguns fungos filamentosos. O cladograma (**figura 44**) posiciona a glucoamilase de *A. brasiliensis* próximo a *A. shirousami*, *A. niger*, *A. ficuum*, *A. niger* e *A. awamori* e um pouco mais distante de *A. oryzae*, desta forma, se comparado com a árvore filogenética de Coutinho e Reilly (1997), a glucoamilase de *A. brasiliensis* está dentre as consideradas mais derivadas e com maior

eficiência catalítica e estabilidade. A glucoamilase de *R. oryzae*, pertencente a um gênero mais basal de fungos filamentosos, assim como no trabalho acima citado, aparece distante da glucoamilase dos fungos do gênero *Aspergillus*.

Figura 44. Cladograma construído a partir da sequência da glucoamilase de diferentes fungos.

4.29 Imobilização

As amilases presentes no extrato bruto tratado com carvão ativo (extrato clarificado) foram imobilizadas em DEAE e Agarose-BrCN. Após a adsorção em DEAE o derivado foi tratado com polietilenoglicol 4000 (PEG). A adição de polietilenoglicol promove estabilização estérica, dessa forma evita que proteínas e outras biomoléculas se aproximem da superfície, prevenindo a agregação das proteínas adsorvidas no suporte (OSMOND *et al.*, 1975).

Na DEAE 86,13% das proteínas foram adsorvidas com sucesso e sua recuperação de atividade foi 12 vezes maior do que a presente no extrato clarificado com a enzima livre (**tabela 30**). Já com Agarose-BrCN houve apenas 55,83% de adsorção das proteínas e a atividade caiu para apenas 14,62 % da enzima livre.

Houve aumento da estabilidade térmica a 50°C com o derivado DEAE-PEG (**figura 45**). Na mesma temperatura a estabilidade da Agarose-BrCN foi comparável a enzima livre. A 55°C

a Agarose-BrCN foi 20% mais estável que a enzima livre no tempo de 6 horas e o DEAE-PEG no tempo de 4 horas apresentava menos 40% da atividade inicial do que a enzima livre.

Como o derivado Agarose-BrCN obteve resultados muito parecidos com a enzima livre e uma ativação muito baixa o derivado DEAE-PEG foi selecionado para a continuidade dos experimentos. Foi testada a estabilidade do derivado DEAE-PEG após ciclos de reuso a 50°C por 5 minutos (**figura 46**). Após cada ciclo o derivado era lavado em água destilada para a retirada dos açúcares produzidos na reação anterior. Após 10 ciclos o derivado ainda manteve 68,74% da atividade inicial, desta forma, o DEAE-PEG pode ser utilizado em processos industriais que exijam a recuperação e reutilização da enzima.

Torres *et al.* (2004) imobilizaram a glucoamilase comercial de *A. niger* (Novo Nordisk) em DEAE-agarose, 75% da enzima colocada em contato com a resina (35mg de proteína/ mL de suporte) foi adsorvida. A glucoamilase adsorvida manteve 100% da atividade, porém, sua meia vida a 55°C foi menor que 20 minutos.

Tabela 30. Imobilização em DEAE-PEG e Agarose-BrCN

Derivado	% Proteína	% Atividade	Ativação
Livre	100	100	1
DEAE-PEG	86,13	1259	12
Agarose-BrCN	55,83	14,62	0,14

Figura 45. Estabilidade térmica dos derivados comparados a enzima livre.

Figura 46. Ciclos de reuso da enzima adsorvida em DEAE-PEG.

4.30 Planejamento de misturas com a glucoamilase de *A. brasiliensis* imobilizada em DEAE-PEG

Para determinar o substrato que a glucoamilase de *A. brasiliensis* imobilizada e DEAE-PEG tem mais afinidade foi construído um planejamento de misturas com amido, amilose e amilopectina.

Para a validação foram realizados experimentos em triplicada nos pontos de 1 e 3 horas com um ponto de 25% de amido e 75% de amilose e outro com 25% de amido e 75% de amilopectina. Para a validação de 1 hora com ponto de 25% de amido e 75% de amilopectina o valor predito foi de 0,698 e o observado 0,700 estando, portanto, dentro do desvio padrão de 0,108. Com 25% de amido e 75% de amilose em 1 hora de reação o valor predito foi de 0,625, o observado foi de 0,512, estando também dentro do desvio padrão de 0,124.

Para a validação de 3 horas com ponto de 25% de amido e 75% de amilopectina o valor predito foi de 0,814 e o observado 0,883 estando, portanto, dentro do desvio padrão de 0,123. Com 25% de amido e 75% de amilopectina em 3 horas de reação o valor predito foi de 0,628, o observado foi de 0,596, estando mais uma vez dentro do desvio padrão calculado em 0,055.

Os valores de Anova e os modelos utilizados encontram-se na **tabela 31**. As equações construídas com os coeficientes do modelo estão na **tabela 32**. Nos gráficos de superfície de resposta (**figura 47**) é possível visualizar quais substratos são mais hidrolisados em cada tempo de reação.

No primeiro tempo (0,5 hora) a amilopectina é o substrato mais hidrolisado, no tempo de 1 hora a amilopectina continua sendo bastante hidrolisada juntamente com o amido, no tempo de 2 horas o cenário é mantido com pouca variação, no tempo de 3 horas a amilopectina volta a ser mais favorável para a produção de açúcares redutores do que o amido e a amilose continua não favorável a hidrólise. No tempo de 4 horas a participação do amido na hidrólise cai ainda mais, possivelmente devido ao esgotamento de suas cadeias de amilopectina, sendo a amilopectina pura o substrato que mais favorece a ação da glucoamilase imobilizada.

O amido é constituído no geral de 15-20% de amilose e de 75 a 80% de amilopectina, sendo que, a amilose é formada por cadeias mais longas de cerca de 1000 unidades de glucose, enquanto a amilopectina é formada por cadeias curtas, de 10 a 60 unidades de glucose (PANDEY *et al.*, 2008). Desta forma a glucoamilase de *A. brasiliensis* parece ter maior afinidade a substratos mais curtos, característica que pode ter sido selecionada devido a maior abundância de amilopectina do que amilose na cadeia do amido.

A glucoamilase I de *A. niger* apresenta menor k_m , portanto, maior afinidade, à amilopectina (2,1 mg/mL) do que à amilose (2,6 mg/mL) (AMIRUL *et al.*, 2005). Ao contrário, as glucoamilases de *A. fumigatus* e *A. awamori* tem maior facilidade em catalisar a hidrólise da

amilose do que a amilopectina, com diferenças de cerca de 10% na atividade (SILVA; PERALTA, 1998; YAMASAKI *et al.*, 1977). A glucoamilase de *P. variotii* possui menor k_m para amilopectina (2 mg/mL) do que para a amilose (2,5 mg/mL) (MICHELIN *et al.*, 2008).

Tabela 31. Planejamento de misturas do derivado DEAE-PEG

Hidrólise (horas)	Modelo da mistura	Fonte de variação	SS	GL	ANOVA		r^2	
					MS	Teste F		
						F calculado		F tabelado
0,5	Cúbico Especial	Modelo	0,045582	4	0,011395	17,639	4,11	0,946
		Resíduo	0,002584	4	0,000646			
		Falta de ajuste	0,001896	2	0,000948	2,757	9,00	
		Erro puro	0,000688	2	0,000344			
		Total	0,048166				$\alpha=0,1$	
1	Cúbico Especial	Modelo	0,041805	4	0,010451	76,579	6,39	0,987
		Resíduo	0,000546	4	0,000136			
		Falta de ajuste	0,000239	2	0,000120	0,780	19,00	
		Erro puro	0,000307	2	0,000153			
		Total	0,042351				$\alpha=0,05$	
2	Cúbico Especial	Modelo	0,142043	5	0,028409	72,650	9,01	0,992
		Resíduo	0,001173	3	0,000391			
		Falta de ajuste	0,000592	1	0,000592	2,040	18,51	
		Erro puro	0,000581	2	0,000290			
		Total	0,143217				$\alpha=0,05$	
3	Quadrático	Modelo	0,051999	5	0,010400	21,004	5,31	0,972
		Resíduo	0,001485	3	0,000495			
		Falta de ajuste	0,000784	1	0,000784	2,236	8,53	
		Erro puro	0,000701	2	0,000351			
		Total	0,053484				$\alpha=0,1$	
4	Cúbico Especial	Modelo	0,088616	3	0,029539	20,421	3,62	0,925
		Resíduo	0,007232	5	0,001446			
		Falta de ajuste	0,004616	3	0,001539	1,177	9,16	
		Erro puro	0,002616	2	0,001308			
		Total	0,095848				$\alpha=0,1$	

Tabela 32. Equações do modelo do planejamento de misturas

Tempo (horas)	Equação
0,5	$y = 0,43*A + 0,5*B + 0,7*C + 0,32*AB - 1,59*ABC$
1	$y = 0,65*A + 0,47*B + 0,71*C + 0,572*AB - 1,31*ABC$
2	$y = 0,83*A + 0,43*B + 0,89*C + 0,4*AB + 0,50BC - 1,65*ABC$
3	$y = 0,66*A + 0,55*B + 0,81*C + 0,25*AB$
4	$y = 0,84*A + 0,65*B + 0,96*C - 3,23*ABC$

Legenda: y = valor esperado em $\mu\text{mol/mL}$; A = proporção de amido; B = proporção de amilose; C = proporção de amilopectina.

Figura 47. Superfície de resposta da ação do derivado DEAE-PEG em diferentes tempos de hidrólise com amido, amilose e amilopectina como substratos.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram isolados, selecionados e identificados dois bons produtores de amilases: *Aspergillus brasiliensis* e *Rhizopus oryzae*. Ambos os fungos são mesofílicos e crescem melhor em meios com nitrogênio de fonte orgânica; as amilases de *A. brasiliensis* são mais estáveis à temperatura que as de *R. oryzae*. A amilase de *A. brasiliensis* foi identificada como glucoamilase; a enzima tem boa estabilidade ao pH e a temperatura; é ativada por Mn^{2+} e inibida em altas concentrações de glucose; sua atividade ótima ocorre em pH de 4,5 e temperatura de 60°C; possui uma estrutura típica de glucoamilases de *Aspergillus* mais derivados, com um domínio catalítico seguido por um *linker* altamente O-glicosilado e um SBD no carboxi-terminal da proteína. A enzima foi imobilizada em DEAE-PEG e reutilizada por 10 ciclos com perda de apenas 31% da atividade; o derivado DEAE-PEG demonstrou possuir maior facilidade em catalisar a hidrólise da amilopectina do que a amilose. Segunda análise de *Neighbor Joining* a glucoamilase de *A. brasiliensis* tem sequência similar às glucoamilases mais derivadas do gênero.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABE, A., ODA, Y.; ASANO, K.; SONE, T. The molecular phylogeny of the genus *Rhizopus* based on rDNA sequences. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v.70, p. 2387-2393, 2006.
- AGRANA RESEARCH & INNOVATION CENTER <http://www.agrana-research.com/>
Acesso fevereiro, 2015.
- AINSWORTH, G.C. **Introduction of history of microbiology**. Cambridge University Press, 1976.
- ALVAREZ, E.; SUTTON, D. A.; CANO, J.; FOTHERGRILL, A. W.; STCHIGEL, A.; RINALDI, M. G.; GUARRO, J. Spectrum of Zygomycetes species identified in clinically significant specimens in the United States. **J. Clin. Microbiol.** v. 47, p.1650–1656, 2009.
- AMIRUL, A.A.; KHOO, S.L.; NAZALAN, M.N.; RAZIP, M.S.; AZIZAN, M.N. Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. **Folia Microbiol.** v. 41, p 165 - 174, 1996.
- ANTO, H.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresour. Technol.** v. 97, p. 1161-1166, 2006.
- ASHIKARI, T.; NAKAMURA, N.; TANAKA, Y.; KIUCHI, N.; SHIBANO, Y.; TANAKA, T.; AMACHI, T.; YOSHIZUMI, H. *Rhizopus* raw-starch-degrading glucoamylase: Its cloning and expression in yeast. **Agric. Biol. Chem.** v. 50, p. 957-964, 1986.
- BAGYALAKSHMI, R.; THERESE, K. L.; MADHAVAN, H. N. Nucleotide polymorphisms associated with Internal Transcribed Spacer (ITS) regions of ocular isolates of *Aspergillus flavus* **J. Microbiol. Methods.** v.68 . p. 1-10, 2007.

- BALAJEE, S. A.; BADDLEY, J. W.; PETERSON, S. W.; NICLE, D.; VARGA, J.; BOEY, A.; LASS-FLÖRL, C.; FRISVAD, J. C. A. *alabamensis*, a New Clinically Relevant Species in the Section *Terrei*. **Eukaryotic Cell**. v.8, p. 713–722. , 2009.
- BALLESTEROS, I.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particle sizes. **Process Biochem.** (Oxford), v. 38, p. 187-192, 2002.
- BELOTI, L.L.; COSTA, B.C.; TOLEDO, M.A.S; SANTOS, C.A.; CRUCELLO, A.; FAVARO, M.T.P.; SANTIAGO, A.S.; MENDES, J.S., MARSAIOLLI, A.J.; SOUZA, P.S. A novel and enantioselective epoxide hydrolase from *Aspergillus brasiliensis* CCT 1435: Purification and characterization. **Protein Express. Purif.** v.91, p.175-183, 2013.
- BHATTI, H.N.; RASHID, H.; NAWAZ, R.; KHALID, M.; ASGHER, M.; JABBAR. Effect of aniline coupling on kinetic and thermodynamic properties of *Fusarium solani* glucoamilase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 73, p.1290-1298, 2007.
- BJELLQVIST, B.; HUGHES, G.J.; PASQUALI, C.H.; PAQUET, N.; RAVIER, F.; SANCHEZ, J.C.H.; FRUTIGER, S.; HOCHSTRASSER, D.F. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. **Electrophoresis**. v.14, p.1023-1031, 1993.
- BRADFORD, M., M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUZINA, W.; BRAUN, H.; FREUDENSCHUSS, K.; LACKNER, A.; HABERMANN, W.; STAMMBERGER, H. Fungal biodiversity--as found in nasal mucus. **Med. Mycol.** v.41, p. 149-161, 2003.
- CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v.25, p. 1327–1333, 2004.

- CANNON, P. F.; **Biodiversity of tropical microfungi** , Hong Kong: editor Hong Kong, p. 255-278, 1997.
- CANTAREL B.L.; COUTINHO P.M.; RANCUREL C.; BERNARD T.; LOMBARD V.; HENRISSAT, B.; The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic. Acids. Res.** 37:D233-238 [PMID: 18838391]. 2009.
- CARVALHAL, F.; RODRIGUES, S. S., BERCHEZ, F. A. S. **Mata Atlântica**. Disponível em: <http://www.ib.usp.br/ecosteiros/textos_educ/mata/index.htm> Acesso agosto, 2013.
- CASTRILLO, M. L.; FONSECA, M. I.; BICH, G. A.; JERKE, G.; HORIANSKI, M. A.. Taxonomy and phylogenetic analysis of *Aspergillus* section Nigri isolated from yerba mate in misiones (Argentina). **J. Basic Appl. Genet.** v.23, 1852.
- CHEN, H.M.; FORD, C.; REILLY, P.J. Substitution of asparagine residues in *Aspergillus awamori* glucoamylase by site-directed mutagenesis to eliminate N-glycosylation and inactivation by deamidation. **Biochem.J.** v.301, p,275-281, 1994.
- CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E. C.; ANTONIO J. F.; CURVELO, A. A. S.; MATTOSO, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros**, v.15, p. 268-273, 2005.
- COSTA, M. O.; MOTTA, C. M. S.; MALOSSO, E. Diversity of filamentous fungi in different systems of land use. **Agroforest Syst.** v. 85, p. 195-203, 2012.
- COUTINHO, F.P.; SILVA, J.F.; SANTANA, I.P.; FELIX, W.P.; YANO-MELO, A.M. Solubilização de fosfatos in vitro por *Aspergillus brasiliensis* Varga, Frisvad e Samson na presença de fontes de carbono. *Hoehnea*. v.41, p.277-282, 2014.
- COUTINHO, P.M. **Glucoamilase** **www page**. 1997. Disponível em <http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/nte/heyde/www.public.iastate.edu/_pedro/glase/glase.html>. Acesso em 02/2015.

- COUTINHO, P.M.; REILLY, P.J. Glucoamylase structural, functional and evolutionary relationships. **Proteins: Struct. Funct. Genet.** v.29, p.334-347, 1997.
- CRUSIUS, I. H. S.; MILANEZ, A. I Fungos microscópicos da Mata Atlântica de Paranapiacaba, São Paulo, Brasil. **Braz. J. Bot.** v.21, n.1, p.73-79, 1998.
- CRUSIUS, I. H. S.; MILANEZ, A. I.; TRUFEM, S. F. B.; ZOTTARELLI, C. L. P.; GRANDI, R. A. P.; SANTOS, M. L.; GIUSTRA, K. C. Microscopic fungi in the Atlantic Rainforest in Cubatão, São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v.37, p. 267-275, 2006.
- CRUZ, E. A.; MELO, M. C; SANTANA, N. B.; FRANCO M; SANTANA, R. S. M; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção de Alfa-Amilase por *A. niger* em Resíduo de Cascas de Mandioca. **Cient. Ciênc. Biol. Saúde.** v. 13, p.245-249, 2011.
- DAVIS, B.J.; Disc electrophoresis - II method and application to human serum. *Ann. NY Acad. Sci.* v.121, p. 404 - 427, 1964.
- DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chem. Soc. Rev.**, v.42, p. 6437-6474, 2013.
- DOLATABADI, S.; SYBREN, H.; MEIS, J.F. Species boundaries and nomenclature of *Rhizopus arrhizus* (syn. *R. oryzae*). **Mycoses.** v.57, p. 108-127, 2014.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. **Compendium of soil fungi.** IHW-Verlag, San Francisco, 2007.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v.28, p.350-356, 1956.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res.** v.32, p.1792-7, 2004.
- EUROPEAN COMMISSION **Safety Requirements for Food Additives, Flavorings and Technological Aids.** TR CU 029/2012. Disponível em:

<http://ec.europa.eu/food/international/trade/docs/eec_council_58_annex_en.pdf>.
Acesso em agosto de 2013.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. Dissertação (Doutorado em Química) - Setor de Ciências Exatas - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

FRANKLAND, J.C. Fungal decomposition of bracken petioles. **J. Ecol.** v. 57, P. 25-36.1969.

GEISER, D. M.; DORNER, J. W.; HORN, B. W.; TAYLOR, J. W. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genet. Biol.** v.31, p.169–79, 2000.

GEISER, D. M.; KLICH, M. A.; FRISVAD, J. C.; PETERSON, S. W.; VARGA, J.; SAMSON R. A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Stud. Mycol.** v. 59, p.1-10, 2007.

GIARDINA, T.; GUNNING, P.; JUGE, N.; FAULDS, C.B.; FURNISS, C.S.M.; SVENSSON, B.; MORRIS, V.J.; WILLIAMSON, G. Both binding sites of the starch-binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase are essential for inducing a conformational change in amylose. **J. Mol. Biol.** v. 313, p. 1149-1159, 2001.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Appl. Environ. Microbiol.** v.61. p. 1323-1330, 1995.

GOUKA, R. J.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. Efficient production of secreted proteins by A.: progress, limitations and prospects. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 47, p. 1-11, 1997.

GRYGANSKYI, A.P.; LEE, S.C.; LITVINTSEVA, A.P.; SMITH, M.E.; BONITO, G.; PORTER, T.M.; ANISHCHENKO, I.M.; HEITMAN, J.; VILGALYS, R. Structure, function, and phylogeny of the mating locus in the *Rhizopus oryzae* complex. **PLoS ONE**. v. 5, p. 1-12, 2010.

GUDI, SK.; CHANDRASEKHAN, G.; RATHER, G.; CHAMDRA, M. G. S.; MANGAMURI, U. K.; PODHA, S. E. CHOI, Y.L. Glucoamylase from a Newly Isolated *Aspergillus*

- niger* FME: detergent-mediated production, purification, and characterization. **J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.** v.56, p.427–433, 2013.
- GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; KUMAR, V. G.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochem.**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.
- GYÖRGY, P.; MURATA, K.; IKEHATA, H. Antioxidants isolated from Fermented Soybeans (Tempeh). **Nature**. v. 203, p. 870 – 872, 1964.
- HATA, Y.; ISHIDA, H.; KOJIMA, YASUHIRO.; ICHIKAWA, E.; KAWATO, A.; IMAYASU, S. Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid state culture (koji) and in submerged culture. **J. Ferment. Bioeng.** v. 84, p. 532-537, 1997.
- HATA, Y.; KITAMOTO, K.; GOMI, K.; KUMAGAI, C.; TAMURA, G. e HARA, S. The glucoamylase cDNA from *Aspergillus oryzae*: its cloning, nucleotide sequence, and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Agric. Biol. Chem.** v. 55, p. 941-949, 1991.
- HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase fúngica. Em: **Bioquímica das Fermentações**. p.56, 1982.
- HENRY, T.; IWEN, P. C.; HINRICHS, S. H.; Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, p.1510–1515, 2000.
- HESELDTINE, C.W. Microbiology of oriental fermented foods. **Ann. Rev. Microbiol.** v. 37, p. 575-601, 1983.
- HIROMI, K.; HAMAZU, Z.; TAKAHASHI, K.; ONO, S. Kinect studies on glucoamilase II : Competition between two types of substrates having α -1,4 and α -1,6 glucosidic linkage. **J. Biochem.** v. 59, p.411-418, 1966.
- HONG, S.; CHO, H.; SHIN, H.; FRISVAD, J.C; SAMSON, R. A. Novel Neosartorya species isolated from soil in Korea. **Int. J. S. Evol. Microbiol.** v.56, p. 477-486, 2006.

- JAFARI-AGHDAM, J.; KHAJEH, K.; RANJBAR, B.; NEMAT-GORGANI, M. Deglycosylation of glucoamylase from *Aspergillus niger*: effects on structure, activity and stability. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1750, p.61-67, 2005.
- JAMES, J.A.; LEE, B.H. Glucoamylases: microbial sources, industrial applications and molecular biology – a review. **J. Food Biochem**. v.21, p. 1-52, 1997.
- JANEČEK, S.; Amylolytic enzymes – focus on the alpha amylases from Archaea and Plants. **Nova Biotechnol**. v.5, p.1-5, 2009.
- JANEČEK, S.; The evolution of starch-binding domain. **FEBS Letters**. v.456, p. 119-125, 1999.
- JANG, J. H.; LEE, J. H.; KI, C. S.; LEE, N. Y. Identification of clinical mold isolates by sequence analysis of the internal transcribed spacer region, ribosomal large-subunit D1/D2, and beta-tubulin. **Ann. Lab. Med**. v.32, p.126–132, 2012.
- JONES, R.L.; VERNER, J.E. The bioassay of gibberellins. **Planta**, v. 72, p.155-161, 1967
- KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *A. sp.* **World J. Microbiol. Biotechnol**. v.11, p. 242-243, 1995.
- KELLEY, L.A.; STERNBERG, M.J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nat. Protoc**. v. 4, p. 363-371, 2009.
- KIM, J. Y.; YEO, S. H.; BAEK, S. Y.; CHOI, H. S. Molecular and morphological identification of fungal species isolated from Bealmijang Meju. **J. Microbiol. Biotechnol**. v.21, p.1270-1279, 2011.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. **Dictionary of the fungi**, 10thed, Wallingford: Ed. CABI, 2008.
- KOÇ, Ö.; METIN, K. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase produced by *Aspergillus flavus* HBF34. **Afr. J. Biotechnol**. v. 9, p. 3414-3424, 2010.

- KUMAR, P.; SATYANARAYANA, T. Microbial glucoamylases: characteristics and applications. **Crit. Rev. Biotechnol.** v.29, p. 225-255, 2009.
- LAEMMLI, Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature.** v. 227, p. 680–685, 1970.
- LIBBY, C.B.; CORNETT, C.A; REILLY, P.J.; FORD, C. Effect of aminoacid deletions in the O-glycosylated region of *Aspergillus awamori* glucoamilase. **Protein Eng.** v.7, p.1109-114, 1994.
- LIU, G.Y.; CHEN, S.R.; WEI, Y.H.; LEE, F.L.; FU, H.M.; YUAN, G.-F.; STALPERS, J. Polyphasic approach to the taxonomy of the *Rhizopus stolonifer* group. **Fungal Biol.** v.111, p. 196–203, 2007.
- LEONE, F.A.; BARANAUSKAS, J.A.; FURRIEL, R.P.M.; BORIN, I.A. SigrafW: an easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochem. Mol. Biol. Educ.** v.33, p.399-403, 2005.
- LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. Quantas espécies há no Brasil?. **Megadiversidade.** v.1, p.36-42, 2006.
- LV, C. X; HUANG, Z. Q.; ZHANG, W.; RAO, P. F.; NI, P. Identification and characterization of filamentous fungi isolated from fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing. **J. Gen. Appl. Microbiol.** v. 58, p. 33–42, 2012.
- MACHIDA,M; GOMI, K. *Aspergillus: molecular biology and genomics*. Caister Academic Press, 2010.
- MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARCK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12ª edição, São Paulo, Artimed. p. 537-540, 2010.
- MANIKANDAN, P.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; REVATHI, R.; ANITA, R.. DOCZI, I., NÉMETH, T.M.; NERENDRAN, V.; VÁGVÖLGYI, C.; BHASKAR, M.; MANOHARAN, C.; SAMSON, R.A., KREDICS, L. Keratitis caused by the recently described new species *Aspergillus brasiliensis*: two case reports. **J. Med. Case Rep.**v.4, p.68, 2010.

- MCCARTER, J.D., WITHERS, S.G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Curr. Opin. Struct. Biol.** v.4, p.885-892, 1994.
- MIAH M.N.; UEDA S. Multiplicity of glucoamylase of *Aspergillus oryzae* II: enzymatic and physico-chemical properties of 3 forms. **Starch.** v.29, p.235– 9, 1977.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination o reducing sugars. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MICHELIN, M.; RULLER, R.; WARD, R.J.; MORAES, L.A.B.; JORGE, J.A.; TERENCEI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus *Paecilomyces variotii*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v.35, p.17-25, 2008.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros.** Brasília: MMA/SBF, 2002.
- MIYAZAKI, T.; MATSUMOTO, Y.; MATSUDA, K.; KURAKATA, Y.; MATSURO, I.; ITO, Y.; NISHIKAWA, A.; TONOZUKA. Heterologous expression and characterization of processing α -glucosidase I from *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642. **Glycoconj. J.** v. 28, p.563-571, 2011.
- MORA, C. T.; TITTENSON, D.P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B.; WORM, B. How many species are on the earth and in the ocean? **PLoS Biol.**, v.9, 2011.
- MORRIS, V.J.; GUNNING, A.P.; FAULDS, C.B.; WILLIAMSON, G.; SVENSSON, B. AFM images of complexes between amylose and *Aspergillus niger* glucoamylase mutants, native and mutant starch binding domains: a model for the action of glucoamilase. **Starch/Stärke.** v.57, p. 1-7, 2005.
- NAGAO, K.; OTA, T.; TANIKAWA, A.; TAKAE, Y.; MORI, T.; UDAGAWA, S.; NISHIKAWA, T. Genetic identification and detection of human pathogenic *Rhizopus* species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene. **J. Dermatology Sci.** v.39, p. 23-31, 2005.

- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**, 5a ed., São Paulo:Editora Sarvier, 2011.
- O'FARREL, P.Z.; GOODMAN, H.M.; O'FARREL, P.H.; High resolution two dimensional electrophoreses of basic and acidic proteins. **Cell**. v.12, p.1133-1142, 1977.
- OLIVEIRA,M.; AMORIM,M.I.; FERREIRA,E.; DELGADO,L.; ABREU,I. Main airborne Ascomycota spores: characterization by culture, spore morphology, ribosomal DNA sequences and enzymatic analysis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.86, p. 1171-1181, 2010.
- OSMOND, D.W.J; VINCENT, B.; WAITE, F.A. Steric stabilization: A reappraisal of current theory. **Colloid Polym. Sci.** v. 253, p. 676-682, 1975.
- PANDEY, A.; SOCCOL. C. R.; NIGAN, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues II: cassava bagasse. **Biores. Technol.**, v. 74, p. 81-87, 2000a.
- PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 31, p. 135-152, 2000b.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCOOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme technology**. Springer. 2008.
- PEDERSEN, M.; LAURITZEN, H.K.; FRISVAD, J.C.; MEYER, A.S. Identification of thermostable β -xylosidase activities produced by *Aspergillus brasiliensis* and *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Lett.** v.29, p. 734-748, 2007
- PAVEZZI,F.C., CARNEIRO,A.A., BOCCHINI-MARTINS,D.A., ALVES-PRADO,H.F., FERREIRA,H., MARTINS,P.M., GOMES,E.; DA SILVA,R. Influence of different substrates on the production of a mutant thermostable glucoamylase in submerged fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 163, p. 14-24, 2011
- PEIXOTO, A. L. **Vegetação da Costa Atlântica**. In: Monteiro S, Kaz L, coordenadores. Floresta Atlântica. Rio de Janeiro: Alumbamento; p.33-41. 1991-1992.

- PEIXOTO, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **Int. Microbiol.** v.6, p. 269-273, 2003.
- PESTANA, F.; CASTILHO, F.J. Glucoamylase production by *Aspergillus awamori* on rice flour medium and partial characterization of the enzyme. **MIRCEN Journal.** v.1, p. 225-237, 1985.
- PRAKASHAM, R.S.; SUBBA, C.H. R., SREENIVAS RAO, R.; SARMA, P.N. Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*. **J. Appl. Microbiol.** v 102, p. 204–211, 2007.
- RAVIKANT, S.; MISHRA, S. K.; NARENDRA, K. Optimization of α -amylase production on agriculture by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid state fermentation. **Res. J. Pharma. Biol. Chem. Sci.** v.1, p.870, 2010.
- RIAZ, M.; RASHID, M.H.; SAWYER, L.; AKHTAR, S.; JAVED, M.R.; NADEEM, H.; WEAR, M. Physiochemical properties and kinetics of glucoamylase produced from deoxy-D-glucose resistant mutant of *Aspergillus niger* for soluble starch hydrolysis. **Food Chem.** v.130, p.24-30, 2012.
- RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V., POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by thermotolerant *A. phoenicis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v.26, p.156-160, 2001.
- RICHARDSON, M. The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. **Clin. Microbiol. Infect.** v.15, p. 2-9, 2009
- ROCH-CHUI, Y.; HANG, Y. D. Amylolytic enzyme production by *Rhizopus oryzae* grown on agricultural commodities. **World J. Microb. Biot.** v.6, p 15-18, 1990.

- ROCKSTRÖM, J.; STEFFEN, W.; NOONE, K.; PERSSON, A.; CHAPIN, S.; LAMBIN, E.F.; LENTON, T.M.; SCHEFFER, M.; FOLKE, C.; SCHELLNHUBER, H.J.; NYKVIST, B.; WIT, T.H.; VAN DER LEEUW, S.; RODHE, H.; SÖRLIN, S.; SNYDER, P.K.; COSTANZA, R.; SVEDIN, U.; FALKENMARK, M.; KARLBERG, L.; CORELL, R.W.; FABRY, V.J.; HANSEN, J.; WALKER, B.; LIVERMAN, D.; RICHARDSON, K.; CRUTZEN, P.; FOLEY, J.A. A safe operating space for humanity. **Nature**. v. 461, p. 472-475, 2009.
- ROSS, J.L.S.; MOROZ, I. C. **Mapa Geomorfológico do Estado de São Paulo 1:500.000**, Departamento de Geografia-FFLCH-USP/IPT/Fapesp, São Paulo, 1997.
- SAHA, B.C.; UEDA, S. Raw starch adsorption, elution and digestion behavior of *Rhizopus niveus*. **J. Ferm. Tech.** v. 61, p.67-72, 1983.
- SANCHEZ, M.; PEDRONI, F.; LEITÃO FILHO, H.F.; CESAR, O. Composição florística de um trecho de floresta ripária na Mata Atlântica em Picinguaba, Ubatuba, SP. **Braz. J. Bot.** v. 22, p. 31-42, 1999.
- SAUER, J.; SIGURSKJOLD, B.W.; CHISTENSEN, U.; FRANDSEN, T.P.; MIRGORODSKAYA, E.; HARRISON, M.; ROEPSTOR, P.; SVENSSON, B. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1543, p.275-293, 2000.
- SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N.S.; GILL, B.S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chem.** v. 81, p. 219-213, 2013.
- SHIBUYA, I.; GOMI, K.; IIMURA, Y.; TAKAHASHI, K.; TAMURA, G. e HARA, S. Molecular cloning of the glucoamylase gene of *Aspergillus shirousami* and its expression in *Aspergillus oryzae*. **Agric. Biol. Chem.** v. 54, p. 1905-1914, 1990.
- SHIPPER, M.A.A. A revision of the genus *Rhizopus*: I. the *Rhizopus stolonifer*-group and *Rhizopus oryzae*. **Stud. Mycol.** v.25, p. 1-34, 1984.
- SILVA, D. M., BATISTA, L. R., REZENDE, E. F.; FUNGARO, M. H. P., SARTORI D.; ALVES, E. Identification of fungi of the genus *A. section nigri* using polyphasic taxonomy. **Braz. J. Microbiol.**, v.42, p. 761-773, 2011.

- SILVA, T.M.; MALLER, A.; DAMÁSIO, A.R.L.; MICHELIN, M.; WARD, R.J.; HIRATA, I.Y.; JORGE, J.A.; TERENZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Properties of a purified thermostable glucoamilase from *Aspergillus niveus*. **Ind. Microbiol. Biotechnol.** v.36, p.1439-1446, 2009.
- SILVA, W.B. E PERALTA, R.M. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *Aspergillus fumigatus*. **Can. J. Microbiol.** v.44, p. 493-497, 1998.
- SISTEMA DE INFORMAÇÕES FLORESTAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO (SIFESP). **Associação da vegetação natural remanescentes e das unidades fisionômico-ecológicas**. Disponível em: < <http://www.iflorestal.sp.gov.br/sifesp/ibge.html>>. Acesso em agosto, 2013.
- SLIVINSKI, C.T.; MACHADO, A.V.L.; IULEK, J.; AYUB, A.; ALMEIDA, M.M. Biochemical Characterisation of a Glucoamylase from *Aspergillus niger* Produced by Solid-State Fermentation. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.54, p. 559-568, 2011.
- SOCOL, C.R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M. E LEBEAULT J.M. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 41, p. 330-336, 1994.
- SOUTHALL, S.M.; SIMPSON, P.J.; GILBERT, H.J.; WILLIAMSON, G.; WILLIAMSON, M.P. The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. **FEBS Letters.** v.447, p.58-60, 1999.
- SPARRINGA, R.A; OWENS J.D. Causes of alkalization in tempe solid substrate fermentation. **Enzyme Microb. Technol**, v.25, p. 677–681, 1999.
- STEENTOF, C.; VAKHRUSHEV, S.Y.; JOSHI, H.J.; KONG, Y.; VESTER-CHRISTENSEN, M.B.; SCHJOLDAGER, K.T.; LAVRSEN, K.; DABELSTEEN, S.; PEDERSEN, N.B.; MARCOS-SILVA, L.; GUPTA, R.; BENNETT, E.P.; MANDEL, U.; BRUNAK, S.; WANDALL, H.H.; LEVERY, S.B.; CLAUSEN, H.; Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. **EMBO. J.** v.32, p.1478-1488, 2013.
- SUTTHIRAK, P.; DHARMSTHITI, S.; LERTSIRI, S. Effect of glycation on stability and kinetic parameters of thermostable glucoamylase from *Aspergillus niger*. **Process Biochem.** v.40, p.2821-2826, 2005.

- SVENSSON, B.; SIERKS, M.R. Roles of the aromatic side chains in the binding of substrates, inhibitors, and cyclomalto-oligosaccharides to the glucoamylase from *Aspergillus niger* probed by perturbation difference spectroscopy, chemical modification, and mutagenesis. **Carbohydr. Res.** v.227, p.29-44, 1992.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.**, v. 28, p. 2731–9, 2011.
- TORNISIELO, S. M; GARLIPP, A.; RUEGGER, M.; ATILLI, D. S.; MALAGUTTI, M. Soilborne filamentous fungi in Brazil. **J. Basic Microbiol.** v.45, p.72-85, 2005.
- TORRES, R.; PESSELA, B.C.C.. MATEO, C.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Reversible immobilization of glucoamylase by ionic adsorption on sepabeads coated with polyethyleneimine. **Biotechnol. Prog.** v.20, p.1297-1300, 2004.
- VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS H.; DIJKHUIZEN L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **J. Biotechnol.** v. 94, p. 137–155, 2002.
- VARGA, J.; KOCSUBÉ S.; TÓTH B.; FRISVAD J. C.; PERRONE, G.; SUSCA, A.; MEIJER, M.; SAMSON, R. A. *A. brasiliensis* sp. nov., a biseriata black *A.* species with worldwide distribution. **Int. J. Syst. Evol. Micr.** v.57, p.1925 -1932. 2007.
- VELOSO, H.P., RANGEL-FILHO, A.L.R. & LIMA, J.C.A. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. **IBGE**, Rio de Janeiro, 1991.
- VENDARAMANA, A.; BALAKUMAR, S.; ARASARATNAM, V. Production and optimization of α -amylase by *Bacillus licheniformis* ATCC 6346 in lab bench-scale fermenter. **J. Microbiol. Biotechnol.** v.2, p. 190-211, 2012.
- VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiol. Mol. Biol. R.** v. 65, p. 1- 43, 2001.

- VIHINEN, M.; MÄNTSÄLÄ, P. Microbial amyolytic enzymes. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** v.24, p.329-417, 1989.
- VOGEL, H. J. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. **Am. Nat.**, v. 98, p. 435-446, 1964.
- WATERSCHOOT, J.; GOMAND, S.V.; FIERENS, E.; DELCOUR, J.A. Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches. **Starch/Stärke**. v.67, p. 14-29, 2015.
- WHITE, T. J., LEE, S., TAILOR, S. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in PCR protocols : a guide to methods and applications**. Academic Press, Inc. San Diego, Califórnia, p. 315-322, 1990.
- WILLIAMSON, G.; BELSHAW, N.J.; WILLIAMSON, M.P. O-Glycosylation in *Aspergillus* glucoamilase. **Biochem. J.** v.282, p.423-428, 1992.
- WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. Ed. Ltd John Wiley e Sons, p 148, 1975.
- YAMASAKI, Y.; SUZUKI, Y.; OZAWA, O. Three forms of α -glucosidase and a glucoamilase from *Aspergillus awamori*. **Agric. Biol. Chem.** v.41, p. 2149 - 2161, 1977.
- ZHONG, L.; TANG, G. e YANG, K. Isolation and sequencing of glucoamylase gene from a glucoamylase over producing strain. **Acta Microbiol. Sin.** v. 34, p. 184-190, 1994.

APÊNDICE A – Identificação morfológica dos fungos selecionados

ADM-REG-019-00

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
COLEÇÃO DE CULTURAS – MICOTECA URM

Recife, 24 de setembro de 2013

A Sra.: Maria Polizeli

Prezada Sra.,

Em resposta a solicitação enviada e registrada sob número 69/13 em resposta a estamos enviando o resultado da identificação das culturas de fungos:

Isolado	Resultado da Identificação
8A – Paula	<i>Rhizopus arrhizus</i> var. <i>arrhizus</i> A. Fisch
6B - Paula	<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.

Atenciosamente,

Cristina Maria de Souza Motta
Curador da Micoteca URM

* Nota: *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* e *Rizhopus oryzae* são um caso de sinonímia.

APÊNDICE B Alinhamento da região do ITS de fungos filamentosos

CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: C:/Users/usuario/paula_aln.ps

Date: Sat Nov 02 12:42:29 2013

Page 1 of 2

CLUSTAL 2.1 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: C:/Users/usuario/paula_aln.ps

Date: Sat Nov 02 12:42:29 2013

Page 2 of 2

```

gb|JX429926.1|Aspergillus oryzae      -----CACCCG-----GTCCGATCCTCGACGCTATGGGCTTTGTCACCCGCTCTG-TAGCCCGGGCC-GGCCCTTCCGCA---ACCCAAATCBAATCTTTCCAGGTGACCTCCCATCAAGGTAGGGATACCCGCTCAAC 553
gb|DQ683124.1|Aspergillus flavus      -----CACCCG-----GTCCGATCCTCGACGCTATGGGCTTTGTCACCCGCTCTG-TAGCCCGGGCC-GGCCCTTCCGCA---ACCCAAATCBAATCTTTCCAGGTGACCTCCCATCAAGGTAGGGATACCCGCTCAAC 549
gb|AF455505.1|Aspergillus nidulans    -----CACCCG-----GTCCGATCCTCGACGCTATGGGCTTTGTCACCCGCTCTG-TAGCCCGGGCC-GGCCCTTCCGCA---ACCCAAATCBAATCTTTCCAGGTGACCTCCCATCAAGGTAGGGATACCCGCTCAAC 555
gb|KC142152.1|Aspergillus fumigatus   -----CACCCG-----GTCCGATCCTCGACGCTATGGGCTTTGTCACCCGCTCTG-TAGCCCGGGCC-GGCCCTTCCGCA---ACCCAAATCBAATCTTTCCAGGTGACCTCCCATCAAGGTAGGGATACCCGCTCAAC 573
gb|FJ717684.1|Aspergillus brasiliensis -----CACCCG-----GTCCGATCCTCGACGCTATGGGCTTTGTCACCCGCTCTG-TAGCCCGGGCC-GGCCCTTCCGCA---ACCCAAATCBAATCTTTCCAGGTGACCTCCCATCAAGGTAGGGATACCCGCTCAAC 548
gb|DQ235784.1|Aspergillus awamori     -----CACCCG-----GTCCGATCCTCGACGCTATGGGCTTTGTCACCCGCTCTG-TAGCCCGGGCC-GGCCCTTCCGCA---ACCCAAATCBAATCTTTCCAGGTGACCTCCCATCAAGGTAGGGATACCCGCTCAAC 584
gb|AF115721.1|Rhizopus rhizopodiformis AATTACCTACCTATCTGCTTTTGTGGTCCAAACCAAAACATAAA-----TCTCGGTTCTCTCTAG-----CCACACAGATA---TTTAAAT---CATCTTT---AACTATGATCTGAACTCAAGTGC----- 638
[DQ641284.1|Rhizopus niveus          -----TATTAC-----G-----CTGGTCTCAGGATTTTTTCTTTGGTTCCGCCAACA---AGTAAGTACAAAGCTATA---ATCCAGC---AACTTTCAAACITGATTTGAAGTCAAGTGGCGAGTACCCGCTCAAC 605
gb|AF115725.1|Rhizopus oryzae        -----TATTAC-----G-----CTGGTCTCAGGATTTTTTCTTTGGTTCCGCCAACA---AGTAAGTACAAAGCTATA---ATCCAGC---AACTTTCAAACITGATTTGAAGTCAAGTGGCGAGTACCCGCTCAAC 572
gb|JN943002.1|Rhizopus delemar       -----TATTAC-----G-----CTGGTCTCAGGATTTTTTCTTTGGTTCCGCCAACA---AGTAAGTACAAAGCTATA---ATCCAGC---AACTTTCAAACITGATTTGAAGTCAAGTGGCGAGTACCCGCTCAAC 575

```

```

gb|JX429926.1|Aspergillus oryzae      TTAACCATATCAAA----- 567
gb|DQ683124.1|Aspergillus flavus      TTAACCATATCAATAACCCGACCAAA 575
gb|AF455505.1|Aspergillus nidulans    TTAACCATATCAATAACCCGACCA 579
gb|KC142152.1|Aspergillus fumigatus   TTAACCATATCAATAACCCGACCA 597
gb|FJ717684.1|Aspergillus brasiliensis TTAAC----- 552
gb|DQ235784.1|Aspergillus awamori     TTAACCATATCAATAACCCGACCA 608
gb|AF115721.1|Rhizopus rhizopodiformis TTAACCATATCAATAACCCGACCA 638
[DQ641284.1|Rhizopus niveus          TTAACCATATCAATAACCCGACCA 629
gb|AF115725.1|Rhizopus oryzae        TTAACCATATCAATAACCCGACCA 572
gb|JN943002.1|Rhizopus delemar       TTAACCATATCAATAACCCGACCA 575

```

APÊNDICE C Alinhamento das sequências de aminoácidos de glucoamilases de fungos filamentosos

	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
A.niger	DSEAVAVGRYPETTYN	----	GNEWFLCTLAAP	QIYDALYQWDKQGS	EVTDVSLDFFKALYS	DAATG--	TYSSSSSTYSSVDA	KTFAGFVSI	ETHAASNGSMSEQY	SDGEQLSA			
A.awamori	DSEAVAVGRYPETTYN	----	GNEWFLCTLAAP	QIYDALYQWDKQGS	EVTDVSLDFFKALYS	DAATG--	TYSSSSSTYSSVDA	KTFAGFVSI	ETHAASNGSMSEQY	SDGEQLSA			
A.ficum	DSEAVAVGRYPETTYN	----	GNEWFLCTLAAP	QIYDALYQWDKQGS	EVTDVSLDFFKALYS	DAATG--	TYSSSSSTYSSVDA	KTFAGFVSI	ETHAASNGSMSEQY	SDGEQLSA			
A.shirousami	DSEAVAVGRYPETTYN	----	GNEWFLCTLAAP	QIYDALYQWDKQGS	EVTDVSLDFFKALYS	DAATG--	TYSSSSSTYSSVDA	KTFAGFVSI	ETHAASNGSMSEQY	SDGEQLSA			
A.brasiliensis	DSEAVAVGRYPETTYN	----	GNEWFLCTLAAP	QIYDALYQWDKQGS	EVTDVSLDFFKALYS	DAATG--	TYSSSSSTYSSVDA	KTFAGFVSI	ETHAASNGSMSEQY	SDGEQLSA			
A.oryzae	ENQAVAVGRYPETTYN	----	GNEWFLCTLAAP	QIYDALYQWDKQGS	EVTDVSLDFFKALYS	DAATG--	TYSSSSSTYSSVDA	KTFAGFVSI	ETHAASNGSMSEQY	SDGEQLSA			
R.oryzae	SYLGNSIGRYPETTYN	NGNSQ	GNSWFLAVTG	YALYRAIKEN	IGNGGVTVSS	ISIPFEKKFDS	SATSGKKYTVG	TSDFNNAQNT	ALAAIRFELST	QLHAHNNGSLAE	EFFIRTTGLSTGA		
Clustal Consensus	. . . : : : : : *		** *		* . . . *	* : : *	* : : : : *	* : *	* : : : : *	** : : *	* : *	. . . : : : : *	

	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720
A.niger	SARCLTWSYAALLTANNR	NSVVPASWGETS	SASSVPGTCAATS	SAIGTYSSVTVT	SWPSIVATG	-GTTTTATPTG	SGSVTSTS	KTTATASKT	STSTSSSTS	CTTPTAVAVTF	DLTATTTY	GENIY	
A.awamori	SARCLTWSYAALLTANNR	NSVVPASWGETS	SASSVPGTCAATS	SAIGTYSSVTVT	SWPSIVATG	-GTTTTATPTG	SGSVTSTS	KTTATASKT	STSTSSSTS	CTTPTAVAVTF	DLTATTTY	GENIY	
A.ficum	SARCLTWSYAALLTANNR	NSVVPASWGETS	SASSVPGTCAATS	SAIGTYSSVTVT	SWPSIVATG	-GTTTTATPTG	SGSVTSTS	KTTATASKT	STSTSSSTS	CTTPTAVAVTF	DLTATTTY	GENIY	
A.shirousami	SARCLTWSYAALLTANNR	NSVVPASWGETS	SASSVPGTCAATS	SAIGTYSSVTVT	SWPSIVATG	-GTTTTATPTG	SGSVTSTS	KTTATASKT	STSTSSSTS	CTTPTAVAVTF	DLTATTTY	GENIY	
A.brasiliensis	SARCLTWSYAALLTANNR	NSVVPASWGETS	SASSVPGTCAATS	SAIGTYSSVTVT	SWPSIVATG	-GTTTTATPTG	SGSVTSTS	KTTATASKT	STSTSSSTS	CTTPTAVAVTF	DLTATTTY	GENIY	
A.oryzae	SARCLTWSYAALLTANNR	NSVVPASWGETS	SASSVPGTCAATS	SAIGTYSSVTVT	SWPSIVATG	-GTTTTATPTG	SGSVTSTS	KTTATASKT	STSTSSSTS	CTTPTAVAVTF	DLTATTTY	GENIY	
R.oryzae	GAPCLTWSHASLITASYA	AGAPAA											
Clustal Consensus	 *		* : *										

	720	730	740	750	760	770	780	790	800
A.niger	NIYLVGSISQIGD	WETSDGIALSAD	KYTSSDPLWYVTV	TLPAGESFEYK	FIRIESDDSV	EWESDPNREY	TVVPQACGT	STATVTD	TWR
A.awamori	NIYLVGSISQIGD	WETSDGIALSAD	KYTSSDPLWYVTV	TLPAGESFEYK	FIRIESDDSV	EWESDPNREY	TVVPQACGT	STATVTD	TWR
A.ficum	NIYLVGSISQIGD	WETSDGIALSAD	KYTSSDPLWYVTV	TLPAGESFEYK	FIRIESDDSV	EWESDPNREY	TVVPQACGT	STATVTD	TWR
A.shirousami	NIYLVGSISQIGD	WETSDGIALSAD	KYTSSDPLWYVTV	TLPAGESFEYK	FIRIESDDSV	EWESDPNREY	TVVPQACGT	STATVTD	TWR
A.brasiliensis	SIYLVGSISQIGD	WETSDGIALSAD	KYTSSDPLWYVTV	TLPAGESFEYK	FIRIESDDSV	EWESDPNREY	TVVPQACGT	STATVTD	TWR
A.oryzae	SIKIVGSISQIGS	WNPSSATALNAD	SYTTDNPLWTG	TINLPAGQSFEYK	FIRVQNG-AV	TWESDPNRY	TVVPSTCGVKS	AVQSDV	W
R.oryzae									
Clustal Consensus									

APÊNDICE D Predição computacional de estrutura secundária da glucoamilase