



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

LAYANA DE SOUSA FERREIRA

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS COM CAPACIDADE AMIOLÍTICA
OBTIDOS A PARTIR DE FUNGOS ISOLADOS DE BEIJUS DE MANDIOCA
EMBOCORADOS.**

SÃO LUIS

2022

LAYANA DE SOUSA FERREIRA

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS COM CAPACIDADE AMIOLÍTICA
OBTIDOS A PARTIR DE FUNGOS ISOLADOS DE BEIJUS DE MANDIOCA
EMBOLORADOS**

Monografia apresentada ao curso de Química Bacharelado da Universidade Federal do Maranhão como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gilza Maria Piedade Prazeres.

SÃO LUIS

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Ferreira, Layana de Sousa.

Obtenção de extratos enzimáticos com capacidade amilolítica obtidos a partir de fungos isolados de beijos de mandioca embolorados / Layana de Sousa Ferreira. - 2022.

50 p.

Orientador(a): Gilza Maria Piedade Prazeres.
Monografia (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2022.

1. Amilase. 2. Aspergillus. 3. Enzimas amilolíticas.
I. Piedade Prazeres, Gilza Maria. II. Título.

LAYANA DE SOUSA FERREIRA

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS COM CAPACIDADE AMIOLÍTICA
OBTIDOS A PARTIR DE FUNGOS ISOLADOS DE BEIJUS DE MANDIOCA
EMBOLOSADOS**

Monografia apresentada ao curso de Química Bacharelado da Universidade Federal do Maranhão como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gilza Maria Piedade Prazeres.

Aprovado em __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Gilza Maria Piedade Prazeres (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a MSc.^a Francisca Socorro Nascimento Taveira
Universidade Federal do Maranhão

MSc.^a Kátia Regina Assunção Borges
Universidade Federal do Maranhão – Programa de Doutorado da Rede Nordeste – Doutorado em Biotecnologia.

*Aos meus pais, Aldenir e Lucileia, por todo amor,
apoio e torcida.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida, saúde e capacidade para que eu chegasse até aqui.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Gilza Maria, pela disponibilidade, orientação, ensinamentos, incentivo, conselhos e toda ajuda prestada durante a realização deste trabalho e durante o curso.

Aos meus pais, pelo esforço financeiro para assegurar a continuidade dos meus estudos, apoio, torcida e por estarem ao meu lado.

Ao Rafael Furtado, por todo amor, companheirismo, apoio, incentivo e por acreditar no meu potencial mesmo quando eu não acreditava.

Aos meus parceiros e grandes amigos de curso, David Nunes e Kassia Lays, pela parceria nos estudos, pela amizade sincera, ajuda nos momentos difíceis, apoio quando necessário, alegria e momentos de descontração durante toda a trajetória do curso.

Aos meus amigos, Daniel Furtado, Rosane Louzeiro e Aleksander Lomas, por todas risadas, ajuda no momento de sufoco, torcida e fofocas compartilhadas.

Ao Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) pela disponibilidade do local e equipamentos. Especialmente a Kátia e a Rita pelos conhecimentos compartilhados.

Aos mestrandos Fernanda Lima e Allysson Kayron do NIBA pelas dicas e ajuda nos experimentos.

Ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Fisiologia pela disponibilidade dos equipamentos.

A toda minha família, irmão, sobrinho, madrinhas, primos, tias e tios.

A todos os meus professores por todos os ensinamentos transmitidos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e conclusão do curso.

“Faça ou não faça, tentativa não há. ”

(Yoda, Star Wars)

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo obter extratos enzimáticos capazes de degradar biomassas que contenham amido. Os extratos foram obtidos a partir de fungos isolados de beijos de mandioca embolorados. O cultivo e isolamento dos fungos foi realizada por meio da técnica de diluição seriada do caldo do beiju embolorado e semeio em meio de cultura. No total foram isolados cinco fungos filamentosos sendo eles, o *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Scopulariopsis* sp., *Rhizopus* sp. e *Penicillium* sp.. As linhagens foram analisadas quanto a produção de amilase a partir de ensaio amilolítico utilizando Lugol como indicador. Todos os fungos isolados se mostraram capazes de produzir enzimas amilolíticas, sendo que *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Scopulariopsis* sp. apresentaram maior halo de degradação indicando que possuem maior produção de amilases. Extratos enzimáticos dos fungos isolados foram então obtidos pelo processo de fermentação em estado solido. As proteínas totais dos extratos foram quantificadas pelo método de Bradford. Os extratos que apresentaram maior quantidade de proteínas foram os do *Aspergillus niger* com 0,9 mg/ml, do *Penicillium* sp. com 0,7 mg/ml e do *Scopulariopsis* sp. com 0,59 mg/ml. Para se analisar a presença de amilase nos extratos foi realizado um ensaio de hidrólise utilizando amido gelatinizado, o extrato enzimático obtido e Lugol como indicador da degradação do amido. Observou-se grande descoloração pelo extrato do *Aspergillus niger*, pequena descoloração pelo *Penicillium* sp. e descoloração intermediária pelas demais linhagens. A quantificação dos açúcares redutores produzida pelo extrato enzimático de cada fungo foi realizada pelo método de Miller (DNS). As maiores concentrações de açúcares redutores foram produzidas pelos extratos de *Aspergillus niger* (0,9 g/L), *Aspergillus flavus* (0,6 g/L) e *Scopulariopsis* sp. (0,5 g/L). Dessa forma, os fungos isolados demonstraram capacidade de degradação de materiais contendo amido, uma vez que, são produtores de amilase.

Palavras-chave: Enzimas amilolíticas, *Aspergillus*, amilase.

ABSTRACT

The present work aimed to obtain enzymatic extracts capable of degrading biomass containing starch. The extracts were obtained from fungi isolated from moldy cassava beijus. The cultivation and isolation of the fungi was carried out using the technique of serial dilution of the moldy beiju broth and seeded in a culture medium. In total, five filamentous fungi were isolated, namely *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Scopulariopsis* sp., *Rhizopus* sp. and *Penicillium* sp. The strains were analyzed for amylase production from an amylolytic assay using Lugol as an indicator. All isolated fungi were able to produce amylolytic enzymes, and *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Scopulariopsis* sp. showed higher degradation halo indicating that they have higher production of amylases. Enzymatic extracts of the isolated fungi were then obtained by the solid-state fermentation process. The total proteins of the extracts were quantified by the Bradford method. The extracts that showed the highest amount of proteins were those of *Aspergillus niger* with 0.9 mg/ml, of *Penicillium* sp. with 0.7 mg/ml and *Scopulariopsis* sp. with 0.59 mg/ml. To analyze the presence of amylase in the extracts, a hydrolysis test was performed using gelatinized starch, the enzymatic extract obtained and Lugol as an indicator of starch degradation. Large discoloration by *Aspergillus niger* extract, small discoloration by *Penicillium* sp. and intermediate discoloration by the other strains. The quantification of reducing sugars produced by the enzymatic extract of each fungus was performed using the Miller method (DNS). The highest concentrations of reducing sugars were produced by extracts of *Aspergillus niger* (0.9 g/L), *Aspergillus flavus* (0.6 g/L) and *Scopulariopsis* sp. (0.5 g/L). Thus, the isolated fungi demonstrated the ability to degrade materials containing starch, since they are amylase producers.

Keywords: amylolytic enzymes, *Aspergillus*, amylase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da molécula de (a) amilose e (b) amilopectina.....	18
Figura 2. Modelo chave- fechadura de Emil Fischer	20
Figura 3. Origem das enzimas no mercado global.	21
Figura 4. Etapas do cultivo dos fungos.	25
Figura 5. Etapas da diluição seriada e o semeio dos fungos.	25
Figura 6. Kit utilizado para microcultivo de fungos.	26
Figura 7. Beiju embolorado coletado de Urbano Santos.....	30
Figura 8. Colônias crescidas em meio de cultura BDA, sete dias após o semeio.	30
Figura 9. Fungos isolados do beiju embolorado coletado.	31
Figura 10. Microscopia de <i>Aspergillus niger</i> (fungo F1) corado com Lactofenol aumento de (a) e (b) 10x e (c) 100x.	32
Figura 11. Microscopia corada com Lactofenol de <i>Aspergillus flavus</i> (fungo F2) aumento de 20x.	32
Figura 12. Microscopia corado com Lactofenol de <i>Scopulariopsis</i> sp. (fungo F3) aumento de 40x.	33
Figura 13. Microscopia corada com Lactofenol de <i>Rhizopus</i> sp. (fungo F4) aumento de 20x.	34
Figura 14. Microscopia corado com Lactofenol de <i>Penicillium</i> sp. (fungo F5) aumento de 10x.	34
Figura 15. Fungo <i>Aspergillus niger</i> em (a) Ágar Batata, (b) Ágar Sabouraud, (c) Ágar Czapek.	35
Figura 16. Fungo <i>Aspergillus flavus</i> em (a) Ágar Batata, (b) Ágar Sabouraud, (c) Ágar Czapek.	36
Figura 17. Fungo <i>Scopulariopsis</i> sp. em (a) Ágar Batata, (b) Ágar Sabouraud, (c) Ágar Czapek.	36
Figura 18. Fungo <i>Rhizopus</i> sp. em (a) Ágar Batata, (b) Ágar Sabouraud, (c) Ágar Czapek. .	37
Figura 19. Fungo <i>Penicillium</i> sp. em (a) Ágar Batata, (b) Ágar Sabouraud, (c) Ágar Czapek.	37
Figura 20. Ensaio de amilase dez dias após o semeio de (a) Branco, (b) <i>Aspergillus niger</i> , (c) <i>Aspergillus flavus</i> , (d) <i>Scopulariopsis</i> sp., (e) <i>Rhizopus</i> sp., (f) <i>Penicillium</i> sp.....	39
Figura 21. Meios fermentativos após 120h do semeio, (a) <i>Aspergillus niger</i> , (b) <i>Aspergillus flavus</i> , (c) <i>Rhizopus</i> sp., (d) <i>Scopulariopsis</i> sp., (e) <i>Penicillium</i> sp.	40

Figura 22. Curva padrão de BSA e equação da reta.	41
Figura 23. Suspensão de amido em (a) antes, (b) após aquecimento.	42
Figura 24. Ensaio de hidrólise do amido utilizando o extrato enzimático dos fungos (a) Branco, (b) <i>Aspergillus niger</i> , (c) <i>Aspergillus flavus</i> , (d) <i>Scopulariopsis</i> sp., (e) <i>Rhizopus</i> sp., (f) <i>Penicillium</i> sp.	43
Figura 25. Curva padrão de glicose e equação da reta.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características macroscópicas dos fungos isolados.....	31
Tabela 2. Quantificação de proteínas dos extratos enzimáticos dos fungos isolados utilizando método de Bradford.....	41
Tabela 3. Quantificação dos açúcares redutores dos extratos enzimáticos dos fungos isolados utilizando método de Miller.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos geral.....	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1 Mandioca.....	16
3.2 Amido.....	16
3.3 Enzimas.....	19
3.3.1 Amilase.....	22
3.4 Fungos.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Meios de cultura	24
4.2 Coleta do beiju de mandioca	24
4.3 Cultivo dos fungos.....	24
4.4 Identificação dos fungos	26
4.5 Ensaio da atividade amilolítica.....	27
4.6 Fermentação em estado solido (FES)	27
4.7 Quantificação de proteínas	27
4.8 Ensaio de hidrólise do amido.....	28
4.9 Quantificação dos açúcares redutores e determinação da atividade enzimática.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	30
5.1 Coleta do beiju.....	30
5.2 Cultivo dos fungos.....	30
5.3 Identificação dos fungos.....	31
5.4 Ensaio da atividade amilolítica.....	38

5.5 Fermentação em estado sólido.....	40
5.6 Ensaio de hidrólise do amido	42
5.7 Quantificação dos açúcares redutores e determinação da atividade enzimática.....	44
6 CONCLUSÃO.....	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são proteínas que catalisam reações que ocorrem nas células e por isso estão envolvidas em diversos processos bioquímicos. As enzimas possuem especificidade de substrato e são denominadas a partir disso.

Uma reação catalisada por enzimas ocorre em condições brandas de temperatura e pressão e sem gerar subprodutos indesejados. Assim, reações enzimáticas reduzem gastos com energia, com processos de purificação do produto final e com descarte de subprodutos. Dessa forma, o uso de biocatalisadores tornam o processo mais seguro e eficientes energeticamente (TEIXEIRA; MILAGRE, 2020). Porém, perda da eficiência catalítica devido a variações de pH e a altas temperaturas são desvantagens para a utilização de enzimas em processos industriais (MONTEIRO; SILVA, 2009).

O uso de enzimas é um dos campos mais promissores no desenvolvimento de produtos como papéis, detergentes, biocombustíveis, alimentos, fármacos e tecidos (RIGO *et al.* 2021). Essas aplicações têm impulsionado pesquisas relacionadas a catálise enzimática, visando a compreensão da estabilidade, estrutura e mecanismos da ação enzimática (HOLLIDAY *et al.*, 2007).

As enzimas mais utilizadas são obtidas a partir de microrganismos como fungos e bactérias, entretanto também podem ser obtidas de outras fontes como animal e vegetal. Mais da metade das enzimas industriais são produzidas por leveduras e fungos filamentosos e 8% são produzidos por animais e 4% por plantas (RIGO *et al.* 2021; MONTEIRO; SILVA 2009)

No Maranhão, fabrica-se uma aguardente artesanal que é consumida popularmente denominada tiquira. A matéria-prima para a produção dessa bebida é a mandioca cuja raiz é rica em amido. A produção de bebidas alcoólicas fermentadas a partir de biomassas amiláceas existe há muitos séculos e utiliza diferentes tipos de matérias-primas como grãos, tubérculos, cana-de-açúcar, frutas nativas e entre outros como substrato. A fermentação para a produção dessas bebidas alcoólicas ocorre através da ação de enzimas produzidas por microrganismos (GOUVEIA, 2018).

Na produção da tiquira, beijus de mandioca são expostos ao ar por sete dias para que sejam embolorados. Em seguida, são imersos em água e fermentados. Depois de alguns dias é obtido um mosto que é destilado. Os beijus são preparados a partir de raízes de mandioca

descascada, ralada e prensada e depois de ser assado apresenta o amido gelatinizado e mais suscetível a ação das enzimas (RIBEIRO, 2011). Durante o emboloramento dos beijos ocorre a inoculação natural de fungos presentes no ambiente. Esses fungos são os principais produtores de enzimas que degradam o amido da mandioca em açúcares fermentescíveis. Leveduras que também crescem nos beijos convertem os açúcares fermentescíveis em etanol e possibilitam a produção da bebida (BASTOS, 2013).

Estudos têm mostrado que os beijos de mandioca embolorados utilizados para a produção da tiquira, apresentam fungos que podem ter interesse científico e tecnológico (BASTOS, 2013; RIBEIRO, 2011). A identificação das atividades enzimáticas produzidas por tais fungos pode levar a obtenção de produtos como etanol a partir de outras biomassas como mesocarpo e epicarpo de babaçu, farinha de milho e casca de arroz ou ainda, acelerar processos biológicos como a compostagem (NOVELLI, 2016).

Dessa forma, o uso de extratos enzimáticos obtidos a partir desses fungos podem contribuir com o aumento da produção de etanol, para a redução uso de combustíveis fósseis, para a redução da poluição e acúmulo de resíduos no ambiente além de levar a obtenção de produtos com importância biotecnológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos geral

Obter extratos enzimáticos de fungos capazes de degradar biomassas amiláceas.

2.2 Objetivos específicos

Isolar e identificar as linhagens de fungos presentes em beijos embolorados;

Avaliar o potencial de produção de enzimas amilolíticas por fungos que crescem em beijos de mandioca.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Mandioca

A planta mandioca que possui nome científico *Manihot esculenta*, faz parte das oitenta espécies do gênero *Manihot* que ocorre no Brasil (ERENO, 2008). Segundo Santana (2007) é uma raiz tuberosa da família Euphorbiaceae, rica em amido e originária do continente americano. No Brasil, a mandioca tem grande importância agrícola e é o quarto maior produtor mundial de mandioca, ficando atrás da Nigéria, Tailândia e Indonésia (CONAB, 2018). Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Amido de Mandioca (2022), em 2021 o Pará apresentou números recordes da safra de mandioca e foi consolidado como o maior produtor brasileiro, com 22% de toda a produção.

A mandioca é consumida tanto *in natura* como para a produção de farinhas. Na indústria, é utilizada para preparar alimentos como o polvilho e também é utilizada na indústria farmacêutica, cosmética e pode ser utilizada na produção de ração animal (SILVA, *et al.*, 2018). Desempenha um importante papel social e econômico, sendo uma fonte de renda de diversos produtores, principalmente às pessoas de baixa renda.

Possui a vantagem de fácil propagação e rendimento satisfatórios mesmo em solos de baixa fertilidade, o que favorece a capacidade de produção mesmo em condições adversas em que o crescimento de outras culturas é inviável (SANTANA, 2007). Outra característica agrônômica reside na possibilidade de as raízes serem armazenadas no próprio solo, por um período razoável, sem perdas significativas de qualidade (CAMILI, 2010).

A mandioca é reconhecida por possuir uma grande quantidade de carboidratos em sua composição, sendo um deles o amido (BASTOS, 2013). É possível encontrar desde açúcares simples até glicosídeos e material celulósico (CAMILI, 2010). O alto teor de amido na mandioca a torna um grande potencial para a produção de etanol. Segundo Ereno (2008), enquanto 1 tonelada de cana-de-açúcar produz 85 litros de álcool, 1 tonelada de mandioca com rendimento de 33% de amido e 2% de açúcares pode produzir 211 litros de álcool combustível.

3.2 Amido

O amido é o principal polissacarídeo de armazenamento nas células vegetais (ESCARAMBONI, 2014). É formado por moléculas de glicose unidos entre si por ligações glicosídicas e é constituído principalmente por dois polissacarídeos, a amilose e a amilopectina

(DENARDIN; SILVA, 2009). É sintetizado nos plastídios presentes nas folhas e acumula-se como grânulos que possuem diferenças polimórficas e graus de cristalinidade (ESCARAMBONI, 2014).

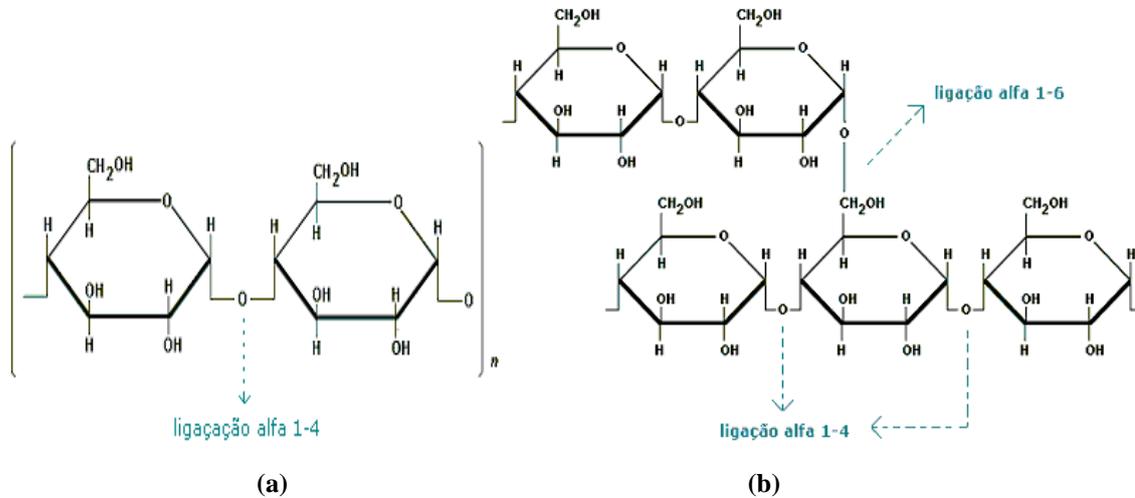
Apresenta-se em forma de grãos inerte, sem sabor e inodoro e pode ser encontrado em diversos vegetais como a batata, arroz, mandioca entre outros. Na mandioca o amido puro possui coloração branco e é facilmente extraído devido à baixa quantidade de proteínas, gorduras e outros componentes nas raízes (MARTINEZ, 2016). Os grânulos do amido são mantidos unidos por ligações de hidrogênio no meio dos polímeros, amilose e amilopectina (CAMILI, 2010).

A proporção de amilose e amilopectina presente é variável de acordo com a fonte vegetal e espécie, essa proporção influenciam na viscosidade e gelatinização do amido. Outros fatores que podem influenciar nas características são as condições climáticas e o tempo de cultivo (MARTINEZ, 2016).

A amilose é um polissacarídeo de cadeia linear insolúvel em água. Segundo Escaramboni (2014) é composto por até 6000 unidades de glicose unidas por ligações do tipo α -(1,4). De acordo com Santana (2007), o conteúdo de amilose no grânulo de amido pode ser um dos fatores envolvidos na resistência do amido no processo de hidrólise. Possui estrutura helicoidal que permite a acomodação de átomos de iodo formando um composto de cor azul intensa, essa reação é muito utilizada em testes para detectar a presença de amido (CAMILI, 2010).

A amilopectina é um polímero ramificado e possui cadeias lineares curtas com 10 a 60 unidade de glicose unidas por ligações α -(1,4) e cadeias laterais com 15 a 45 unidades de glicose unidas por ligações α -(1,6) (ESCARAMBONI, 2014).

Figura 1. Estrutura química da molécula de (a) amilose e (b) amilopectina.



Fonte: RIBEIRO (2011).

As substâncias amiláceas após sofrer hidrólise e ter o amido quebrado em moléculas menores podem se transformar em açúcares fermentáveis e ser convertido em álcool (BASTOS, 2013). A hidrólise total do amido produz moléculas de glicose, enquanto a hidrólise parcial produz moléculas de maltose (CAMILI, 2010). A taxa de hidrólise depende da distribuição das camadas cristalinas e semicristalinas do grânulo e seu tamanho, além da interação dos seus constituintes (SANTANA, 2007). A hidrólise pode acontecer por via enzimática e também por via ácida.

A hidrólise ácida do amido ocorre por tratamento com uma solução ácida como ácido clorídrico, ácido sulfúrico ou ácidos orgânicos e a reação se inicia quando os íons hidroxônios (H_3O^+) atacam os átomos de oxigênio das ligações glicosídicas do amido (BORBA *et al.* 2021). O ácido reage com o amido, rompendo as ligações α -(1,6) mais vulneráveis e consequentemente reduzindo as ramificações do grânulo. A reação passa a ser mais lenta, quando o ácido interage com as regiões cristalinas do grânulo, rompendo as ligações α -(1,4) de sua estrutura linear (MARTINS, 2020). Essa hidrólise é eficiente para a degradação do amido, porém possui algumas desvantagens como a produção de resíduos poluentes e produtos que inibem a fermentação posterior (BASTOS, 2013). Entretanto apesar da maior dificuldade de obtenção de açúcares redutores pela hidrólise ácida em relação à hidrólise enzimática, esta apresenta menores custos de processo (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Na hidrólise enzimática, uma enzima amilolítica quebra a molécula de amido em compostos com menor massa molecular como maltodextrina e dextrina (OH *et al.*, 2019). A utilização de enzimas para a degradação do amido torna o processo mais seguro e mais

favorável ambientalmente, além de fornecer melhores rendimentos (BORBA *et al.* 2021). Embora a utilização de enzimas traga muitas vantagens, há fatores que limitam o seu uso em processos industriais, dentre eles a vulnerabilidade a variações de pH e temperatura que podem desativar a atividade enzimática (MONTEIRO; SILVA, 2009)

No processo de hidrólise enzimática após o preparo da matéria prima, é necessário ocorrer a gelatinização e depois a sacarificação do amido (BASTOS, 2013). A gelatinização ocorre na presença de água e calor para provocar a expansão dos grânulos do amido (RIBEIRO, 2011). Uma suspensão aquosa de amido é aquecida e as ligações enfraquecidas permitem que os grânulos possam absorver água. Esse processo pode acontecer em diferentes faixas de temperatura dependendo da fonte vegetal (CAMILI, 2010).

Após a gelatinização, ocorre a sacarificação, onde as ligações do amido são rompidas e quanto mais completo esse rompimento, maior o rendimento em açúcares (RIBEIRO, 2011). Após essas duas etapas o amido é transformado em açúcares capazes de serem fermentados (BASTOS, 2013).

3.3 Enzimas

O termo enzima (do grego “en” que significa dentro e “zyme” que significa levedura) foi introduzido pela primeira vez por volta de 1878 por Willian Kühne para designar as substâncias contidas nos extratos de levedura usados em fermentação (MONTEIRO; SILVA, 2009). São macromoléculas de origem proteicas que catalisam reações (FERNANDES, 2009). São substâncias sólidas, mas difíceis de serem cristalizadas devido suas estruturas (SANTANA, 2007).

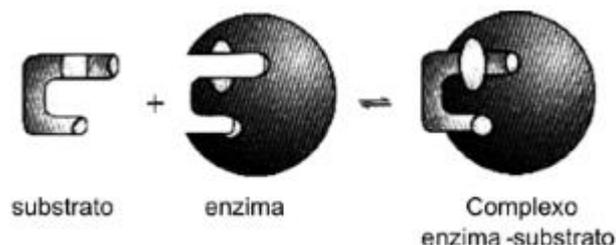
Segundo Monteiro e Silva (2009), as enzimas são divididas em seis classes de acordo com o tipo de reações que catalisam, sendo elas:

- i. Oxirredutases: catalisam reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons.
- ii. Transferases: transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil, entre moléculas.
- iii. Hidrolases: catalisam reações de hidrólise de ligação covalente.
- iv. Liases: adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos deixando dupla ligação
- v. Isomerases: reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos.
- vi. Ligases: condensação de duas moléculas, sempre às custas de energia, geralmente do ATP.

Segundo Fernandes (2009) as enzimas constituem um dos mais importantes grupos de produtos biológicos de necessidade humana e são provavelmente as moléculas biológicas mais intensamente estudadas (CINELLI, 2012). Algumas reações bioquímicas como digestão de alimentos, envio de sinais através dos nervos e contração de músculos não ocorrem em velocidade útil sem catálise. A enzima, portanto contorna esses problemas tornando as reações energeticamente favoráveis (SANTANA, 2007). As enzimas evoluíram para catalisar determinadas reações com substratos naturais específicos e em condições reacionais fisiológicas (TEIXEIRA; MILAGRE, 2020).

As enzimas são capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores, catalisar alterações estruturais dentro de uma molécula e até mesmo ajudar a construir moléculas específicas (GONÇALVES, 2016). Para que ocorra a ação enzimática é necessário que a enzima encaixe perfeitamente no substrato de forma que os centros ativos coincidam (OLIVEIRA JUNIOR, 2014). Esse encaixe ocorre porque tanto as enzimas quanto os substratos são complementares geometricamente, daí o motivo da especificidade das enzimas, isso foi postulado por Emil Fischer em 1894 e ficou conhecido como modelo “chave-fechadura” (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Figura 2. Modelo chave- fechadura de Emil Fischer



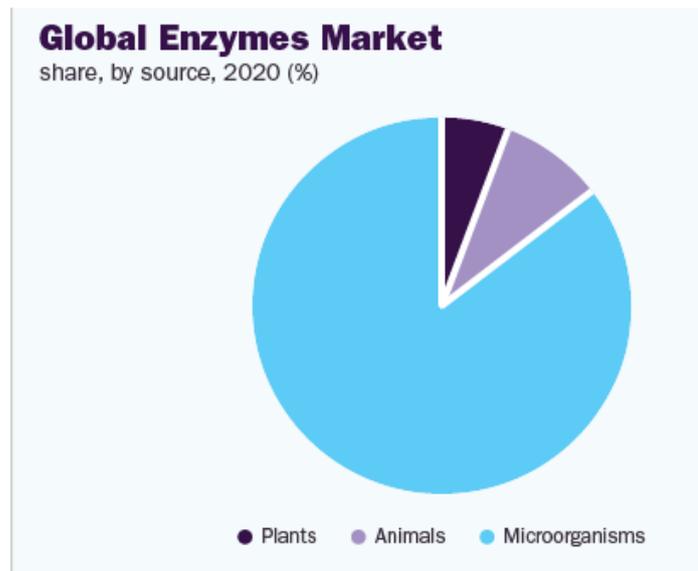
Fonte: MONTEIRO e SILVA (2009)

Na catálise enzimática, a enzima reduz a energia de ativação da reação que se torna termodinamicamente e cineticamente favorável (CINELLI, 2012). Cada enzima possui um valor ótimo de pH e temperatura, no qual a atividade da enzima é máxima (MONTEIRO; SILVA, 2009). Dessa forma, a ação catalítica das enzimas pode ser influenciada por altas temperaturas e pH alto pois pode ocorrer a desnaturação da proteína (BASTOS, 2013). Algumas enzimas possuem além da sua característica de especificidade a habilidade de se ligar a substratos diferentes e catalisar reações diferentes de suas reações naturais, ainda que em baixos níveis de atividade (TEIXEIRA; MILAGRE, 2020).

As enzimas possuem cada vez mais participação no mercado global devido à grande procura por processos e tecnologias ecologicamente corretas. Segundo o relatório do Grand View Research, em 2020, o mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 10,69 bilhões e espera-se a expansão a uma taxa de crescimento anual composta de 6,5% de 2021 a 2028. Segundo o mesmo relatório, o segmento industrial dominou o mercado com uma participação superior a 55% em 2020, isso ocorre devido a ampla aplicação das enzimas na fabricação de bebidas, queijos, na indústria têxtil, em produtos de panificação e várias outras áreas industriais.

Em relação a origem, podem ser tanto de origem animal e vegetal, como a papaína proveniente do mamão assim como podem ser de origem microbiana. Segundo Escaramboni (2014) as fúngicas são mais vantajosas devido a capacidade de produção em grandes quantidades e facilidade de manipulação. Segundo o relatório do Grand View Reserch, as enzimas provenientes de microrganismos dominaram o mercado com uma participação de 80% em 2020 sendo que as de origem vegetal ficaram em último lugar como mostra a Figura 3, isso ocorre devido a crescente procura por microrganismos produtores de enzimas. Para uso das enzimas microbianas ser mais satisfatórias do que as de origem animal e vegetal é necessário que os microrganismos produtores de enzimas tenham bom rendimentos na produção das enzimas, ser de fácil cultivo e fácil manipulação (FERNANDES, 2009).

Figura 3. Origem das enzimas no mercado global.



Fonte: Grand View Reserch (2021).

Dentre as várias enzimas utilizadas no setor industrial destacam-se as amilases, enzimas que promovem a hidrólise do amido presente nos produtos de origem vegetal (GONÇALVES, 2016).

3.3.1 Amilase

As amilases são enzimas que possuem como substrato o amido. Compreendem umas grandes variedades de enzimas que atuam para quebrar os polissacarídeos amilose e amilopectina do amido transformando em glicose (ESCARAMBONI, 2014). São as mais antigas na indústria de enzimas e fazem parte da classe das hidrolases (FERNANDES, 2009). E agem especificamente sobre as ligações glicosídicas do amido (SANTANA, 2007). As enzimas amilolíticas são classificadas como α -amilases, β -amilases, amiloglucosidases e isoenzimas e cada uma possui um mecanismo diferente de catálise (MARTINEZ, 2016).

As α -amilases fazem parte do grupo das endoamilases ou endoenzimas e agem na liquefação do amido (ESCARAMBONI, 2014). Essa enzima catalisa a hidrólise de ligações α -(1,4) no interior do polímero de forma aleatória gerando produtos lineares e ramificados (CINELLI, 2012). Como as ligações são rompidas casualmente dentro da molécula de amido é formado pequenas cadeias de dextrose, denominadas de dextrinas, dessa forma a pasta de amido torna-se gelatinizada e menos consistente (BASTOS, 2013).

A β -amilase faz parte do grupo das exoamilases, conhecidas também como enzimas sacarificantes (ESCARAMBONI, 2014). Atua sobre ligações α -(1,4) a partir de terminais não redutores da cadeia e o principal produto de hidrólise é a β -maltose (CINELLI, 2012). A ação da β -amilase diminui e para de agir à medida que se aproxima dos pontos de ligação α -(1,6) da amilopectina (SANTANA, 2007).

Outra enzima que atua sobre o amido é a amiloglucosidase que hidrolisa as ligações α -(1,4) e α -(1,6) produzindo glicose (BASTOS, 2013). Também é uma exoenzima com ação lenta na amilose pois só atua a partir da extremidade não-redutora e não penetra no interior da estrutura helicoidal da amilose (RIBEIRO, 2011). A isoamilase ou isoenzimas são enzimas desramificadoras que hidrolisam exclusivamente as ligações glicosídicas do tipo α -(1,6) (ESCARAMBONI, 2014).

As amilases podem ser produzidas por animais e por microrganismos como os fungos.

3.4 Fungos

Os fungos são organismos heterotróficos pertencentes ao reino fungi e são conhecidos popularmente como mofos e bolores (BASTOS, 2013). Desempenham diversos papéis na natureza, como por exemplo os fungos decompositores que decompõem matéria orgânica tornando muitos dos nutrientes contidos neles disponíveis para outros seres (OLIVEIRA JUNIOR, 2014). São seres microscópicos de alta importância na conversão de alimentos (BASTOS, 2013). Dessa forma suas atividades são extremamente necessárias para a continuidade da existência do mundo (OLIVEIRA JUNIOR, 2014). Esses microrganismos formam esporos que são dispersos por corrente de ar e por conta disso pode ocorrer a inoculação natural desses seres (RIBEIRO, 2011).

No grupo dos fungos estão inclusas as leveduras que são seres unicelulares e os fungos filamentosos que são formados por estruturas pluricelulares (BASTOS, 2013). Para que haja uma classificação adequada a que família um fungo pertence, é necessário a identificação das suas características microscópicas e macroscópicas como coloração e textura da colônia (OLIVEIRA JUNIOR, 2014). As diferentes colorações das colônias são decorrentes da maciça produção de esporos assexuais, como os conídios e os esporangiósporos (RIBEIRO, 2011).

As leveduras são formadas por uma única célula e, geralmente, não formam filamentos (CAMILI, 2010). Dependem, para o seu desenvolvimento e sobrevivência, de carbono orgânico, principalmente na forma de carboidratos (RIBEIRO, 2011). Já o corpo de um fungo filamentoso é composto por longos filamentos de células conectadas, chamada de hifas e um conjunto de hifas é denominado de micélio, suas colônias são normalmente aveludadas e pulverulentas (OLIVEIRA JUNIOR, 2014). O micélio normalmente é incolor, entretanto em algumas espécies há produção de pigmentos, conferindo-lhe uma tonalidade vermelha, amarela, cinza ou preta (RIBEIRO, 2011). Os fungos filamentosos estão presentes no solo, no ar, na água e em matéria orgânica em decomposição, são conhecidos vulgarmente como bolores ou mofos e elaboram numerosos metabólitos, como por exemplo, as enzimas (BASTOS, 2013).

Os fungos são especialmente valorizados, por serem uma excelente fonte de enzimas de interesse industrial (ESCARAMBONI, 2014). Possuem vários fatores satisfatórios para seu uso como: produção em larga escala, variedade catalítica e fácil manipulação genética e ambiental (FERNANDES, 2009). São obtidas por meio de processos fermentativos, podendo ser obtidas tanto por Fermentação em Estado Sólido (FES) como por Fermentação Submersa (FSM) de microrganismos (GONÇALVES, 2016).

Atualmente, as enzimas de origem microbiana possuem uma vasta aplicação na indústria, sendo algumas delas o processamento de alimentos, bebidas, nas indústrias de detergentes, têxtil, rações, produção de fármacos entre outros (FERNANDES, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) e no Núcleo de Combustível, Catálise e Ambiental (NCCA) ambos localizados na Universidade Federal do Maranhão.

4.1 Meios de cultura

No presente trabalho foram preparados os seguintes meios de cultura adquiridos da KASVI:

Ágar Batata Dextrose (BDA) – Composto por infusão de amido de batata 4,0 g/l, dextrose 20,0 g/l e ágar 15,0 g/l.

Ágar Czapek Dox (CZA) – Nitrato de Sódio 2,0 g/l, Sulfato de Magnésio 0,5 g/l, Cloreto de Potássio 0,5 g/l, Sulfato Ferroso 0,01 g/l, Fosfato Dipotássico 1,0 g/l, sacarose 30,0 g/l e ágar 15,0 g/l.

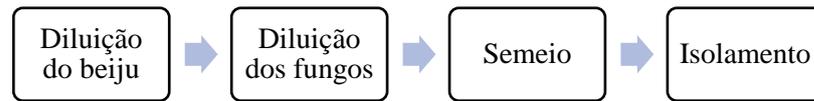
Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) – Hidrolisado pancreático de caseína 5,0 g/l, hidrolisado péptico de tecido animal 5,0 g/l, dextrose 40,0 g/l e ágar 16,0 g/l.

4.2 Coleta do beiju de mandioca

No Maranhão, a produção de tiquira ocorre na estação seca, entre agosto e dezembro que é período de colheita da mandioca. Dessa forma, a coleta dos beijus foi feita em dezembro de 2019, em um alambique de produção artesanal de tiquira localizado no povoado Cajueiro, no município de Urbano Santos, no leste do Maranhão. Os beijus foram acondicionados em sacos plásticos e levados ao NIBA.

4.3 Cultivo dos fungos

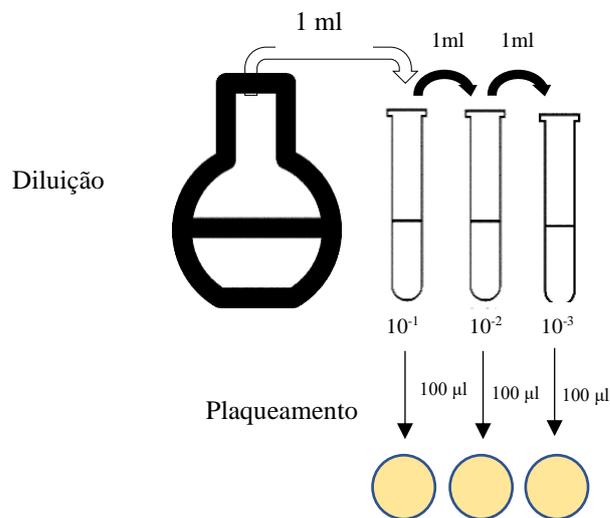
Para isolar e cultivar os fungos que cresciam nos beijus foram realizadas quatro etapas conforme Figura 4.

Figura 4. Etapas do cultivo dos fungos.

Fonte: Próprio autor.

Diluição do beiju: Os beijos foram colocados em um recipiente e acrescentou-se 1 L de água estéril e deixou-se em repouso por vinte e quatro horas. Decorrido esse tempo, foi adicionado mais 1 L de água estéril ao recipiente. Em seguida, os beijos úmidos foram amassados e mantidos em repouso por mais duas horas.

Diluição dos fungos: A mistura foi filtrada e o líquido foi transferido para um balão e colocado no agitador orbital da Gehaka modelo AO-370. Após homogeneização, retirou-se 1 ml do caldo e foram feitas diluições seriadas em tubos de ensaio contendo 9 ml de água destilada estéril para se obter diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} v/v (Figura 5).

Figura 5. Etapas da diluição seriada e o semeio dos fungos.

Fonte: Próprio autor.

Semeio de fungos: Uma amostra de 100 μ L do caldo de beijos com diluição 10^{-1} foi transferida para uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA. O líquido foi espalhado sobre o meio de cultura e a placa de Petri foi incubada a temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi feito para diluições 10^{-2} e 10^{-3} do caldo de beijos.

Isolamento dos fungos: O crescimento de colônias de fungos nas placas foi acompanhado diariamente. Os fungos crescidos foram transferidos para outras placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Esse procedimento foi repetido várias vezes para isolar os diversos fungos.

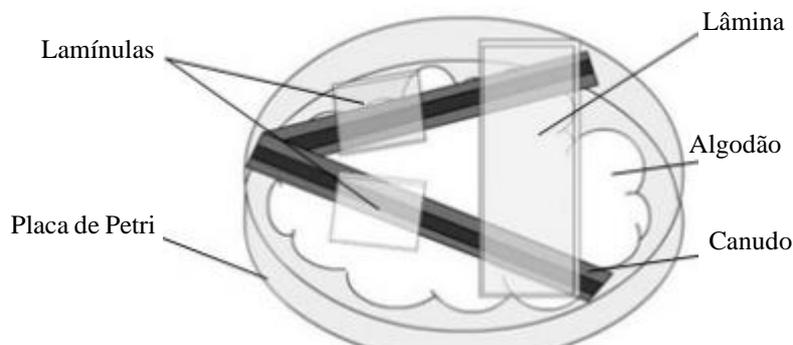
Os fungos também foram semeados em meios de cultura CZA e SDA.

4.4 Identificação dos fungos

A identificação foi realizada analisando as características macroscópicas das colônias, como coloração e textura e as características microscópicas como a estrutura dos fungos.

Para a visualização das características microscópicas dos fungos utilizou-se a técnica de microcultivo em lamínulas. Foi utilizado um kit adaptado (Figura 6), no qual em uma placa de Petri, deposita-se algodão, um canudo de plástico dobrado na forma de V, uma lâmina de microscópio e duas lamínulas (RIBEIRO, 2011) O material foi autoclavado a 120 °C por 15 minutos.

Figura 6. Kit utilizado para microcultivo de fungos.



Fonte: Ribeiro (2011).

Após a esterilização, um pequeno pedaço de meio BDA solidificado foi cortado e adicionado nas extremidades da lâmina, com uma pinça estéril semeou-se o fungo nas bordas do meio de cultura e adicionou-se a lamínula em cima do meio semeado. O algodão foi umedecido com água estéril e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por sete dias.

Após incubação, as lamínulas foram retiradas e adicionadas em lâminas estéril e coradas com Lactofenol Azul de Algodão. Por fim, levou-se a lâmina ao microscópio óptico da marca BIOPTIKA modelo B20T+ para observação das estruturas dos fungos.

4.5 Ensaio da atividade amilolítica

Preparou-se uma solução de Ágar puro 6% (m/v) e uma solução de amido 10% (m/v) ambas em tampão Citrato-fosfato de pH 5. A solução de amido foi aquecida e em seguida acrescentada a solução de ágar. O meio de cultura tamponado foi autoclavado para esterilização e, em seguida foi distribuído em placas de Petri. Decorridas vinte e quatro horas, os fungos isolados foram semeados nas placas e após crescimento da colônia adicionou-se Lugol para indicar a degradação do amido.

4.6 Fermentação em estado sólido (FES)

Preparo da solução de nutrientes: Foi preparada segundo Escaramboni (2014) utilizando a concentração que de acordo com as análises se obteve a maior atividade enzimática. Utilizou-se 1,25% (m/m) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25% (m/m) de KH_2PO_4 e 1,25% (m/m) de Ureia.

Preparo do meio fermentativo: Em um erlenmeyer adicionou-se 10 g de farelo de trigo adquirido em comercio local e acrescentou-se 5 ml da solução de nutrientes, o meio foi autoclavado a 120 °C por 15 minutos.

Adição dos fungos no meio: Após o meio esfriar, com uma pinça de plástico estéril raspou-se o micélio do fungo da placa de Petri e adicionou-se no meio para fermentação. O recipiente foi então fechado e incubado a temperatura ambiente por 120 horas.

Extrato enzimático: Após a finalização da FES, adicionou-se 100 ml de água destilada no Erlenmeyer contendo o meio fermentativo e levou-se ao agitador orbital Gehaka AO-370 a 180 rpm por 30 minutos. Decorrido o tempo, o conteúdo do erlenmeyer foi filtrado com papel filtro e o líquido obtido foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi congelado para as análises e o precipitado descartado.

4.7 Quantificação de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando o reagente de Bradford adquirido pronto da Sigma.

Preparo da curva de padrão de proteína: Foi utilizado Soro-Albumina Bovina (BSA) como padrão para a curva. Preparou-se uma solução de BSA 1 mg/ml e fez-se cinco diluições utilizando água destilada com concentrações variando de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml. Após diluído, foi retirado 5 µl de cada diluição e adicionado em 250 µl do reagente de Bradford. Agitou-se

levemente e incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos. Após incubação 200 µl de cada tubo foi adicionado em microplaca de 96 poços.

Preparo do branco e amostras: Foi retirado 5 µl do extrato enzimático e adicionou-se em 250 µl do reagente de Bradford, para o branco adicionou-se 5 µl de água destilada, ao invés de extrato. Cada tubo foi então agitado manualmente levemente e incubou-se a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, 200 µl de cada amostra e o branco foi adicionado em triplicata na mesma microplaca contendo a curva padrão de BSA. Por fim efetuou-se a leitura de absorvâncias em espectrofotômetro do modelo de leitor de placa da BioTek Synergy H1 em comprimento de onda de 595 nm.

4.8 Ensaio de hidrólise do amido

Tubos de ensaio contendo 5 ml de solução de amido 10% (m/v) foram aquecidos em banho-maria a 70 °C por 30 minutos para a gelatinização do amido. Decorrido o tempo adicionou-se 20 µl do extrato enzimático nas soluções e aqueceu-se cada um durante 1 hora a 60 °C. O branco foi preparado da mesma forma, exceto que não se adicionou o extrato enzimático. Após o aquecimento adicionou-se uma gota de Lugol nas soluções.

4.9 Quantificação dos açúcares redutores e determinação da atividade enzimática

A quantificação foi feita segundo o método de Miller (1959), utilizando o Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

Preparo do DNS: Em um béquer foi adicionado 20 ml de NaOH 2M e aquecido a 70 °C, acrescentou-se 1 g de Ácido 3,5-dinitrosalicílico, agitou-se e acrescentou-se 40 ml de água destilada. Adicionou-se 30 g de Tartarato de Sódio e Potássio lentamente e após diluição acrescentou-se 40 ml de água destilada. Por fim guardou-se em frasco âmbar.

Preparo da curva padrão de glicose: Preparou-se uma solução de glicose com concentração 1 g/L e feito dez diluições com concentrações variando de 0,1 g/L a 1 g/L. Após diluído, foi retirado 1 ml de cada diluição e acrescentado em 1 ml de DNS. Os tubos foram levados para banho maria a 100 °C por 5 minutos e posteriormente emergido em banho de gelo por mais 5 minutos. Por fim, foi retirado 200 µl de cada tubo e adicionado em microplaca de 96 poços.

Preparo do branco e amostras: Para o branco, utilizou-se 145 µl de tampão citrato fosfato pH 5 e 125 µl de solução de amido 2% (m/v) e levado a 60°C por 10 minutos. Retirou-se 90 µl da mistura e acrescentou-se 900 µl de DNS. Levou-se a banho maria a 100 °C por 10 minutos.

Para análise das amostras, em um microtubo tipo eppendorf adicionou-se 125 µl de tampão citrato fosfato pH 5, 125 µl de solução de amido 2% (m/v) e 20 µl do extrato bruto enzimático, levou-se a 60°C por 10 minutos e posteriormente 90 µl da reação foi adicionada em 900 µl de DNS e levada a banho maria a 100 °C por 10 minutos. Em seguida, 200 µl de cada amostra e do branco foi adicionada em triplicata na mesma microplaca contendo a curva padrão de glicose. Por fim, efetuou-se a leitura de absorbâncias em espectrofotômetro leitor de placa da BioTek Synergy H1 em comprimento de onda de 540 nm. Com os dados obtidos foi determinada a unidade de atividade enzimática como sendo a quantidade de enzimas que liberam 1 µmol de açúcares redutores por minuto de reação e expressa em U/g de substrato seco segundo equação 1. (ESCARAMBONI, 2014).

$$U/g = \frac{\mu\text{mols de açúcares redutores}}{\text{tempo de reação (min)}} \quad 1$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Coleta do beiju

A observação visual dos beijus indicou que estavam embolorados e que apresentavam uma diversidade fúngica evidenciada pelas diferentes colorações na superfície dos mesmos (Figura 7).

Figura 7. Beiju embolorado coletado de Urbano Santos.



Fonte: Próprio autor.

5.2 Cultivo dos fungos

Após quarenta e oito horas do início do cultivo observou-se o desenvolvimento das primeiras colônias de fungos nas placas de Petri. Decorridos sete dias de cultivo, as placas apresentaram diversos fungos crescidos (Figura 8).

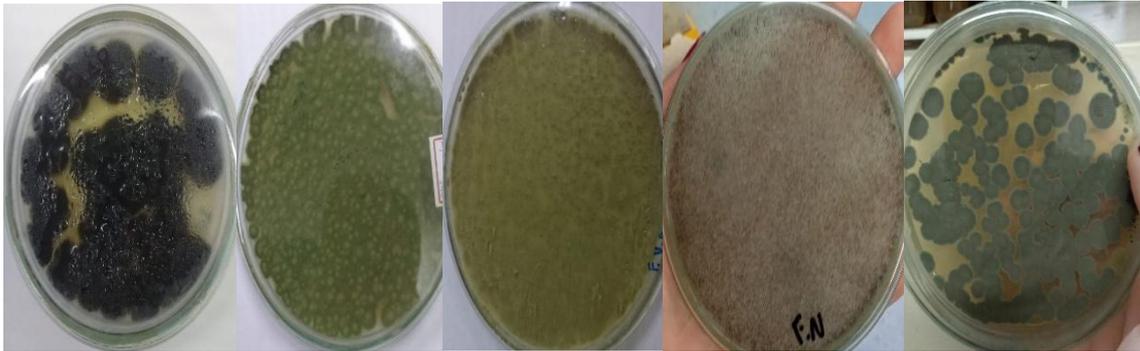
Figura 8. Colônias crescidas em meio de cultura BDA, sete dias após o semeio.



Fonte: Próprio autor.

A partir dessas diversas colônias foram feitos repiques com o objetivo de isolar as linhagens de fungos que possuíam características distintas. A principal diferença observada foi a coloração da colônia. Finalmente foram isolados cinco fungos filamentosos com colorações distintas (Figura 9).

Figura 9. Fungos isolados do beiju embolorado coletado.



Fonte: Próprio autor.

5.3 Identificação dos fungos

A análise das características macroscópicas das colônias isoladas está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Características macroscópicas dos fungos isolados.

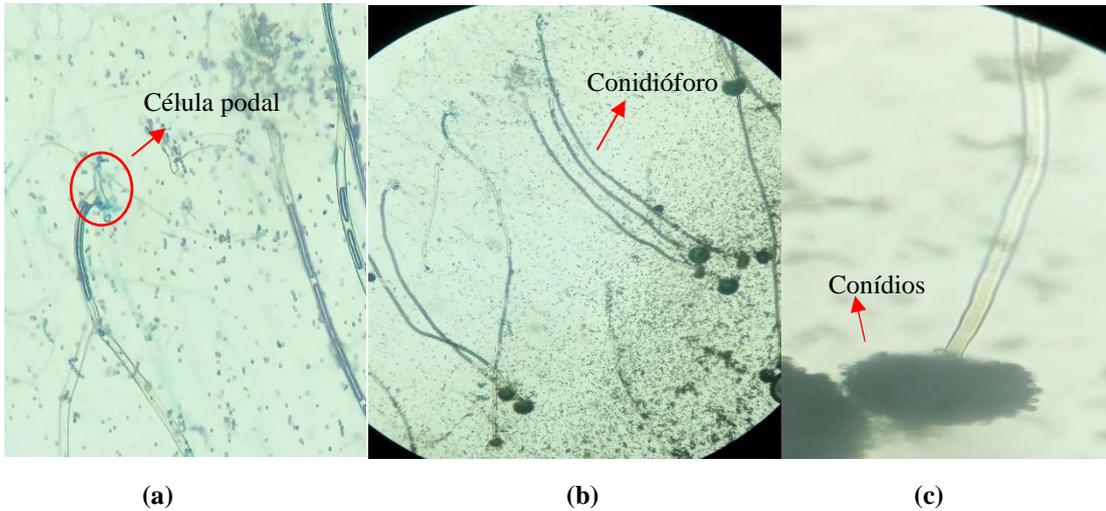
Fungo	Cor	Textura	Topografia
F1	Preto	Granular	Rugosa
F2	Verde amarelado	Granular	Rugosa
F3	Marrom	Pulverulenta	Rugosa
F4	Branco	Algodonosa	Plana
F5	Azul musgo	Pulverulenta	Rugosa

Fonte: Próprio autor.

As análises microscópica e macroscópica dos fungos isolados foram realizadas de acordo com as chaves de identificação segundo Fischer e Cook (2001); Hoog *et al.* (2000).

O fungo F1, possui crescimento rápido de colônia e é muito conhecido como bolor preto. Microscopicamente possui hifas septadas e hialinas, conidióforo largo, vesícula esférica completamente coberta pelos conídios pretos e presença de células podais (Figura 10). Estas características indicam que se trata do *Aspergillus niger*.

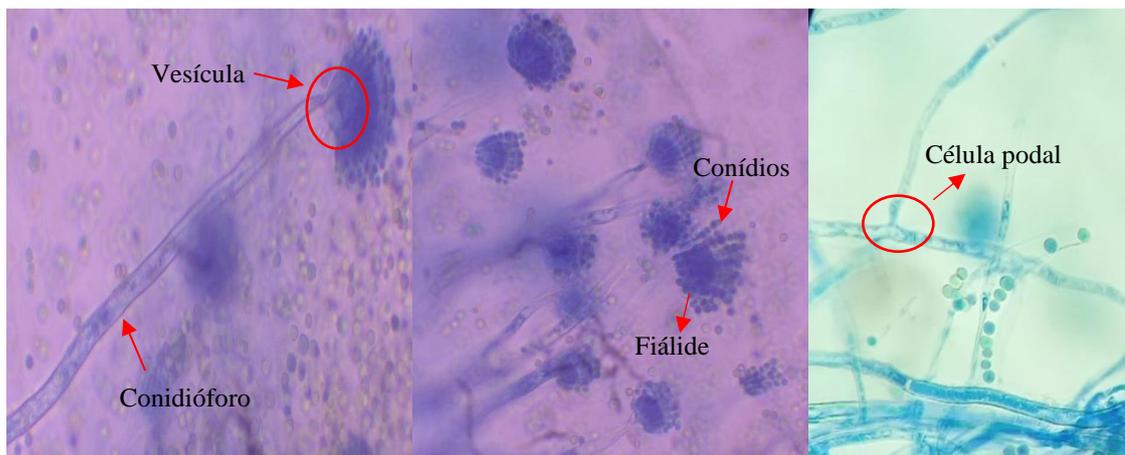
Figura 10. Microscopia de *Aspergillus niger* (fungo F1) corado com Lactofenol aumento de (a) e (b) 10x e (c) 100x.



Fonte: Próprio autor.

No fungo F2, observa-se presença de fiálides cobrindo a maior parte da superfície da vesícula esférica, conídios esféricos arranjados em cadeias divididas em colunas, hifas septadas, conidióforo longo, rugoso e hialino com presença de célula podal (Figura 11). Sua colônia é de crescimento rápido e coloração verde amarelada. As características indicam que se trata do *Aspergillus flavus*.

Figura 11. Microscopia corada com Lactofenol de *Aspergillus flavus* (fungo F2) aumento de 20x.

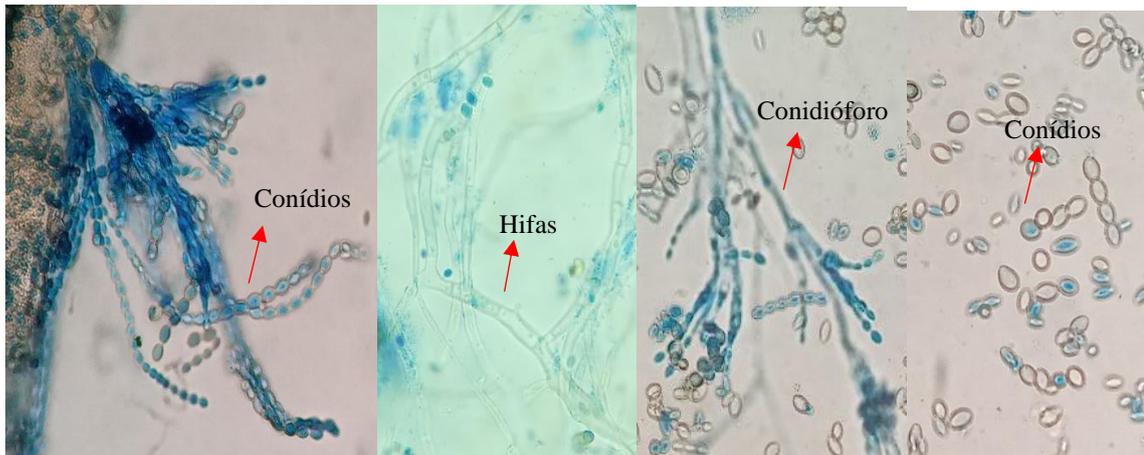


Fonte: Próprio autor.

No fungo F3, tem-se hifas largas e septadas, conidióforos curtos e ramificados que se arranjam tanto isolados como em cachos, conídios grandes, de forma piriforme com a base achatada e ponta arredondada, são também hialinos e se arranjam em cadeias. É possível visualizar a base de um conídio presa a ponta arredondada de um outro conídio e também se

observa o centro do conídio mais denso, com um tingimento mais intenso do que a periferia, demonstrando que possui parede mais espessa (Figura 12). Sua colônia é de cor marrom e cresce rapidamente. Suas características, principalmente a dos conídios, indicam se tratar do *Scopulariopsis* sp.

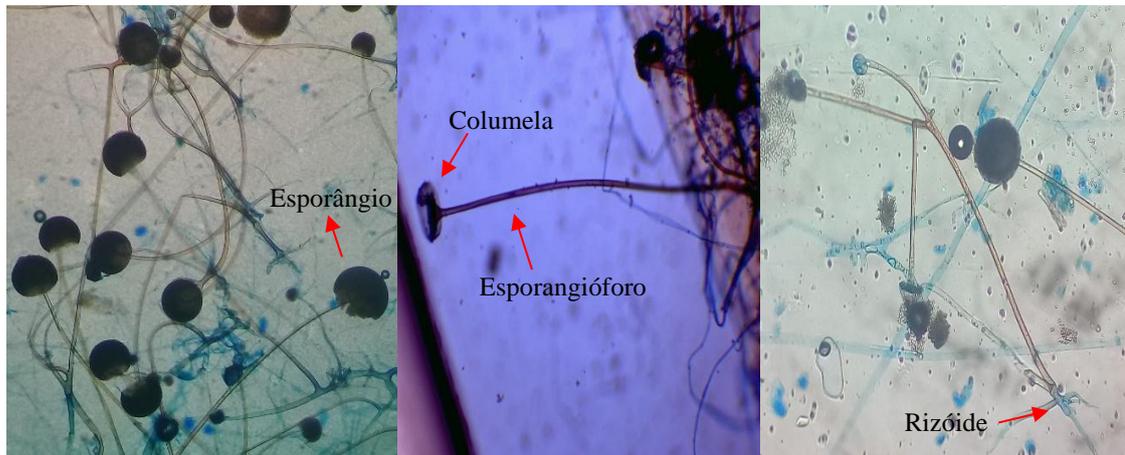
Figura 12. Microscopia corado com Lactofenol de *Scopulariopsis* sp. (fungo F3) aumento de 40x.



Fonte: Próprio autor.

O fungo F4, possui colônia algodonosa de pigmento inicialmente branco com o tempo possuindo uma cor preta na superfície por conta dos esporos. A colônia é de crescimento rápido e com abundante micélio aéreo preenchendo toda a placa de Petri. A sua estrutura possui hifas asseptadas, rizóide na base do esporangióforo que parecem com raízes, columela formando meio círculos com a base achatada, esporângio preto e globoso na ponta do esporangióforo longo e reto que podem desenvolver-se isolados ou em grupos (Figura 13). Suas características indicam que essa linhagem se trata do *Rhizopus* sp.

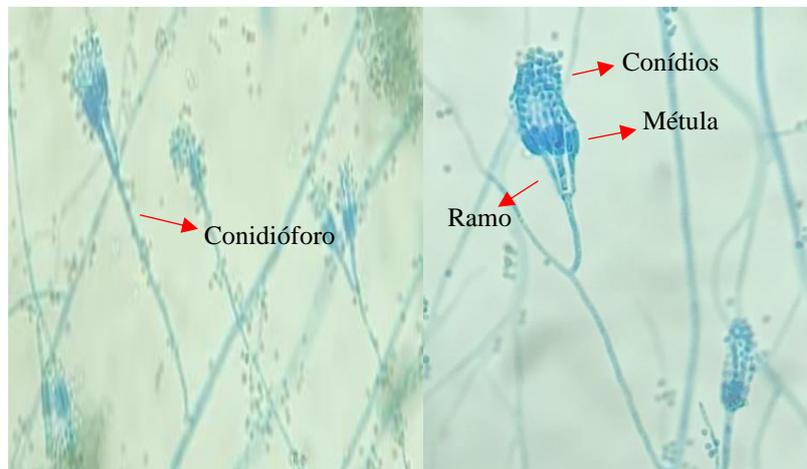
Figura 13. Microscopia corada com Lactofenol de *Rhizopus* sp. (fungo F4) aumento de 20x.



Fonte: Próprio autor.

O fungo F5 é do gênero *Penicillium* sp. Possui crescimento rápido, colônia inicialmente esbranquiçada e tendo uma maior esporulação após quatro dias do semeio. A colônia madura apresenta coloração azul musgo. Em sua estrutura microscópica observa-se hifas finas, conidióforos eretos, solitários e ramificados, fiálide na ponta de métulas e conídios pequenos e redondos em cadeia nas fiálides (Figura 14).

Figura 14. Microscopia corado com Lactofenol de *Penicillium* sp. (fungo F5) aumento de 10x.



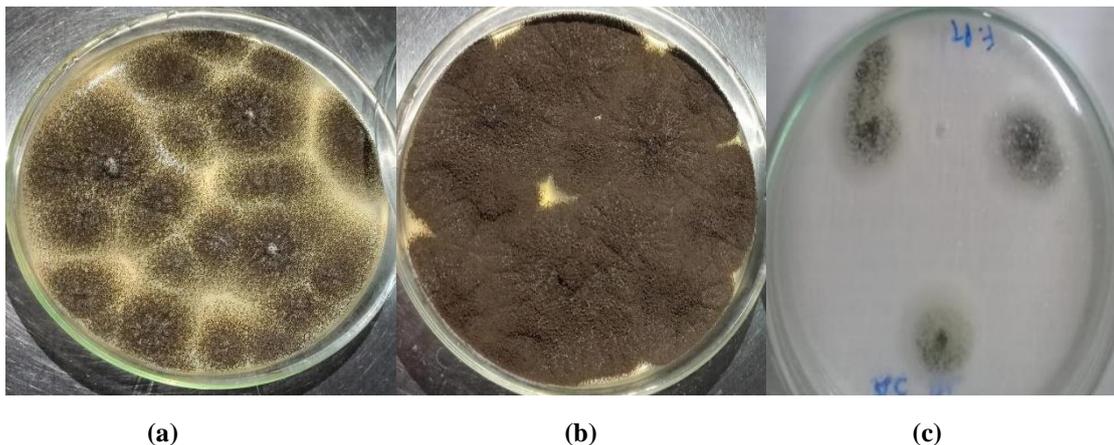
Fonte: Próprio autor.

O trabalho de Ribeiro (2011), isolou *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus oryzae* de beiju embolorado de Humberto de Campos. No trabalho de Bastos (2013), o autor utilizou cepas de fungos *Aspergillus niger* isolados de beijus mofados de alambiques do povoado Cajazeiras, no município Urbano Santos. Mesma cidade onde adquiriu-se os beijus do atual trabalho. Park *et al.* (1982 *apud* RIBEIRO, 2011), isolou de beijus coletados em unidades

de fabricação de tiquira perto da capital do Maranhão linhagens de *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp., *Paecilomyces* sp. e *Neurosporas*. A maior parte dos fungos isolados por esses autores foram semelhantes aos encontrados e identificados no presente trabalho, o que seria esperado já que os fungos se dispersam pela natureza e a única alteração que pode ocorrer é a concentração dessas espécies e linhagens.

Os fungos isolados foram semeados em outros meios de cultura afim de se identificar em qual o crescimento ocorria de forma mais satisfatória. Os meios utilizados foram o Ágar Czapek (CZA), Ágar Batata (BDA) e Ágar Sabouraud (SDA) e foram analisados após 120 horas do semeio, todos são meios para cultivos de fungos e possuem diferenças na sua composição. A Figura 15 apresenta o aspecto das colônias de *Aspergillus niger* em diferentes meios de cultura.

Figura 15. Fungo *Aspergillus niger* em (a) Ágar Batata, (b) Ágar Sabouraud, (c) Ágar Czapek.

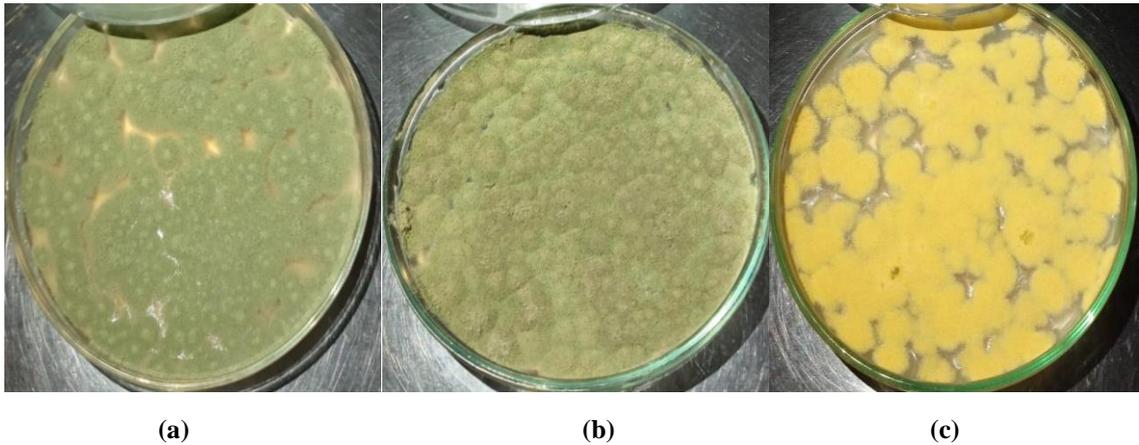


Fonte: Próprio autor.

Nos três meios de cultura testados o *Aspergillus niger* obteve a sua coloração preta característica. É possível observar que em 120 horas do semeio no meio Ágar Czapek, a colônia desse fungo ainda está no início do seu crescimento, enquanto que no meio Sabouraud e Ágar Batata a colônia já se encontra com maior esporulação.

Na Figura 16, tem-se as diferenças macroscópicas no cultivo de *Aspergillus flavus* em diferentes meios de cultura. De acordo com Fisher e Cook (2001), essa linhagem possui pigmento amarelo intenso a amarelo esverdeado. O cultivo em diferentes meios de cultura mostrou que no meio BDA e SDA a cor verde é mais destacada e no meio Czapek, o pigmento amarelo predomina e a colônia apresenta cor amarelo intenso

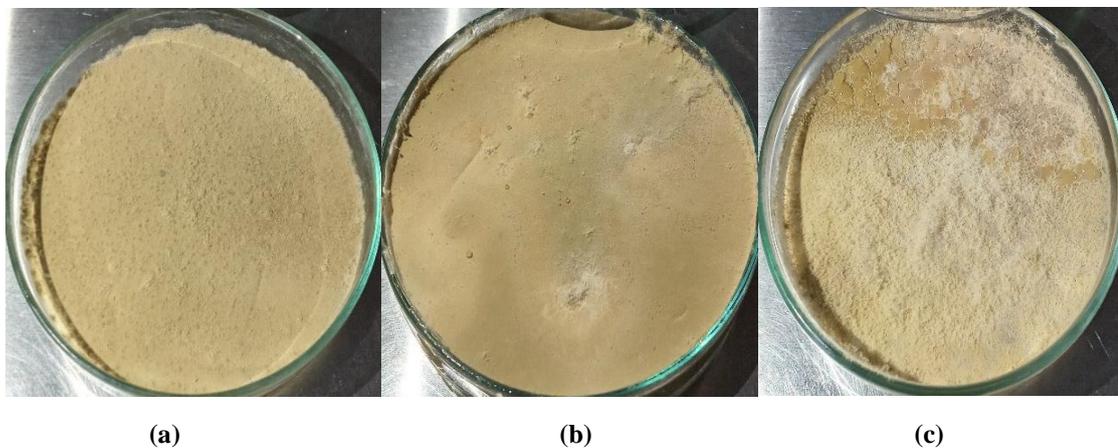
Figura 16. Fungo *Aspergillus flavus* em (a) Ágar Batata, (b) Ágar Sabouraud, (c) Ágar Czapek.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 17 apresenta o cultivo do *Scopulariopsis* sp. nos três meios de cultura utilizados. Essa linhagem após 120 horas preenche toda a placa, mostrando facilidade de crescimento em todos os meios de cultura testados, uma vez que esse fungo apresentou mesma taxa de crescimento em ambos os meios e apresenta também a mesma coloração amarronzada.

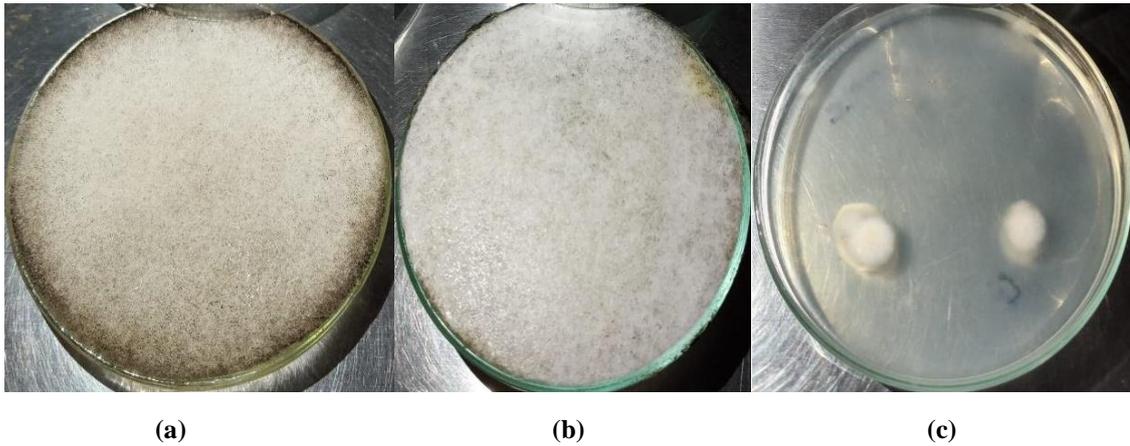
Figura 17. Fungo *Scopulariopsis* sp. em (a) Ágar Batata, (b) Ágar Sabouraud, (c) Ágar Czapek.



Fonte: Próprio autor.

As colônias do fungo *Rhizopus* sp. é mostrada na Figura 18. No Ágar Czapek, é possível observar a colônia sem a presença dos esporos pretos, e o lento crescimento do abundante micélio aéreo característico desse gênero.

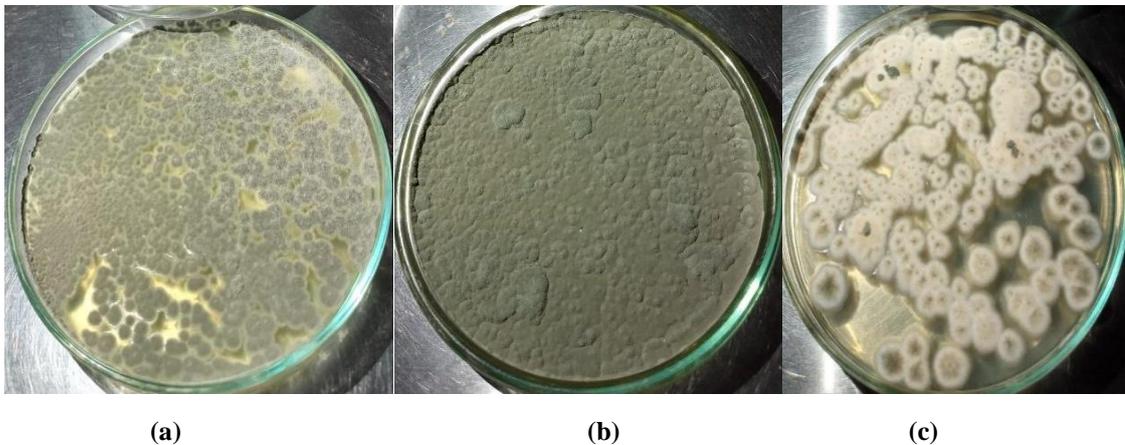
Figura 18. Fungo *Rhizopus* sp. em (a) Ágar Batata, (b) Ágar Sabouraud, (c) Ágar Czapek.



Fonte: Próprio autor.

As colônias do último fungo isolado, o *Penicillium* sp. é apresentado na Figura 19. No meio Czapek observa-se o pigmento esbranquiçado do início do crescimento da colônia dessa linhagem, que com uma colônia mais madura fica com o pigmento azul.

Figura 19. Fungo *Penicillium* sp. em (a) Ágar Batata, (b) Ágar Sabouraud, (c) Ágar Czapek.



Fonte: Próprio autor.

O meio Ágar Batata Dextrose (BDA) é um dos meios mais utilizados para o semeio de fungos, possui infusão de amido de batata em sua composição, dextrose como fonte de carbono e um pH $5,6 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (LABORCLIN, 2019). O Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) é um meio de cultura ácido, sendo $5,6 \pm 0,2$. Em sua composição possui uma mistura de peptona vegetais e animais como fonte de nitrogênio e dextrose como fonte de carbono e energia (SPLABOR, 2022). Já o meio Ágar Czapek, ao contrário do meio SDA possui uma fonte inorgânica de nitrogênio, sendo o Nitrato de Sódio, além de possuir outros componentes como

Sulfato de Magnésio, Cloreto de Potássio e Sulfato Ferroso, possui também sacarose como fonte de carbono e pH neutro, sendo $7,3 \pm 0,2$ (PROLAB).

No teste de meio de cultura realizado, analisou-se que o meio preferível para crescimento desses fungos isolados foi o meio SDA no qual se observou a maior esporulação seguido pelo meio BDA. Sendo assim, pode-se dizer que as linhagens dos fungos isolados preferem consumir nitrogênio orgânico e crescem melhor em pH ácido, que pode ser confirmado ao analisar os resultados no meio Czapek onde se tem um crescimento lento da maior parte das linhagens, exceto o *Scopulariopsis* sp., em pH neutro. Dessa forma, os testes realizados foram feitos em pH ácido.

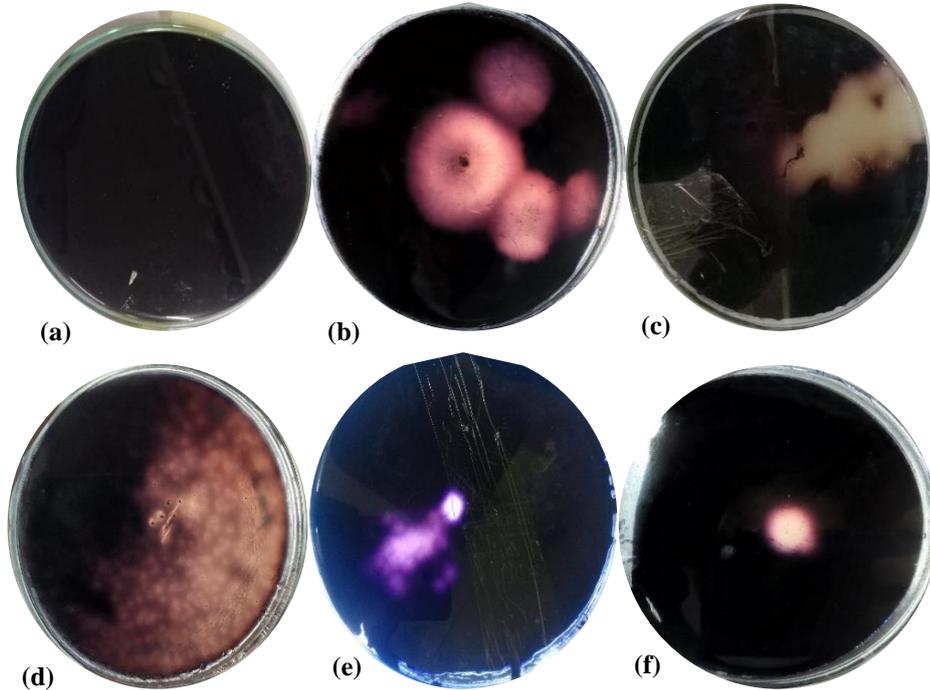
5.4 Ensaio da atividade amilolítica

Com as linhagens de fungos isolados e identificados foi realizado um ensaio qualitativo de produção de amilase por esses fungos. O ensaio escolhido foi utilizando o Lugol (mistura de Iodo e Iodeto de Potássio) como indicador de atividade amilolítica.

A amilose, polímero linear presente no amido, quando em contato com iodo possui a capacidade de acomodar os seus átomos. Isso ocorre devido a estrutura helicoidal da amilose que interage com o iodo e o aloja na cavidade central da hélice e forma um complexo iodo-amido de coloração azul intenso (DENARDIN; SILVA, 2009). Por conta dessa coloração característica, o iodo é muito utilizado para detectar presença de amido.

O ensaio amilolítico realizado foi analisado após dez dias do semeio no meio contendo amido, após o crescimento da colônia o Lugol foi adicionado em quantidade suficiente para cobrir toda a placa de Petri. A degradação foi observada pela formação de um halo translúcido formado na placa de Petri, indicando que naquela área o amido foi consumido pelas enzimas produzidas pelo fungo semeado. Na Figura 20 é apresentado o halo formado por cada linhagem.

Figura 20. Ensaio de amilase dez dias após o semeio de (a) Branco, (b) *Aspergillus niger*, (c) *Aspergillus flavus*, (d) *Scopulariopsis* sp., (e) *Rhizopus* sp., (f) *Penicillium* sp.



Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos mostram que as linhagens de fungos isoladas apresentaram variação quanto ao potencial de produção de enzima capaz de degradar o amido. As linhagens que apresentaram os maiores halos de degradação foram o *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Scopulariopsis* sp.

Utilizando o mesmo ensaio para avaliar a produção de amilases, Freires (2019), demonstrou que fungos *Aspergillus* sp. e *Scopulariopsis* sp. isolados do solo são bons produtores de amilase, apresentando halos de degradação bastante satisfatórios. Tal resultado foram semelhantes deste trabalho, uma vez que, os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Scopulariopsis* sp. foram os que apresentaram maiores potencial de degradação do amido.

O trabalho feito por Fernandes (2009), demonstrou que fungos *Penicillium* sp. isolados do solo apresentaram potencial intermediário quanto a produção de amilase. No presente trabalho, o *Penicillium* sp. foi um dos que apresentou menor halo de degradação, pode ter ocorrido que essa linhagem requeria mais tempo de incubação para o consumo do amido pelo fungo.

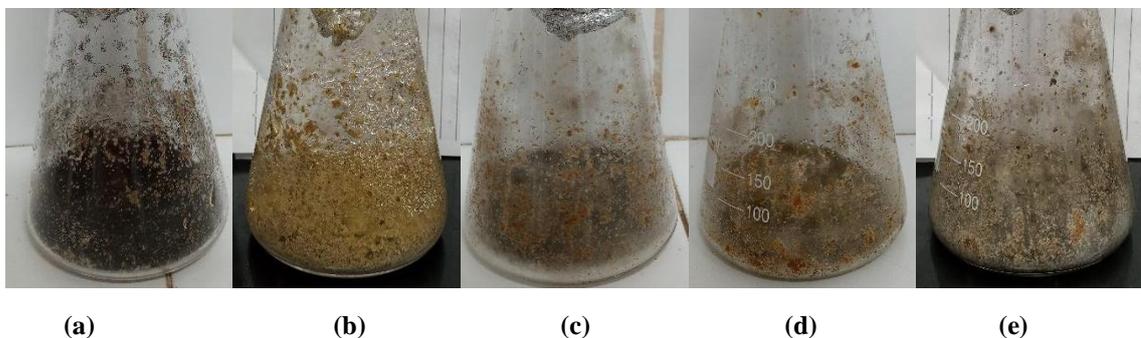
5.5 Fermentação em estado sólido

Como as linhagens se mostram capazes de produzir enzimas amilolíticas, foram obtidos extratos enzimáticos brutos de cada linhagem utilizando a fermentação em estado sólido (FES).

A FES é um processo que se desenvolve na superfície de materiais sólidos que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, com ou sem nutrientes adicionados (OLIVEIRA JUNIOR, 2014). A FES fornece aos microrganismos um ambiente próximo ao natural de onde existem e dessa forma os seus crescimentos podem ocorrer mais facilmente (ESCARAMBONI, 2014). Possui algumas desvantagens como dificuldade na medição de pH, cálculo de rendimento e limitação no tipo de microrganismos devido à baixa concentração de água livre no meio (OLIVEIRA JUNIOR, 2014). Entretanto, as suas vantagens a torna uma boa opção de escolha para obtenção de extratos, possui vantagens como economia de água e energia, menos geração de efluentes orgânicos, maior rendimento do produto final e possui baixo custo já que não é necessário processo de retirada de água residual como ocorre na fermentação submersa (ESCARAMBONI, 2014). Possui também uma grande variedade de substratos que podem ser utilizados, inclusive, resíduos industriais e agrícolas, contribuindo dessa forma com a redução dos mesmos.

Foi feita a FES utilizando farelo de trigo como substrato e adição de nutrientes para favorecer o crescimento dos fungos e sua produção enzimática, o processo foi realizado para todos os fungos isolados e incubados por 120 horas. No final da FES observou-se crescimento satisfatório de todas as linhagens nos meios fermentativo (Figura 21).

Figura 21. Meios fermentativos após 120h do semeio, (a) *Aspergillus niger*, (b) *Aspergillus flavus*, (c) *Rhizopus* sp., (d) *Scopulariopsis* sp., (e) *Penicillium* sp.

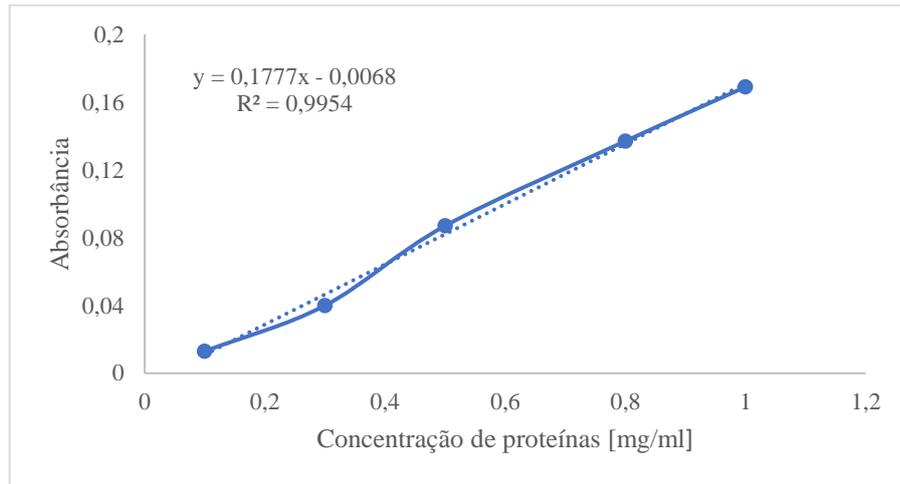


Fonte: Próprio autor.

Após a centrifugação, obteve-se o extrato enzimático bruto de cada uma das linhagens. O teor de proteínas nos extratos foi determinado pelo método de Bradford (1976). Esse método

utiliza o corante Coomassie Brilliant Blue e se baseia na interação entre as macromoléculas das proteínas e o corante. Essa interação provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (ZAIA *et al.*, 1998). A concentração de proteínas foi determinada utilizando uma curva padrão de proteína construída a partir de leituras de absorbância obtidas por amostras de BSA com concentrações conhecidas (Figura 22).

Figura 22. Curva padrão de BSA e equação da reta.



Fonte: Próprio autor.

A partir da equação da reta (2), foi possível calcular a concentração de proteínas em cada um dos extratos enzimáticos obtidos. A Tabela 2 apresenta os teores de proteínas totais presentes nos extratos de cada linhagem de fungo isolado.

$$y = 0,1777x - 0,0068$$

2

Tabela 2. Quantificação de proteínas dos extratos enzimáticos dos fungos isolados utilizando método de Bradford.

Fungo	[mg/ml]
<i>Aspergillus niger</i>	0,927
<i>Aspergillus flavus</i>	0,466
<i>Scopulariopsis</i> sp.	0,595
<i>Rhizopus</i> sp.	0,308
<i>Penicillium</i> sp.	0,708

Fonte: Próprio autor

O *Aspergillus niger* foi o fungo que apresentou maior concentração de proteínas no extrato enzimático e foi uma das linhagens que apresentou maior halo de degradação do amido (Figura 20b). A linhagem de *Penicillium* sp. produziu o extrato com a segunda maior concentração de proteínas, mas apresentou baixa atividade amilolítica (Figura 20f). Freires

(2019) mostrou que o *Penicillium* sp. apresenta boa atividade de protease. Assim é provável que o extrato enzimático do *Penicillium* sp. obtido tenha a presença de protease e amilase, assim como outras proteínas.

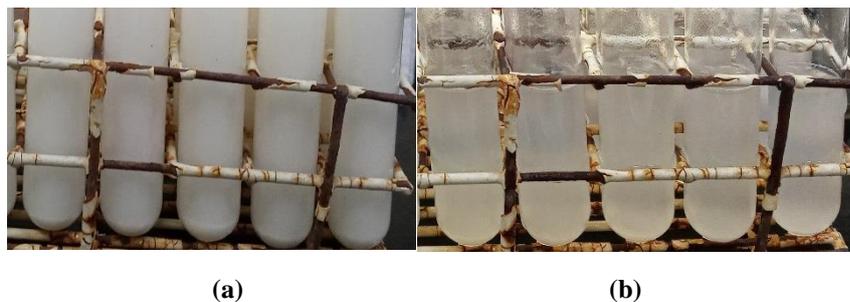
Os extratos de *Scopulariopsis* sp., *Aspergillus flavus* e *Rhizopus* sp. também apresentaram proteínas como esperado, visto que se observou potencial de produção de amilase por esses fungos.

5.6 Ensaio de hidrólise do amido

Como foi observado presença de proteínas, foi realizado um ensaio qualitativo para confirmar presença de amilase nos extratos de cada fungo utilizando Lugol como indicativo da hidrólise do amido.

Os grânulos do amido, quando aquecidos em água, incham irreversivelmente e perdem a sua organização estrutural, esse fenômeno ocorre em uma ampla faixa de temperatura e é chamado de gelatinização (DENARDIN; SILVA, 2009). No ensaio de hidrólise, soluções de amido 10% foram aquecidas em banho maria a 60°C para gelatinizar. O pH medido da solução foi 4 e não foi corrigido, uma vez que todos os procedimentos foram realizados em pH ácido. A Figura 23 apresenta o aspecto da suspensão de amido antes (a) e após (b) o aquecimento.

Figura 23. Suspensão de amido em (a) antes, (b) após aquecimento.

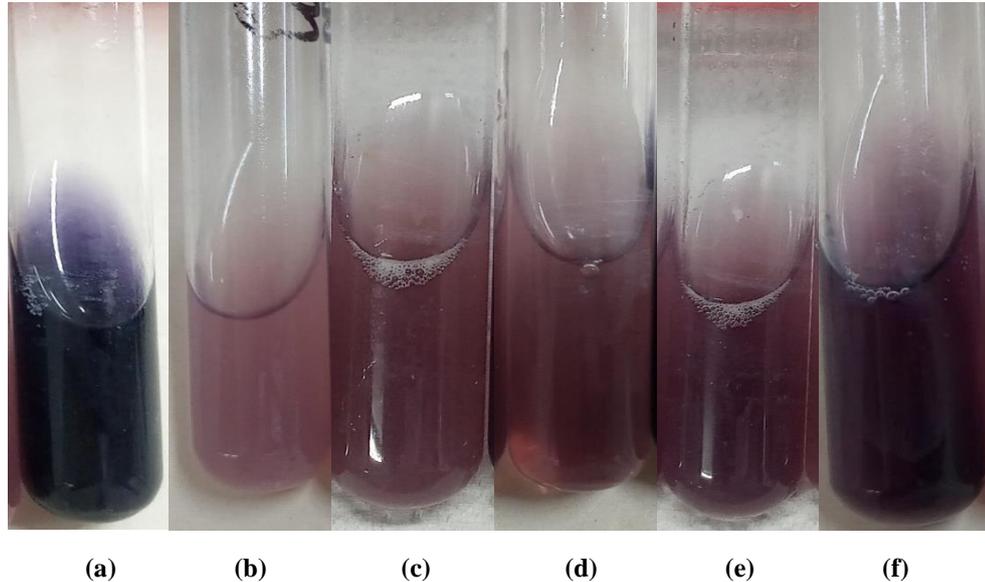


Fonte: Próprio autor.

Observa-se a mudança na coloração das soluções, indo de branco ao translúcido, indicando a gelatinização do amido. Esse processo torna o amido mais exposto a ação das enzimas na hidrólise.

Após a gelatinização, adicionou-se o extrato enzimático para ocorrer a degradação do amido presente. Na Figura 24 é apresentado as suspensões de amido após a hidrólise pelas supostas enzimas presentes no extrato de cada fungo.

Figura 24. Ensaio de hidrólise do amido utilizando o extrato enzimático dos fungos (a) Branco, (b) *Aspergillus niger*, (c) *Aspergillus flavus*, (d) *Scopulariopsis* sp., (e) *Rhizopus* sp., (f) *Penicillium* sp.



Fonte: Próprio autor.

A coloração azul intensa se deve à interação das cadeias de amilose com o íon I_3^- presente no reagente Lugol. A descoloração indica que a hélice da amilose foi degradada em moléculas menores e não acomoda o íon I_3^- no seu interior. A enzima que hidrolisa a amilose é a α -amilase que atua hidrolisando as ligações α -(1,4) presente nesse polímero, desfazendo dessa forma a estrutura helicoidal da amilose e logo, o complexo iodo-amido.

No ensaio de hidrólise utilizando os extratos enzimáticos obtidos é possível observar a diferença da coloração característica do complexo iodo-amido presente no branco (Figura 24a) e a descoloração nos tubos contendo o extrato. O extrato de *Aspergillus niger* apresentou maior descoloração, indicando boa atividade amilolítica. Esse resultado pode ser comprovado também pela determinação do teor de proteínas desse extrato que apresentou a maior concentração e no ensaio amilolítico que se obteve halo de degradação satisfatório. O extrato do *Penicillium* sp., apresentou a coloração mais forte do azul, mostrando atividade amilolítica mais baixa em comparação aos outros extratos, assim como no ensaio amilolítico realizado. Em todos os demais extratos obteve-se atividade enzimática. Utilizando os dados da quantificação de proteínas e os dados deste ensaio pode-se dizer que há presença de amilase nos extratos obtidos.

5.7 Quantificação dos açúcares redutores e determinação da atividade enzimática

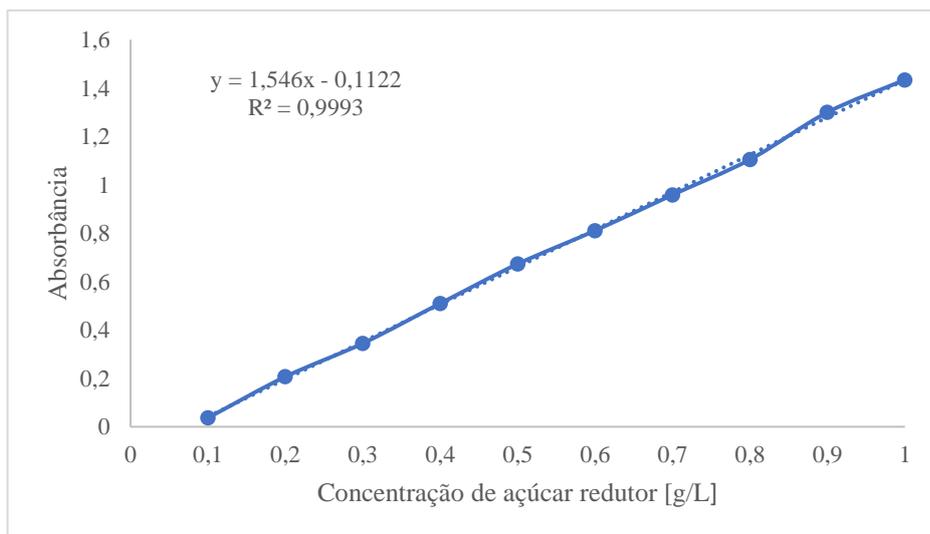
O amido é um polímero de glicose. Quando o amido é hidrolisado, as ligações que mantêm as moléculas de glicose unidas são quebradas de forma que se obtém glicoses e maltoses livres, que são açúcares redutores.

Como mostrado no ensaio de hidrólise do amido (Figura 24), todos os extratos enzimáticos obtidos a partir dos fungos isolados provocaram a degradação das macromoléculas do amido em moléculas menores, ou seja, em açúcares redutores.

Os açúcares redutores possuem seu grupo carbonílico livre e são capazes de se oxidar na presença de agentes oxidantes em solução alcalina. O Ácido 3,5-dinitrosalicílico é um agente oxidante que reage com açúcares redutores e se reduz formando o Ácido-3-amino-5-nitrosalicílico, que é um composto corado que absorve a luz em comprimentos de onda de 540 nm (GONÇALVES *et al.*, 2010).

Utilizou-se o extrato enzimático de cada fungo isolado para hidrolisar o amido e formar açúcares redutores. Após a reação, o DNS foi adicionado e a leitura realizada em espectrofotômetro, a quantificação foi realizada utilizando uma curva de padrão de glicose e com os valores de absorbância e concentração se obteve a equação da reta (Figura 25).

Figura 25. Curva padrão de glicose e equação da reta.



Fonte: Próprio autor.

Com a equação da reta (3) foi possível calcular a concentração dos açúcares redutores formados pela degradação do amido pelas enzimas presentes nos extratos brutos obtidos. A Tabela 3 apresenta a concentração de açúcares redutores em cada extrato.

$$y = 1,546x - 0,1122 \quad 3$$

Tabela 3. Quantificação dos açúcares redutores dos extratos enzimáticos dos fungos isolados utilizando método de Miller.

Fungo	[g/L]	U/g
<i>Aspergillus niger</i>	0,963	534,54
<i>Aspergillus flavus</i>	0,681	377,16
<i>Scopulariopsis</i> sp.	0,544	301,28
<i>Rhizopus</i> sp.	0,355	196,61
<i>Penicillium</i> sp.	0,324	179,44

Fonte: Próprio autor.

O fungo *Aspergillus niger* apresentou a maior taxa de produção de açúcar redutor e atividade enzimática (534,54 U/g), assim como em todas as análises realizadas essa linhagem apresentou um grande potencial da atividade amilolítica seguido pelas linhagens *Aspergillus flavus* e *Scopulariopsis* sp. que foram os três fungos que apresentaram o maior halo de degradação.

No trabalho de Ribeiro (2011), a linhagem *Rhizopus oryzae* isolada de beiju embolorado apresentou a maior atividade enzimática, obtendo a maior concentração de glicose nos ensaios, superando até mesmo *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*. No presente trabalho o *Rhizopus* sp. apresentou concentração intermediária de açúcar redutor e atividade enzimática de 196,61 U/g, não sendo a melhor linhagem com atividade amilolítica, pode ter ocorrido que o método de extração não foi o melhor para esse fungo, ou é uma linhagem diferente já que foi possível identificar apenas a nível de gênero. O *Penicillium* sp., como mostrado no ensaio amilolítico e ensaio de hidrólise apresentou a mais baixa atividade, porém apresentou grande quantidade de proteínas no extrato, a concentração de açúcar redutor quantificado e a atividade enzimática determinada (179,44 U/g) confirma a suposição de que o extrato possui outras proteínas além da amilase.

6 CONCLUSÃO

No total foram isoladas cinco linhagens de fungos do beiju embolorado coletado em Urbano Santos. As linhagens isoladas foram identificadas como sendo *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Scopulariopsis* sp., *Rhizopus* sp. e *Penicillium* sp..

Todos as linhagens isoladas apresentaram potencial de hidrolisar o amido quando cultivadas em meio Ágar-amido indicando que produzem enzimas extracelulares.

Esporos das linhagens isoladas foram semeados e se desenvolveram sobre substrato sólido de farelo de trigo.

Os extratos enzimáticos de cada uma das linhagens isoladas mostraram presença de proteínas e degradação do amido pelo ensaio de hidrólise, demonstrando que o processo de obtenção utilizado foi satisfatório para essas linhagens.

O *Aspergillus niger* foi a linhagem que mais se destacou nas análises realizadas, mostrando ser um bom produtor de amilase e o *Penicillium* sp. mostrou o menor potencial para hidrolisar o amido, porém mostrou quantidade satisfatória de proteínas, mostrando provavelmente a presença de outras proteínas, além da amilase.

Conclui-se, portanto, que foi possível identificar os fungos presentes no beiju embolorado e confirmar a capacidade de cada uma das linhagens para produzir enzimas capazes de degradar biomassas amiláceas e transformá-las em açúcares que podem ser convertidos em etanol.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira de Produtores de Amido de Mandioca. Pará teve safra recorde de mandioca em 2021. 2022. Disponível em: <https://abam.com.br/para-teve-safra-recorde-de-mandioca-em-2021/>. Acesso em: 5 mar. 2022.

BASTOS, F. A. **Otimização do processo de produção de tiquira empregando enzimas comerciais e fungos isolados a partir dos beijos utilizados no método tradicional**. 2013. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013. Disponível em: <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/tede/955>. Acesso em: 9 set. 2020.

BORBA, V.S. *et al.* Modificações do amido e suas implicações tecnológicas e nutricionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos: Pesquisa e práticas contemporâneas**. vol. 1, ed. 1, p. 428-457, 2021. Disponível em: <https://www.editoracientifica.org/articles/code/210504724>. Acesso em: 9 jul. 2022.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMILI, E.A. **Parâmetros operacionais do processo de produção de etanol a partir de polpa de mandioca**. 2010. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/101669>. Acesso em: 3 abr. 2022.

CINELLI, B.A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: http://objdig.ufrj.br/60/teses/coppe_m/BernardoAlvesCinelli.pdf. Acesso em: 17 mar. 2022.

CONAB. Mandioca. Análise mensal. Fevereiro, 2018. Disponível em: [file:///C:/Users/55989/Downloads/Mandioca - Análise Mensal - fevereiro-2018 .pdf](file:///C:/Users/55989/Downloads/Mandioca_-_Análise_Mensal_-_fevereiro-2018_.pdf). Acesso em: 24 abr. 2022.

DENARDIN, C.C.; SILVA, L.P. da. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945-954, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000003>. Acesso em: 16 mar. 2022.

ERENO, D. Etanol de mandioca doce. **Revista Pesquisa Fapesp**. ed. 144, p. 68-73, 2008. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/etanol-de-mandioca-doce/>. Acesso em: 28 ago. 2021.

ESCARAMBONI, Bruna. **Produção de amilases pelo cultivo em estado sólido de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* e sua utilização na obtenção de xarope de glicose**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/134177>. Acesso em: 17 mar. 2022.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/2672>. Acesso em: 17 mar. 2022.

FISCHER, F.; COOK, B.N. *Micologia: Fundamentos e diagnóstico*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

FREIRES, A.S.S. **Avaliação da produção de amilase e protease por fungos filamentosos de solos no Semiárido Pernambucano**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, 2019. Disponível em: <http://hdl.handle.net/123456789/2503>. Acesso em: 20 jul. 2022.

GONÇALVES, C. *et al.* Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods**, London, v. 2, p. 2046-2048, 2010. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2010/AY/c0ay00525h>. Acesso em: 20 jul. 2022.

GONÇALVES, L.G. **Produção de amilases de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* e hidrólise enzimática do bagaço de mandioca visando a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae***. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/138917>. Acesso em: 16 mar. 2022.

GOUVEIA, C. *Bebidas Alcoólicas Indígenas*. Laboratório de Análises e Pesquisas de Bebidas Alcoólicas - Universidade Federal da Paraíba, 2018. Disponível em: <http://www.ct.ufpb.br/lba/contents/menu/produtos/bebidas-alcoolicas-indigenas>. Acesso em: 27 ago. 2022.

Grand View Reserch, *Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Type (Industrial, Specialty), By Product (Carbohydrase, Proteases), By Source (Microorganisms, Animals), By Region, And Segment Forecasts, 2021 – 2028*, 2021. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>. Acesso em: 10 mar. 2022.

HOLLIDAY, G. L. *et al.* The Chemistry of Protein Catalysis. **Journal of Molecular Biology**, v.372, n.5, p.1261-1277. 2007.

HOOG, G.S. *et al.*; de. *Atlas Of Clinical Fungi*. 2a ed., CBS, Utrecht, Holanda, 2000.

IBGE. *Levantamento Sistemático de Produção Agrícola*. 2022. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/7832>. Acesso em: 30 abr. 2022.

LABORCLIN. *Potato Dextrose Agar*. rev. 01, 2019. Disponível em: https://www.laborclin.com.br/wpcontent/uploads/2019/05/POTATO_DEXTROSE_AGAR_12042019.pdf. Acesso em: 10 jun. 2022.

MARTINEZ, D.G. **Produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos do processamento da mandioca**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Energia na Agricultura) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2016. Disponível em: https://www5.unioeste.br/portalunioeste/arq/files/PPGEA/Dissertacao_Daiana_G_Martinez.pdf. Acesso em: 20 jan. 2022.

MARTINS, P. C. **Aplicação de modificação química em amidos: estratégias para melhoria de embalagens para alimentos**. 2020. Tese (Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, 2020.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p.9-23, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.19142/rpq.v3i5.83>. Acesso em: 10 nov. 2020.

NOVELLI, P.K.; BARROS, M.M.; FLEURI, L.F.; Novel inexpensível fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198 p.119-124, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.089>. Acesso em: 2 set. 2020.

OH, S-M. *et al.* Physicochemical and retrogradation properties of modified chestnut starches. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 1723–1731, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10068-019-00622-8>. Acesso em: 9 jul. 2022.

OLIVEIRA JÚNIOR, S.D. de. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/15852>. Acesso em: 17 mar. 2022.

PROLAB. Caldo Czapek Dox. Disponível em: <https://www.prolab.com.br/produtos/meios-de-cultura/caldos-Czapek-dox/caldo-Czapek-dox/>. Acesso em: 10 jun. 2022.

RIBEIRO, D.M.L. **Caracterização e comportamento sacarificante da flora microbiana empregada na fabricação da aguardente de mandioca (tiquira)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011. Disponível em: <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/tede/919>. Acesso em: 2 mar. 2022.

RIBEIRO, N.; GODINHO, A. M.M.; MARQUES, T.A. Produção de Glicose a partir do amido da Batata-Doce por Hidrólise Ácida. **Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão**, Presidente Prudente, 2009.

RIGO, D. *et al.* Produção microbiológica de enzimas: Uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9232-9254, 2021. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/ojs/index.php/BRJD/article/download/23661/19022>. Acesso em: 9 jul. 2022.

SANTANA, N.B. **Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol**. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007. Disponível em: <http://locus.ufv.br/handle/123456789/2828>. Acesso em: 11 set. 2020.

SILVA, L.E. B. *et al.* Aspectos gerais e peculiaridade sobre mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) **DIVERSITAS JOURNAL**. vol. 3, n.1, p.13-23, 2018. Disponível em: https://diversitasjournal.com.br/diversitas_journal/article/view/587/529. Acesso em: 28 set. 2020.

SPLABOR. Agar Sabouraud: Preparação, composição e princípios. 2022. Disponível em: <https://www.splabor.com.br/blog/guia-tecnico/agar-sabourand-preparacao-composicao-e-principios/>. Acesso em: 10 jun. 2022.

TEIXEIRA, I.S.; MILAGRE, C.D.F. Evolução dirigida de enzimas: pequenas modificações, melhores biocatalisadores. **Química Nova**, v. 43, p. 773-786, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170538>. Acesso em: 30 mar. 2022.

ZAIA, D.A.M; ZAIA, C.T.B.V; LICHTIG, J. Determinação de proteínas via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, p. 787-793, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000600020>. Acesso em: 23 jul. 2022.