

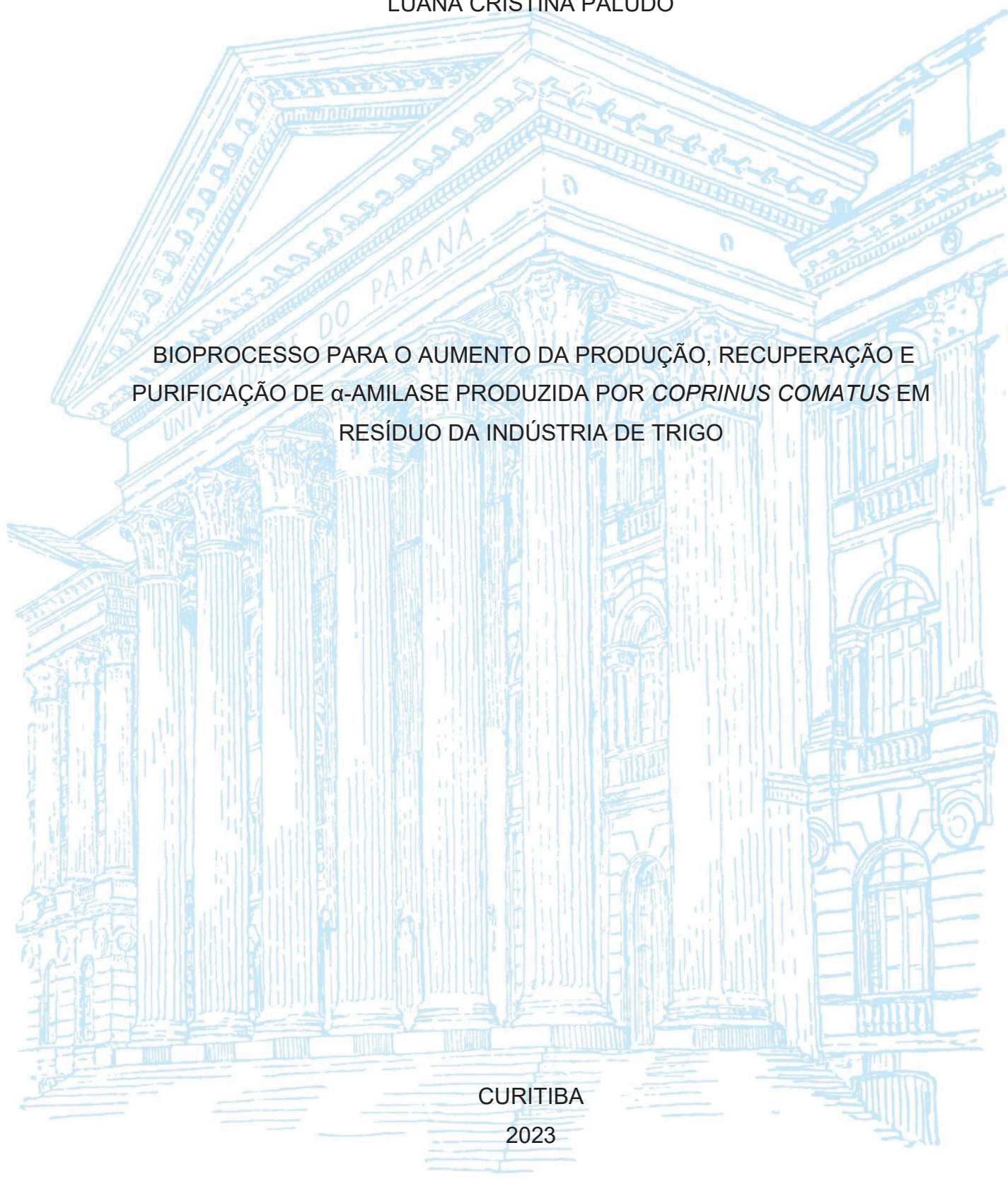
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA CRISTINA PALUDO

BIOPROCESSO PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO, RECUPERAÇÃO E
PURIFICAÇÃO DE α -AMILASE PRODUZIDA POR *COPRINUS COMATUS* EM
RESÍDUO DA INDÚSTRIA DE TRIGO

CURITIBA

2023



LUANA CRISTINA PALUDO

BIOPROCESSO PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO, RECUPERAÇÃO E
PURIFICAÇÃO DE α -AMILASE PRODUZIDA POR *COPRINUS COMATUS* EM
RESÍDUO DA INDÚSTRIA DE TRIGO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná, como requisito para
à obtenção do título de Doutor em Engenharia de
Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Rigon Spier
Coorientadora: Michelle Rossana Ferreira Vaz

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Paludo, Luana Cristina

Bioprocesso para o aumento da produção, recuperação e purificação de α -amilase produzida por *coprinus comatus* em resíduo da indústria de trigo / Luana Cristina Paludo. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Michele Rigon Spier

Coorientador: Michelle Rossana Ferreira Vaz

1. Enzimas. 2. Amilases – Inibidores. 3. Modelagem. 4. Antioxidantes. 5. *Coprinus*. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Spier, Michele Rigon. IV. Vaz, Michelle Rossana Ferreira. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LUANA CRISTINA PALUDO** intitulada: **BIOPROCESSO PARA O AUMENTO DA PRODUÇÃO, RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE -AMILASE PRODUZIDA POR *COPRINUS COMATUS* EM RESÍDUO DA INDÚSTRIA DE TRIGO**, sob orientação da Profa. Dra. MICHELE RIGON SPIER, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 23 de Janeiro de 2023.

Assinatura Eletrônica
30/01/2023 22:49:42.0
MICHELE RIGON SPIER
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
27/01/2023 09:14:19.0
ALESSANDRA CRISTINA PEDRO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR)

Assinatura Eletrônica
31/01/2023 12:24:47.0
AGNES DE PAULA SCHEER
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
24/02/2023 12:13:57.0
HERTA STUTZ
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE)

Assinatura Eletrônica
16/02/2023 08:41:00.0
SASCHA HABU
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por sempre me guiar e amparar,
agradeço a minha família e a todas as pessoas que estiveram comigo nessa
jornada, mas principalmente a você que continua não desistindo dos seus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Eternamente grata a Deus por ser o meu sustento em todos os momentos da minha vida, seja falando comigo, seja falando por meio de outra pessoa. Nesta caminhada pude conhecer e ver o quanto Deus me guia, ama e é imensamente misericordioso.

Agradeço a minha mãe Maria Regina por seu colo, positividade e amparo inigualável e ao meu pai Célio por me deixar seguir meus sonhos e me apoiar. Agradeço também ao meu padrasto Juarez por sempre estar lá por mim, aos meus irmãos Fernando e Fellipe por serem presentes na minha vida. Também agradeço a minha cunhada Bia, ao meu sobrinho lindo Lorenzo e a Helena que já, já chega.

Agradeço a UFPR por todos esses anos de cuidado, ao PPGEAL pela oportunidade, mas principalmente a professora Michele Rigon Spier pela chance de aprender, pela orientação e por toda a nossa caminhada juntas todos esses anos para chegarmos aqui. A professora Michelle Rossana Ferreira Vaz por aceitar me coorientar. O LENGEBIO e as USINAS A e B estarão sempre no meu coração assim como todos os amigos que fiz nesses lugares. Agradeço a todos dos laboratórios que me auxiliaram nessa jornada, CEPPA e EMULTEC. Também agradeço a CAPES por apoiar meu sonho e também a todos os técnicos e serventes que tornaram toda essa caminhada possível.

Agradeço a todos os meus amigos por me amarem, por puxarem minhas orelhas e me ajudarem sempre. Agradeço a Vanessa, Telma, Suélen, Tatiane, Cristina, Franciele, Bianca Peron, Rúbia, Pablo, Rodolfo, Ivisson, Ana Biz, Thay, Deo, Yann, Bianca Padilha. Aos meus amigos do MUR Andressa, Aline, Damily, Ana Canarines e Alessandra que me ajudaram a seguir com Deus e oraram por mim.

Um agradecimento especial ao meu amigo que tem me protegido do céu desde 2019, Rubens. Você está sempre nos meus pensamentos.

**Em algum lugar, daqui a muito e muito tempo:
Dois caminhos se separaram em um bosque e eu...
Eu escolhi o menos percorrido
E isso fez toda a diferença.**

O caminho não escolhido - Robert Frost, 1916.

*Pois que se uniu a mim, eu o livrarei; e o protegerei, pois conhece o meu nome.
Quando me invocar, eu o atenderei; na tribulação estarei com ele.
Hei de livrá-lo e o cobrirei de glória.
Será favorecido de longos dias, e eu lhe mostrarei a minha salvação.”*
Salmo 90, 15-18

“Faça pouco ou faça muito, mas faça algo” – Matheus Ishiro Escórcio, 2022.

Que a gente siga em frente, mesmo que alguns dias sejam mais produtivos que outros. Não parar é o que importa.

RESUMO

As amilases são enzimas amplamente usadas nas indústrias de alimentos e estima-se que em 2027 o mercado de enzimas movimente para esta aplicação mais de US\$ 2,39 bilhões. Isto torna necessário o desenvolvimento de novas fontes de amilases com melhor desempenho catalítico, sendo produzidas a baixos custos para competir com as enzimas já existentes. Por isto, este projeto visa a produção de uma amilase por macromiceto de forma menos onerosa, com destinação das frações obtidas no cultivo sem geração de resíduos no processo. Primeiramente foram avaliados diferentes processos em batelada utilizando subproduto denominado farinha de fundo de moinho (FFM) em concentrações de 105 g·L⁻¹ e 48,5 g·L⁻¹ e meios sintéticos (controles) baseados nestes, visando avaliar o melhor processo para a produção enzimática. Após, foram realizados estudos com modelos matemáticos para prever a síntese de enzimas, a produção de biomassa e o consumo de substrato. O ensaio com menor concentração de subproduto foi selecionado como melhor alternativa (48,5 g·L⁻¹ de FFM), diminuindo o custo com o substrato e os resíduos gerados pós-cultivo. Os modelos matemáticos avaliados conseguiram prever os parâmetros do crescimento da biomassa e do consumo de substrato, entretanto, para a produção enzimática apenas o pico de atividade de α -amilase foi previsto. Posteriormente, foi realizado o estudo da purificação de baixa resolução que permitiu obter uma enzima com potencial para aplicação industrial. Os processos de precipitação e separação por membranas foram aplicados para a purificação das amilases. A α -amilase purificada foi caracterizada quanto a pH (5,0) e temperatura ideal (50 °C) de reação enzimática e massa molecular estimada ($\cong$ 67 kDa). A enzima hidrolisou 99% de um meio contendo 30 g·L⁻¹ de amido em 3h. A liofilização desta enzima permitiu concentrá-la em 18,88 vezes. Entretanto, ainda buscando a diminuição nos custos e a redução de processos e resíduos, foi avaliado a utilização do extrato bruto enzimático (EEB) sem a etapa de purificação. A avaliação do EEB foi realizada avaliando a atividade enzimática, caracterizando a enzima, a toxicidade do extrato e a presença de compostos antioxidantes. A enzima demonstrou estabilidade de armazenamento sem a adição de conservantes, com uma atividade relativa final superior a 60% após 721 dias. O EEB não foi tóxico frente a *Artemia salina* e apresentou atividade antioxidante. O EEB apresentou pH ideal de 6,0, temperatura 50 °C e também teve um aumento da estabilidade térmica na presença de cálcio 2,5 mM. Bem como, hidrolisou 96% do amido e apresentou um aumento da atividade enzimática de 63 vezes com a liofilização. A biomassa que seria um resíduo neste processo foi utilizada para a produção de um pó proteico rico não apenas em proteína ($\geq$ 26%), mas também em antioxidantes e não apresentaram toxicidade. Este estudo demonstrou o potencial que a cepa do *Coprinus comatus* tem para a síntese não apenas de α -amilase como também para a produção de outros compostos importantes e também a produção de subprodutos com alto valor agregado como o pó proteico.

Palavras-chave: Enzima amilolítica. Bioprocesso. Parâmetros cinéticos. Modelagem matemática. Processo verde. Purificação. Pó de macromiceto; *downstream*. Atividade antioxidantes.

ABSTRACT

Amylases are enzymes widely used in the food industry it is estimated that in 2027 this market will represent more than 2.39 billion dollars. Therefore, it is necessary to develop new fonts of amylases with better catalytic performance. These amylases must have a lower production cost to compete with the ones that already exist. Therefore, this project aims to develop an amylase of macromycetes with low production cost and without generating waste in the destination process of the fractions obtained through cultivation. First, different batch processes were evaluated using a by-product named Low-Grade Flour (LGF) with 105 g·L⁻¹ and 48.5 g·L⁻¹ concentrations, and synthetic means of control based on these were performed to assess the best process for the enzyme production. Then, the informed parameters were used in mathematical models to predict enzymatic synthesis, biomass production, and substrate consumption. The trial with a lower concentration of flour was selected as the best alternative (48.5 g·L⁻¹ of LGF) to reduce the substrate cost and the waste generated under submerged post-cultivation. The mathematical models were able to predict biomass growth parameters and substrate consumption. On the other side, considering the enzymatic production, only the α -amylase activity peak was predicted. Subsequently, it was carried out a low-resolution study of the purification trial was done to obtain an enzyme with industrial application potential. Precipitation and separation processes by membrane were used for purification. The purified α -amylase was characterized based on pH (5.0), the temperature of the ideal enzymatic reaction (50 °C), and the molecular mass ($\cong$ 67 kDa). The enzyme was able to hydrolyze 99% of the culture medium containing 30 g·L⁻¹ starch after 3h. The lyophilization of this enzyme allowed its concentration, increasing the enzymatic activity by 18.88-fold. Still seeking a lower cost, the reduction processes and waste, the use of crude enzymatic extract (CEE) was evaluated without the purification. The CEE was evaluated by enzymatic activity, enzyme characterization, the toxicity of the extract, and the presence of antioxidant compounds. After the analysis, it was possible getting an enzyme with storage stability without the addition of preservatives, with final relative activity greater than 60% after 721 days. The CEE was not toxic against *Artemia salina* and showed the presence of antioxidants. The crude enzyme showed ideal pH of 6.0, a temperature of 50 °C, and an increase of thermal stability in presence of calcium 2.5 mM. 96% of the starch was hydrolyzed in 3 h, showing a 63-fold increase in enzymatic activity with freeze-drying. The biomass that was a residue in the process was used to produce a protein-rich powder ($\geq$ 26%) with antioxidant activity and no toxicity. This study showed the potential of the *Coprinus comatus* strain for α -amylase synthesis and production of other important compounds and also to produce by-products with high added value.

Keywords: Amylolytic enzyme. Bioprocess. Kinetic parameters. Mathematical modeling. Purification. Macromycete powder. *Downstream*. Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – RESUMO DAS ETAPAS REALIZADAS NA PESQUISA.....	28
--	----

CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMA-SUBSTRATO E ATUAÇÃO DESTE SOBRE UM DETERMINADO SUBSTRATO.....	33
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUATERNÁRIA DE α -AMILASE DE <i>ASPERGILLUS ORYZAE</i>	36
FIGURA 3 - ESTRUTURAS DO BASIDIOMA DOS COGUMELOS.	41
FIGURA 4 - CICLO MORFOLÓGICO DOS BASIDIOMICETOS EM CULTIVO SUBMERSO NO BIORREATOR.	42
FIGURA 5- <i>COPRINUS COMATUS</i> EM DIFERENTES FORMAS E DESENVOLVIMENTO DO BASIDIOMA.....	44
FIGURA 6 - FRAGMENTOS DAS ESTRUTURAS DAS CADEIAS DE AMIOSE (a), AMILOPECTINA (b) E SEUS AGRUPAMENTOS (c) NOS GRÂNULOS DE AMIDO.	52
FIGURA 7 - ESTRUTURA DO GRÃO DE TRIGO VISTO LONGITUDINALMENTE, OS SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE FARINHA DE TRIGO: COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E VALOR POR TONELADA..	53
FIGURA 8 - ETAPAS DE UM PROCESSO GENÉRICO DE PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS.....	54
FIGURA 9 - PRINCIPAIS TIPOS DE MEMBRANAS E SUAS CARACTERÍSTICAS...	57

CAPÍTULO II - VALIDAÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS COMO FERRAMENTA PARA PREDIÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR *COPRINUS COMATUS* EM MEIO DE CULTURA DE BAIXO CUSTO.

RESUMO GRÁFICO.....	61
---------------------	----

FIGURA 1 -	(A) PROCESSO EM BATELADA B1; (B) PROCESSO EM BATELADA CONTROLE BC1; (C) BATELADA B2; E (D) BATELADA CONTROLE BC2.....	69
FIGURA 2 -	PROCESSO EM PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>COPRINUS COMATUS</i> DOS MEIOS DE CULTIVO B1, BC1, B2 E BC2; E OS MODELOS MATEMÁTICOS.....	75
FIGURA 3 -	EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASES EM PROCESSO EM BATELADA DE CS _m DE <i>COPRINUS COMATUS</i>	78
FIGURA 4 -	CONCENTRAÇÃO DE AMIDO OBSERVADA (CONSUMO DE SUBSTRATO) E MODELO AJUSTADO (LOGÍSTICA MODIFICADA) NOS PROCESSOS EM BATELADA DE CS _m DE <i>C. COMATUS</i> B1, BC1, B2 E BC2.....	80

CAPÍTULO III - PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -AMILASE EXTRACELULAR PRODUZIDA POR *COPRINUS COMATUS*

RESUMO GRÁFICO.....	84
FIGURA 1 - SISTEMA DE OPERAÇÃO DO PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS VISANDO A CLARIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO EM ESCALA PILOTO.....	91
FIGURA 2 - PERFIL DE FLUXO DE PERMEADO E FATOR DE CONCENTRAÇÃO PARA MF (A); MEMBRANA DE UF DE 100 kDa (B) E MEMBRANA DE UF DE 10 kDa (C).....	103
FIGURA 3 - ATIVIDADE RELATIVA DE α -AMILASE EM RELAÇÃO A TEMPERATURA DE REAÇÃO DO EXTRATO PURIFICADO (A); ATIVIDADE RELATIVA EM RELAÇÃO A DIFERENTES PH (B)....	106
FIGURA 4 – ESTABILIDADE TÉRMICA DE α -AMILASE PURIFICADA NAS TEMPERATURAS DE 40, 50 E 60 °C DURANTE UM PERÍODO DE 180 MIN.....	108
FIGURE 5 – DEGRADAÇÃO DA SOLUÇÃO DE AMIDO (3% m.v ⁻¹) E LIBERAÇÃO DE GLICOSE AO LONGO DE 180 MIN UTILIZANDO A ENZIMA PURIFICADA EM BANHO-MARIA A 50°C.....	110

FIGURA 6 – ANÁLISE DE SDS-PAGE DE α -AMILASE PURIFICADA. A) MARCADOR PADRÃO (AMERSHAM LOW MOLECULAR WEIGHT CALIBRATION KIT FOR SDS ELECTROFORESE); B) ENZIMA PURIFICADA.....	112
---	-----

CAPÍTULO IV - CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO PRODUZIDO COM SUBPRODUTO AGROINDUSTRIAL POR *C. COMATUS*

RESUMO GRÁFICO	115
FIGURA 1 – <i>ARTEMIA SALINA</i> INOCULADA EM ÁGUA SALINA POR 24 H VISTA EM MICROSCÓPIO COM UM ZOOM DE 400 X.....	118
FIGURA 2 – PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DE NÁUPLIOS DE <i>ARTEMIA SALINA</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EEB, INCUBADOS POR 24 HORAS A 26 °C.....	123
FIGURA 3 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA REALIZADA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM POÇOS UTILIZANDO PLACAS DE PETRI PARA AVALIAR AS CEPAS <i>S. AUREUS</i> (A) E <i>E. COLI</i> (B).....	126
FIGURA 4 – ATIVIDADE RELATIVA DA α -AMILASE COM TEMPERATURA DE REAÇÃO DE 20, 30, 40, 50, 60, 70 E 80 °C DO EEB.....	128
FIGURA 5 – ATIVIDADE RELATIVA DE α -AMILASE INOCULADA A 50 °C POR 15 MIN EM DIFERENTES TAMPÕES COM PH DE 3,5 A 8,5.....	129
FIGURA 6 – ATIVIDADE RELATIVA DA α -AMILASE COM A INFLUÊNCIA DOS ÍONS METÁLICOS EM COMPARAÇÃO A AMOSTRA CONTROLE SEM ADICIONAR ÍONS METÁLICOS INOCULADOS A 50 °C POR 15 MINUTOS PARA A REAÇÃO ENZIMÁTICA.....	130
FIGURA 7 – ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA A 40, 50 E 60°C, COM E SEM ADIÇÃO DE CÁLCIO A 2,5 mM POR 180 MIN DE INCUBAÇÃO.....	131
FIGURA 8 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EXTRATO BRUTO POR 721 DIAS EM TEMPERATURA DE CONGELAMENTO (0 °C), REFRIGERAÇÃO (4 °C) E TEMPERATURA AMBIENTE (± 25 °C).....	132
FIGURE 9 – DEGRADAÇÃO DA SOLUÇÃO DE AMIDO (3% m.v ⁻¹) E LIBERAÇÃO DE GLICOSE AO LONGO DE 180 MIN EM BANHO-MARIA A 50 °C.....	134

CAPITULO V - CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DO *COPRINUS COMATUS* E PRODUÇÃO DE FARINHA PROTEICA COMO FORMA DE REAPROVEITAMENTO DO RESÍDUO EM FORMA DE *PELLETS* DO CULTIVO SUBMERSO

RESUMO GRÁFICO.....	138
FIGURA 1 - BIOMASSA ÚMIDA (BU, PELLETS TRITURADOS); BIOMASSA SECA EM ESTUFA COM CIRCULAÇÃO DE AR A 50 °C (BE); BIOMASSA LIOFILIZADA (BL).....	146
FIGURA 2 – PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DE NÁUPLIOS DE <i>ARTEMIA SALINA</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EEB, INCUBADOS POR 24 HORAS A 26 °C.....	149

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 - OPERAÇÕES UNITÁRIAS DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS.....	56
--	----

CAPÍTULO II - VALIDAÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS COMO FERRAMENTA PARA PREDIÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR *COPRINUS COMATUS* EM MEIO DE CULTURA DE BAIXO CUSTO

TABELA 1 – MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DOS CULTIVOS PARA O CRESCIMENTO DA CEPA E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM CONJUNTO.....	65
TABELA 2 - EQUAÇÕES PARA CÁLCULO DOS PARÂMETROS DA CINÉTICA AVALIADA.....	67
TABELA 3 - MODELOS MATEMÁTICOS PARA AVALIAR O CRESCIMENTO DE BIOMASSA, PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E CONSUMO DE SUBSTRATO.....	68
TABELA 4 - PARÂMETROS CINÉTICOS DO PROCESSO OBTIDOS NO CULTIVO REALIZADO NAS BATELADAS B1, BC1, B2 E BC2.....	71
TABELA 5 - PARÂMETROS PREVISTOS E CALCULADOS PARA O MODELO LOGÍSTICO MODIFICADO, MODELO GOMPERTZ MODIFICADO E MODELO BARANYI E ROBERTS PARA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BIOMASSA.....	74
TABELA 6 - PARÂMETROS OBTIDOS PELOS MODELOS.MATEMÁTICOS LUEDEKING-PIRET E GOMPERTZ MODIFICADO PARA AS CINÉTICAS DE FORMAÇÃO DO PRODUTO.....	77
TABELA 7 - PARÂMETROS μ , τ , R^2 E RMSE FORAM OBTIDOS PELO MODELO LOGÍSTICO MODIFICADO PARA CONSUMO DE SUBSTRATO (CONCENTRAÇÃO DE AMIDO) NOS DIFERENTES PROCESSOS DE BATELADA EM CS _m ESTUDADOS (B1, BC1, B2, BC2).....	79

CAPÍTULO III - PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -AMILASE EXTRACELULAR PRODUZIDA POR *COPRINUS COMATUS*

TABELA 1 – PURIFICAÇÃO DE α -AMILASE (EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO (EBE)), ETAPAS UTILIZADAS, ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA, CONCENTRAÇÃO ALCANÇADA NO PROCESSO E RENDIMENTO DESTA.....	86
TABELA 2 - MEMBRANAS UTILIZADAS NA SEPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE α -AMILASE PRODUZIDA POR <i>C. COMATUS</i> DO EXTRATO BRUTO.....	93
TABELA 3 – FRAÇÕES RETIRADAS DOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DE BAIXA RESOLUÇÃO PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA, ATIVIDADE ESPECÍFICA E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	94
TABELA 4 – DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ESPECÍFICA, PERDA E CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA AO LONGO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO PARCIAL.....	98
TABELA 5 - ATIVIDADE ESPECÍFICA, PERDA (%) E CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE NO PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO/CONCENTRAÇÃO POR UNIDADES DE ULTRAFILTRAÇÃO.....	101
TABELA 6 – PERMEABILIDADE HIDRÁULICA LIMPA E SUJA E GRAU DE OBSTRUÇÃO DAS MEMBRANAS.....	102
TABELA 7 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA TOTAL, PROTEÍNA, ATIVIDADE ESPECÍFICA, PERDA (%) E CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE NO PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO/CONCENTRAÇÃO POR SEPARAÇÃO COM MEMBRANAS EM ESCALA PILOTO.....	104
TABELA 8 – INFLUÊNCIA DOS ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE RELATIVA DE α -AMILASE AVALIANDO A SIGNIFICÂNCIA PELO TESTE DE TUKEY ($p < 0,05$). VALORES COM A MESMA LETRA EM CADA COLUNA NÃO APRESENTA DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA.....	107

CAPÍTULO IV - CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO PRODUZIDO COM SUBPRODUTO AGROINDUSTRIAL POR *C. COMATUS*

TABELA 1 – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT), FLAVONÓIDES TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DPHH, ABTS E FRAP DO EEB AQUOSO.....	124
---	-----

CAPÍTULO V - CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DO *COPRINUS COMATUS* E PRODUÇÃO DE FARINHA PROTEICA COMO FORMA DE REAPROVEITAMENTO DO RESÍDUO EM FORMA DE *PELLETS* DO CULTIVO SUBMERSO

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA BIOMASSA <i>DE COPRINUS COMATUS</i> NAS AMOSTRAS BU, BL E BE.....	143
TABELA 2 – VALORES DOS PARÂMETROS DE COR ENCONTRADOS PARA AS AMOSTRAS BU, BL E BE.....	146
TABELA 3 – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT), FLAVONÓIDES TOTAIS DO EEB E SUA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE MEDIDA POR DPHH, ABTS E FRAP.....	147

DESTAQUES GERAIS DO TRABALHO

TABELA 1 – CUSTOS PARA A PRODUÇÃO EM ESCALA LABORATORIAL E ESCALA PILOTO DO EEB LÍQUIDO, EEB LIOFILIZADO E DA FARINHA DE MACROMICETO, BEM COMO, COMPARATIVO COM O PREÇO MÉDIO COMERCIAL DESTES TIPOS DE PRODUTO.....	157
--	-----

LISTA DE FLUXOGRAMAS

CAPÍTULO III - PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -AMILASE EXTRACELULAR PRODUZIDA POR *COPRINUS COMATUS*

FLUXOGRAMA 1 – ETAPAS REALIZADAS PARA A SEPARAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -AMILASE PRODUZIDA POR <i>COPRINUS COMATUS</i>	88
--	----

DESTAQUES GERAIS DO TRABALHO

FLUXOGRAMA 1- MELHOR ALTERNATIVA PARA PRODUÇÃO, CONCENTRAÇÃO E REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUO DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE α - AMILASE PRODUZIDA POR <i>C. COMATUS</i> E OS PREÇOS DE CADA PRODUTO EM COMPARAÇÃO AO VALOR COMERCIAL.....	156
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

rpm	- Rotações por minuto
vvm	- Volume de ar que será injetado no meio de cultura pelo volume do meio de cultura por minuto
min	- Minutos
U	- Unidade internacional de atividade enzimática
EEB	- Extrato enzimático bruto
CSm	- Cultivo submerso
CS	- Cultivo em meio sólido
t_d	- Tempo de duplicidade
$\mu_{\text{máx}}$	- Velocidade máxima específica de crescimento (h^{-1})
Y_{total}	- Produtividade horária total ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
$Y_{X/S}$	- Fator de conversão de substrato em biomassa ($\text{gdb} \cdot \text{gds}^{-1}$)
$Y_{P/S}$	- Fator de conversão de substrato em produto ($\text{U} \cdot \text{gds}^{-1}$)
$Y_{P/X}$	- Fator de conversão de biomassa em produto ($\text{U} \cdot \text{gdb}^{-1}$)
gds	- gram of dried substrate
gdb	- gram of biomass in the dried basis
SmC	- Cultivo semissólido
P_{total}	- Produtividade enzimática total
$P_{X\text{total}}$	- Produtividade total de biomassa
$P_{\text{pmáx}}$	- Produtividade máxima da enzima
J	- Fluxo de permeado no equilíbrio ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)
J_0	- Fluxo de permeado no tempo zero ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)
J_{LIM}	- Fluxo de permeado no último minuto de operação ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)
J_p	- Valor de fluxo de permeado ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)
J_w	- Fluxo de permeado com água microfiltrada para a membrana limpa ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)
J'_w	- Fluxo de permeado com água microfiltrada para a membrana suja ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)
FC	- Fator de concentração
NTU	- Unidade nefelométrica de turbidez

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	25
2.	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos	29
	CAPÍTULO I	30
1.	REVISÃO DE LITERATURA	31
1.1	MERCADO DE ENZIMAS	31
1.2	ENZIMAS	32
1.3	AMILASES	33
1.3.1	Massa molecular de α -amilase	35
1.3.2	Composição elementar das amilases fúngicas	36
1.4	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	36
1.4.1	Fatores que afetam a atividade enzimática de α -amilase	38
1.4.1.1	pH ótimo de atuação de α -amilase	38
1.4.1.2	Temperatura de atuação de α -amilase produzida por macromicetos	38
1.4.1.3	Cofatores e ativadores da atividade enzimática de α -amilase	39
1.4.1.4	Inibidores da atividade de α -amilase	40
1.5	MACROMICETOS	41
1.5.1	<i>Coprinus comatus</i>	43
1.6.	CONDIÇÕES E FATORES QUE INFLUENCIAM O DESENVOLVIMENTO DA BIOMASSA E A PRODUÇÃO DE AMILASES POR MACROMICETOS	45
1.6.1.	Fontes de carbono para o cultivo e produção enzimática	46
1.6.2.	Fonte de nitrogênio que influenciam o crescimento da biomassa e produção de amilase	47
1.6.3.	Elementos e micronutrientes importantes para o crescimento da biomassa e produção enzimática por macromicetos	47
1.6.4.	Relação C/N para a produção enzimática e crescimento da biomassa de <i>C. comatus</i>	48
1.6.5.	Efeito da temperatura de cultivo na produção de biomassa e enzima	48
1.6.6.	Efeito do pH do meio de cultivo CSm	49
1.6.7.	Agitação e aeração no cultivo do macromiceto e produção de amilase	49

1.7.	AMIDO E SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DO TRIGO: POTENCIAL COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE AMILASES	50
1.7.1	Trigo e os subprodutos do seu processamento como fonte de amido para a produção de amilases	51
1.8.	RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS	54
1.8.1.	Clarificação.....	56
1.8.2.	Etapas de <i>Downstream</i> para a purificação de baixa resolução	57
1.8.3.	Etapas de <i>Downstream</i> para a purificação de alta resolução.....	59
1.8.4.	Tratamento final das enzimas	59
	CAPÍTULO II	60
	RESUMO GRÁFICO	61
1.	RESUMO	61
1.	INTRODUÇÃO	62
2.	MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1.	MANUTENÇÃO DA CEPA DE <i>COPRINUS COMATUS</i>	64
2.2.	INÓCULO	64
2.3.	MEIOS DE CULTURA PARA AS CINÉTICAS DOS PROCESSOS EM BATELADA.....	65
2.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	66
2.5	PARÂMETROS CINÉTICOS E FATORES DE CONVERSÃO	66
2.5.	MODELOS MATEMÁTICOS APLICADOS NA CINÉTICA DE BIOPROCESSOS.....	67
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	68
3.1.	CINÉTICA PARA CRESCIMENTO DE BIOMASSA, PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E CONSUMO DE SUBSTRATO	68
3.2.	MODELAGEM DE CRESCIMENTO DE BIOMASSA	74
3.3	MODELAGEM MATEMÁTICA PARA CONSUMO DE SUBSTRATO (CONCENTRAÇÃO DE AMIDO)	78
4.	CONCLUSÃO	81
	CAPÍTULO III	83
	RESUMO GRÁFICO	84
	RESUMO	84

1.	INTRODUÇÃO	85
2.	MATERIAL E MÉTODOS	88
2.1.	MANUTENÇÃO, REATIVAÇÃO, PRODUÇÃO DE INÓCULO E DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO POR <i>C. COMATUS</i>	89
2.2.	<i>DOWNSTREAM</i> (PURIFICAÇÃO)	89
2.2.1	Clarificação	89
2.2.2	Métodos de purificação de baixa resolução	90
2.2.2.1.	Purificação por precipitação de α -amilase por <i>salting-out</i> e avaliação de métodos de dessalinização	90
2.2.2.2.	Purificação utilizando separação por membranas em escala laboratorial	90
2.2.2.3	Purificação utilizando separação por membranas em escala piloto	91
2.2.2.3.1.	Análise de turbidez	94
2.3	AVALIAÇÃO DAS FRAÇÕES DOS PERMEADOS E RETIDOS DOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DE BAIXA RESOLUÇÃO	94
2.3.1	Determinação de atividade de α -amilase	94
2.3.2	Determinação da concentração de proteína	95
2.3.3	Determinação da atividade específica	95
2.4	CARACTERIZAÇÃO DA α -AMILASE PURIFICADA	95
2.4.1	Determinação do efeito do pH e da temperatura na enzima purificada produzida por <i>C. comatus</i> em CSm	95
2.4.2	Determinação do efeito dos íons metálicos na atividade de α -amilase	96
2.4.3	Estabilidade térmica de α -amilase purificada	96
2.4.4	Avaliação da hidrólise do amido e liberação de glicose	96
2.4.5	Avaliação da atividade enzimática após a liofilização	97
2.4.6	Determinação da massa molar enzimática por eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)	97
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	97
3	RESULTADOS	97
3.1	<i>DOWNSTREAM</i>	97
3.1.1	Purificação por precipitação de α -amilase por <i>salting-out</i> e avaliação de métodos de dessalinização	97
3.1.1.1.	Dessalinização da enzima precipitada pelo método de diálise	99
3.1.1.2.	Dessalinização da enzima precipitada por unidades de ultrafiltração	100

3.1.2	Purificação utilizando separação por membranas em escala laboratorial...	100
3.1.3	Purificação utilizando separação por membranas em escala piloto	101
3.2.	CARACTERIZAÇÃO DA α -AMILASE PURIFICADA.....	105
3.2.1.	Efeito do pH e da temperatura na atividade de α -amilase produzida por <i>C. comatus</i> em cultivo submerso	105
3.2.2	Determinação do efeito dos íons metálicos na atividade de α -amilase	107
3.2.3	Estabilidade térmica de α -amilase purificada	108
3.2.4	Avaliação da hidrólise do amido e liberação de glicose	109
3.2.5	Avaliação da atividade enzimática após a liofilização	111
3.2.6	Determinação da massa molar enzimática por eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes pelo método (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)	112
4.	CONCLUSÃO	113
	CAPÍTULO IV	114
	RESUMO GRÁFICO	115
	RESUMO	115
1.	INTRODUÇÃO	116
2.	MATERIAL E MÉTODOS	117
2.1.	PRODUÇÃO DO EEB	117
2.1.1.	Microorganismo e a produção de EEB	117
2.2	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO	117
2.2.1	Composição centesimal do EEB	117
2.2.2	Toxicidade por <i>Artemia salina</i>	117
2.2.3	Atividade antioxidante, compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides totais do extrato enzimático bruto	118
2.2.4	Atividade antibacteriana	119
2.3	AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA PRESENTE NO EEB...	120
2.3.1	Atividade enzimática.....	120
2.3.2	Efeito da temperatura, pH e íons metálicos na atividade enzimática do EEB	120
2.3.3	Estabilidade térmica enzimática de α -amilase.....	121
2.3.4	Estabilidade de armazenamento	121
2.3.5	Avaliação da hidrólise do amido e liberação de glicose	121

2.3.6	Avaliação da atividade enzimática após a liofilização do extrato enzimático bruto	121
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	122
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	122
3.1	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO.....	122
3.1.1	Composição centesimal do EEB	122
3.1.2.	Toxicidade do EEB frente a <i>Artemia salina</i>	122
3.1.3	Atividade antioxidante do EEB.....	123
3.1.4	Atividade antibacteriana do EEB	126
3.2	AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA PRESENTE NO EEB...	127
3.2.1	Efeito da temperatura, pH e íons metálicos na atividade enzimática do EEB	127
3.2.2	Estabilidade térmica enzimática	131
3.2.3	Estabilidade de armazenamento	132
3.2.4	Avaliação da hidrólise do amido e liberação de glicose com a aplicação do EEB	133
3.2.5	Avaliação da atividade enzimática após a liofilização do extrato enzimático bruto	135
4	CONCLUSÃO	135
	CAPÍTULO V	137
	RESUMO GRÁFICO	138
	RESUMO	138
1.	INTRODUÇÃO	139
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	140
2.1.	OBTENÇÃO DA BIOMASSA DE <i>C. COMATUS</i>	140
2.2.	PRODUÇÃO DO PÓ DE MACROMICETO POR ESTUFA COM CIRCULAÇÃO DE AR E POR LIOFILIZAÇÃO DA BIOMASSA ÚMIDA.....	140
2.2.1	Produção do pó de macromiceto da biomassa em forma <i>pellets</i> por estufa com circulação de ar.....	140
2.2.2	Produção do pó da biomassa de <i>C. comatus</i> pela técnica de liofilização .	141
2.3.	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA E DO PÓ DE <i>C. COMATUS</i>	141
2.3.1	Composição centesimal	141
2.3.2	Atividade de água (<i>Aw</i>)	141

2.3.3	Determinação da cor	141
2.3.4	Atividade antioxidante, FT e CFT da farinha de cogumelo	142
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	142
3.	RESULTADOS	142
3.1	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS AMOSTRAS.....	142
3.2	ATIVIDADE DE ÁGUA (AW)	145
3.3.	COR DAS AMOSTRAS	145
3.4.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, FT E CFT	147
3.5	TOXICIDADE POR <i>ARTEMIA SALINA</i>	149
4	CONCLUSÃO	150
	DESTAQUES GERAIS DO TRABALHO	152
	REFERÊNCIAS	158
	APÊNDICE	195
	APÊNDICE 1 – CURVA PADRÃO FUWA	195
	APÊNDICE 2 – CURVA PADRÃO BRADFORD.....	195
	APÊNDICE 3 – PREPARO DO REATIVO DE BRADFORD.....	195
	APÊNDICE 4 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE A-AMILASE	196
	APÊNDICE 5 - DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA DO <i>COPRINUS</i> <i>COMATUS</i> AO LONGO DA INCUBAÇÃO	196
	APÊNDICE 6 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO ...	197
	APÊNDICE 7 – SDS-PAGE.....	197
	APÊNDICE 8 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE DPPH	198
	APÊNDICE 9 – CURVA PADRÃO DO DPPH	198
	APÊNDICE 10 – REAGENTE FRAP	198
	APÊNDICE 11 – CURVA PADRÃO FRAP	199
	APÊNDICE 12 - REAGENTES PARA A ANÁLISE DE ABTS	199
	APÊNDICE 13 – CURVA PADRÃO DE ABTS	200
	APÊNDICE 14 – TESTE DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO.....	200
	APÊNDICE 15 – ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	201
	APÊNDICE 16 – CÁLCULO DE CUSTOS DE PROCESSO EM ESCALA LABORATORIAL (1 L) E EM ESCALA PILOTO (100 L)	203
	ANEXO	206

ANEXO 1 – TABELA DE CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO PARA <i>SALTING-OUT</i>	206
--	-----

1. INTRODUÇÃO

As enzimas vêm exercendo ao longo da história funções catalíticas mesmo quando o entendimento dos processos metabólicos exercidos por elas era desconhecido (PORTER *et al.*, 2016). Essas biomoléculas são aplicadas em substituição aos catalisadores inorgânicos, por possuírem maior especificidade, além de gerarem menor quantidade de resíduos. Estas também podem acelerar as reações de 5 a 17 vezes em ordem de magnitude (NELSON; COX, 2018).

O mercado mundial das enzimas movimentou em 2021 um montante de US\$ 11,71 bilhões e tem previsão para alcançar mais de US\$ 20,5 bilhões até 2030 (PRECEDENCE RESEARCH, 2022). O mercado nacional de enzimas possui um grande déficit, pois, das mais de 230 empresas de biotecnologia presentes no país 86% importam grande parte das tecnologias e reagentes necessários. As empresas na sua maioria são de micro e pequeno porte, não podendo ser comparadas às empresas internacionais (DAIHA *et al.*, 2019). Embora o país importe a maior parte das enzimas, a grande diversidade de micro-organismos ainda pouco explorados, justifica a necessidade de estudos para ampliar a produção de enzimas de interesse industrial.

No mercado de enzimas, as α -amilases foram avaliadas em US\$ 274,1 milhões em 2017 e tem uma estimativa de mais de US\$ 465,5 milhões em 2032 (ADROIT MARKET RESEARCH, 2019). Isto, deve-se as diversas aplicações em que estas enzimas podem ser utilizadas, principalmente na indústria de alimentos, para a produção de xarope de glicose, adoçantes, na indústria de panificação e na hidrólise do amido (SINDHU *et al.*, 2017; CARVALHO; FERNANDES, 2019; JUJJAVARAPU; DHAGAT, 2019; SINGH *et al.*, 2019). A crescente aumento do uso desta enzima também se deve principalmente a busca por alimentos saudáveis que não usem aditivos artificiais. Isto, está ligado diretamente a pandemia do COVID-19 e o aumento do estilo de vida saudável, onde os emulsificantes artificiais utilizados na panificação estão sendo substituídos pela α -amilase (ALLIED MARKET RESEARCH, 2021; FARIAS; KAWAGUTI; KOBLITZ, 2021; RUAN; ZHANG; XU, 2022). As α -amilases são responsáveis pela hidrólise do amido, em locais aleatórios da cadeia, originando compostos como maltose, maltotriose, dextrinas limite e glicose (TIWARI *et al.*, 2015; SIMAIR *et al.*, 2017; NELSON; COX, 2018).

No que se refere às amilases, este mercado tem se tornado competitivo, em virtude da numerosa variedade de ofertas e a crescente necessidade de encontrar novas fontes para a síntese destas enzimas que apresentem características que as destaquem de outras, como por exemplo, a faixa de temperatura para atuação ou de pH, estabilidade térmica. Ademais, a necessidade de novas técnicas que minimizem os custos de produção, purificação e formulação, tornando-as viáveis para a comercialização e competição no mercado (RESEARCH AND MARKETS, 2019).

Considerando a redução dos custos para a produção da enzima e levando em conta que a safra mundial de cereais é elevada, observou-se a oportunidade de aproveitar e agregar valor aos subprodutos gerados pela agroindústria. Isto poderá contribuir com a redução dos custos de produção de amilases além de aumentar a sua produção como demonstrado por estudos de Frantz *et al.* (2019) quando comparado aos estudos realizados por Paludo *et al.* (2018). Os estudos reportados por Frantz *et al.* (2019), usando subproduto, apresentaram quase 11 vezes mais atividade de α -amilase que o estudo reportado por Paludo *et al.* (2018) em meio sintético. Dos cereais produzidos mundialmente, o trigo apresentou produção de 775,3 milhões de toneladas na safra 2021/2022, em que, 75% é destinada a produção de farinha. Os resíduos e subprodutos gerados por esse seguimento industrial estão em torno de 180 milhões de toneladas em 2018 (USDA, 2018; FRANTZ *et al.*, 2019; USDA 2021). Isto abre uma gama de possibilidades para a utilização desses resíduos para a geração de produtos com maior valor agregado.

A maioria das amilases são de origem microbiana. Fontes como os microrganismos ainda são pouco exploradas, mesmo que estes organismos possuam uma alta capacidade de bioconverter matéria orgânica em outros compostos (SPIER *et al.*, 2015; PERALTA *et al.*, 2017; FRANTZ *et al.*, 2019). Os estudos que utilizam desta fonte para a produção de amilases em meio contendo subprodutos da indústria de alimentos são escassos (EL-ZALAKI; HAMZA, 1979; KEKOS *et al.*, 1987, ZILLY *et al.*, 2012). Frantz *et al.* (2019) foram os primeiros a reportarem o uso de farinha de fundo de moinho para a produção de amilases.

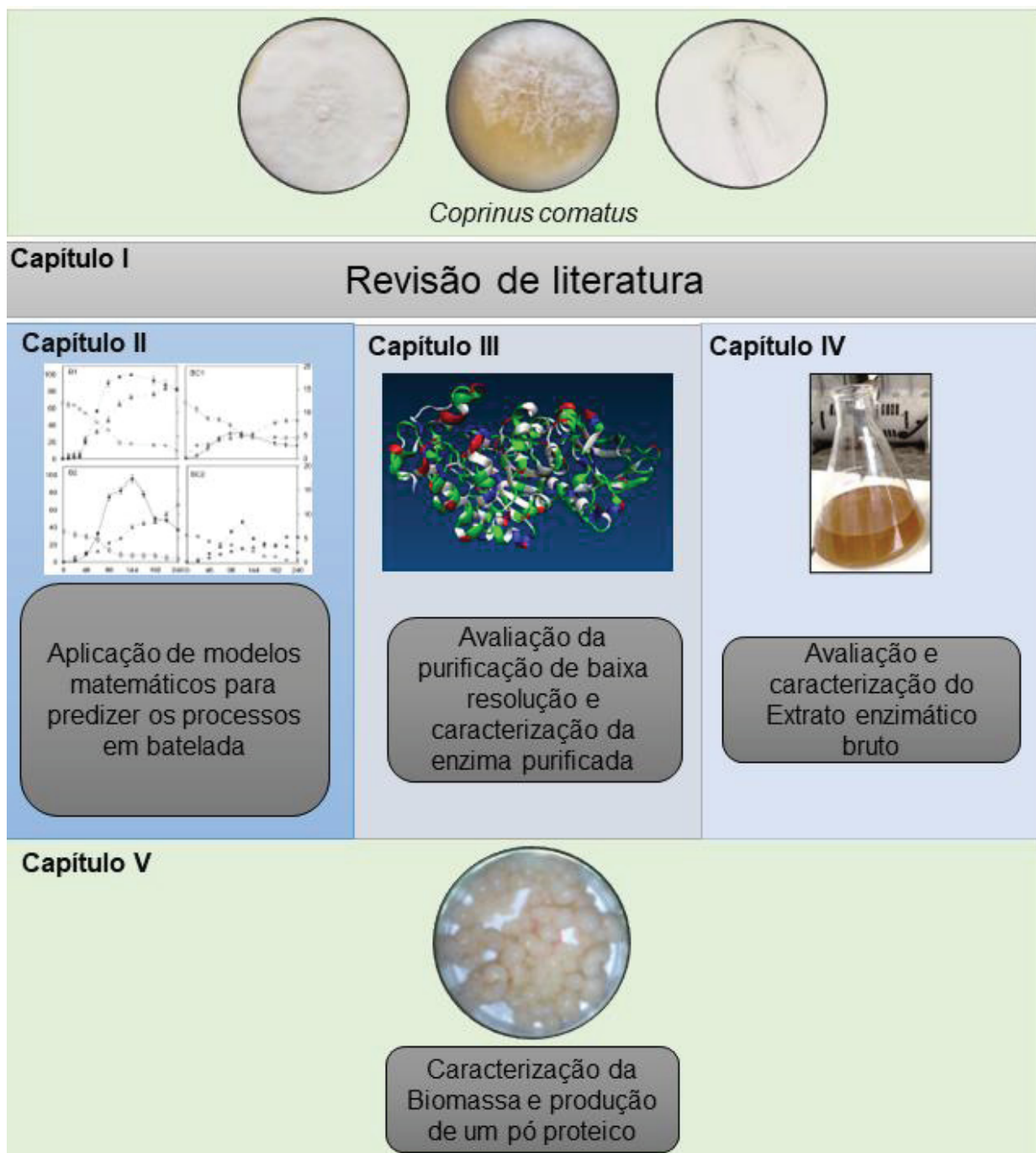
A cepa *Coprinus comatus* possui grande potencial por ser uma linhagem comestível, produtora de diferentes biomoléculas com alto valor agregado, além de produzir enzimas extracelularmente. Esta espécie foi avaliada de forma quantitativa para produção de amilases por Paludo *et al.* (2018) e Frantz *et al.* (2019). Krupodorova *et al.* (2014) avaliaram a atividade enzimática de *C. comatus* pelo método qualitativo.

Atualmente não há patentes registradas sobre amilases produzidas por *C. comatus*, bem como esse grupo enzimático produzido por outros basidiomicetos nas bases de dados das patentes como *Espacenet Patent Search* e o Google patente. Além da necessidade de uma fonte inovadora, processos mais eficientes e menos onerosos são essenciais para um produto final que possua características para competir no mercado enzimático atual. Em virtude disso, estudos que combinem e avaliem métodos de produção e purificação enzimáticas são de extrema relevância.

O processo de purificação consiste no emprego de diferentes etapas e métodos. O produto final e sua aplicação são o que definem as técnicas a serem utilizadas e o grau de purificação necessário. Quanto maior a purificação, mais oneroso o processo, e as perdas durante as etapas de produção em relação à atividade enzimática. Por isto, este trabalho visa a obtenção de uma α -amilase viável para competir no mercado de enzimas. O resíduo gerado neste processamento também foi avaliado para a obtenção de um novo produto com valor agregado.

Esta tese está estruturada em cinco capítulos, sendo o primeiro capítulo um uma fundamentação teórica. O capítulo dois uma avaliação das cinéticas e dos modelos matemáticos. O capítulo três apresenta estudos de separação e recuperação da enzima, bem como a característica da enzima purificada. O capítulo quatro apresenta estudo sobre a caracterização do extrato enzimático bruto e da enzima presente neste. Em contrapartida, o último capítulo apresenta a avaliação da utilização da biomassa como uma farinha proteica. O esquema da divisão da tese está ilustrado no resumo gráfico abaixo.

RESUMO GRÁFICO DAS ETAPAS REALIZADAS NA PESQUISA



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho propôs o estudo de um bioprocesso para o incremento da produção, recuperação e purificação de α -amilase produzida por *Coprinus comatus* (C.C) (A54ED3, Sisgen) utilizando um subproduto do processamento de trigo, denominado farinha de fundo de moinho. Bem como o desenvolvimento de um

processo verde que minimize a geração de resíduo e o aproveitamento de subprodutos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar quatro processos em batelada, dois com subproduto e dois com meio sintético, quanto ao crescimento da biomassa, atividade enzimática e degradação de amido para determinar a melhor técnica de bioprodução para a síntese de α -amilase;
- Avaliar os parâmetros cinéticos do cultivo (velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de duplicação (t_d), Produtividade (γ) e fatores de rendimento (Y));
- Realizar modelagem matemática dos processos em batelada para prever o crescimento da cepa *Coprinus comatus*, a síntese enzimática e a degradação do substrato por meio da utilização dos modelos Luedeking-Piret, Gompertz modificado, Logístico modificado, Baranyi e Roberts;
- Avaliar a concentração e purificação parcial enzimática utilizando a precipitação por *salting-out* e quantificar o rendimento desse processo;
- Analisar o sistema de separação por membranas em escala laboratorial e em escala piloto quanto à atividade enzimática, concentração e rendimento;
- Caracterizar a enzima pura frente a alguns parâmetros: temperatura ótima de atuação, pH ideal, influência de íons ativadores e inibidores de atividade, estabilidade térmica, liofilização e massa molecular por eletroforese (SDS-PAGE);
- Avaliar o extrato enzimático bruto quanto a estabilidade de armazenamento, toxicidade frente à *Artemia salina* e compostos antioxidantes, além de caracterizar e liofilizar a enzima bruta;
- Analisar a composição centesimal, cor, atividade de água, toxicidade e compostos antioxidantes da biomassa em forma de *pellets* para a produção de farinha de micomiceto.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA



1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 MERCADO DE ENZIMAS

O mercado mundial de enzimas em 2021 arrecadou aproximadamente US\$ 11,71 bilhões e tem uma estimativa de movimentar até 2030 por volta de US\$ 20,5 bilhões (PRECEDENCE RESEARCH, 2022). Esse mercado é representado em 56,7% por enzimas que são destinadas a aplicação em indústrias dos segmentos do papel, couro, têxteis, higiene, produtos de limpeza e amido (PRECEDENCE RESEARCH, 2022). O segmento alimentício acarretará no mercado de enzimas um crescimento médio anual durante o período de 2022 a 2031 previsto com um CARG (Taxa de crescimento anual composta) de 6,2%. As enzimas aplicadas nas indústrias alimentícias movimentaram em 2021 um montante de US\$1,9 bilhões e em 2031 deve alcançar um montante de US\$ 4,12 bilhões (ALLIED MARKET RESEARCH, 2022).

As enzimas responsáveis pela degradação de carboidratos são responsáveis pela maior parcela do mercado de enzimas, com 47% da receita em 2021 (GRAND VIEW RESEARCH, 2021). Dentre as enzimas disponíveis no mercado dessa classe, as amilases destacam-se, não apenas pela aplicação em diversas indústrias de alimentos, mas também em diferentes segmentos industriais, representando 30% do mercado enzimático (NAILI *et al.*, 2016; SINDHU *et al.*, 2017).

A α -amilase é uma das mais empregadas neste mercado, com uma movimentação de US\$ 274,4 milhões em 2017 e uma estimativa de US\$ 465,5 milhões até 2032. A previsão para este mercado pode ser ainda maior considerando o crescente aumento do interesse nesta biomolécula (ADROIT MARKET RESEARCH, 2019). Isto está diretamente ligado a grande gama de aplicações que esta enzima pode ser utilizada além do atual crescimento decorrente da pandemia do COVID-19. O crescimento decorrente da pandemia está ligado ao aumento de alimentos saudáveis e naturais. O exemplo mais marcante deste crescimento está ligado à sua aplicação como substituto de emulsificantes artificiais (PERSISTENCE MARKET RESEARCH, 2020). A α -amilase melhora a maciez e a vida útil dos pães, isto, em decorrência da produção de maltose e maltodextrinas na hidrólise da amilose e amilopectina. Esses açúcares redutores provocam um bloqueio na interação que ocorre entre o amido e o glúten, ocasionando o efeito *anti-staling* (antienvelhecimento), aumentando a maciez e umidade no miolo do produto. Além disso, estas enzimas podem contribuir para o desenvolvimento da reação de Maillard,

melhorando a coloração da casca do pão (FIB- FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2022). O mercado das α -amilases também vem sendo impulsionado pelo aumento do interesse por alimentos prontos, como pães, biscoitos, bolos, até mesmo pela indústria de *fast-food* (FUTURE MARKET INSIGHTS, 2022).

O crescimento também terá um aumento em virtude do consumo que tem havido nos principais mercados emergentes. O CAGR de 2022 a 2032 no mercado de α -amilases utilizadas em processos de panificação é de 3,8 %, enquanto, o mercado de panificação aumentará em 6 % neste mesmo período. A α -amilase também tem ganhado espaço na indústria química, pois é utilizada como catalizador para a produção de biocombustíveis, ramo mercadológico este que terá um CAGR de 7 % entre 2022 e 2032 (ALPHA, 2022). Por isso, há uma grande necessidade de as empresas apresentarem novos produtos que possuam eficiência e inovação com um produto final a um preço competitivo. Tornando necessário diferentes enzimas que possam competir nesse mercado cada vez mais diversificado (RESEARCH AND MARKETS, 2019).

1.2 ENZIMAS

As enzimas são proteínas que possuem estruturas tridimensionais extremamente complexas, bem como um sítio ativo que é integrado nessa estrutura. Esta característica possibilita a atuação sobre um substrato específico liberando compostos distintos com uma alta taxa de reação. Isso ocorre devido a elevada especificidade enzimática que reduz a energia requerida para a ativação da reação (VITOLO, 2009; GRÖGER; ASANO, 2012; MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA *et al.*, 2017; NELSON; COX, 2019; SHARMA *et al.*, 2021).

As enzimas geralmente possuem o sufixo *-ase* e são classificadas considerando a reação que realizam. Segundo a Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica estas são classificadas atribuindo números, começando com a sigla EC (*Enzyme Commission Numbers*), seguido de 4 números distintos. Por exemplo EC 1.2.3.4, onde 1 refere-se a classe, 2 a subclasse, 3 a sub-sub-classe e o 4 é específico de cada enzima (MADIGAN *et al.*, 2016).

Com relação as suas funções, estas exercem funções catalíticas nos organismos por meio de vários processos metabólitos, como nas classes já mencionadas, além de serem responsáveis por diversos processos bioquímicos. Estas proteínas possuem grande capacidade de catalisação, atuando em meios

aquosos, em temperaturas e pH específicos para cada uma delas (PORTER *et al.*, 2016; SINDHU *et al.*, 2017).

As enzimas formam um complexo enzima-substrato (complexo ES, Equação 1, Figura 1) com o meio em que atuam. O complexo ES ocasiona a reação e posteriormente a formação do(s) produto(s), após isto, a enzima irá retornar a forma original e estará pronta para uma nova reação (WHITEHURST; OORT, 2010).

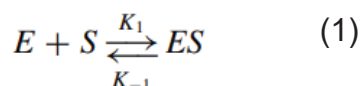
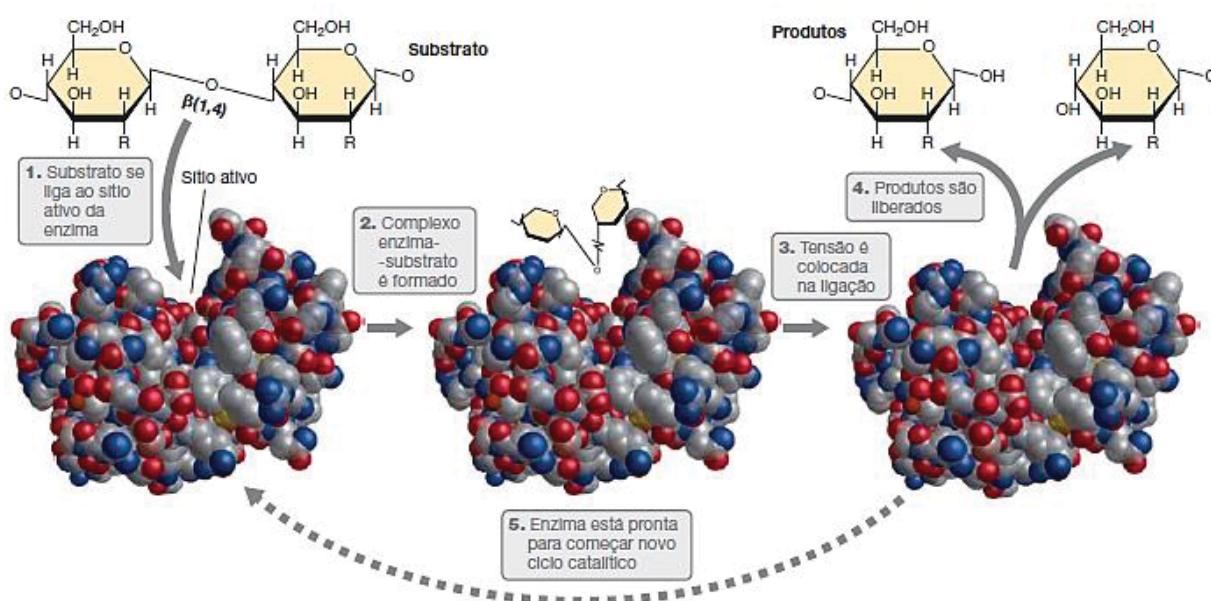


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMA-SUBSTRATO E ATUAÇÃO DESTE SOBRE UM DETERMINADO SUBSTRATO



FONTE: (MADIGAN *et al.*, 2016).

Essas biomoléculas vêm sendo aplicadas como substitutas dos catalisadores inorgânicos, isto, tendo em vista a redução de custos, principalmente com o tratamento dos subprodutos e resíduos das indústrias. Estas podem aumentar a velocidade da reação numa ordem de magnitude de 5 a 17 vezes, o que as torna amplamente mais atrativas para setores industriais como as indústrias de alimentos (OZATAY, 2020), ração animal (COWIESON; KLUENTER, 2019), fármacos (TANG *et al.*, 2020), produtos agrícolas (WILTSCHI *et al.*, 2020), têxteis (PRIYANKA; NEERAJ, 2022), biopolímeros (XU *et al.*, 2020) e bioetanol (VASIC *et al.*, 2021).

1.3 AMILASES

As amilases são enzimas responsáveis pela hidrólise do amido em compostos como α-glicose, β-glicose, glicose, maltose, β-maltose, maltotriose, dextrinas lineares,

ciclodextrinas e dextrinas (NELSON; COX, 2019; SIMAIR *et al.*, 2017). Estas podem ser enquadradas em duas categorias: as exoamilases e as endoamilases.

As exoamilases hidrolisam as extremidades não redutoras da cadeia de amido de forma contínua liberando produtos finais que possuem cadeias curtas de glicose. As que clivam apenas ligações α -1,4 são conhecidas como β -amilases (EC 3.2.1.2), enquanto as que hidrolisam também as ligações glicosídicas α -1,6 são denominadas amiloglucosidases ou glucoamilases (EC 3.2.1.3) e α -glucosidases (EC 3.2.1.20). O produto da hidrólise pode ser apenas glicose (glucoamilase ou α -glucosidase) ou maltose e dextrina β -limite (β -amilase) (PANDEY *et al.*, 2000; WHITEHURST; OORT, 2010).

As endoamilases hidrolisam as ligações α -1,4 que estão presentes na cadeia na parte interna (endo) da amilopectina ou amilose de forma aleatória liberando produtos finais com cadeias de glicose com variados tamanhos. Desta categoria a α -amilase (EC 3.2.1.1.) é a mais representativa, sendo a mais comercializada. Estas endoamilases realizam a catálise do amido liberando oligossacarídeos com a cadeia variada, isto ocorre por meio da clivagem das ligações glicosídicas α -D-(1,4), não havendo a hidrólise das ligações α -1,6 nem dos resíduos terminais de glicose. Esta proteína normalmente libera maltose, maltotriose e dextrinas limite sendo fundamental para inicializar a hidrólise do amido (GUPTA *et al.*, 2003; SOUZA; MAGALHÃES, 2010; CELESTINO *et al.*, 2014; TIWARI *et al.*, 2016; SINDHU *et al.*, 2017).

De acordo com Spier *et al.* (2006), a α -amilase teoricamente produz 13% de glicose e 87% de maltose quando degrada a amilose. Quando a amilopectina é hidrolisada pela enzima há uma produção de 8% de isomaltose, 19% glucose e 73% de maltose. Segundo Torres *et al.* (2012), a formação das dextrinas por esta enzima se dá pela hidrólise das ligações α -1,4 da cadeia do amido e quanto maior a presença de glucosamilase no meio, menor será a concentração deste componente. Nesta hidrólise também pode haver a formação de oligossacarídeos como a maltotriose. Isto ocorre devido a enzima α -amilase não hidrolisar as ramificações da cadeia de amido (α -1,6), limitando a quebra da amilopectina, o que acarreta na liberação de dextrinas limites ou oligossacarídeos que serão degradados posteriormente pela glucoamilase (SUVD *et al.*, 2001).

A α -amilase está presente em todos os organismos vivos. A grande maioria são metaloenzimas e necessitam de íons metálicos, principalmente cálcio para uma atividade de reação eficiente e também para permanecerem estáveis e íntegras

(KUMAR; SATYANARAYANA, 2007; NEVES *et al.*, 2012; SINDHU *et al.*, 2017; CARVALHO; FERNANDES, 2019).

A α -amilase atua de forma isolada ou em conjunto com outras amilases, sendo aplicada na indústria de bebidas (SUNDARRAM; MURTHY, 2014), xarope (YAKUP *et al.*, 2010; SHARMA; SATAYANARAYANA, 2011), liquefação do amido (DAMIEN *et al.*, 2010), panificação (LUNDKVIST *et al.*, 2007; SAINI *et al.*, 2017; KAMOTO *et al.*, 2018), clarificação do suco de fruta (KUMAR, 2014), fármacos (PAUL, 2017), têxtil (SAHA *et al.*, 2018; MOJSOV *et al.*, 2018), de papel e celulose (KARN; KUMAR, 2019) e detergentes (SOUZA; MAGALHÃES, 2010).

1.3.1 Massa molecular de α -amilase

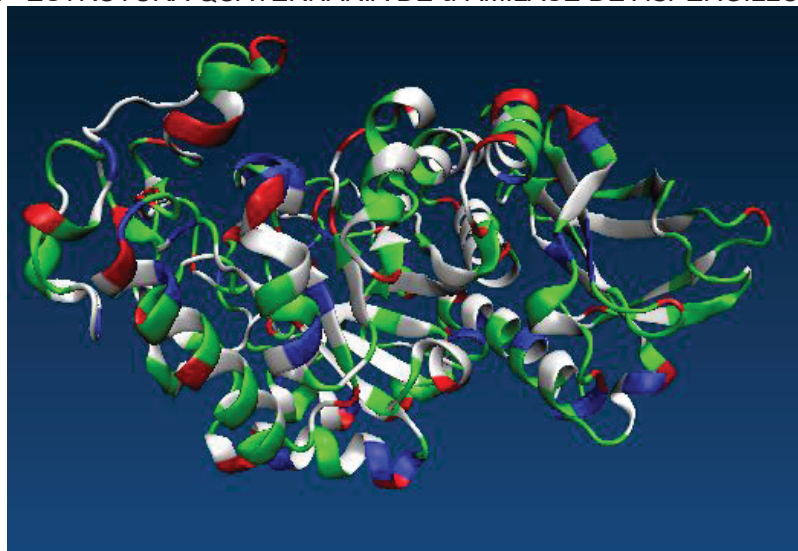
As α -amilases podem possuir massa molecular variada dependendo da sua fonte. α -amilases bacterianas relatadas na literatura variam entre 31 e 100 kDa (SINDHU *et al.*, 2017), enquanto que as de origem fúngica variam de 36 a 75 kDa normalmente (AQUINO *et al.*, 2003; MICHELIN *et al.*, 2010). Ramachandran *et al.* (2004) purificaram a α -amilase do fungo *Aspergillus oryzae* e verificaram que apresentava massa molecular de 68 kDa. Por sua vez, Ali *et al.* (2015) caracterizaram esta enzima de *Aspergillus penicillioides* e encontraram tamanho molecular de 42 kDa. Jesen *et al.* (1988) caracterizaram a α -amilase com 56 kDa produzida por *Thermomyces lanuginosus*. A massa molecular de 56 kDa também foi caracterizada na α -amilase sintetizada por *Monascus sanguineus* (TALLAPRAGADA *et al.*, 2017). *Scytalidium thermophilum* apresentou uma α -amilase de 36 kDa (AQUINO *et al.*, 2003), 75 kDa por *Paecilomyces variotii* (MICHELIN *et al.*, 2010), 59 kDa *Pichia pastoris* (WANG *et al.*, 2019), 58 kDa de *Talaromyces pinophilus* (XIAN *et al.*, 2015), 50 kDa por *Aspergillus niger* (WANG *et al.*, 2018) e 43 kDa em *Aspergillus niger* (VARALAKSHMI *et al.*, 2009). Kusuda *et al.* (2004) determinaram a massa molecular de uma α -amilase para um basidiomiceto denominado *Tricholoma matsutake*, com 46 kDa. A massa molecular da α -amilase de *Aspergillus flavus* apresentou um valor de 54 kDa (KARIM *et al.*, 2018). É possível perceber que o tamanho da enzima varia consideravelmente, isto pode estar relacionado a cepa estudada, e a quantidades de resíduos de aminoácidos presentes nesta. Entretanto, o peso molecular não influencia na atividade catalítica na enzima. Normalmente 45 resíduos de aminoácidos

corresponde a uma massa molecular de 5 kDa, sendo que glicosilação aumenta a massa molecular assim como a estrutura quaternária.

1.3.2 Composição elementar das amilases fúngicas

A composição elementar é fundamental para realizar os cálculos estequiométricos das reações biológicas, mas poucos estudos têm sido realizados para determinar esta composição. A estequiometria é importante para realizar os balanços de massa e energia dos bioprocessos; para avaliar o rendimento teórico e o experimental, bem como, a consistência deste último; além da formulação de meios de cultivo que supram todas as necessidades do microrganismo. A composição é determinada após o sequenciamento da enzima, calculando a composição de cada aminoácido presente. A composição elementar dos fungos segundo Nielsen *et al.* (2003) é $\text{CH}_{1,72}\text{O}_{0,55}\text{N}_{0,17}$ dos fungos. Em contrapartida, uma α -amilase sintetizada por *Aspergillus oryzae* (SWIFT *et al.*, 1991) possui a composição elementar $\text{C}_{2359}\text{H}_{4292}\text{O}_{1316}\text{S}_{19}\text{Ca}_1$ (dados não publicados) e tem uma estrutura quaternária como mostrado na Figura 2. Ainda não há no *Protein Data Bank* (PDB, 2021) o sequenciamento de nenhuma α -amilase de basidiomicetos.

FIGURA 2 - ESTRUTURA QUATERNÁRIA DE α -AMILASE DE *ASPERGILLUS ORYZAE*



FONTE: Swift *et al.*, (1991).

1.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As enzimas convertem um substrato específico em diversos produtos, dependendo da sua especificidade e função como visto no subitem 1.1. Cada enzima

possui uma forma de atuação e os produtos que serão liberados. A determinação desta forma de atuação (reação) normalmente é realizada por métodos quantitativos específicos, mas também podem ser realizadas avaliando a concentração do substrato. A α -amilase, por sua vez, tem sua atividade determinada mais comumente por duas formas. A atividade pode ser determinada pela metodologia proposta por Miller (1959) denominada método DNS (ácido dinitrosalicílico). Este método se baseia na reação que ocorre entre o ácido e os açúcares redutores presentes no meio reacional, produtos da hidrólise da enzima, formando um composto avermelhado após a redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico para 3-amino-5-nitrosalicílico.

Outro método muito utilizado é o iodo/iodeto proposto por Fuwa (1954), que se baseia na diminuição da intensidade da cor formada pelo complexo iodo-amido após a hidrólise das ligações glicosídicas do substrato amido pela enzima α -amilase. O complexo tem coloração azul intensa e é resultante da oclusão (aprisionamento) do iodo nas estruturas helicoidais da amilose e em menor intensidade nas ramificações da amilopectina. Na hidrólise de α -amilase, esta quebra essas ligações glicosídicas na cadeia de amido e ocorre a perda da cor tendendo ao amarelo (cor do iodo/iodeto diluído em água). Xiao *et al.* (2006) avaliaram as duas metodologias e concluíram que pelo método proposto por Fuwa (degradação do substrato amido) era possível determinar a atividade enzimática de α -amilase de forma mais precisa.

Os outros dois métodos que apesar de pouco utilizados também podem ser aplicados para a determinação da atividade de α -amilase, segundo Farooq *et al.* (2021) são pela atividade de dextrinização proposto por Sakthi *et al.* (2012) e o método de Somogyi-Nelson proposto por Nelson (1944).

Cada atividade enzimática tem um padrão para o cálculo e quantificação, dependendo da metodologia. Entretanto, as metodologias comumente consideram que uma unidade internacional (U) é a quantidade capaz de converter uma concentração específica de substrato, dependendo da enzima (0,1 mg de amido para α -amilase), por minuto por mL de reação nas condições estipuladas na análise para o ensaio enzimático. A atividade enzimática pode ser expressa em $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, quando se considera o volume utilizado da enzima para a reação ou $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ quando se avalia a concentração de proteína (enzima purificada) no meio.

Por isto é de suma importância avaliar e considerar todos os parâmetros que serão utilizados na realização do ensaio enzimático para possibilitar a determinação

da atividade enzimática de forma precisa, e comparativa com metodologias oficiais até mesmo para comparação com dados relatados na literatura.

1.4.1 Fatores que afetam a atividade enzimática de α -amilase

De maneira geral, as enzimas podem ter sua taxa de reação afetada positiva ou negativamente. Além disso, as enzimas podem também sofrer desnaturação inativação, ativação ou inibição por diversos fatores. Isto pode ocorrer em decorrência do pH, da temperatura, da concentração do substrato, da presença de cofatores, ativadores e inibidores no meio (NELSON; COX, 2019; WHITEHURST; OORT, 2010).

1.4.1.1 pH ótimo de atuação de α -amilase

O pH é um parâmetro importante acerca de atividade enzimática pois reflete diretamente nesta. Isto ocorre, pois, o pH pode melhorar o desempenho da enzima, aumentando a velocidade de reação ou até mesmo diminuindo esta velocidade. O pH ideal determina para qual tipo de aplicação a enzima deve ser utilizada, bem como, qual o melhor setor para sua atuação e melhor desempenho, como por exemplo enzimas alcalinas são mais utilizadas em indústria têxtil (SUNDARRAM, MURTY, 2014). Para as α -amilases produzidas por macromicetos, os valores de pH ótimo encontram-se na faixa de 4,6 (DU *et al.*, 2013), 5,0 (BERNARDES *et al.*, 2014; FRANTZ *et al.*, 2019), 6,0 (KUNAMNENI *et al.*, 2005; (UDDIN *et al.*, 2013), 6,5 (PALUDO *et al.*, 2018; ALMEIDA *et al.*, 2017), até 7,0 (SIQUEIRA *et al.*, 1997), mostrando a necessidade de avaliar o pH de atuação da enzima produzida, pois os valores podem diferir entre espécies do mesmo gênero.

1.4.1.2 Temperatura de atuação de α -amilase produzida por macromicetos

A temperatura de atividade das α -amilases pode variar mesmo em fontes enzimáticas classificadas no mesmo gênero (conjunto com diversas espécies). As temperaturas ideais reportadas na literatura para a atividade de α -amilase produzida por macromicetos variaram de 25 °C para a cepa *Agaricus blazei* (JONATHAN; ADEOYO, 2011) até temperaturas de 60 °C para o macromiceto *Tricholoma matsutake* (KUSUDA *et al.*, 2006). Segundo Irshad *et al.* (2012), para a α -amilase da cepa *Ganoderma tsuage* este parâmetro foi de 35 °C, enquanto, Du *et al.* (2013) observaram uma temperatura ótima de atuação enzimática de 40 °C para *Hericium*

erinaceum. Em contrapartida, a cepa *C. comatus* apresentou uma amilase com este parâmetro de atuação reportado como ideal a 50 °C (SŁAWIŃSKA; KALBARCZYK, 2011; PALUDO *et al.*, 2018; FRANTZ *et al.*, 2019). A enzima α -amilase também apresentou a mesma temperatura ideal para cepas como *Pleurotus ostreatus* (SŁAWIŃSKA; KALBARCZYK, 2011), *Ganoderma lucidum* (DO; KIM, 1985) e *Tricholoma matsutake* (HUR *et al.*, 2001).

1.4.1.3 Cofatores e ativadores da atividade enzimática de α -amilase

A síntese de α -amilase, bem como sua atividade, necessita de cofatores e ativadores para desempenharem sua função de forma eficiente, como alguns íons metálicos. Esses atuam nas reações de transferência de elétrons, reações redox, na reação enzimática, além de estabilizar a estrutura quaternária e a conformação catalítica (PALMER, 2001; NAIZMI *et al.*, 2006).

Algumas enzimas não possuem a necessidade de outros compostos químicos além dos presentes nos seus resíduos de aminoácidos para apresentar atividade enzimática. Entretanto, existem enzimas que necessitam de cofatores. Os cofatores podem ser um ou mais íons inorgânicos, entre estes o Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} . As enzimas também podem necessitar de uma coenzima, moléculas orgânicas ou metalorgânicas complexas. A coenzima atua como carreador transitório para grupos funcionais específicos. As coenzimas normalmente são derivadas de vitaminas, pois são nutrientes orgânicos que são comuns e necessários em quantidades pequenas (NELSON; COX, 2018). A grande maioria das enzimas são caracterizadas como metaloenzimas, por necessitarem da presença de íons metálicos para uma eficiente atividade enzimática (VYAS; SHARMA, 2015). Isto ocorre devido a interação do sítio catalítico e do seu respectivo substrato que é facilitada por estes íons metálicos (PASIN *et al.* 2017).

As amilases, principalmente as α -amilases são metaloenzimas, as quais apresentam uma grande necessidade do íon Ca^{2+} para a síntese enzimática, bem como para o aumento da atividade enzimática e estabilidade (GUPTA, 2003; SOUZA; MAGALHÃES, 2010). Kusuda *et al.* (2004), comprovaram que esta enzima é ativada por esse íon, porém inibida por Ba^{2+} e Ag^{2+} . Nwagu e Okolo (2011), observaram a atividade de amilase produzida por *Fusarium* sp. ser estimulada em 118% pelo íon Ca^{2+} a 2 mM. No entanto, segundo pesquisas realizadas por Frantz *et al.* (2019) e

Paludo *et al.* (2018), a α -amilase produzida por *C. comatus* não depende de Ca^{2+} para o aumento da atividade enzimática. Os autores testaram o íon em concentrações de 1, 2,5 e 5 mM e este não estimulou a atividade de α -amilase. Entretanto os meios testados pelos autores já apresentavam certa concentração de cálcio, o que pode ter sido suficiente.

Outras pesquisas também demonstraram que algumas destas enzimas não necessitam de Ca^{2+} , este tipo de enzima é importante na indústria de produção de xarope, pois a presença deste íon pode inibir a glicose isomerase que é utilizada neste processo (IMEN; MAHMOUD, 2015; SINGH *et al.*, 2012). Paludo *et al.* (2018) também relataram que a α -amilase produzida por *C. comatus* nas condições relatadas pelos autores tem a atividade estimulada em aproximadamente 40% pela presença do íon Mg^{2+} .

1.4.1.4 Inibidores da atividade de α -amilase

As enzimas podem perder a atividade por ação dos inibidores enzimáticos. Estes podem ser classificados em competitivos e não competitivos. Os inibidores competitivos atuam ocupando o sítio ativo da enzima e acabam por competir com o substrato e impedir este de se ligar e ser catalisado. Isto é possível pela similaridade da estrutura química entre o substrato e inibidor. Mas este não é catalisado pela enzima e nem forma produtos, podendo até se ligar de forma irreversível no sítio ativo (TORTORA *et al.*, 2012). Os inibidores que se ligam de forma irreversível a enzima eliminando a atividade enzimática. Em contrapartida, outros ligam-se menos firmemente apenas diminuindo a atividade enzimática quando em concentrações maiores (YADA, 2017).

Por sua vez, os inibidores não competitivos interagem com a enzima, mas não no sítio ativo. Estes ligam-se em outro sítio, denominado sítio alostérico, isto acarreta na modificação da conformação no sítio ativo e consequentemente o torna não funcional podendo ser ou não reversível (TORTORA *et al.*, 2012; YADA, 2017).

Os peptídeos antimicrobianos, conhecidos como AMPs, podem inibir a atividade de α -amilase em concentrações de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (BARD *et al.*, 2015). Meera *et al.* (2017) utilizaram uma proteína purificada do extrato vegetal de *Leucas aspera* em concentrações de $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para inibir a síntese de α -amilase fúngica. Kasar *et al.* (2016) por sua vez, utilizaram uma glicoproteína ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) extraída da semente

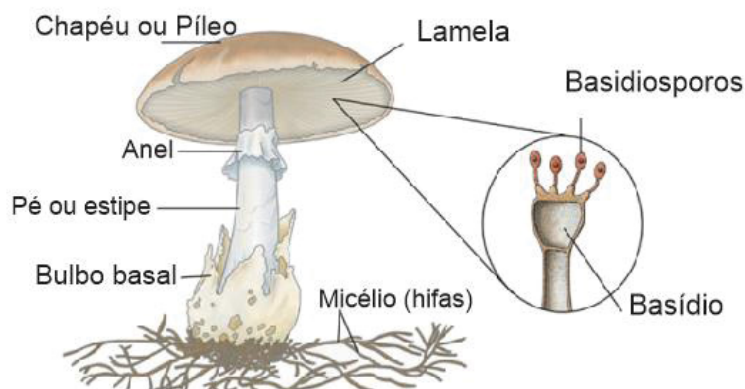
de *Withania somnifera* para inibir esta enzima. Os extratos de *Antidesma madagascariense* e *Faujasopsis senacia* em concentrações de 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ apresentaram atividade inibitória (MAHOMOODALLY *et al.* 2012). O extrato vegetal do fruto de *Aristotelia chilensis* também apresentou poder inibitório em concentrações de 41,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (RUBILAR *et al.*, 2011).

1.5 MACROMICETOS

Os cogumelos, também conhecidos como macromicetos ou basidiomicetos são fungos pluricelulares (filamentosos), pertencentes ao Reino Fungi e aos filos (conjunto de classes) Basidiomycota ou Ascomycota (STUTZ; ALVAREZ, 2017). Estes fungos podem ser encontrados em diferentes habitats, como água, solo, matéria em decomposição e rocha devido a sua capacidade de degradar uma gama de substratos (PHILIPPOUSSIS; DIAMANTOPOULOU, 2011; TONINI *et al.*, 2007; MANOHARACHARY *et al.*, 2005; ABDULLAN; IQBAL-ZAFAR, 1999).

Os macromicetos utilizam matéria orgânica como fonte para obtenção de energia, sendo eucariotos, heterotróficos, que possuem a formação de filamentos (hifas), constituintes do micélio (basídios) responsáveis pela produção dos esporos (basidiosporos). Estes possibilitam a propagação da espécie de forma sexuada. A forma sexuada de reprodução, por meio dos basidiosporos, ocorre apenas quando há a formação do corpo de frutificação (basidioma, Figura 3) (HANSON, 2008; FORZZA, 2010). O micélio é principalmente formado por polímeros naturais como quitina, proteínas e celulose (ISLAM *et al.*, 2017). Os macromicetos também são decompositores, simbioses e parasitas (MARTINS, 2011).

FIGURA 3 - ESTRUTURAS DO BASIDIOMA DOS MACROMICETOS

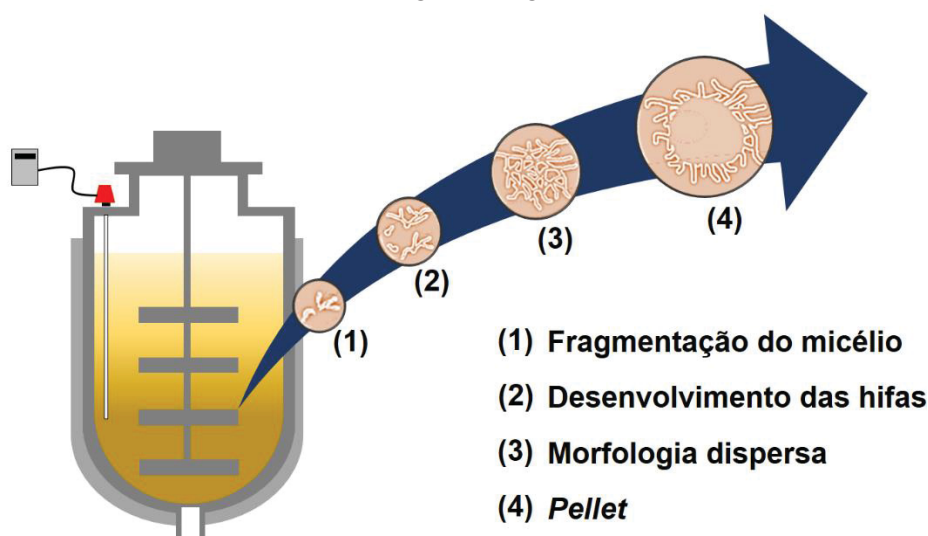


FONTE: PROSIEIX LTDA (2012).

No geral, a formação do corpo de frutificação comumente empregado nas culturas sólidas leva em torno de 2 meses. Por isto, vários estudos foram realizados utilizando o cultivo em meio líquido visando a produção em espaço compactos, em um curto período (dias) e com menores chances de contaminação.

Em laboratório normalmente não é utilizado o basidioma e consequentemente os basidiósporos. A reprodução é feita por multiplicação somática, também conhecida como reprodução assexuada, em que o micélio é fragmentado para cultivo em meios sólidos, semissólidos e/ou meios líquidos (Figura 4) (STUTZ; ALVAREZ, 2017).

FIGURA 4 - CICLO MORFOLÓGICO DOS BASIDIOMICETOS EM CULTIVO SUBMERSO NO BIORREATOR



FONTE: A autora (2023);

O micélio possui um conteúdo proteico entre 20-30% (matéria seca), além de aminoácidos como a metionina e a cistina (ULZIJARGAL & MAU, 2011). Além disso, estudos realizados por Lee *et al.* (2008) relatam maior teor de ergotionina (um composto antioxidante) no micélio do cogumelo (*Phellinus linteus*) do que no corpo de frutificação. Os macromicetos também apresentaram a capacidade de solubilizar minerais em experimentos que foram realizados para avaliar a bioacumulação (FOMINA *et al.*, 2006; RATHORE *et al.*, 2019).

Os nutrientes no micélio são mais acessíveis do que no corpo de frutificação, também conhecido como basidioma, isto pode estar ligado ao fato do micélio penetrar o substrato por meio da pressão física e da secreção de enzimas. Por sua vez, isto pode acarretar na decomposição dos polímeros biológicos em nutrientes com fácil

transporte e absorção, como os açúcares (HANEED *et al.*, 2017). Por isso, o cultivo submerso das cepas de macromicetos é vantajoso.

Os macromicetos (cogumelos) comestíveis e/ou medicinais estão inseridos no filo Basidiomycota, juntamente com macromicetos venenosos, agentes patógenos de plantas, entre outros. Atualmente estima-se serem conhecidas aproximadamente 30.000 espécies (PERALTA *et al.*, 2017; STUTZ; ALVAREZ, 2017).

A Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos (ANPC) estima a movimentação mundial de US\$ 35 bilhões do mercado dos macromicetos comestíveis, com um crescimento de 9% até 2021. A demanda nacional é maior do que a produção. Dessa forma, em 2017, o Brasil importou mais de 10 mil toneladas do cogumelo champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). O consumo nacional ainda é pequeno comparado a países asiáticos e europeus, mas vem crescendo conforme o conhecimento dos benefícios de consumo e valor nutricional se difundem entre a população. Além de serem ricos em proteínas possuem uma boa concentração de minerais, ácidos graxos, aminoácidos essenciais e fibras. Estes também contêm uma diversidade significativa de biomoléculas com propriedades medicinais e nutricionais, sendo uma forma fácil de fonte acessível para biomoléculas como fenólicos, vitaminas e antioxidantes naturais. Existem muitos relatórios que identificam os macromicetos como uma forma fácil de fonte acessível de fenólicos, vitaminas e outros antioxidantes naturais (STOJKOVIC *et al.*, 2019; DAS *et al.*, 2021).

Os macromicetos comestíveis vêm sendo amplamente estudados no que diz respeito ao seu potencial medicinal, desde propriedades anticancerígenas até imunomoduladoras (SUÁREZ-ARANGO; NIETO, 2013). Além de serem utilizados também para o desenvolvimento de suplementos de saúde, principalmente quando se trata de nutracêuticos (RATHORE *et al.*, 2019).

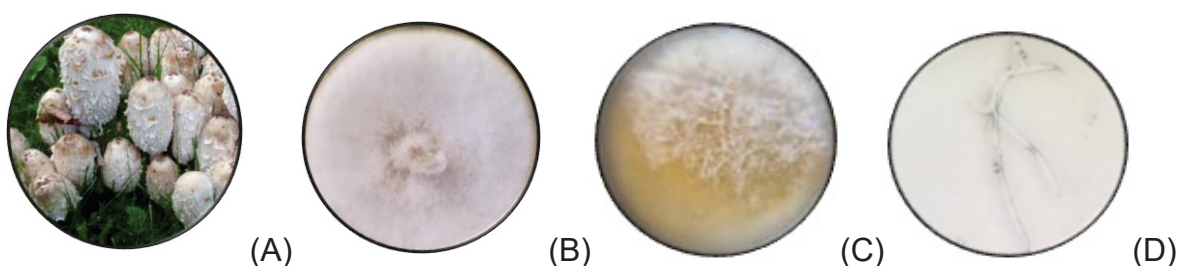
1.5.1 *Coprinus comatus*

O *Coprinus comatus* é uma das cepas que se destacam quando o assunto é macromicetos pela sua diversidade de aplicações (FALANDYSZ, 2016). Este macromiceto já foi estudado quanto ao seu potencial de regularizar os níveis glicêmicos do sangue (BAILEY *et al.*, 1984; YU *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2015; STOJKOVIC *et al.*, 2019), de agente antitumoral (ROUHANA-TOUBI *et al.*, 2015; ZAIDMAN *et al.* 2008), de recuperar danos alcóolicos causados ao fígado (OZALP *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2019), de síntese de antioxidantes (TSAI *et al.*, 2009;

TEŠANOVIĆ *et al.*, 2017; AKATA *et al.*, 2019), para a biorremediação de solos contaminados (TANG *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018), produção de enzimas (FRANTZ *et al.*, 2019; PALUDO *et al.*, 2018) entre outros potenciais.

O *C. comatus*, Figura 5, desenvolve-se no outono e na primavera, em jardins e campos de todo o mundo. É apreciado principalmente em países asiáticos pelo seu sabor, aparência e valor nutricional (LI *et al.*, 2010; REYES *et al.*, 2009; STOJKOVIĆ *et al.*, 2013; STILINOVIĆ *et al.*, 2020).

FIGURA 5 - *COPRINUS COMATUS* EM DIFERENTES FORMAS E DESENVOLVIMENTO DO BASIDIOMA



Basidioma (A); na forma de micélio (B); micélio com aproximação de 60x (C) e micélio com aproximação de 400x (D).

FONTE: Figura (A) - Lukes e Lukes, (2017); Figuras (B, C e D) – A Autora, (2023).

Os macromicetos como o *C. comatus* vêm sendo amplamente utilizados e estudados na biotecnologia. Por serem heterotróficos e utilizarem uma vasta gama de substratos, para decomposição e assimilação nutricional, demonstram não apenas a capacidade para biorremediação mas a utilização de mecanismos enzimáticos, o que por sua vez demonstra o potencial de produção de enzimas (MORADALI *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2010; PERALTA *et al.*, 2017; EVERT; EICHHORN, 2014).

Dentre as enzimas produzidas podem ser destacadas lacases (JIANG *et al.*, 2013; LU; DING, 2010; MA; RUAN, 2015; PERALTA *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2014)), celulasas (CMCases) (SHEN *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2006; FEN *et al.*, 2014), polifenoloxidase (LI *et al.*, 2007), peroxidase (IKEHATA; BUCHANAN, 2010) e lipase (KRUPODOROVA *et al.*, 2013).

A produção de amilases por essa espécie de basidiomicetos é ainda escassa. Apenas Frantz *et al.* (2019) realizaram um estudo utilizando um subproduto do moinho de trigo como substrato e observaram atividades de aproximadamente $60 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ para α -amilase e $12 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ para glucoamilase. Paludo *et al.* (2018) avaliaram essa espécie para a produção de amilases utilizando meio sintético em cultivo submerso, e observaram valores próximos a $6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (α -amilase) e $9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (glucoamilase)

enquanto Krupodorova *et al.* (2014) avaliaram este potencial apenas de forma qualitativa, obtendo resultados positivos para *C. comatus*.

1.6. CONDIÇÕES E FATORES QUE INFLUENCIAM O DESENVOLVIMENTO DA BIOMASSA E A PRODUÇÃO DE AMILASES POR MACROMICETOS

O desenvolvimento dos micro-organismos esta diretamente ligado a diferentes fatores e condições, podendo estas influenciarem positiva ou negativamente. Dentre estes fatores estão o carbono, nitrogênio, nutrientes, relação C/N, temperatura, pH e a agitação e aeração do meio de cultivo. Este tópico irá abordar cada um desses fatores separadamente.

A síntese enzimática por micro-organismos pode ocorrer de duas principais formas; por cultivo sólido (CS), comumente denominado de fermentação em estado sólido, ou por cultivo submerso (CSm) conhecida também por fermentação submersa (SUNDARRAM; MURTHY, 2014). Mas além desses também é importante considerar que existem cultivos submersos com sólidos em suspensão e sem sólidos em suspensão.

O CS é definido como o cultivo que possui inexpressiva quantidade de água livre, ou seja, água que não apresenta fluxo por estar retida nas membranas (PANDEY, 2003; KRISHNA, 2005; PASTERNAK *et al.*, 2009). Em contrapartida, o CSm é composto por um meio na forma líquida (SUNDARRAM, MURTHY, 2014), podendo os componentes estarem totalmente dissolvidos no meio (cultivo sem sólidos em suspensão) ou que apresente apenas parcial dissolução no meio (cultivo com sólidos em suspensão).

A α -amilase é comumente produzida em CSm, pois esta técnica é industrialmente mais viável pela facilidade para controlar os diversos parâmetros do cultivo, como pH, temperatura, aeração e agitação (SOUZA; MAGALHÃES, 2010). Este tipo de cultivo também facilita a excreção de biomoléculas no meio e maior absorção dos nutrientes presentes no substrato (SUNDARRAM; MURTHY, 2014; FRANTZ, 2018).

Apesar das vantagens do cultivo submerso a grande maioria dos estudos relacionados a produção enzimática de macromicetos foi realizado em CS, isto pode estar associado a semelhança que este tipo de cultivo tem com o habitat natural desses organismos, pelo interesse no crescimento do corpo de frutificação, bem

como, por possibilitar a diminuição dos custos inerentes a CSm (RASHAD *et al.*, 2009; INÁCIO *et al.*, 2015; AMIN *et al.*, 2017).

No entanto, diversos estudos reportam a técnica de CSm para macromicetos, o que mostra o potencial e adaptabilidade que estes fungos possuem. As cepas como *Lycophyllum shimeji*, *Tricholoma lobayense*, *Morcella elata*, *Pleurotus sajor-caju*, *Coriolus versicolor*, *Volvariella volvacea* (BUSWELL; CHANG, 1994), aproximadamente 50 cepas do Sul da Índia (GOUD *et al.*, 2009) e *Calvatia gigantea* (KEKOS *et al.*, 1987) foram avaliadas utilizando cultivo semi-sólido. Também foram avaliadas cepas como *Ganoderma lucidum* (DO; KIM, 1985). Assim como, *Pleurotus pulmonarius* e *Picnoporus cinnabarinus* (DÍAZ-GODÍNEZ *et al.*, 2016), *Tricholoma matsutake* (WAN *et al.*, 2012), *Agaricus blazei*, *Agaricus* sp., *Corilopsis occidentalis*, *Coriolus versicolor*, *Termitomyces clypeatus*, *Termitomyces globulus*, *Pleurotus tuher-regium*, *Podoscypha bolleana*, *Pogonomyces litydnoides* e *Nothopanus hygrophanus* (JONATHAN; ADEOYO, 2011) utilizando este mesmo tipo de cultivo. O *C. comatus* foi estudado por Paludo *et al.* (2018) em CSm sem sólidos em suspensão e por Frantz *et al.* (2019) em CSm com sólidos em suspensão. Poucos desses estudos utilizaram resíduos industriais para a redução dos custos, como por exemplo o estudo de Frantz *et al.* (2019) a, no qual foi observada uma maior produção enzimática para esta cepa.

1.6.1. Fontes de carbono para o cultivo e produção enzimática

A fonte de carbono é essencial para a produção enzimática, bem como para o crescimento da biomassa. A fonte de carbono utilizada para a produção de amilases por macromicetos é normalmente o amido (PALUDO *et al.*, 2018; WAN *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2008).

Diversas fontes de carbono têm sido estudadas para a produção de amilases por macromicetos. Além do amido solúvel, já foram reportadas pesquisas utilizando glicose (DÍAZ-GODÍNEZ *et al.*, 2016; JONATHAN; ADEOYO, 2011), maltose, sacarose (JONATHAN; ADEOYO, 2011), farelo de trigo (SOUZA *et al.*, 2008; KEKOS *et al.*, 1987), resíduos de soja (BUSWELL; CHANG, 1994), resíduos da indústria de farinha de trigo (FRANTZ *et al.*, 2019), amido de milho, amido de batata inglesa, de batata doce e amilose (WAN *et al.*, 2012).

1.6.2. Fonte de nitrogênio que influenciam o crescimento da biomassa e produção de amilase

O nitrogênio necessário para o crescimento da biomassa e produção de biomoléculas podem ser provenientes de fontes orgânicas ou inorgânicas. O cloreto de amônio não é uma fonte eficiente em comparação com outras como os nitratos (SUNDARRAM; MURTHY, 2014). Vários estudos foram realizados com diferentes fontes de nitrogênio para a produção de amilases por macromicetos. Días-Godínez *et al.* (2016) utilizaram o extrato de levedura e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Wan *et al.* (2012) também utilizaram o extrato de levedura. Por sua vez, Jonathan e Adeoyo (2011) avaliaram nitrato de sódio, peptona, extrato de levedura e ureia, com as duas últimas fontes sendo as melhores. Buswell e Chang (1994) compuseram o meio com asparagina e Kekos *et al.* (1987) utilizaram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , caseína e extrato de levedura.

Os estudos realizados por Paludo *et al.* (2018) e Frantz *et al.* (2019) para *Coprinus comatus*, mostraram que a ureia ($2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $3,76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente) é uma fonte de nitrogênio que estimula o crescimento de biomassa e a produção de amilases. Nesses mesmos estudos foi possível observar que a cepa do *C. comatus* tem preferência por meios residuais, como a farinha de fundo de moinho, por serem meios mais complexos e ricos nutricionalmente em comparação aos meios de cultivos sintéticos.

1.6.3. Elementos e micronutrientes importantes para o crescimento da biomassa e produção enzimática por macromicetos

Os componentes fosfato e o magnésio são importantes para o crescimento e também para a produção de biomoléculas por participarem da cadeia de transporte celular (HARDER; DIJKHUIZEN, 1983). O crescimento do organismo também sofre interferência dos íons como Ca^{2+} , Na^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} e Mg^{2+} (SARANRAJ; STELLA, 2013) e a síntese enzimática é influenciada por macronutrientes como K, S, P e Mg e os micronutrientes Mn, Fe, Zn, Mo e Cu (FLEGG *et al.*, 1985).

Paludo *et al.* (2018) e Frantz *et al.* (2019) relataram a necessidade de suplementar o meio com sais contendo fosfato, $7,52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de K_2HPO_4 e $3,00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 , respectivamente, mesmo em meio complexo como farinha utilizados pelos primeiros autores para o cultivo de *C. comatus*. Concentrações iniciais de 0,2M de fosfato apresentaram o melhor resultado para a produção de amilases fúngicas

(UENO *et al.* 1987; GUPTA *et al.*, 2003). A cepa *Aspergillus oryzae* teve a produção de enzima estimulada pela suplementação com Mg^{2+} , porém os íons Na^+ , K^+ , Mn^{2+} , Cl^- , Fe^{2+} e Mo^{2+} não apresentaram influência (KUNDU *et al.*, 1973). Por sua vez, para *C. comatus* os íons Na^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} não apresentaram incremento na produção de amilases em meio sintético (PALUDO *et al.*, 2018) e não houve a necessidade de suplementar a farinha de fundo de moinho com esses íons para aumentar a produção enzimática (FRANTZ *et al.*, 2019).

1.6.4. Relação C/N para a produção enzimática e crescimento da biomassa de *C. comatus*

O cultivo de macromicetos requer uma relação carbono/nitrogênio (C/N) que supra as necessidades para o crescimento da biomassa e a síntese de biomoléculas (WU *et al.*, 2004; STAJIĆ *et al.*, 2006). Essa razão pode variar conforme o produto de interesse, por exemplo para a produção de biomassa de *Ganordema lucidum* em cultivo submerso, a relação C/N é de 16,7:1 (TORRES LÓPEZ *et al.*, 2011). Em contrapartida, para *Agaricus brasiliensis* esta relação foi de 11:1 quando o cultivo foi realizado em meio sólido para crescimento da biomassa em forma de micélio (ZAGHI JUNIOR *et al.*, 2010).

Por sua vez, para a produção de biomassa e enzimas simultaneamente em cultivo submerso (CSm), a relação variou de 12:1 para a síntese de α -amilase por *Coprinus comatus* em meio sintético e 13,5:1 quando a produção objetiva a síntese de glucoamilase (PALUDO *et al.*, 2018). Por sua vez, segundo Frantz *et al.* (2019) a razão de C/N ideal foi de 10,72:1 para o crescimento e produção de enzimas para *C. comatus* após otimizarem um meio de cultivo contendo subprodutos da indústria de trigo.

1.6.5. Efeito da temperatura de cultivo na produção de biomassa e enzima

Os macromicetos possuem necessidades fisiológicas para o seu metabolismo e crescimento celular, além de outros metabólitos de interesse comercial, tais como enzimas. A temperatura ótima de cultivo pode variar conforme a cepa, sendo que a faixa de temperatura habitual para esse grupo fúngico varia entre 24 e 30 °C (SUNDARRAM; MURTHY, 2014). Para *Pleurotus ostreatus* o ideal é 24 °C (SŁAWIŃSKA; KALBARCZYK, 2011), assim como para *Lyophyllum shimeji* (KUSUDA

et al., 2006) e *Tricholoma matsutake* (KUSUDA *et al.*, 2009). Para *Tricholoma matsutake* (WAN *et al.*, 2012), *Ganoderma lucidum* (HAN *et al.* 2006) a temperatura recomendada é de 25 °C, e 28 °C para *Agaricus* sp. (UDDIN *et al.*, 2013), *Agaricus blazei* e *Pleurotus tuber-regium* (JONATHAN; ADEOYO, 2011), *Coprinus comatus* (PALUDO *et al.*, 2018; FRANTZ *et al.*, 2019) e de, até 30 °C para o *screening* de mais de 50 linhagens da Índia (GOUD *et al.*, 2009).

1.6.6. Efeito do pH do meio de cultivo CSm

O pH para o cultivo desses macrofungos está na faixa de 6,0 a 7,0. O pH 6,8 foi ideal para o crescimento e produção de enzimas para *Agaricus blazei* (JONATHAN; ADEOYO, 2011). Nos estudos reportados na literatura para a cepa *Coprinus comatus* o pH do cultivo variou entre 6,0 (PALUDO *et al.*, 2018) e 6,77 (FRANTZ *et al.*, 2019). O *Agaricus* sp. foi cultivado em pH 6,0 por Uddin *et al.* (2013) sendo pH 6,0 do meio de cultivo também utilizado para o cultivo de 30 linhagens de macromicetos por Krupodorova *et al.* (2014).

1.6.7. Agitação e aeração no cultivo do macromiceto e produção de amilase

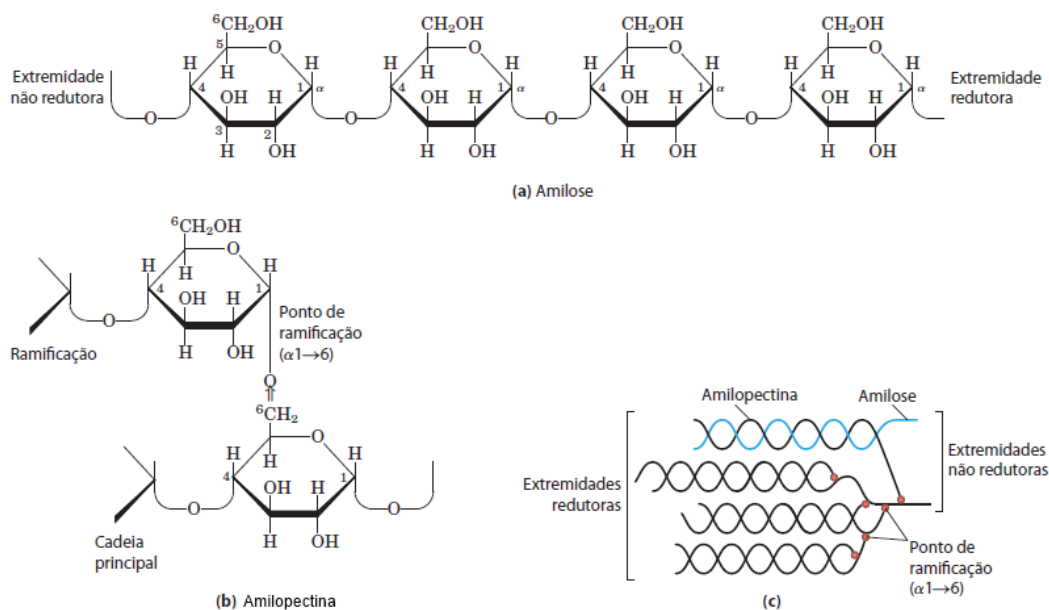
A taxa de transferência de oxigênio e a mistura de nutrientes influenciam o crescimento dos cultivos fúngicos. A agitação e aeração podem interferir na produção de biomoléculas e na morfologia micelial devido ao caráter aeróbico dos macromicetos (GUPTA *et al.*, 2003), além dos fenômenos de movimento do meio que podem interferir na formação dos *pellets* e causar cisalhamento da biomassa se feita de forma turbulenta. A escolha do tipo de agitação e aeração é de fundamental importância para o cultivo de fungos, neste caso mais especificamente dos macromicetos (MEIJER *et al.*, 1993. RIBEIRO *et al.*, 2021).

Kim *et al.* (2003) utilizaram a injeção de ar no cultivo de *Paecilomyces sinclarii* em um fluxo constante de 3,5 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) e verificaram uma dissolução do O₂ maior que 30% e uma satisfatória produção de biomassa (30 g·L⁻¹). A produção de biomoléculas por *Ganoderma resinaceum* foi melhorada com a aeração, por meio da injeção de ar atmosférico a taxa de 5 vvm (KIM *et al.*, 2006). Zhou *et al.* (2018) avaliaram o fungo *Streptomyces kanasensis* e a aeração de 2 vvm aumentou a produção de biomoléculas.

1.7. AMIDO E SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DO TRIGO: POTENCIAL COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE AMILASES

O amido é utilizado na indústria para diversos fins, que incluem tanto a produção de pães, massas, molhos quanto sua aplicação na indústria têxtil, farmacêutica e de embalagens biodegradáveis. O amido é um homopolissacarídeo constituído por glicose presente em leguminosas, tubérculos, raízes e cereais. É um composto constituído de polímeros de amilopectina e de amilose (Figura 6). À proporção que estes polímeros estão presentes no grânulo, varia em decorrência do tempo de maturação da fonte, da espécie, idade e a forma de cultivo do vegetal, assim como a região e clima desta plantação. A proporção da amilopectina e da amilose conferem ao amido propriedades físico-químicas, reológica e funcionalidades diferenciadas (VANIER *et al.*, 2017; TEIXEIRA *et al.*, 2014).

FIGURA 6 - FRAGMENTOS DAS ESTRUTURAS DAS CADEIAS DE AMILOSE (a), AMILOPECTINA (b) E SEUS AGRUPAMENTOS (c) NOS GRÂNULOS DE AMIDO



FONTE: Nelson e Cox (2014).

A amilose é um polímero composto por unidades de glucopiranosil dispostos de forma linear, ligados entre si por ligações (α -1,4), com um grau de polimerização (DP) de aproximadamente 250-1000 unidades de D-glicose e uma massa molecular de 1×10^6 g mol⁻¹. No que se refere, a amilopectina além das ligações α -1,4 entre as moléculas de α -D-glucopiranosil, há ramificações que são unidas por ligações (α -1,6). Este polímero apresenta um DP de 5000-50.000 de unidades de D-glicose e uma massa molecular com a ordem de aproximadamente 1×10^7 a 1×10^9 g mol⁻¹. A amilose

está presente normalmente nos grânulos de amido em uma proporção de aproximadamente 30 a 25%, enquanto a amilopectina representa uma parcela de 70 a 85% (VANIER *et al.*, 2017; FENNEMA: DAMODARAN *et al.*, 2010; PÉREZ *et al.*, 2009).

1.7.1 Trigo e os subprodutos do seu processamento como fonte de amido para a produção de amilases

O grão de trigo é constituído principalmente pelo endosperma, pelo pericarpo (farelo) e o gérmen, como mostra a Figura (8). O endosperma corresponde de 87 a 89% do grão em que é composto a parte amilácea e outra denominada aleurona (proteína de reserva), o pericarpo (camada externa do grão) de 7,8 a 8,6% e o gérmen de 2,8 a 3,5% que inclui a raiz primária (embrião) e o escutelo (QUAGLIA, 1991; SCHEUER *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2006; MIRANDA, 2006).

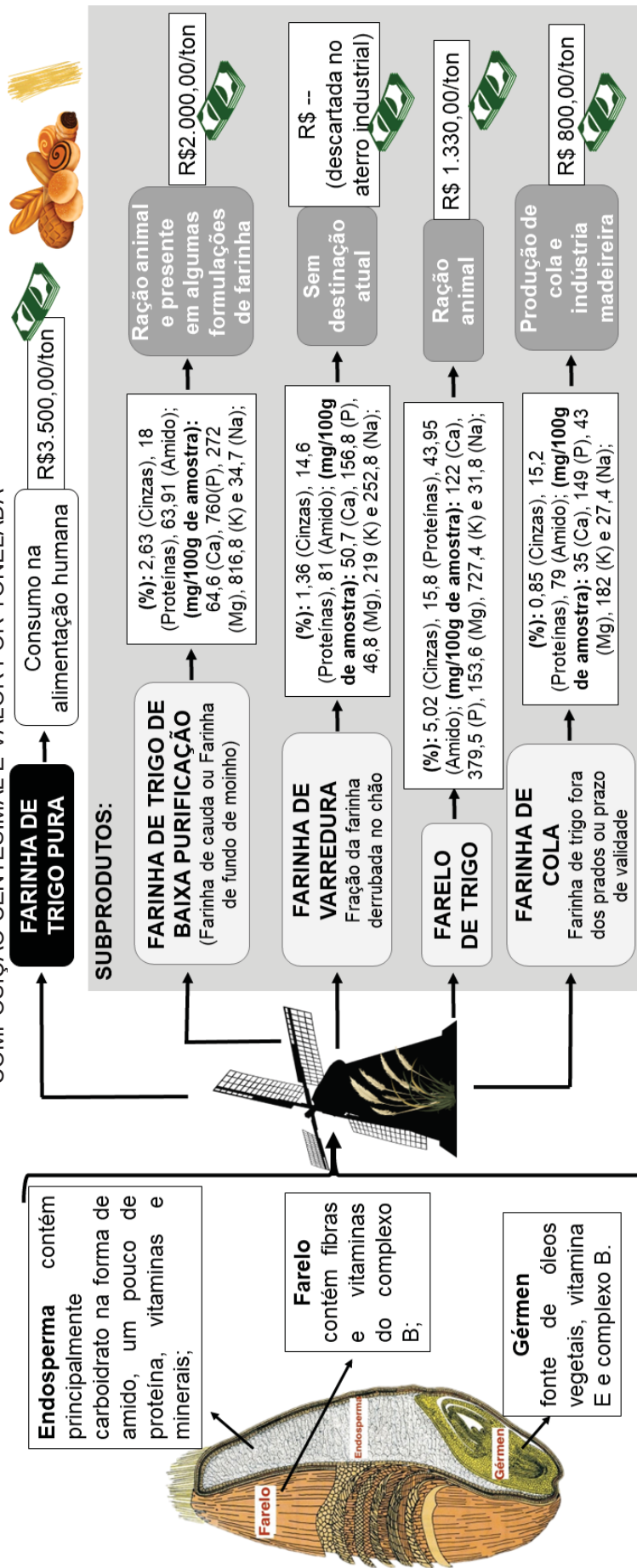
O processamento do trigo gera diferentes tipos de farinha pela combinação das 3 frações que compõe o grão (NEVES *et al.*, 2006). O endosperma amiláceo puro origina as farinhas primárias que correspondem a 65% do montante do processamento. As outras frações desse grão são responsáveis pela origem das farinhas de cauda e outros subprodutos (DELCOUR; HOSENEY, 2010).

O amido é um dos principais constituintes da farinha de trigo e em grande parte dos subprodutos dessa indústria. A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) considera a farinha de trigo o segundo alimento mundialmente mais consumido (ABITRIGO, 2019a). A produção mundial foi de aproximadamente 769,6 milhões de toneladas na safra de 2021/2022 (USDA, 2019). No Brasil a moagem de trigo atingiu 12,67 milhões de toneladas em 2021 (CANAL RURAL, 2022).

A farinha de trigo segundo a Associação Brasileira de Indústria de Trigo (ABITRIGO, 2019b) teve o consumo nacional estimado em 9,9 milhões de toneladas, sendo a média de consumo per capita de 40,62 kg. Isto deve-se as diversas utilizações dessa farinha para a produção de pães, bolos, biscoitos, massas entre outros alimentos, bem como na indústria de cola e fármacos (ABITRIGO, 2019a; ABITRIGO, 2019b; MIRANDA; DE MORI; LORINI, 2010). Vale ressaltar que 43,7% da produção de farinha é destinada para o segmento de panificação e pré-misturas. Subprodutos desde ramo giraram em torno de 2,4 milhões de toneladas em 2021, destacando-se o farelo de trigo (AGROFYNEWS, 2021).

Frantz *et al.* (2019) avaliaram a composição centesimal e de minerais dos subprodutos da indústria de farinha de trigo (Figura 7). Os resultados encontrados mostram que os subprodutos são fontes de amido, proteínas e minerais (cálcio, potássio, magnésio) e apresentam potencial para a produção de amilases por *Coprinus comatus*. Outros estudos utilizaram o farelo de trigo para a produção de α -amilases por diferentes variedades de macromicetos (EL-ZALAKI; HAMZA, 1979; KEKOS *et al.*, 1987, ZILLY *et al.*, 2012). Entretanto, os estudos reportados na literatura ainda são escassos, principalmente para o macromiceto *C. comatus*, o que possibilita a pesquisa nesta vertente.

FIGURA 7 - ESTRUTURA DO GRÃO DE TRIGO VISTO LONGITUDINALMENTE, OS SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE FARINHA DE TRIGO: COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E VALOR POR TONELADA



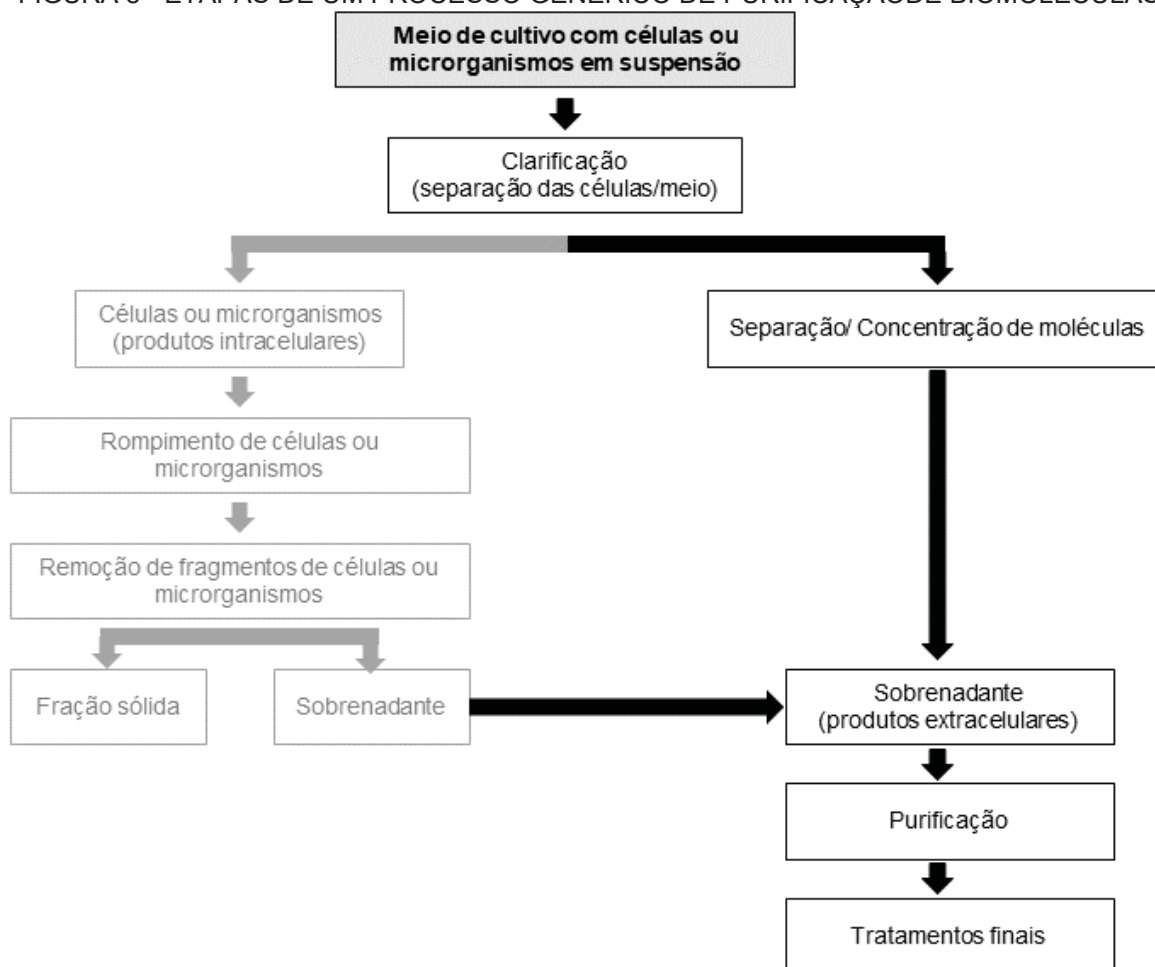
*Os valores por tonelada são aproximados e do ano de 2022.

FONTE: Adaptado de Frantz et al. (2019), Belarina (2018, dados não publicados), Peron-Schlosser et al. (2021) e MFRURAL (2022)

1.8. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

As etapas do *downstream* (Figura 8), processo de recuperação e purificação de biomoléculas, ocorrem logo após o término do cultivo. Estas etapas são de suma importância em virtude da posterior aplicação industrial (ROY; GUPTA, 2002).

FIGURA 8 - ETAPAS DE UM PROCESSO GENÉRICO DE PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS



FONTE: Adaptado de Pessoa Jr e Kilikian (2020).

A escolha das etapas de separação e recuperação das biomoléculas, principalmente enzimas, depende das características físico-químicas destas (FLICKINGER, 2013). Os processos de separação costumam ser baseados no tamanho da proteína, solubilidade, carga e suas interações com diferentes tipos de materiais para melhorar a precisão da operação (FRANTZ *et al.*, 2019). As enzimas produzidas por macromicetos são extracelulares (excretadas para fora da célula), isto, acarreta em uma redução de etapas necessárias no *downstream*. Portanto, as etapas de rompimento celular para a liberação das enzimas no meio não são necessárias. Esse fator contribui para a redução dos custos de produção e recuperação da enzima.

O *downstream* é dividido normalmente em quatro etapas gerais: a clarificação, consistindo na etapa de clarificação; purificação de baixa resolução; purificação de alta resolução; e tratamentos finais (DESAI, 2000; ROY; GUPTA, 2002; FLICKINGER, 2013) como descrito na Tabela 1.

TABELA 1 - OPERAÇÕES UNITÁRIAS DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS

Etapas do processo	Operações unitárias	Princípios
Clarificação	Filtração convencional	Tamanho de partículas
	Centrifugação	Tamanho e densidade de partículas
	Filtração tangencial (membranas)	Tamanho de partículas
	Floculação	Hidrofobicidade de partículas
	Precipitação	Solubilidade
Purificação de baixa resolução	Ultrafiltração (membranas)	Massa molar e raio hidrodinâmico de moléculas
	Extração em sistemas de duas fases líquidas	Solubilidade
Purificação de alta resolução	Cromatografia de troca iônica	Tipo e densidade de carga na superfície da biomolécula
	Cromatografia de afinidade (biológica ou química)	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção)
	Cromatografia de interação	Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção antígeno/anticorpo)
	Cromatografia de exclusão molecular	Hidrofobicidade
	Membranas absorptivas	Massa molar e características para adsorção ou sítios específicos da superfície de uma proteína
Tratamentos finais	Cristalização	Solubilidade e características de equilíbrio líquido-sólido
	Liofilização	Características de equilíbrio líquido-sólido
	Secagem	Características de equilíbrio líquido-sólido

FONTE: Pessoa Jr e Kilikian (2020).

A biomolécula que será purificada é o que deve nortear a seleção das operações unitárias de purificação. A purificação normalmente ocorre com a combinação de operações unitárias de *downstream*, sendo que o grau de purificação necessário será determinado pela aplicação do produto final (FRANTZ, 2018). O uso da α -amilase normalmente necessita de maior grau de purificação quando aplicada a indústrias farmacêuticas, alimentícias, de álcool, de detergentes e até mesmo na produção de ração animal (GUPTA *et al.*, 2003; FAR *et al.*, 2020). Diversas enzimas utilizadas no ramo industrial não necessitam de todas as etapas. Em certas situações, apenas o aumento da concentração e estabilização desta são suficientes (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2020) tais como para aplicação no tratamento de efluentes industriais.

1.8.1. Clarificação

A primeira etapa que consiste na clarificação representa a remoção das partículas sólidas em suspensão no meio de cultivo, células do organismo na sua forma fragmentada ou íntegra, reduzindo a turbidez. A escolha do processo que será utilizado na clarificação depende da densidade das partículas, tamanho destas ou a hidrofobicidade. Nesta etapa incluem-se os métodos de centrifugação, separação por membranas, filtração convencional e/ou floculação (DESAI, 2000; ROY; GUPTA, 2002; FLICKINGER, 2013). Sendo os mais utilizados a centrifugação, a separação por membranas e a filtração convencional, enquanto a floculação é mais comumente aplicada em processos de tratamento da água. Nesta etapa, assim como nas outras etapas do processo pode ocorrer a necessidade de uma combinação de operações unitárias para alcançar o produto desejado. A clarificação por centrifugação por exemplo, as vezes pode não ser suficiente para a remoção das moléculas em suspensão, sendo necessário a utilização em conjunto da operação de filtração tangencial (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2020).

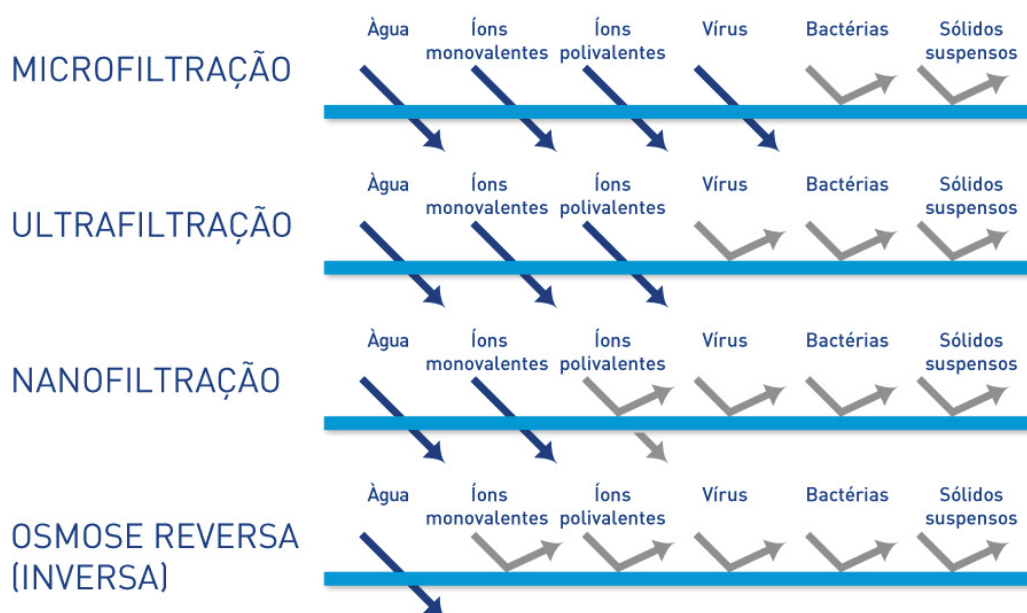
A centrifugação consiste na sedimentação da biomassa em consequência da aceleração acarretada pelo campo gravitacional. Esta operação é a que normalmente é utilizada em escala industrial (DESAI, 2000). Esse método é empregado quando as partículas são pequenas ou o extrato enzimático é muito viscoso (UZIR; DON, 2008; KATOH; YOSHIDA, 2009).

O processo de separação por membranas é definido conforme o tamanho dos poros, massa molecular e a pressão aplicada. A pressão aplicada é utilizada como força motriz e são aplicadas na concentração, fracionamento e na purificação das soluções diluídas, principalmente soluções aquosas (NOBREGA et al., 2006). Os poros podem ser classificados principalmente em cinco tamanhos diferentes. A membranas da filtração convencional são as que possuem poros de 100 µm até 11 µm. A microfiltração (MF) com 0,1 a 10 µm sendo ideal para a retenção de materiais em suspensão, a maioria dos vírus, as bactérias e os protozoários. A ultrafiltração (UF) com poros de 100-1.000 kD utilizada para fracionar e purificar soluções que contenham macromoléculas. A nanofiltração (NF) de 200-1.000 D, retém principalmente sais bivalentes. A osmose inversa (OI), por sua vez, possui poros com < 200 D e é uma barreira que impede a passagem principalmente de sais inorgânicos e moléculas orgânicas pequenas como a glicose (SCHNEIDER; TSUTIYA, 2001;

VIGNESWARAN e al., 2012). Cada tamanho de membrana é responsável por reter componentes específicos conforme apresentado na Figura 9.

FIGURA 9 - PRINCIPAIS TIPOS DE MEMBRANAS E SUAS CARACTERÍSTICAS.

TIPOS DE MEMBRANA E SUAS CARACTERÍSTICAS



FONTE: Pentair, (2018).

Por sua vez, a filtração convencional é utilizada para as partículas com tamanhos maiores, enquanto, a filtração por membrana para a separação das partículas menores. A flotação, entretanto, é utilizada para partículas que sejam hidrofóbicas (ZYDNEY, 2016; KILIKIAN; PESSOA JR, 2020).

Na filtração o meio com células suspensas é forçado a atravessar um tecido ou meio filtrante, retraindo essas células. A parte do meio que atravessa é denominado clarificado, permeado ou filtrante. A parte que não atravessa é denominado retido. As células em suspensão que se acumulam sobre o meio filtrante é a torta de filtração. A resistência à filtração pode ocorrer pelo aumento gradativo da espessura da torta de filtração (DORAN, 1995; ROUSH; LU, 2008). A filtração pode ocorrer devido a imposição de pressão na suspensão de células ou ao vácuo, resultando na passagem do meio (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2020).

1.8.2. Etapas de *Downstream* para a purificação de baixa resolução

A etapa de purificação de baixa resolução consiste na separação da biomolécula-alvo em relação a biomoléculas com diferenças físico-químicas, como

íons, pigmentos, água, entre outros (ZYDNEY, 2016). Este processo está dividido principalmente em 3 métodos: precipitação, ultrafiltração, também utilizado na etapa de clarificação, ou extração em sistemas de duas fases líquidas (KILIKIAN; PESSOA JR, 2020).

A separação por membranas está presente na clarificação dos extratos (subitem 1.7.1) como também na purificação de baixa resolução. Normalmente na clarificação é utilizado membranas com os poros de microfiltração ou poros com o diâmetro maior. Em contrapartida na purificação de baixa resolução é utilizado as membranas de ultrafiltração, nanofiltração e osmose para concentrar e purificar as biomoléculas.

A ultrafiltração consiste em separar as biomoléculas de interesse com o intermédio de membranas considerando sua massa molar e o raio hidrodinâmico destas. A presente etapa tem a função de concentrar como também purificar, pois as macromoléculas ficam retidas e a água e pequenas moléculas atravessam a membrana por meio da pressão exercida ou de centrifugação (NOBREGA *et al.*, 2005). Xian *et al.* (2015) utilizaram membranas de 0,22 μm para separar uma α -amilase produzida por *Talaromyces pinophilus*. Frantz *et al.* (2019) utilizaram a ultrafiltração com membranas de 10 kDa para dessalinizar a enzima α -amilase precipitada.

O processo de separação por membranas tornou-se mais visado devido a economia de energia. Normalmente não ocorre a mudança de fase do produto, a especificidade do processo e por ser uma separação que ocorre a temperatura ambiente (ROUSH; LU, 2008; PESSOA JR.; KILIKIAN, 2020).

Por sua vez, o método de precipitação visa reduzir o volume do extrato clarificado contendo a enzima para as etapas posteriores. Esse processo é muito utilizado em escala laboratorial e industrial, na qual a adição de sais é chamada de *salting-out* e a diminuição de *salting-in*. Isto ocorre com a adição de sais metálicos, calor, solventes orgânicos, polieletrólitos e ajuste de pH. No *salting-out*, íons como NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ são adicionados em concentrações elevadas, acima de 65%, aumentando a força iônica e consequentemente a agregando e precipitando (KILIKIAN; PESSOA JUNIOR, 2005; MARSHAK *et al.*, 1996). Estudos foram realizados para utilizar esse tipo de etapa na purificação de amilases por fungos, como He *et al.* (2017) e Yin *et al.* (2015). Kusuda *et al.* (2003) utilizaram sulfato de amônio

com uma saturação de 40%, enquanto, Tallapragada *et al.* (2017) usaram 60% de saturação.

Frantz *et al.* (2019) utilizou uma saturação de 80% de sulfato de amônio para concentrar a α -amilase de *Coprinus comatus* e obteve uma concentração de 3,12 vezes, com uma recuperação de aproximadamente 71% da atividade. Ramachandran *et al.* (2004), observaram uma concentração de 2,4 vezes utilizando sulfato de amônio com saturação entre 40-70%. Kumar *et al.* (2011) utilizaram 70-80% de saturação que resultou em uma atividade específica de 53,09 U·mg⁻¹ para α -amilase produzida por *A. niger*. Hassan *et al.* (2018) realizaram a precipitação com 60% de saturação do sulfato de amônio e verificaram uma atividade específica 20% maior.

1.8.3. Etapas de *Downstream* para a purificação de alta resolução

A etapa de purificação de alta resolução tem como objetivo a separação de biomoléculas com características semelhantes (UZIR; DON, 2008; KATOH; YOSHIDA, 2009). O processo é dividido em 6 principais métodos que podem ser: cromatografia de troca-iônica, cromatografia de afinidade, cromatografia de imunoafinidade, de interação hidrofóbica, exclusão molecular e membranas adsorptivas. O método escolhido deve levar em consideração a densidade e o tipo da carga na superfície da enzima, a hidrofobicidade, massa molar, sítios específicos e as características de adsorção da biomolécula (DESAI, 2000; KILIKIAN; PESSOA JR, 2020).

1.8.4. Tratamento final das enzimas

A etapa de tratamento final compreende procedimentos de cristalização, liofilização e/ou secagem para o equilíbrio líquido-sólido e preservação da enzima (KILIKIAN; PESSOA JR, 2020).

A enzima também necessita de um estudo de estabilidade e de formulações para avaliar qual a melhor forma de armazenamento e o rendimento ao longo do tempo, assim como da caracterização para avaliar a melhor aplicação. Existem estudos que avaliaram a estabilidade de uma enzima produzida por cogumelo em cultivo submerso, utilizando o encapsulamento e avaliaram a estabilidade desta ao longo do tempo (SPIER *et al.*, 2015; SALMON *et al.*, 2012).

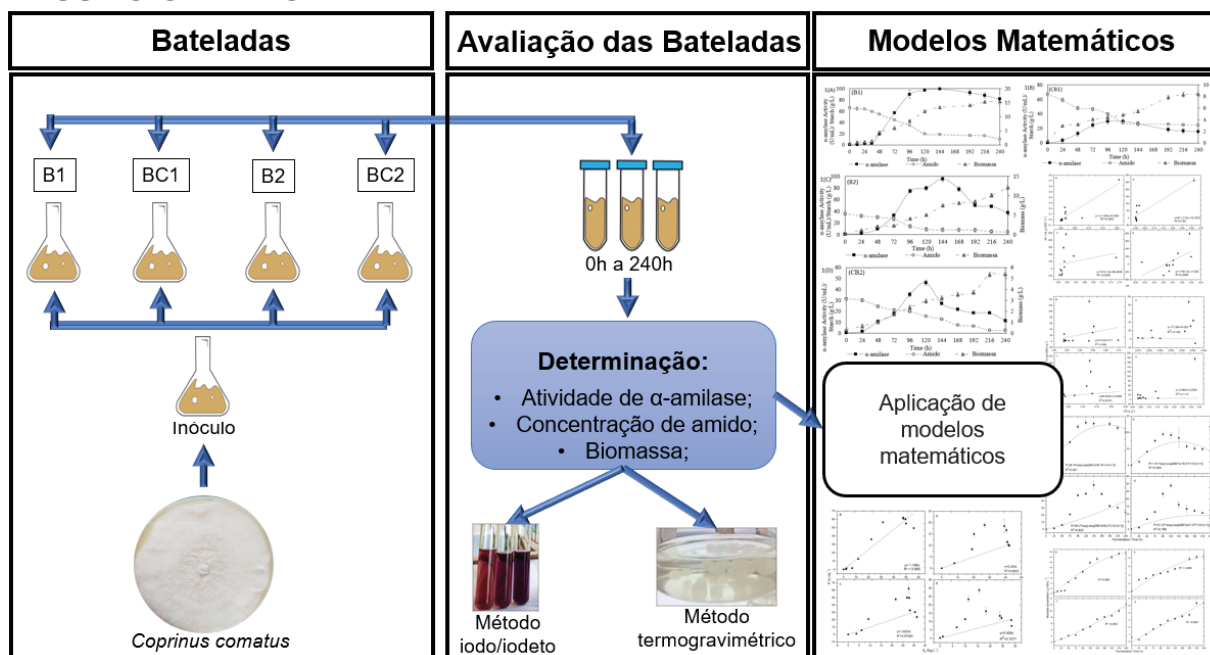
Artigo aceito na revista *Acta Scientiarum. Technology* intitulado como “**Validation of mathematical models as a tool for prediction of α -amylase production by *Coprinus comatus* in a low-cost culture médium**”.

CAPÍTULO II

VALIDAÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS COMO FERRAMENTA PARA PREDIÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR *COPRINUS COMATUS* EM MEIO DE CULTURA DE BAIXO CUSTO.



RESUMO GRÁFICO



RESUMO

Estudar novas fontes microbianas e avaliar o comportamento da cinética de crescimento para prever a produção em larga escala tornou-se essencial para competir no mercado das enzimas cada vez mais concorrido. Além disso, pesquisas utilizando matérias-primas de baixo custo, bem como de processos mais acessíveis economicamente têm ganhado interesse para maior atratividade para investimentos e para tornar o produto competitivo frente ao mercado. Na literatura o uso de macromicetos como fonte de amilases e a aplicação de modelos matemáticos para prever seu comportamento é escassa. Neste estudo foram realizadas quatro cinéticas de crescimento em diferentes composições de meios de cultura: duas utilizando farinha de fundo de moinho (FFM), um subproduto, e duas com meio sintético. Na cinética, modelos matemáticos foram utilizados para avaliar os bioprocessos e sua viabilidade de escalonamento. Modelos matemáticos, como o modelo Logístico modificado, Gompertz modificado, Baranyi e Roberts e Luedeking-Piret modificado, foram aplicados para prever o crescimento da biomassa, produção de enzimas e consumo de substrato. Os resultados mostraram a capacidade dos modelos em prever o crescimento da biomassa e o consumo de substrato (concentração de amido). Por outro lado, os modelos matemáticos descrevem com eficiência apenas a atividade enzimática máxima (α -amilase), e não os demais parâmetros do processo, devido à complexidade e diversidade das biomoléculas sintetizadas por *Coprinus*

comatus. O subproduto do moinho de trigo foi eficiente como ingrediente na composição dos meios de cultura. Além disso, concluiu-se que a formulação B2 (meio de cultura com $48,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de FFM) é o processo de batelada com maior potencial para produção de α -amilase de *C. comatus* e para o escalonamento deste processo em escala industrial. O processo em batelada B2 foi 34,55% maior do que o apresentado em estudos anteriores e 51,63% maior do que o processo em batelada controle BC2. Este trabalho é importante e válido para a comunidade científica uma vez que estudos de modelagem para macromicetos são escassos na literatura e por apresentar uma das maiores produções de α -amilases por macromicetos reportados atualmente na literatura.

Palavras-chave: Basidiomicetos; cinéticas; produção de biomassa; atividade enzimática; consumo de substrato.

1. INTRODUÇÃO

As α -amilases são significativas por apresentarem diversos usos, principalmente na indústria alimentícia, como na produção de xarope de glicose, fermentação, panificação e adoçantes (IRAM *et al.*, 2021). Da mesma forma, as α -amilases são usadas em biorrefinaria, medicina, produção de papel e na indústria química - como na produção de álcool e na hidrólise de amido (AGHAEI *et al.*, 2022; FASIM; MORE; MORE, 2021; PARIS *et al.*, 2012). Essas enzimas promovem a hidrólise do amido aleatoriamente, originando compostos como maltose, maltotriose e dextrinas limite (PAUL *et al.*, 2017). Devido a sua variedade de usos e compostos produzidos, esta enzima se destaca no mercado enzimático.

Atualmente, essa enzima vem sendo utilizada como substituto de emulsificantes na indústria alimentícia, principalmente em produtos de panificação, aumentando a vida útil e o frescor do pão, por exemplo (RUAN; ZHANG; XU, 2022). Há um interesse crescente da população mundial por alimentos com menos produtos químicos, como aditivos alimentares (FARIAS; KAWAGUTI; KOBLITZ, 2021). A pandemia do COVID-19 tem levado progressivamente a uma maior preocupação com a imunidade e a saúde, fazendo com que os consumidores busquem alimentos orgânicos e naturais. Esse aumento na demanda se reflete no mercado de enzimas, com valor estimado de US\$ 17,2 bilhões para o ano de 2027 (IBRAHIM, EID & Amin,

2021). Para o mercado de α -amilase, esse valor deve ultrapassar US\$ 465,5 milhões até 2032 apenas no ramo da panificação (ALPHA, 2022).

A maioria das amilases industriais são produzidas a partir de fontes microbianas. Dentre as enzimas microbianas, os fungos se destacam pela capacidade de hidrolisar uma variedade de fontes orgânicas (KUMARI *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2020). Apesar do alto potencial dos macromicetos em bioconverter matéria orgânica em outros compostos, estudos visando a produção de amilases por macromicetos são limitados (FRANTZ *et al.*, 2019; UDDIN *et al.*, 2013).

O *C. comatus* tem alto potencial para produzir diferentes biomoléculas com alto valor agregado e enzimas extracelulares. Esta cepa foi avaliada quantitativamente quanto à produção de amilase apenas por Paludo *et al.* (2018) e Frantz *et al.* (2019). No entanto, não há estudos sobre o uso de *Coprinus comatus* para produção enzimática em escala industrial, e não há patentes registradas sobre “ α -amilases produzidas por *C. comatus*” nas bases de patentes Espacenet Patent Search e Google Patent.

O custo de produção de enzimas em escala industrial é alto, e o meio de cultura utilizado como substrato é um dos principais responsáveis por isto. Portanto, a substituição por fontes de carbono de baixo custo é cada vez mais importante nesse mercado (BALAKRISHNAN *et al.*, 2021; PORFIRIF *et al.*, 2016). O preço das biomoléculas pode ser mais competitivo usando substratos de baixo custo (BALAKRISHNAN *et al.*, 2021; JUJJAVARAPU *et al.*, 2019). Levando isso em consideração, Frantz *et al.* (2019) avaliaram a composição centesimal e mineral de subprodutos de moagem de trigo. Os resultados mostraram que esses subprodutos são fonte de amido, proteína e minerais (cálcio, potássio e magnésio). Um desses subprodutos é a FFM, normalmente utilizada em formulações de farinha de trigo e na produção de ração animal, e possui baixo custo em relação à farinha comercializada. Frantz *et al.* (2019) também mostraram que o FFM tem potencial para produção de amilase por *Coprinus comatus*.

Nesse cenário, este trabalho avaliou processos em batelada aplicando modelagem matemática de processos bioquímicos para prever o comportamento de crescimento, produção de enzimas e consumo de substrato no meio e possibilitar o escalonamento do processo. Diante disso, a modelagem matemática é definida como a tentativa de expressar o funcionamento de uma reação por meio de equações matemáticas. A aplicação desse método é essencial para entender as interações no

bioprocesso, pois relacionam as variáveis de resposta às condições ambientais como temperatura, pH e substrato (GOMES *et al.*, 2021; COBAN & DEMIRCI, 2016).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Engenharia Bioquímica e Biotecnologia (LENGBIO) e no Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos situados na Usina Piloto A e B, respectivamente no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná. A cepa *Coprinus comatus* (A54ED3, Sisgen) foi disponibilizada pelo Laboratório de Bioprocessos de Cogumelos (LBC) da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO, PR) e o resíduo do processamento do trigo (farinha de fundo de moinho (FFM)) foi fornecido pela Belarina Alimentos S/A (Curitiba, PR), indústria de moagem e processamento de trigo.

2.1. MANUTENÇÃO DA CEPA DE *COPRINUS COMATUS*

A manutenção da cepa foi realizada conforme estudos descritos por Frantz *et al.* (2019) e Paludo *et al.* (2018). Tubos de ensaio foram preparados contendo meio PDA (Potato dextrose ágar), previamente autoclavados (121 ± 2 °C/15 min), com suplementação de 1% de subproduto do moinho de trigo. Os tubos foram resfriados inclinados e um fragmento do micélio (5x5 mm) foi transferido para a superfície do meio. Posteriormente, estes foram incubados em estufa a 28 ± 2 °C por 5 dias para completo crescimento da biomassa na superfície do meio. Os tubos de ensaio foram hermeticamente vedados e conservados em geladeira (4 ± 2 °C) por 3 meses.

2.2. INÓCULO

O inóculo foi obtido a partir da inoculação de 3 fragmentos (5mmx 5mm) em estufa bacteriológica (Incubadora Microprocessada de culturas Bacteriológica, Quimis®, Brasil), da cepa do *C. comatus* em frascos Erlenmeyer com capacidade de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo. O meio de cultivo foi produzido com o subproduto FFM, a 1% ($m \cdot v^{-1}$) diluído em água destilada (FRANTZ *et al.*, 2019) com o pH (6,0) ajustado em pHmetro (Modelo PHS-3B, Phtek) e o meio foi esterilizado (121 ± 2 °C/15 min) em autoclave.

De acordo com o estudo preliminar (Apêndice 14) realizado, foram transferidos para frascos erlenmeyer 0,5% ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) de *pellets* (massa úmida), homogeneizados e incubados em *shaker* (TECNAL, TE-424, BR) orbital a $28\pm 2^\circ\text{C}$ por 5 dias sob agitação de 120 rpm. Os meios de cultivo foram descritos conforme Tabela 1.

2.3. MEIOS DE CULTURA PARA AS CINÉTICAS DOS PROCESSOS EM BATELADA

O FFM foi caracterizado conforme análises realizadas por Frantz *et al.* (2019), avaliando a concentração de carboidratos, proteínas, lipídeos, umidade, cinzas e minerais. Este subproduto possui 13,24% de umidade, 2,68% de cinzas, 18,02% de proteínas e 63,91% de amido, com presença de Ca^{2+} , P, Mg^{2+} , K^+ e Na^+ . A Tabela 1 apresenta a composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios avaliados.

TABELA 1 – MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA A REALIZAÇÃO DOS CULTIVOS PARA O CRESCIMENTO DA CEPA E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM CONJUNTO.

Etapa	Composição do meio de cultura
Manutenção da cepa	PDA $39\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 1% ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) de FFM
Inóculo	1% ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) de FFM* diluído em água deionizada (100 mL) e pH 6,0
Batelada 1 (B1)	$105\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de FFM, $3,76\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ureia e $7,52\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fosfato de potássio monobásico (K_2HPO_4)
Batelada controle da 1 (BC1)	$67,5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de amido P.A., $3,76\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ureia e $8,82\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de K_2HPO_4 , $0,12\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ cloreto de cálcio (CaCl_2), $0,06\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ cloreto de sódio (NaCl) e $0,9\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sulfato de magnésio (MgSO_4)
Batelada 2 (B2)	$48,5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de FFM, $4,0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ureia e $8,0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de K_2HPO_4
Batelada controle da 2 (BC2)	$31\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de amido P.A., $4,0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ureia, $9,3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de K_2HPO_4 , $0,06\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 , $0,075\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl e $0,4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO_4 .

*FFM – Farinha de fundo de moinho;

Fonte: A autora, (2023).

Os cultivos submersos (CSm) foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL dos meios analisados (B1, BC1, B2 e BC2) com aeração por difusão realizada em agitador orbital do tipo *shaker*. Os meios utilizados em cada CSm tiveram o pH ajustado (6,0), e foram autoclavados ($121\pm 2^\circ\text{C}/15\text{ min}$), após foram inoculados e incubados em *shaker* com agitação orbital de 120 rpm a $28\pm 2^\circ\text{C}$ por 240 h. A cada 24 h foram retiradas amostras em triplicata do ponto analisado para avaliação da atividade enzimática de α -amilases ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), concentração de amido ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

A razão carbono/nitrogênio (C/N) do processo em batelada, calculado por meio de testes preliminares, utilizando o subproduto FFM (B1) foi de 10,72:1 e para o B2 foi de 7,58:1. O ensaio utilizando o meio B2 foi avaliado para testar uma concentração de C/N menor do que B1, e também visando a diminuição da quantidade necessária de subproduto e do amido residual ao final do processo. Os meios de cultura utilizados foram escolhidos baseados nos estudos realizados por Frantz *et al.* (2019), o meio B1 como o meio otimizado no Delineamento composto central rotacional (DCCR). Enquanto, o meio B2 um dos meios do DCCR que apresentou atividade de α -amilase semelhante a B1, mas com menor concentração de subproduto. Os meios de cultura controle (BC1 e BC2) foram preparados com base na composição de seus respectivos meios utilizando subproduto FFM, BC1 baseado em B1 e BC2 em B2.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

O crescimento da biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi determinada pelo método termogravimétrico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) descrito no Apêndice 5 e a concentração de amido ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi quantificado conforme metodologia AOAC (1996.11, 1995). O ensaio enzimático (atividade de α -amilase, $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi determinado pelo método colorimétrico proposto por Fuwa (1954) e adaptado por Paludo *et al.* (2018), descrito no Apêndice 4.

2.5 PARÂMETROS CINÉTICOS E FATORES DE CONVERSÃO

Os cálculos de tempo de duplicação (t_d , h), fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$, $\text{U}\cdot\text{gs}^{-1}$), de biomassa em produto ($Y_{P/X}$, $\text{U}\cdot\text{gx}^{-1}$), de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$, $\text{gx}\cdot\text{gb}^{-1}$), produtividade de biomassa (Y_x , $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), produtividade enzimática (Y_p , $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) e velocidade máxima específica de crescimento microbiano ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) foram realizados para cada uma das bateladas testadas considerando-se os dados obtidos ao longo do cultivo (Tabela 2). Os cálculos foram realizados com o auxílio do método proposto por Le Duy e Zajic (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

TABELA 2 - EQUAÇÕES PARA CÁLCULO DOS PARÂMETROS DA CINÉTICA AVALIADA.

Parâmetros cinéticos e fatores de conversão			
Tempo de duplicação	$T_d = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}}$		
Fatores de conversão	$Y_{\frac{X}{S}} = -\frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$	$Y_{\frac{P}{S}} = -\frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f}$	$Y_{\frac{P}{X}} = \frac{P_f - P_0}{X - X_0}$
Produtividade	$Y_X = \frac{X_f - X_0}{t_t}$	$Y_P = \frac{P_f - P_0}{t_t}$	
Velocidade máxima específica de crescimento	$\mu_{\text{máx}} = \frac{\ln X - \ln X_0}{t_f - t_0}$		

X_0 – biomassa inicial (g.L⁻¹); X_f – biomassa final (g.L⁻¹); t_t – tempo total de cultivo (h); S_0 – substrato inicial (g/L); S_f – substrato final (g.L⁻¹); P_0 – produto inicial (U.L⁻¹); P_f – produto final (U.L⁻¹); D_t – tempo de duplicação (h); $Y_{X/S}$ – Fator de conversão de substrato em biomassa (g_x.g_b⁻¹); $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em produto (U.g_s⁻¹); $Y_{P/X}$ – Fator de conversão de biomassa em produto (U.g_x⁻¹); Y_x – Produtividade da biomassa (g.L⁻¹.h⁻¹); Y_p – Produtividade enzimática (U.L⁻¹.h⁻¹); $\mu_{\max}$ – Velocidade máxima específica de crescimento (h⁻¹).

Fonte: A autora, (2023).

2.6. MODELOS MATEMÁTICOS APLICADOS NA CINÉTICA DE BIOPROCESSOS

Diferentes modelos matemáticos (Tabela 3) foram testados para avaliar os dados experimentais obtidos na cinética de crescimento da biomassa (g.L⁻¹ na base úmida (b.u)) como previamente feito por Gomes *et al.* (2021) e Spier *et al.* (2009). Todos os modelos foram calculados usando OriginPro 8.5 (OriginLab, Massachusetts, EUA, 2018), Excel (Microsoft®) e Microfit® (SIQUEIRA, 2014). O coeficiente de determinação (R²) e o erro quadrático médio (RMSE) foram utilizados para determinar o ajuste adequado dos modelos matemáticos em relação às cinéticas de processos em bateladas.

As modificações feitas nos modelos estão detalhadas nas respectivas referências. Os presentes autores apenas modificaram o sinal positivo do 1 para negativo no modelo de Gompertz (CHENG *et al.* 2010), que foi aplicado para prever o crescimento da biomassa. Durante as análises, o modelo proposto por Cheng *et al.* (2010) demonstrou não ser capaz de prever o crescimento da biomassa de macromicetos. O crescimento de biomassa previsto pelo modelo ocorria de forma acelerada como ocorre em crescimentos de bactérias ou leveduras, que possuem o tempo de duplicação menor se comparados aos macromicetos, não prevendo os dados experimentais. Após a modificação do sinal no modelo de Gompertz foi possível prever o comportamento de crescimento de biomassa.

TABELA 3 - MODELOS MATEMÁTICOS PARA AVALIAR O CRESCIMENTO DE BIOMASSA, PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E CONSUMO DE SUBSTRATO.

Modelos	Equações	Parâmetros calculados	Referências
Crescimento de biomassa			
Gompertz modificado	$X(t) = X_f \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_{max} e}{X_f} (\lambda - t) - 1 \right] \right\}$	X_f, μ_{max}	Cheng <i>et al.</i> (2010) com modificações
Logístico modificado	$X(t) = \frac{X_0 \exp(\mu_{max} t)}{1 - \left(\frac{X_0}{X_f} \right) (1 - \exp(\mu_{max} t))}$	μ_{max}, X_f	Ramprakash e Muthukumar (2015)
Baranyi e Roberts	$X(t) = X_0 + \mu_{max} \left(x + \left(\frac{1}{X_f} \right) \log \left(\frac{1 + \exp(-X_f(t-\lambda))}{1 + \exp^{X_f \lambda}} \right) \right)$	$X_f, \mu_{max}, \text{lag } (\lambda)$	Siqueira (2014)
Produção enzimática (atividade de α-amilase)			
	$P(t) = P_0 + \alpha A(t) + \beta B(t)$		
Luedeking e Piret modificado	$A(t) = P_0 \left(\frac{\exp(\mu_{max} t)}{1 - \frac{P_0}{P_{max}} (1 - \exp(\mu_{max} t))} \right)$ $B(t) = \frac{P_{max}}{\mu_{max}} \ln \left(1 - \frac{P_0}{P_{max}} (1 - \exp(\mu_{max} t)) \right)$	$P_{max}, \mu_{max}, \alpha, \beta$	Tarafdar <i>et al.</i> (2021); Gomes <i>et al.</i> (2021)
Gompertz modificado	$P(t) = P_{max} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{Y_p e}{P_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$	$P_{max}, \text{lag } (\lambda)$	Mahdinia <i>et al.</i> (2019)
Consumo de substrato (Concentração de amido)			
Logístico modificado	$S(t) = \frac{S_0}{1 + \exp(\mu_{max}(\tau - t))}$	μ_{max}, τ	Mahdinia <i>et al.</i> (2019)

P – produto (enzima); t – tempo de cultivo; α – constante empírica de dependência do crescimento da biomassa; β – constante empírica de não-dependência do crescimento da biomassa; P_0 – produto final; (t); P_{max} – máxima atividade enzimática; Y_p – produtividade enzimática; λ – fase lag; X_0 – biomassa inicial; X_f – biomassa final; S_0 – substrato inicial; e – constante de Euler: 2.71; μ_{max} – Velocidade máxima específica de crescimento; τ – tempo máximo de degradação de substrato.

Fonte: A autora, (2023).

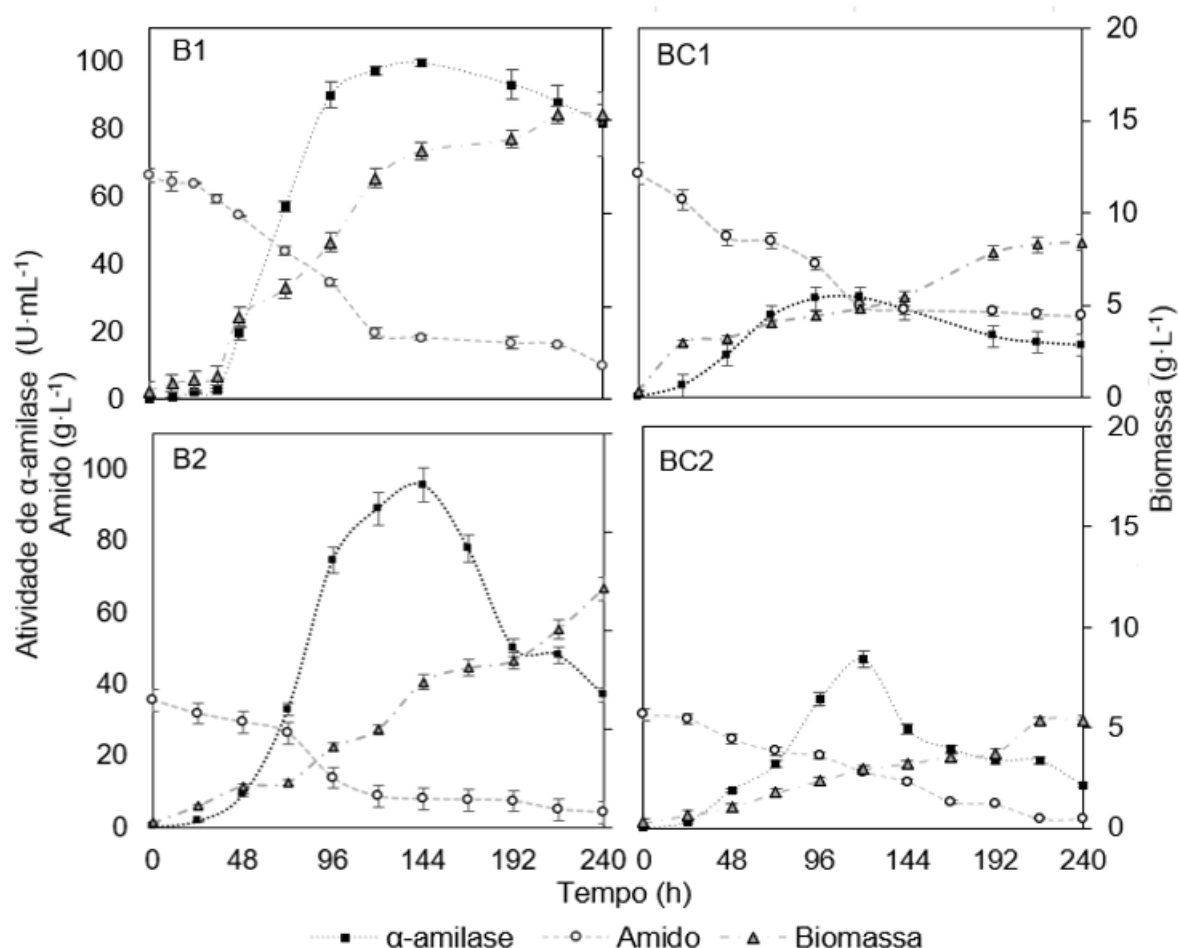
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. CINÉTICA PARA CRESCIMENTO DE BIOMASSA, PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E CONSUMO DE SUBSTRATO

O primeiro conjunto de ensaios foi realizado para avaliar a cinética enzimática em dois meios de cultura (B1 e B2) e seus respectivos meios de controle (BC1 e BC2). A Figura 1 apresenta a cinética realizada para avaliação do crescimento de biomassa

($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), produção de enzimas (atividade de α -amilase, $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) e consumo de substrato (concentração de amido, $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

FIGURA 1 - (A) PROCESSO EM BATELADA B1; (B) PROCESSO EM BATELADA CONTROLE BC1; (C) BATELADA B2; E (D) BATELADA CONTROLE BC2.



*Cultivos submersos (CSm) para a síntese de α -amilase por *Coprinus comatus*, com condições fixadas de taxa de inoculação ($0,5\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$), pH inicial (6,83), temperatura de incubação ($28\pm 2^\circ\text{C}$) e agitação de 120 rpm em agitador orbital do tipo *shaker*.

Fonte: A autora, (2023).

Como demonstrado na Figura 1, os processos em batelada B1 ($105 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e B2 ($48,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) com FFM como substrato mostraram a maior produção de biomassa, acima de $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, quando comparados aos processos em batelada controle (BC1 e BC2). Os processos controle, que utilizaram amido P.A. apresentaram concentrações abaixo de $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em 240 h de cultivo. O crescimento de biomassa foi verificado ainda na fase log de crescimento, em que o fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) variaram de $0,17 \text{ g}\cdot\text{gds}^{-1}$ ($\text{g biomassa}\cdot\text{g de substrato}^{-1}$) para BC2 até aproximadamente $0,4 \text{ g}\cdot\text{gds}^{-1}$ para B2. Essa diferença pode estar relacionada à

disponibilidade de biomoléculas no meio devido à complexidade da composição da FFM em relação ao meio sintético. De acordo com Frantz *et al.* (2019), o subproduto FFM é rico em proteínas, lipídios, fibras, cálcio, magnésio e fósforo, e compostos complexos essenciais para o crescimento micelial. Estudos relatam a importância de meios de cultura complexos para aumentar o crescimento de microrganismos (FRANTZ *et al.*, 2019; ADEBAYO-TAYO; UGWU, 2011). O amido e as proteínas presentes na FFM são fontes de energia, carbono, nitrogênio, aminoácidos e compostos essenciais para o metabolismo dos seres vivos. A partir disso, é possível compreender a diferença entre as bateladas com um subproduto e um meio sintético.

Além disso, analisando o comportamento da cepa nas bateladas, é possível afirmar que a produção da enzima está associada ao crescimento micelial, comportamento também observado por Frantz *et al.* (2019).

A hidrólise do amido na atividade enzimática máxima (144h, $99,51 \pm 1,11 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi de 72% na batelada B1, enquanto BC1 hidrolisou 59,24% do amido no pico da atividade enzimática (120h, $29,77 \pm 1,23 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$). Na batelada B2, a α -amilase hidrolisou 42,03% do amido em 144h na atividade máxima ($95,51 \pm 2,70 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), enquanto em BC2, a hidrólise foi de apenas 36,05% em 120h no pico ($46,20 \pm 1,27 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$). As bateladas B2 e BC2 apresentaram menor hidrólise de amido ao longo do tempo. Por outro lado, apresentaram menor concentração de amido residual, comparadas a B1 e BC1. Isso é importante para a viabilização do processo industrial, pois há menos resíduos para descarte e posterior tratamento.

Os processos em batelada para controle apresentaram pico de atividade enzimática em menor tempo comparados às suas respectivas bateladas com subprodutos (às 120h para BC1 e BC2, e 144 h para B1 e B2). Por outro lado, os processos BC1 e BC2 apresentaram menor atividade enzimática, com BC1 3,34 vezes menor que B1 e BC2 2,06 vezes menor que a atividade obtida em B2. O processo B1 apresentou atividade enzimática 9% maior que o B2, mas não apresenta diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) entre as amostras. Vale ressaltar que apesar dos processos em batelada B1 e B2 apresentarem pico em 144 h, as atividades enzimáticas obtidas por estes em 120 h foram apenas 7 % menor do que no pico de atividade, o que justificaria a interrupção do processo em 120 h para diminuir os custos com o processo.

Assim, é possível inferir que o processo em batelada B2 é mais interessante para processos futuros. Além disso, como a quantidade de FFM necessária para a

produção da batelada B2 é 53,81% menor do que para B1, o custo de produção será reduzido. Portanto, B2 pode ser considerado a batelada avaliada com menor custo para produção de α -amilase a partir de *C. comatus*.

A partir dos resultados obtidos em B1, BC1, B2 e BC2, os parâmetros cinéticos do bioprocesso foram calculados para a produção de α -amilase, μ_{max} , T_d taxa de produção de enzimas, biomassa e fatores de conversão ($Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, e $Y_{P/X}$), que são mostrados na Tabela 4.

TABELA 4 - PARÂMETROS CINÉTICOS DO PROCESSO OBTIDOS NO CULTIVO REALIZADO NAS BATELADAS B1, BC1, B2 E BC2.

Parâmetros	B1	BC1	B2	BC2	Paludo et al. (2018)	Frantz et al. (2019)
Biomassa (g.L⁻¹)	15,35	8,41	12,12	5,37	0,77	3,78
	(240 h)	(240h)	(240 h)	(240 h)		
μ_{max} (h ⁻¹)	0,0146	0,0134	0,0159	0,0122	0,03	0,02
P_{max} (U.mL⁻¹)	99,51±1,11	29,77±1,23	95,51±2,70	46,20±1,27	5,84	62,70
	(144h)	(120h)	(144h)	(120h)	(48h)	(136h)
T_d (h)*	47,42	51,88	43,73	57,00	22,13	38,61
Y_P (U.L ⁻¹ h ⁻¹)	339,16	64,51	153,60	46,61	-	-
Y_X (g.L ⁻¹ h ⁻¹)	0,062	0,033	0,049	0,021	0,01	0,01
$Y_{P/S}$ (U.gds ⁻¹)	1448,5	364,69	1175,5	391,58	323,00	814,28
$Y_{X/S}$ (g.gds ⁻¹)	0,265	0,19	0,3781	0,1777	0,06	0,06
$Y_{P/X}$ (U.gdb ⁻¹)	5465,1	1919,3	3109,4	2203,1	5260,02	12542,34

'gds – g de substrato; "gdb – g de biomassa; * T_d – tempo de duplicação; μ_{max} – Velocidade máxima específica de crescimento; Y_P – produtividade enzimática; Y_X – produtividade de biomassa; $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em produto; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{P/X}$ – fator de conversão de biomassa em produto; P_{max} – máxima atividade enzimática; B1 (Batelada 1 usando resíduo industrial): 105 g.L⁻¹ farinha de fundo de moinho (FFM); BC1 (Batelada controle 1): 67,5 g.L⁻¹ amido P.A.; B2 (Batelada 2 usando resíduo industrial): 48,5 g.L⁻¹ FFM; BC2 (Batelada controle 2): 31 g.L⁻¹ amido P.A.

Fonte: A autora, (2023).

Os processos em batelada com o subproduto FFM (B1 e B2) apresentaram tempo de duplicação de 47,42 e 43,73 h, respectivamente, inferiores aos processos em batelada controle (51,88 e 57,00 h, para BC1 e BC2, respectivamente). Estes resultados podem estar relacionados a composição do meio, visto que a FFM apresenta, vitaminas e proteínas que facilitam a duplicação celular enquanto o meio sintético carece desses componentes. Em contrapartida B2 tem o tempo de duplicação menor que B1 provavelmente pela menor quantidade de amido no meio, que por sua vez, diminui a necessidade de produzir enzima e aumenta a conversão de substrato em biomassa. Observado pelo maior fator de conversão de substrato em biomassa para B2 que para B1 e o menor fator de conversão de substrato em produto (enzima) em B2 que B1.

Entretanto, para esta cepa, esses valores foram superiores aos demais estudos relatados na literatura conforme apresentado na Tabela 4. A velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max}) apresentou o mesmo comportamento, porém os valores do presente estudo foram inferiores aos relatados na literatura. A diferença pode estar relacionada à produção de enzima, ou fatores do meio de cultivo, como pH, força iônica, nutrientes e concentração de nutrientes no meio. Estes fatores podem aumentar ou inibir a velocidade máxima específica de crescimento. Os processos em bateladas B1 e B2 apresentaram maior μ_{max} devido à concentração significativa de nutrientes no meio. Vaz *et al.* (2011) também observaram que o meio de cultura com maior concentração de nutrientes, como fosfato, extrato de levedura e glicerol aumentou μ_{max} e outros parâmetros.

Em termos de produtividade (Y_p e Y_x) as cinéticas de crescimento com subprodutos (B1 e B2) apresentaram valores superiores aos processos BC1 e BC2, corroborando a importância do meio nos parâmetros do processo. A produtividade enzimática (Tabela 4) para as bateladas avaliadas foi de 339,165 U.L⁻¹h⁻¹ para B1 e 153,6 U.L⁻¹h⁻¹ para B2. Por outro lado, valores menores foram observados para as bateladas com meio sintético: 64,51 U.L⁻¹h⁻¹ para BC1 e 46,61 U.L⁻¹h⁻¹ para BC2, sendo 5,26 e 3,29 vezes menores que B1 e B2, respectivamente. Vale ressaltar que ao avaliar a produtividade (Y_p) no pico da atividade enzimática, observou-se que B1 e B2 apresentaram produtividade de 413,82 U.L⁻¹h⁻¹ e 396,80 U.L⁻¹h⁻¹, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). O meio com subproduto também mostrou melhor Y_x do que o meio sintético. Esses resultados podem ser explicados pela composição dos meios com subprodutos em relação aos meios sintéticos. Conforme mencionado anteriormente, o FFM possui em sua composição, compostos que podem ter induzido uma melhor produção de biomassa e enzima, o que resultou em fatores de produção mais expressivos.

O fator de conversão substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) apresentou valores 1,87 e 2,33 vezes maiores quando comparados B1 com BC1 e B2 com BC2, respectivamente. O fator de conversão biomassa em produto ($Y_{p/x}$) também apresentou essa característica, com B1 2,84 vezes maior que BC1 e B2 1,41 vezes maior que BC2. Também pode ser observado quando o fator de conversão de substrato para produto foi analisado. O fator de conversão de substrato para produto ($Y_{p/s}$) foi 1448,5 U.gds⁻¹ (B1) e 1175,5 U.gds⁻¹ (B2), enquanto BC1 foi 364,69 U.gds⁻¹ e BC2 foi 391,58 U.gds⁻¹. Esses resultados significam que para cada grama de

substrato consumido, há uma produção de mais de 1000 U para as bateladas com FFM comparado a uma faixa inferior a 400 U para o meio sintético.

As diferenças entre as bateladas com subprodutos e as com meios sintéticos reforçam a ideia de que os microrganismos se adaptam e se desenvolvem melhor em meio complexo e rico. Os microrganismos geralmente estão presentes na natureza e são considerados decompositores, simbiotes e até parasitas (CRUZ, 2011). Esta pode ser uma das razões pelas quais a FFM induziu satisfatoriamente o crescimento micelial e a produção de α -amilase.

Fatores de conversão e parâmetros de rendimento são importantes na escolha da linhagem utilizada. Além disso, parâmetros operacionais otimizados e meios de cultivos adequados reduzem custos de produção (FRANTZ *et al.*, 2019). Estima-se que cerca de 30 a 40% do custo envolvido na produção da enzima esteja relacionado ao meio de cultura (JOO; CHANG, 2005; KUMAR; TAKAGI, 1999). Portanto, há uma busca crescente por subprodutos agroindustriais que possam ser substratos para a produção de enzimas e reduzir o custo total de produção (PAUL *et al.*, 2017). A FFM mostrou-se adequada para a produção de α -amilases por *C. comatus* em comparação ao meio sintético. Além disso, o uso de FFM em meios de cultura é favorável devido ao baixo custo.

O custo geral gasto em cada meio foi calculado considerando a quantidade necessária para a produção do volume estipulado e o preço atual do subproduto. Para a produção de 1000 L de extrato enzimático bruto, o gasto com a fonte de amido aumentaria 67 reais se o meio B1 fosse escolhido, a longo prazo este valor pode ser impactante na indústria. Outro fator importante é que no processo B2 há menor geração de amido residual se comparado a B1, diminuindo custos com tratamento e reaproveitamento desse resíduo. Vale ressaltar que em ambos processos, a interrupção do processo pode ocorrer em 120 h, pois a diferença da atividade enzimática entre 120 e 144 h é inferior a 9%. Este fator também afeta positivamente a diminuição dos custos com considerável economia energética.

Vale ressaltar também que FFM custa em média R\$ 2 mil a tonelada, o equivalente a R\$ 2 por kg. O quilo desse subproduto pode produzir até 20,62 L de enzimas, com uma atividade enzimática média de 104.136,02 U·L⁻¹, o preço de custo de FFM por litro de enzima produzida é de R\$ 0,097. Entretanto, em um meio sintético com a mesma proporção de amido P.A. o preço médio por L de enzima seria R\$ 0,103 por L com uma atividade enzimática de 46.200 U·L⁻¹. Além da melhoria na atividade

enzimática, a FFM ao final da produção de apenas 10 mil L de enzima gerará uma economia de R\$ 60. Este é outro fator que corrobora a escolha do processo em batelada B2 para os próximos estudos.

3.2. MODELAGEM DE CRESCIMENTO DE BIOMASSA

Os modelos utilizados para prever o crescimento de biomassa nos processos em bateladas relacionam o tempo de cultivo pelo crescimento. O modelo Logístico modificado por Mu *et al.* (2005) foi usado para prever a velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\max}$) e a concentração de biomassa final (X_f). Enquanto, por meio, do modelo modificado de Gompertz (CHENG *et al.*, 2010) foi possível prever X_f e $\mu_{\max}$. O modelo matemático proposto por Baranyi e Roberts (1994) permitiu a determinação dos parâmetros $\mu_{\max}$ e λ (fase lag do crescimento). Todos os modelos também foram avaliados quanto ao R^2 e RMSE, como mostrados na Tabela 5.

O $\mu_{\max}$ previsto pelo modelo Logístico modificado variou de 0,023 h⁻¹ (BC2) a 0,040 h⁻¹ (B1). Os valores foram semelhantes aos encontrados por Paludo *et al.* (2018) ($\mu_{\max} = 0,032$ h⁻¹) e por Frantz *et al.* (2019) ($\mu_{\max} = 0,02$ h⁻¹). Os $\mu_{\max}$ obtidos pelo modelo Logístico e pelo modelo matemático de Baranyi e Roberts foram superiores aos experimentais. O mesmo também foi observado com o modelo Gompertz modificado, provavelmente por não considerar o consumo de substrato.

TABELA 5 - PARÂMETROS PREVISTOS E CALCULADOS PARA O MODELO LOGÍSTICO MODIFICADO, MODELO GOMPERTZ MODIFICADO E MODELO BARANYI E ROBERTS PARA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BIOMASSA.

Modelo	Bateladas	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	X_f (g·L ⁻¹)	λ (h)	R^2	RMSE
Logístico modificado	B1	0,040	14,88	-	0,988	0,641
	BC1	0,025	7,98	-	0,919	1,535
	B2	0,029	11,07	-	0,966	0,759
	BC2	0,023	5,32	-	0,946	0,407
Gompertz modificado	B1	0,340	15,33	-	0,991	0,545
	BC1	0,092	8,58	-	0,951	0,547
	B2	0,155	11,58	-	0,985	0,451
	BC2	0,064	5,33	-	0,970	0,287
Baranyi e Roberts	B1	0,072	16,85	28,00	0,930	1,735
	BC1	0,037	9,08	12,28	0,950	0,887
	B2	0,054	11,99	57,98	0,987	0,452
	BC2	0,021	5,34	19,01	0,975	0,261

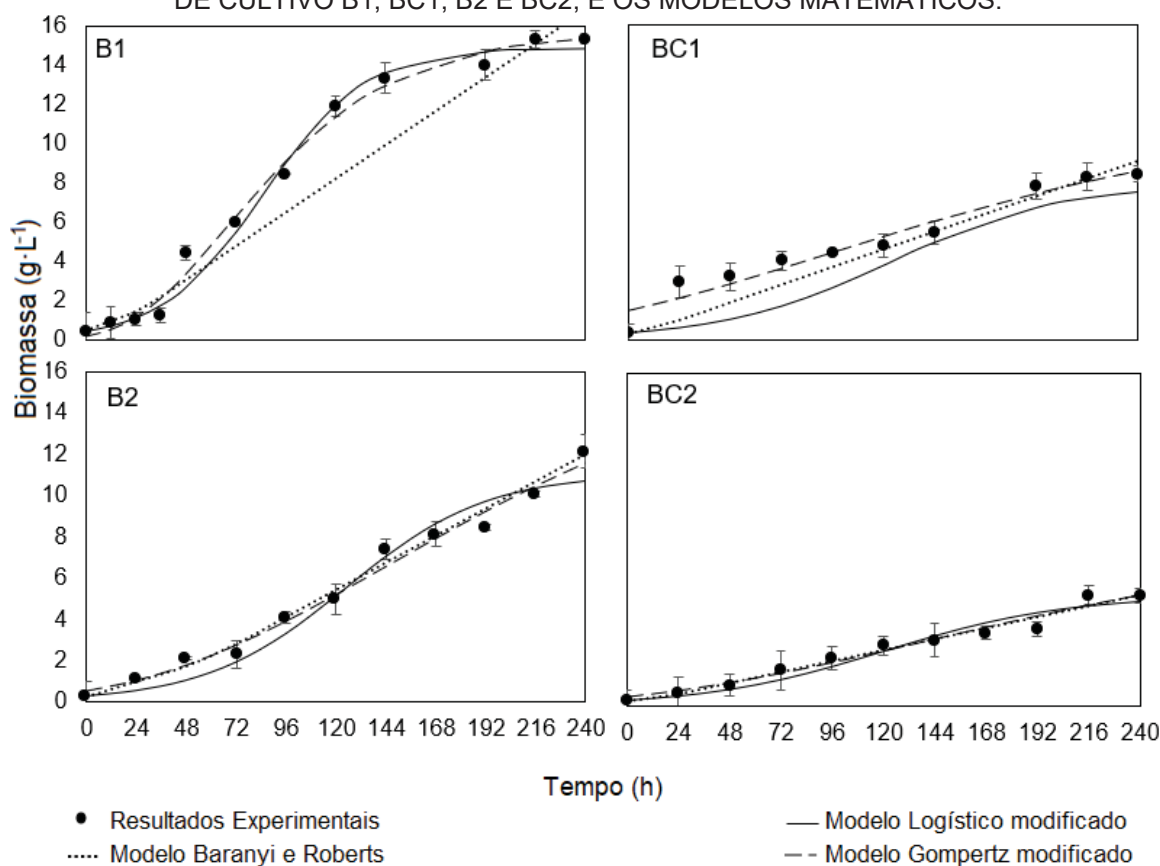
Fonte: A autora, (2023).

O modelo Logístico modificado previu um X_f para B1 com variação de 3,05% em relação aos dados experimentais, e o valor previsto de BC1 teve uma variação de 6,08% em relação aos resultados observados. Para o lote B2, que utiliza 48,5 g·L⁻¹ de

subproduto, os valores previstos e experimentais de X_f diferiram em 8,68%, e BC2 apresentou um desvio de 0,68%. Embora o modelo Logístico modificado não tenha considerado o consumo de substrato no bioprocessamento cinético, este modelo não variou mais de 10% em relação aos resultados experimentais; além disso, todos os R^2 e RMSE foram superiores a 0,9 e inferiores a 0,2, respectivamente, isto demonstra o quanto o modelo consegue prever de forma satisfatória os dados. Portanto, o modelo Logístico modificado é adequado para prever o crescimento de biomassa de *C. comatus*.

Os valores de X_f previstos pelo modelo de Gompertz modificado apresentaram menor variação em relação aos dados experimentais (Figura 2). Os valores variaram 0,09% para B1, 2,04% para BC1, 4,44% para B2 e 0,53% para BC2.

FIGURA 2 – PROCESSO EM PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *COPRINUS COMATUS* DOS MEIOS DE CULTIVO B1, BC1, B2 E BC2; E OS MODELOS MATEMÁTICOS.



Fonte: A autora, (2023).

O modelo de Baranyi e Roberts previu a biomassa final com diferença inferior a 10% quando comparado aos dados experimentais. O processo em batelada B1 teve um X_f de 16,85 g·L⁻¹, que foi 9,77% superior ao valor experimental (15,35 g·L⁻¹). O processo em batelada controle BC1 também obteve diferença semelhante a B1, com

9,69% a mais de biomassa obtida pelo modelo matemático em relação aos dados da cinética. A batelada B2, com subprodutos, apresentou produção de biomassa experimentalmente superior ao valor previsto pelo modelo (1,09%), e a batelada controle BC2 obteve 0,37% a mais de biomassa do que o previsto pelo modelo.

A fase lag (λ) obtida pelo modelo de Baranyi e Roberts para B1 foi de aproximadamente 28h, enquanto para BC1 foi de 12,28h. A B2 teve um λ de 57,98h e o BC2 teve uma fase de adaptação de 19,01h. Esses valores foram muito semelhantes aos encontrados experimentalmente. O λ da cinética de controle foi inferior as bateladas com subprodutos, provavelmente devido ao uso de um meio sintético menos complexo que o FFM, o que reduziu o tempo necessário para adaptação da linhagem ao ambiente.

O modelo Logístico modificado conseguiu prever o crescimento da biomassa com $R^2 > 0,9$ e $RMSE < 2$ para todas as bateladas. O modelo de Gompertz modificado também se correlacionou significativamente com os dados experimentais ($R^2 > 0,951$ e $RMSE < 1$). O R^2 e $RMSE$ obtidos para Baranyi e Roberts mostraram que o modelo matemático também pode prever satisfatoriamente a produção de biomassa por *C. comatus*. Entretanto, o melhor modelo para predizer o comportamento dessa cepa no crescimento de biomassa foi o Gompertz modificado.

3.2. MODELAGEM MATEMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS (ATIVIDADE DE α -AMILASE)

O modelo de Luedeking-Piret modificado estima os valores de α e β , indicando se a formação da produção está associada ou não ao crescimento da biomassa. Quando $\alpha \neq 0$ e $\beta = 0$, a formação da enzima está associada ao crescimento micelial. Por outro lado, se $\alpha = 0$ e $\beta \neq 0$, a formação do produto não está associada ao crescimento micelial (GERMEC *et al.*, 2019; MOHAMMAD *et al.*, 1995). Os parâmetros (α , β e μ_{max}) calculados pelo modelo são apresentados na Tabela 6.

O segundo modelo matemático avaliado para a formação do produto foi o Gompertz modificado (MU *et al.*, 2005; van GINKEL *et al.*, 2001; LIN; LAY, 2004) que relaciona a atividade enzimática com o tempo de cultivo, e prevê a fase de adaptação para a produção da enzima (λ) para a produção de enzimas em cada batelada. Os resultados, R^2 e $RMSE$ para cada aplicação de modelo matemático são mostrados na Tabela 6. Todos os modelos avaliados conseguiram prever o $P_{m\acute{a}x}$ que corresponde a atividade enzimática máxima em cada processo em batelada.

TABELA 6 - PARÂMETROS OBTIDOS PELOS MODELOS MATEMÁTICOS LUEDEKING-PIRET E GOMPERTZ MODIFICADO PARA AS CINÉTICAS DE FORMAÇÃO DO PRODUTO.

Modelo	Batelada	P_{max} (U·mL ⁻¹)	λ	α	β	μ_{max} (h ⁻¹)	R ²	RMSE
Luedeking-Piret modificado	B1	92,99	-	6045,65	0	0,076	0,973	5,71
	BC1	29,14	-	3458,00	0,0012	0,08	0,748	5,91
	B2	95,49	-	7856,00	0	0,062	0,707	25,72
	BC2	42,58	-	7896,00	0	0,063	0,522	18,16
Gompertz modificado	B1	96,67	40,32	-	-	-	0,985	7,28
	BC1	27,00	24,82	-	-	-	0,740	7,34
	B2	91,93	69,17	-	-	-	0,735	28,57
	BC2	44,70	36,67	-	-	-	0,524	17,60

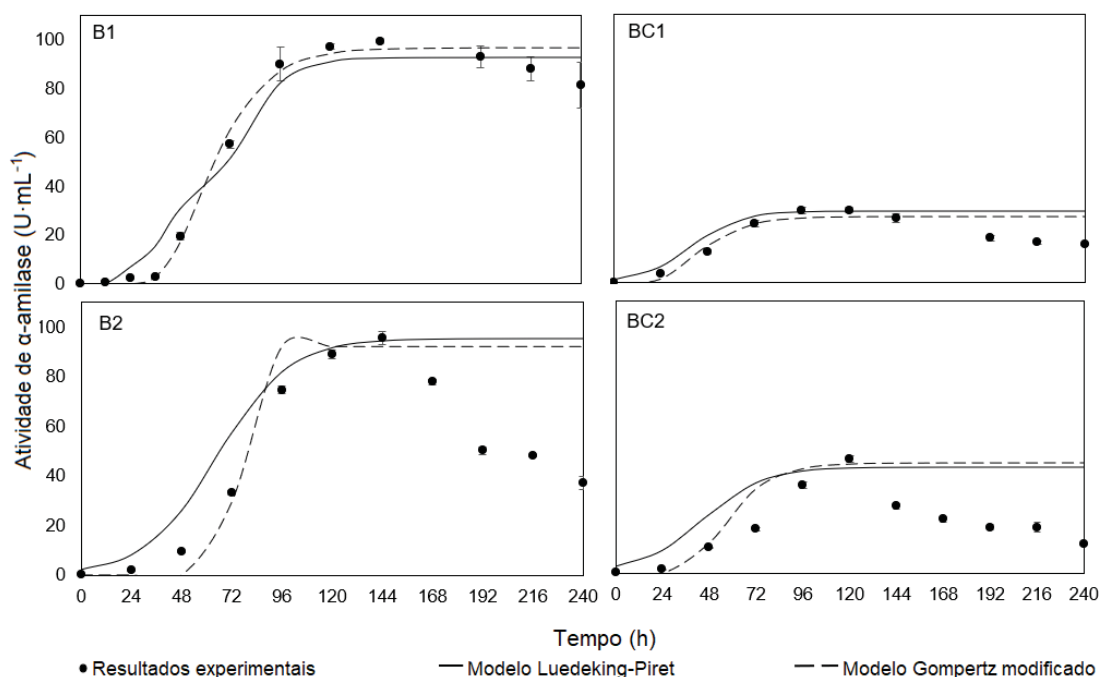
Fonte: A autora, (2023).

O valor experimental de P_{max} e os dados obtidos pelo modelo de Luedeking-Piret modificado apresentaram diferença de 6,54% para B1, 2,12% para BC1, 0,02% para B2 e 7,83% para BC2. O P_{max} obtido nos experimentos, B1 foi de 99,50 U·mL⁻¹, enquanto o Modelo de Gompertz modificado previu um máximo de 96,67 U·mL⁻¹ (desvio de 2,85%). Enquanto isso, a atividade enzimática máxima prevista em BC1 e o valor experimental apresentaram um desvio de 9,32%. Por sua vez, a batelada B2 apresentou um desvio de 3,20% e o BC2 apresentou um valor de 3,75%. No entanto, todos os valores previstos tiveram um desvio inferior a 10% do obtido experimentalmente.

Os valores de λ obtidos pelo modelo de Gompertz modificado diferiram dos dados experimentais. Além disso, considerando o T_d obtido experimentalmente, parâmetro diretamente ligado a λ , é possível concluir que este modelo não consegue prever satisfatoriamente o comportamento do crescimento de fungos filamentosos, como neste estudo do macromiceto *Coprinus comatus* para estes parâmetros. Por outro lado, os valores obtidos para P_{max} foram comparáveis aos experimentais.

A associação entre formação de biomassa e síntese de biomoléculas foi relatada por Osadolor *et al.* (2017), onde α foi 3,189 e β foi 0,077 h⁻¹. Os autores observaram que a formação de pellets foi associada à produção de etanol quando a cepa do fungo *Neurospora intermedia* foi utilizada. Esse comportamento também foi observado no presente estudo, onde α foi maior que β (β foi aproximadamente 0 para todos os processos em bateladas). A significância de α em relação a β mostrou que para essas bateladas, a produção da enzima está associada ao crescimento de *C. comatus*, comportamento verificado experimentalmente (Figura 3).

FIGURA 3 - EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASES EM PROCESSO EM BATELADA DE CSm DE *COPRINUS COMATUS*



Fonte: A autora, (2023).

A velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\max}$) prevista pelo modelo de Luedeking-Piret modificado para os processos em bateladas indicou valores superiores aos encontrados experimentalmente. Isso pode estar relacionado ao fato de o modelo não considerar as demais biomoléculas sintetizadas junto com a biomassa.

Os valores de R^2 e RMSE mostraram que os modelos matemáticos utilizados para prever a formação do produto não conseguiram descrever de forma eficiente todos os processos em batelada. Isso pode estar relacionado à incapacidade do modelo matemático de prever a diminuição da atividade enzimática ao longo do tempo. Os modelos não consideraram a degradação do substrato e a relação enzima/substrato fundamental. No entanto, na produção de enzimas em escala industrial, o processo é interrompido quando a enzima atinge sua atividade máxima; assim, os modelos matemáticos seriam eficientes na previsão do processo, pois ambos podem prever a atividade máxima da α -amilase (Figura 3).

3.3 MODELAGEM MATEMÁTICA PARA CONSUMO DE SUBSTRATO (CONCENTRAÇÃO DE AMIDO)

O modelo Logístico foi originalmente desenvolvido para avaliar o crescimento de biomassa (ZWIETERING *et al.*, 1990). No entanto, foi modificado por Kargi (2009) para consumo de substrato (MAHDINIA *et al.*, 2019). Estas modificações permitiram calcular a velocidade máxima específica de consumo de substrato (μ) e o tempo de consumo máximo de substrato (τ). Mahdinia *et al.*, (2019) e Kargi (2009) utilizaram este modelo para estimar o consumo do substrato ao longo do tempo. Neste contexto, o referido modelo foi utilizado neste estudo para prever o consumo do amido (substrato) pelo *Coprinus comatus*. Os resultados para os parâmetros do modelo estão apresentados na Tabela 7, bem como, R^2 e RMSE.

TABELA 7 - PARÂMETROS μ , τ , R^2 E RMSE FORAM OBTIDOS PELO MODELO LOGÍSTICO MODIFICADO PARA CONSUMO DE SUBSTRATO (CONCENTRAÇÃO DE AMIDO) NOS DIFERENTES PROCESSOS DE BATELADA EM CS_m ESTUDADOS (B1, BC1, B2, BC2).

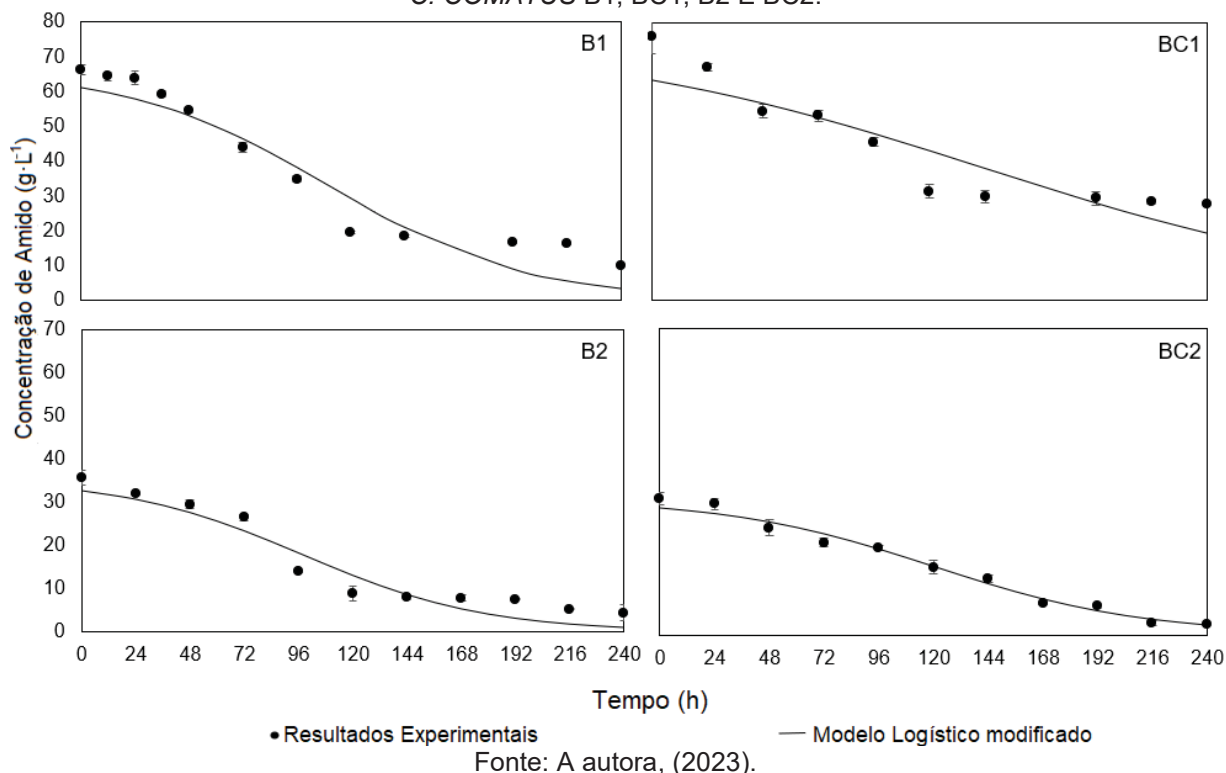
Modelo	Batelada	μ	τ	R^2	RMSE
Logístico modificado	B1	0,022	109,54	0,932	0,545
	BC1	0,011	143,48	0,821	6,318
	B2	0,025	98,31	0,938	3,110
	BC2	0,022	120,29	0,982	1,334

Fonte: A autora, (2023).

A velocidade máxima específica de consumo de substrato (μ) para os processos em bateladas avaliados variou de 0,011 h⁻¹ (BC1) a 0,025 h⁻¹ (B2). O tempo máximo de consumo (τ) do substrato variou de 98,31 h (B2) a 143,48 h (BC1). B1 e B2 apresentaram um tempo de consumo menor que os processos em batelada controle, BC1 e BC2, respectivamente. Este fato sugere que quanto maior a atividade enzimática apresentada no processo em batelada (B1 e B2) menor foi o tempo de consumo do substrato (τ).

O tempo de consumo do substrato (amido) pode ser observado na Figura 4, e é possível notar que não há diferença significativa entre os dados experimentais e o previsto pelo modelo matemático. Os valores de R^2 e RMSE obtidos a partir do modelo Logístico modificado também demonstraram que o modelo pode ser utilizado para descrever o processo de todas as bateladas estudadas no presente trabalho.

FIGURA 4 - CONCENTRAÇÃO DE AMIDO OBSERVADA (CONSUMO DE SUBSTRATO) E MODELO AJUSTADO (LOGÍSTICA MODIFICADA) NOS PROCESSOS EM BATELADA DE CSm DE *C. COMATUS* B1, BC1, B2 E BC2.



Alguns modelos apresentados na literatura para avaliar parâmetros cinéticos foram desenvolvidos para analisar diferentes seres vivos, como Logístico e Gompertz que inicialmente avaliaram o crescimento da população humana e sua taxa de mortalidade. Outros modelos, como o de Luederking-Piret e Baranyi e Roberts, avaliaram a cinética de crescimento de biomassa para bactérias. Ao longo do tempo, esses modelos foram adaptados e testados para serem utilizados em diferentes microrganismos. A maioria com tempo de duplicação e comportamento de crescimento diferente dos macromicetos. Embora existam modelos matemáticos para prever cinéticas com bactérias e leveduras desde 1949 (modelo de Monod) o interesse em modelos para fungos filamentosos só ocorreu nas últimas décadas (DANTIGNY & PANAGOU, 2013). Os estudos de macromicetos são ainda mais recentes e limitados.

Os fatos apresentados podem explicar os problemas encontrados na aplicação dos modelos matemáticos na cinética de macromicetos, uma vez que o atraso no tempo de duplicação e a hidrólise dos componentes estão diretamente relacionados ao crescimento da biomassa, consumo de substrato e síntese de biomoléculas. Por outro lado, isso não torna esses modelos matemáticos inadequados, pois, podem prever satisfatoriamente os parâmetros necessários para

escalonar o bioprocesso, como mostrado no presente trabalho. Desta forma o trabalho foi importante para viabilizar e avaliar diferentes modelos em bioprocessos com *C. comatus* na produção de α -amilase. Além disso, a produção de enzimas foi melhorada usando subprodutos de moagem de trigo em comparação ao meio sintético, o que demonstra a necessidade de avaliar outros subprodutos como possíveis substratos.

4. CONCLUSÃO

O estudo utilizou modelos matemáticos para prever o crescimento da biomassa, síntese de α -amilase por *Coprinus comatus* e hidrólise de substrato em quatro diferentes composições de meios. Os meios B1 e B2 com substrato FFM e BC1 e BC2 com amido P.A. Os três modelos aplicados ao crescimento da biomassa (Logístico modificado, Gompertz modificado e Baranyi e Roberts) puderam prever os valores de X_t , parâmetro importante nesta cinética, com diferença inferior a 10% em relação aos dados experimentais. Ao avaliar a síntese de α -amilase, o modelo de Gompertz modificado e o de Luederking-Piret também predisseram a P_{max} com uma diferença inferior a 10% do valor experimental. O modelo matemático Logístico modificado foi importante para avaliar a cinética de hidrólise do substrato, pois pode prever a faixa de maior consumo do meio.

O modelo de Gompertz modificado foi o melhor modelo matemático para prever o crescimento da biomassa e a produção de enzima, se comparado aos demais. Por sua vez, apesar de o consumo de substrato ter sido avaliado apenas com o modelo Logístico modificado, este conseguiu prever o comportamento da hidrólise do amido.

Além disso, foi possível por meio deste estudo aumentar a produção enzimática proposta por Frantz *et al.* (2019) em 34,35 % com uma menor (53,8 %) concentração de FFM. Também foi possível observar a melhoria da produção enzimática e crescimento de biomassa com a utilização desse subproduto em comparação aos meios sintéticos.

Atualmente, ainda há poucos modelos matemáticos que são aplicáveis para os macromicetos. Neste trabalho diversos modelos foram testados antes da escolha dos aqui apresentados. Assim, ainda há a necessidade de desenvolver mais modelos matemáticos que se apliquem aos macromicetos. Modelos matemáticos que considerem o comportamento de crescimento e síntese de biomoléculas, pois os macromicetos apresentam o desenvolvimento de forma mais lenta que os demais

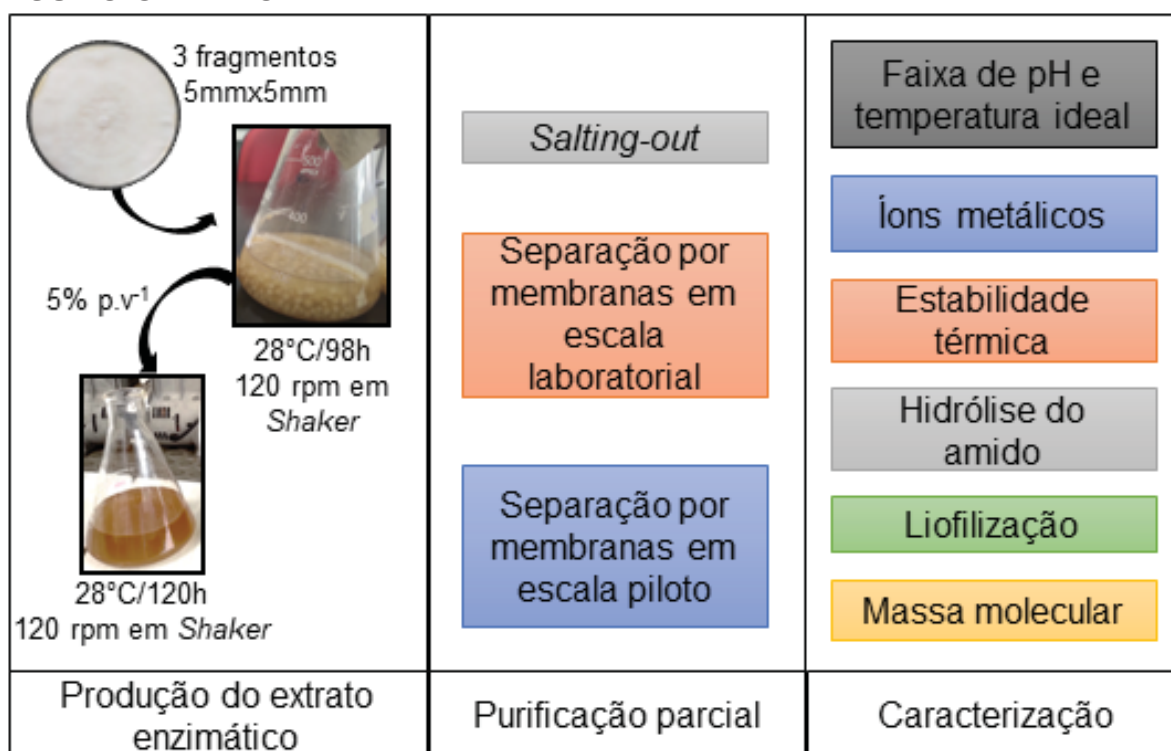
organismos comumente avaliados. Um exemplo disto é que para a avaliação da síntese enzimática que os modelos utilizados puderam prever a atividade máxima de α -amilase. No entanto não conseguiram ter um coeficiente de correlação satisfatório. Isto, pois na maioria das cinéticas os modelos matemáticos não preverem outros parâmetros importantes como $\mu_{\text{máx}}$. Esse aspecto pode acarretar em previsões equivocadas de alguns parâmetros. Há também a possibilidade de adaptar os modelos matemáticos já existentes.

CAPÍTULO III

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -AMILASE EXTRACELULAR PRODUZIDA POR *COPRINUS* *COMATUS*



RESUMO GRÁFICO



RESUMO

As amilases são enzimas utilizadas principalmente na indústria alimentícia e o mercado enzimático para este tipo de aplicação espera movimentar mais de US\$ 4,12 bilhões em 2031. As amilases também tem muita representatividade nos mercados de biocombustível, têxtil, de detergente e papel. Isso torna necessário o desenvolvimento de novas fontes de amilases com melhor desempenho catalítico que possam ser aplicados industrialmente e produzidos a baixo custo para competir com as enzimas existentes. O presente trabalho visa a purificação e caracterização da enzima presente no extrato enzimático bruto obtido do CSm de *C. comatus* usando 48,5 g de subproduto como substrato. Primeiramente, diferentes processos de purificação parcial foram avaliados, em seguida, a enzima purificada foi caracterizada quanto à temperatura e pH ideais de ação. Posteriormente também foi avaliado a influência de íons metálicos, estabilidade térmica, hidrólise do amido e massa molecular. A combinação de precipitação *salting-out* e dessalinização com unidades de ultrafiltração concentrou a enzima 22 vezes, além disso, a purificação em escala piloto mostrou-se promissora. A temperatura ideal da enzima purificada na reação enzimática foi de 50 °C e o pH de 5,0, não havendo melhora significativa da atividade com a adição de íons metálicos. No entanto, a adição de cálcio a 2,5 mM em tampão acetato (pH 6,0) resultou em uma melhora de até 47% na estabilidade térmica. A α -amilase purificada hidrolisou

aproximadamente 100% ($\cong 30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) do amido em 3 h de reação, mesmo diluída 100 vezes. O extrato purificado liofilizado apresentou 38 vezes maior atividade enzimática de α -amilase do que na forma líquida. A massa molecular determinada pelo método de SDS-PAGE foi de aproximadamente 67 kDa, sendo a primeira vez reportada na literatura para este macromiceto.

Palavras-chave: SDS-PAGE; α -amilase; Purificação de baixa resolução; Caracterização enzimática; *Coprinus comatus*.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos têm a tendência de secretar as biomoléculas que produzem de forma extracelular, reduzindo a necessidade de etapas como a de rompimento celular na purificação dessas biomoléculas (LUANG-IN *et al.*, 2019). Dentre estas biomoléculas, as enzimas, possuem uma grande representatividade e são visadas pelas suas diversas aplicações.

A α -amilase (α -1,4 glucano-glucanohidrolase, EC 3.2.1.1), por exemplo, é uma das enzimas mais representativas no mercado enzimático, constituindo aproximadamente 30% desta vertente (FINCAN *et al.*, 2021; XIE *et al.*, 2014). A amilase (α -amilase) hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 aleatoriamente ao longo da cadeia de amido, liberando oligossacarídeos e monossacarídeos como maltose, glicose e α -dextrina limite (BHANJA *et al.*, 2007)

Porém, no mercado de enzimas busca-se a diminuição dos custos de produção e a consequente redução do valor do produto, para viabilizar a competição neste mercado (BALAKRISHNAN *et al.*, 2021). As etapas de purificação são um dos principais responsáveis pelo aumento de custo, sendo que este processo tem seu custo definido dependendo do número de etapas e principalmente do tipo de operação escolhido. As etapas que serão realizadas são definidas considerando a aplicação da biomolécula alvo, bem como, sua natureza (KILIKIAN; PESSOA JR, 2020).

Os processos com maior grau de purificação normalmente são os com custos elevados, além de necessitarem de uma maior quantidade de etapas para este fim (BHATIA, 2018). A quantidade de etapas está inversamente relacionada a porcentagem de recuperação. Por isto, é necessário determinar os custos e as perdas da molécula-alvo no processo de purificação para avaliar a viabilidade do processo (KILIKIAN; PESSOA JR, 2020).

O estudo sobre o processo de purificação de α -amilase é necessário para avaliar a viabilidade desta enzima frente a outras já presentes no mercado e também para garantir a retirada de biomoléculas no meio que possam interferir na eficiência e aplicabilidade da enzima. Além de aumentar as possibilidades de uso para indústrias que requeiram produtos e aplicações com alto teor de pureza. Um estudo com os mais recentes trabalhos reportados na literatura, Tabela 1, foi realizado para avaliar as etapas aplicadas, e as características ao final do processo como rendimento, massa molecular e a atividade específica de α -amilase.

TABELA 1 – PURIFICAÇÃO DE α -AMILASE (EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO (EBE)), ETAPAS UTILIZADAS, ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA, CONCENTRAÇÃO ALCANÇADA NO PROCESSO E RENDIMENTO DESTE.

Microorganismo	Sulfato de amônio (%)	Massa molecular (kDa)	Técnicas de Purificação	Atividade específica (U·mg ⁻¹)	Rendimento (%) / Concentração	Referências
<i>Bacillus licheniformis</i> So-B3	70	74	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Diálise; 4- Liofilizado; 5- Cromatografia;	13,78 (5) 88,98	(1) 62 / 8 (5) 30 / 51	(FINCAN <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bacillus cereus</i> SP-CH11	40-90	55	1-EEB; 2-Precipitado; 3-Diálise; 4-Cromatografia;	(1)9,19 IU (2)9,32 (3)10,33 (4) 241,30	(1)100 / 1 (2)83,30 / 1,01 (3)78,30 / 1,12 (4)3,2 / 26,26	(PRIYADARSHINI; PRADHAN; RAY, 2020)
<i>Bacillus atrophaeus</i> NRC1	80	61	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Cromatografia;	(1)567,1 (2)773,3 (3)4635,5	(1)100 / 1 (2) 87,6 / 1,4 (3)8,2 / 2,7	(ABD-ELAZIZ <i>et al.</i> , 2020)
<i>Aeribacillus pallidus</i> BTPS-2	75	100	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Diálise; 4-Cromatografia;	(1)25,82 (2)6,29 (3)149,6	(4) 53.04 / 3,31	(TIMILSINA <i>et al.</i> , 2020)
<i>Trichoderma reesei</i>	80	51	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Diálise;	(1)8,81 (2)16,01	(1)100 / 1 (3) 58,39 / 1,87	(KALIA <i>et al.</i> , 2021)
<i>Bacillus velezensis</i> KB 2216	80	66	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Cromatografia;	(1) 891,79 (2)1705,76 (3) 4320,32	(1)100 / 1 (2) 90,53 / 1,91 (3)31,35 / 4,74	(BHATT <i>et al.</i> , 2020)
<i>Streptomyces</i> sp. Al-Dhabi-46	50-60	44	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Diálise; 4-Cromatografia	(1) 16.2 (4) 187	3.2	(AL-DHABI <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bacillus tequilensis</i> TB5	80	54	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Diálise;	(1) 16.19 (3) 29.81	(1)100 / 1 (3) 79.38 / 1,84	(PAUL <i>et al.</i> , 2017)
<i>Bacillus subtilis</i> Y25	-	58	1-EEB; 2-Cromatografia;	(1) 4 (2) 15,21	(1) 100 / 1 (2) 69,36 / 3,8	(ALADEJANA <i>et al.</i> , 2020)
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>		30	1-EEB; 2-Cromatografia;	(1) 34 (2) 550	(1) 100/ 1 (2) 18/ 15,7	(ABDULAAL, 2018)
<i>Anoxybacillus ayderensis</i> FMB1	70	58,5	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Diálise; 4-Cromatografia;	(1) 669,1 (2) 6336,9 (3) 7069,6	(1) 100 / 1 (2) 35,1 / 9,47 (3) 12,1 / 10,5	(BEKLER; GÜVEN; GÜVEN, 2020)
<i>Bacillus</i> sp Q-164	80	45	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Diálise; 4-Liofilização; 5-Cromatografia;	(1) 203 (2) 397 (3) 491 (5) 942	(1) 100 / 1 (2) 71 / 1,96 (3) 58 / 2,42 (5) 35 / 4,64	(LAKSHMI <i>et al.</i> , 2020)

TABELA 1 – PURIFICAÇÃO DE α -AMILASE (EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO (EBE)), ETAPAS UTILIZADAS, ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA, CONCENTRAÇÃO ALCANÇADA NO PROCESSO E RENDIMENTO DESTE.

(Continua)					
<i>Bacillus subtilis</i> S113	-	-	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Diálise; 4-Liofilização; 5-Cromatografia;	(1)16, 85 (2)(3) 93,38 (5) 324,92	(1) 100 / 1 (2)(3) 71,3 / 5,54 (5) 22,41 / 19,28 (KOHLI; JOSHI; VARMA, 2020)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	80	-	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Diálise; 4-Cromatografia;	(1) 2,16 (2) 12 (3) 20	(1) 100 / 1 (2) 83 / 5,58 (3) 64 / 9,25 (MULAY; DEOPURKAR, 2017)
<i>Alloiococcus otitis</i>	60	38	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Diálise; 4-Cromatografia;	(1) 3,5 (2) 61,2 (3) 110,3 (4) 224,4	(1) 1 (2) 17,5 (3) 31,5 (4) 67 (HAZAA <i>et al.</i> , 2018)
<i>Aspergillus flavus</i>	80	54	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Diálise; 4-Cromatografia;	(1)18,88 (2) 34,81 (4) 48,10	(1) 100 / 1 (2) 39,59 / 1,84 (3) 11,73 / 2,55 (KARIM <i>et al.</i> , 2018)
<i>Aspergillus niger</i>	70	20	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Diálise;	(1)0,156 (2) 0,708	(1) 1 (2) 4,53 (SHAFIQUE; SHAFIQUE, 2017)
<i>Pseudomonas balearica</i> VITPS19	30	-	1-EEB; 2-Precipitação; 3-Diálise; 4-Cromatografia;	(1) 2173 (2) 2390 (3) 3235 (4) 14040	(1) 100 / 1 (2) 78,8 / 1,09 (3) 4,8 / 1,48 (4) 70,2 / 6,46 (KIZHAKEDATHIL; SUBATHARA, 2021)
<i>Anoxybacillus rupiensis</i> TS-4	50-70	48	1-EEB; 2-Coluna de dessalinização; 3-Cromatografia de troca iônica; 4-Cromatografia de exclusão de tamanho		(3) 34,72 / 17,85 (4) 38,33 / 17,25 (KIKANI; KOURIEN; RATHOD, 2019)

Fonte: A autora, (2023).

Os estudos reportados na literatura demonstram que a massa molecular da α -amilase pode variar de 20 até 100 kDa e que são normalmente utilizados uma média de 4 operações unitárias para purificar esta biomolécula. A diálise, por exemplo, é uma das operações unitárias mais utilizadas em conjunto com a precipitação. Entretanto, a precipitação na maioria dos estudos foi reportada utilizando o método *salting-out* com sulfato de amônia, um sal neutro.

A maioria dos estudos reportados na literatura utilizaram operações unitárias de alta resolução, como vários tipos de cromatografia por exemplo. Estudos visando a purificação de α -amilases são normalmente realizados em bactérias ou leveduras, às vezes em fungos filamentosos, entretanto, para os micetozoa quase nenhum estudo foi reportado na literatura para este tipo de enzima.

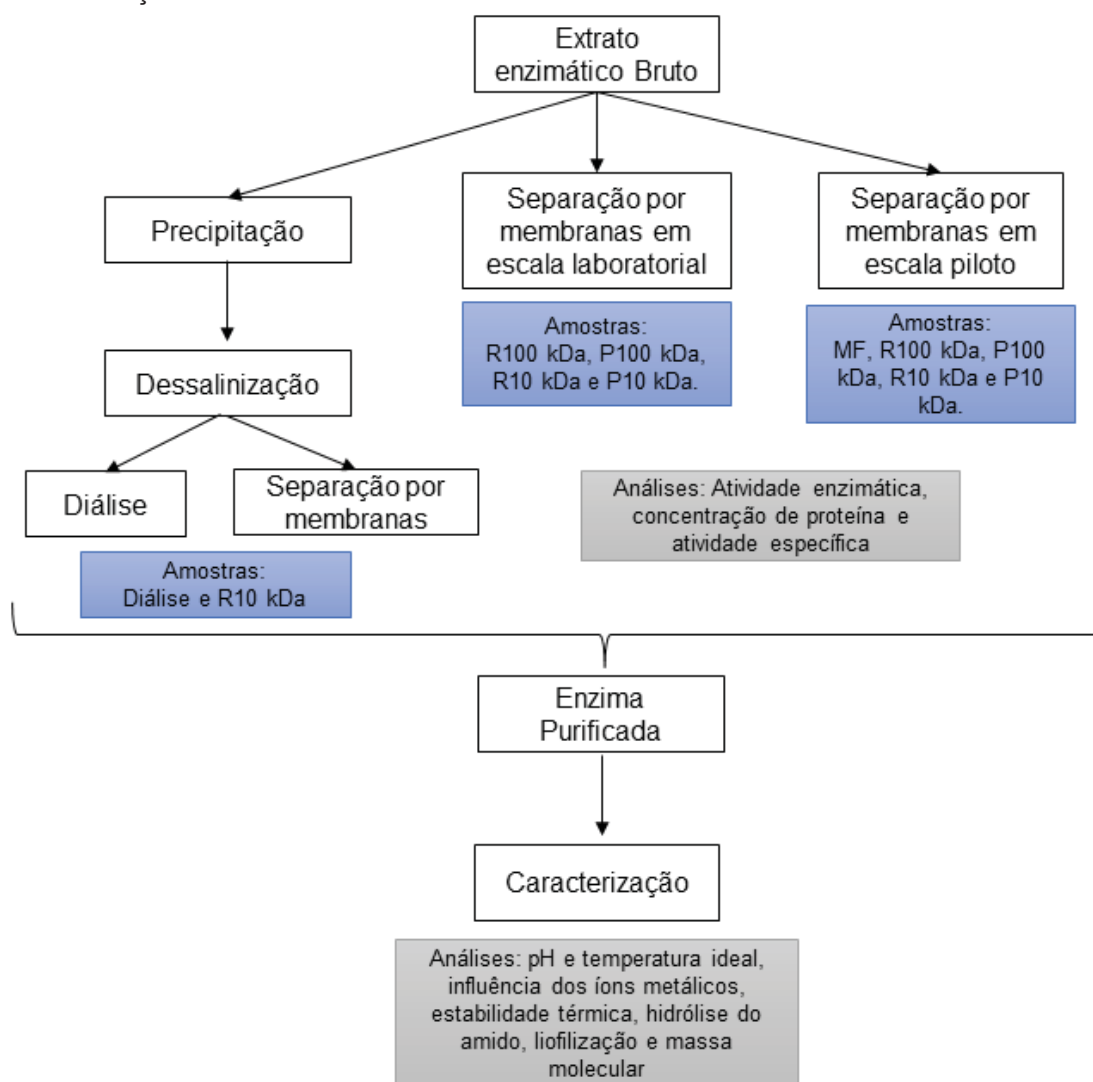
Portanto, tendo em vista a frequente necessidade por processos menos onerosos e a avaliação de estudos que foram realizados recentemente sobre purificação de α -amilase, o presente estudo teve como objetivo avaliar processos de

purificação de baixa resolução. O método de separação por membranas e a técnica de precipitação foram utilizados com o objetivo de reduzir as etapas e consequentemente de custos. A enzima purificada também foi caracterizada quanto a temperatura e pH ótimos de atuação, estabilidade térmica e massa molecular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica e de Biotecnologia (LENGBIO), Laboratório de emulsões (EMULTEC) e no Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA). A cepa e o subproduto utilizado são os mesmos descritos no Capítulo II. O resumo geral das etapas realizadas para a obtenção da enzima purificada foi descrito no fluxograma 1.

FLUXOGRAMA 1 – ETAPAS REALIZADAS PARA A SEPARAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE α -AMILASE PRODUZIDA POR *COPRINUS COMATUS*



Fonte: A autora, (2023).

3.1. MANUTENÇÃO, REATIVAÇÃO, PRODUÇÃO DE INÓCULO E DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO POR *C. COMATUS*

A manutenção, reativação e produção do pré-inóculo foi realizado conforme descrito no Capítulo II. A produção do extrato enzimático bruto ocorreu transferindo-se 0,5 % ($m \cdot v^{-1}$) do inóculo em forma de *pellets* para o meio escolhido no Capítulo II. O cultivo ocorreu por 120 h em agitador orbital do tipo *shaker* (TECNAL, TE-424, BR) a 120 rpm com uma temperatura de $28 \pm 2^\circ C$.

3.2. *DOWNSTREAM* (PURIFICAÇÃO)

A separação e purificação da α -amilase produzida por *C. comatus* foi avaliada utilizando a técnica de precipitação com posterior dessalinização, também foi utilizada a operação unitária de separação por membrana em escala laboratorial e piloto. As operações unitárias foram escolhidas pelo seu grau de simplicidade e baixo custo comparado a outras operações mais complexas. A purificação foi realizada utilizando-se um combinado de métodos de baixa resolução que apresentem uma alta eficiência e baixo custo, para tornar a produção em larga escala viável e assim competir no mercado enzimático.

2.2.1 Clarificação

Após o cultivo do extrato enzimático bruto (EEB) foi realizado a clarificação para a retirada dos sólidos em suspensão para posterior purificação de baixa resolução. O EEB foi clarificado por meio da utilização de peneira com abertura de 0,075 mm - 200 mesh (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda®, Brasil) para a retirada de sólidos insolúveis (resíduo insolúvel do FFM e biomassa do macromiceto). Após esta etapa o EEB foi dividido em três frações.

As frações do EEB foram utilizadas nas etapas de precipitação e separação por membrana em escala laboratorial. As frações foram centrifugadas (Centribio®, Brasil) a 4.000 rpm por 15 min à $4 \pm 2^\circ C$. A fração do EEB que foi utilizada para a separação por membrana em escala piloto foi clarificada para diminuição da turbidez por filtração a vácuo (Modelo 2750TGH152/48-221, Thomas®, USA) com o auxílio de um filtro de 15 μm (Qualy, J. Prolab®, Brasil).

As frações do EEB após a clarificação foram armazenadas em geladeira à temperatura de 4 ± 2 °C para a utilização nas etapas posteriores.

2.2.2 Métodos de purificação de baixa resolução

A avaliação da purificação de baixa resolução foi realizada utilizando a precipitação por *salting-out* e a separação por membranas.

2.2.2.1. Purificação por precipitação de α -amilase por *salting-out* e avaliação de métodos de dessalinização

O EEB foi precipitado pelo método de *salting-out*, como descrito por Marshak *et al.* (1996), utilizando-se 65% do sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Prolab®, Brasil). A concentração do sal foi previamente testada. Este método baseia-se na neutralização das cargas superficiais da enzima, reduzindo a solubilidade da mesma pela interação das cargas superficiais das proteínas e íons em solução.

Para tanto, 50 mL do EBE acondicionado em um béquer de 100 mL foi utilizado para a saturação gradual até a precipitação da enzima. O sulfato de amônio foi adicionado gradualmente até atingir a saturação de 65% sob agitação a 4 °C. Após, a mistura foi armazenada *overnight* a 4 ± 2 °C (IQBAL *et al.*, 2010). Posteriormente, a proteína precipitada foi centrifugada por 30 min a 4.000 rpm (Centribio®, Brasil) com a temperatura de 4 ± 2 °C.

A dessalinização foi avaliada por meio de ultrafiltração (*cut-off* -10 kDa, Vivaspín 6, GE®, Reino Unido) e por diálise. A diálise foi realizada utilizando uma membrana de celulose de 25 mm (D9777-100FT, SIGMA-ALDRICH Alemanha). Os dois métodos de dessalinização foram avaliados separadamente e a enzima purificada de cada método foi avaliada quanto aos parâmetros descritos no item 2.3.

2.2.2.2. Purificação utilizando separação por membranas em escala laboratorial

A purificação por separação por membranas foi realizada com as unidades de ultrafiltração utilizando o EEB descrito no subitem 2.2.1. Uma alíquota de 5 mL do EEB foi adicionada a membrana de ultrafiltração (UF) de 100 kDa e centrifugada a 4.000 rpm por 15 min com parada para refrigeração do extrato a cada 5 min. Amostras do permeado (P100 kDa) e do retido (R100 kDa) nas unidades de ultrafiltração foram separados para posterior análise e o volume restante foi transferido para unidades de

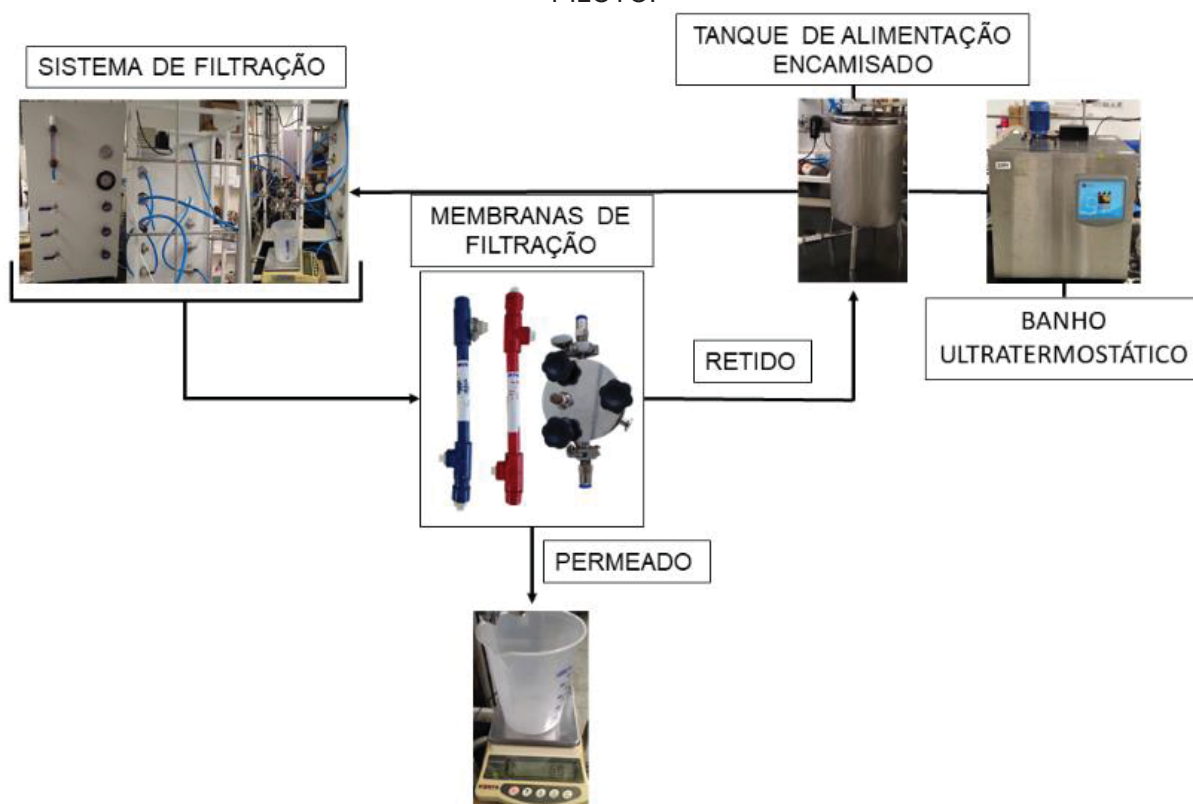
ultrafiltração de 10 kDa. Após centrifugação, amostras do permeado (P10 kDa) e do retido (R10 kDa) também foram separados para análise, sendo o retido da UF de 10 kDa a fração alvo. A cada etapa foram avaliadas a atividade enzimática (subitem 2.3.1), concentração de proteína (subitem 2.3.2.) e atividade específica.

2.2.2.3 Purificação utilizando separação por membranas em escala piloto

O processo em escala piloto foi realizado utilizando as membranas de micro (MF) e ultrafiltração (UF), Tabela 2, para clarificar e concentrar o EEB descrito no subitem 2.2.1, visando a menor perda de biomoléculas, conforme Gerke *et al.* (2017). O processo em escala piloto utilizou um volume de 6 litros de EEB.

Os ensaios foram conduzidos com o auxílio de uma bomba a vácuo (RV12, Edwards, Suécia) com o reciclo parcial do extrato, havendo o retorno do permeado para o tanque de alimentação. O tanque foi mantido a 7 ± 2 °C, por um sistema com um tanque encamisado acoplado ao banho ultratermostático com circulação (Q214M, Quimis, Brasil). A temperatura do extrato durante o processo de ultrafiltração foi mantida em 15 ± 2 °C. O sistema de filtração foi esquematizado na Figura 1.

FIGURA 1 - SISTEMA DE OPERAÇÃO DO PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS VISANDO A CLARIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO EM ESCALA PILOTO.



Fonte: A autora, (2023).

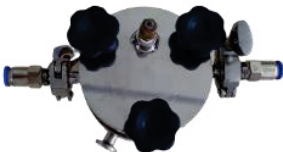
A MF foi utilizada para a separação dos sólidos insolúveis e em suspensão, bem como para preservar as membranas das etapas seguintes de UF. Esta foi realizada por meio de uma unidade de MF tangencial multitubular de α -alumina, com diâmetro de poro de 0,44 μm e área superficial de 0,036 m^2 (PAM-MEMBRANAS, Brasil) para a filtração de volume de 6 L de EEB por 208 min. A grande maioria das α -amilases descritas na literatura apresentam tamanho inferior a 80 kDa, por isso, foi escolhido uma membrana MF com maior abertura dos poros.

Na primeira etapa de UF o EEB foi filtrado na membrana de 100 kDa, composta de polietersulfona, com diâmetro nominal de corte, *cut-off* de 100 kDa e área superficial de 0,036 m^2 (PAM-MEMBRANAS, Brasil). A UF com a membrana de 100 kDa utilizou 4,7 L do permeado da MF e o processo foi realizado por 133 min.

O EEB clarificado foi submetido a um estudo prévio de diferentes pressões transmembrana para definir os parâmetros do processo. A avaliação ocorreu durante um período de 15 min para a membrana de MF e UF de 100 kDa, com as pressões de 0,1, 0,3, 0,5 e 0,7 atm na vazão de 100 $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$.

A última etapa de separação foi realizada com uma membrana de UF de 10 kDa (Nadir PM UP010, Microdyn-Nadir, Alemanha) e área superficial de 0,005 m^2 , para concentrar as enzimas. Nesta etapa são removidas água e moléculas abaixo de 10 kDa, que incluem sais, açúcares, peptídeos e outros constituintes de baixa massa molecular. A UF de 10 kDa também foi avaliada para definir a melhor pressão e vazão de operação. Os parâmetros foram definidos realizando um estudo por 30 min nas pressões de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0 atm na vazão de 200 $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$. Os dispositivos utilizados para a separação por membrana foram descritos na tabela 2.

TABELA 2 - MEMBRANAS UTILIZADAS NA SEPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE α -AMILASE PRODUZIDA POR *C. COMATUS* DO EXTRATO BRUTO.

Membranas de Filtração			
Dispositivos de Membrana	Abertura de poro	Área superficial (m ²)	Modelo/Marca
	0,44 μ m	0,036 m ²	PAM-MEMBRANAS, Brasil
	100 kDa	0,036 m ²	PAM-MEMBRANAS, Brasil
	10 kDa	0,005 m ²	Nadir PM UP010, Microdyn-Nadir, Alemanha

Fonte: A autora, (2023).

As frações retidas e as permeadas foram avaliadas quanto à atividade enzimática (subitem 2.3.1.), a concentração de proteínas (subitem 2.3.2.), a atividade específica (subitem 2.3.3.) e a turbidez (subitem 2.2.2.3.1).

O comportamento dinâmico da etapa de clarificação por meio de um estudo cinético em batelada foi realizado. O processo foi avaliado quanto o fluxo de permeado médio (J_p , g·m⁻²·h⁻¹), fator de concentração (FC), turbidez (NTU), além da atividade enzimática (U·mL⁻¹), atividade específica (U·mg⁻¹) e a concentração de proteínas (mg).

O J_p foi analisado utilizando gravimetria, na qual o permeado é coletado em um recipiente por gravimetria em balança semi-analítica e a massa anotada em tempos determinados (USHIKUBO *et al.*, 2006). O fluxo de permeado que é dado em g·m⁻²·h⁻¹ (Equação 1) e por este parâmetro avaliamos a massa coletada (Δm , em g), relacionando a área superficial da membrana (S , em m²) e o tempo (t , em h). O FC (Equação 2) relaciona a massa (m_i) do extrato na alimentação inicial (g) e a massa (g) de permeado acumulada durante o processo (g).

$$J_p = \frac{\Delta m}{S \cdot t} \quad (1)$$

$$FC = \frac{m_i}{m_i - m_p} \quad (2)$$

Os fatores de purificação (FP, Equação 3), denominado concentração, para mensurar o aumento da atividade específica da amilase. A recuperação (R, Equação 4), também chamada de rendimento, para avaliar a porcentagem da biomolécula que

foi recuperada pelas etapas de MF e UF (MANERA *et al.*, 2011). Esses fatores foram apresentados nas tabelas como Concentração e Rendimento.

$$FP = \frac{\frac{\text{Atividade da enzima purificada}}{\text{Concentração de proteína na enzima purificada}}}{\frac{\text{Atividade do extrato enzimático}}{\text{Concentração de proteína no extrato enzimático}}} \quad (3)$$

$$R(\%) = \frac{\text{Atividade da enzima purificada}}{\text{Atividade do extrato enzimático}} \times 100 \quad (4)$$

2.2.2.3.1. Análise de turbidez

A turbidez do extrato enzimático foi determinada utilizando um turbidímetro de bancada (GEHAKA®, modelo CG 1800). O aparelho compara o espalhamento de um feixe de luz que passa na amostra e os das amostras padrão (<0,1, 100, 800 NTU) para calibração do equipamento. Os resultados foram expressos em Unidade Nefelométrica de Turbidez (NTU).

2.3 AVALIAÇÃO DAS FRAÇÕES DOS PERMEADOS E RETIDOS DOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DE BAIXA RESOLUÇÃO

2.3.1 Determinação de atividade de α -amilase

A atividade de α -amilase ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi realizada utilizando-se o método proposto por Fuwa (1954) e adaptado por Paludo *et al.* (2018). A atividade detalhada foi descrita no Apêndice 4 e a curva padrão no Apêndice 1. As atividades foram determinadas nas frações descritas na tabela 3.

TABELA 3 – FRAÇÕES RETIRADAS DOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DE BAIXA RESOLUÇÃO PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA, ATIVIDADE ESPECÍFICA E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

Processo	Frações avaliadas	Código
Precipitação	Diálise	Diálise
	Retido da UF de 10 kDa	R(10 kDa)
Separação por membranas em escala laboratorial	Retido da UF de 100 kDa	R(100 kDa)
	Permeado da UF de 100 kDa	P(100 kDa)
	Retido da UF de 10 kDa	R(10 kDa)
	Permeado da UF de 10 kDa	P(10 kDa)
Separação por membranas em escala piloto	Retido da MF	R(MF)
	Permeado da MF	P(MF)
	Retido da UF de 100 kDa	R(100 kDa)
	Permeado da UF de 100 kDa	P(100 kDa)
	Retido da UF de 10 kDa	R(10 kDa)
	Permeado da UF de 10 kDa	P(10 kDa)

Fonte: A autora, (2023).

2.3.2 Determinação da concentração de proteína

O teor de proteína ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$) (Apêndice 3) foi quantificado por meio do método desenvolvido por Bradford (1976) e adaptado quanto ao volume de reagente por Paludo *et al.* (2018). A determinação da concentração de proteína foi realizada utilizando-se a curva padrão (Apêndice 2).

2.3.3 Determinação da atividade específica

A atividade específica (A_{esp} , Equação 5) da enzima foi determinada por meio da relação entre a atividade enzimática (A) em $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ e o teor de proteína (P) em $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e A_{esp} foi expresso em $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$.

$$A_{\text{esp}} = \frac{A}{P} \quad (5)$$

2.4 CARACTERIZAÇÃO DA α -AMILASE PURIFICADA

A fração obtida na separação por membranas em escala laboratorial foi utilizada para caracterizar a enzima purificada. Esta foi avaliada quanto aos fatores que influenciam sua atividade enzimática, como a faixa de pH e temperatura de atuação, bem como, os íons metálicos. A α -amilase também foi caracterizada quanto a estabilidade térmica, hidrólise de amido, massa molecular por SDS-PAGE e liofilização.

2.4.1 Determinação do efeito do pH e da temperatura na enzima purificada produzida por *C. comatus* em CSm

O pH ideal da enzima purificada foi avaliado utilizando-se tampões nas concentrações de 0,1M. O tampão acetato de sódio foi utilizado nos seguintes valores de pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0) e em tampão fosfato de sódio em pHs 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5 (PALUDO *et al.*, 2018; FRANTZ *et al.*, 2019). Os tampões foram utilizados durante a reação enzimática para avaliação da influência sobre a atividade da α -amilase. Todas as amostras foram inoculadas a 50 °C/15 min em banho-maria como descrito no subitem 2.3.1. Os resultados foram comparados com as amostras controles, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Por sua vez, para a determinação da faixa de temperatura de atuação da enzima purificada, as temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C foram utilizadas

(PALUDO *et al.*, 2018; FRANTZ *et al.*, 2019). As demais condições da reação foram as mesmas descritas no subitem 2.3.1.

A atividade relativa (%) foi expressa como a razão existente entre a atividade de α -amilase obtida nas análises (pH e/ou temperatura) e a atividade enzimática obtida nas amostras controle em condições padrão.

2.4.2 Determinação do efeito dos íons metálicos na atividade de α -amilase

O efeito dos íons metálicos foi avaliado durante a reação enzimática utilizando soluções tampão acetato de sódio pH 6,0 com diferentes concentrações e íons. As concentrações foram de 1,0 mM, 2,5 mM e 5,0 mM e os íons avaliados $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Fe}_2(\text{SO})_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (PALUDO *et al.*, 2018; FRANTZ *et al.*, 2019; DU *et al.*, 2012). A amostra controle, em que a atividade seguiu as condições do ensaio padrão (tampão acetato de sódio pH 6,0 sem adição de íons) para a reação enzimática foi utilizada para comparação dos resultados obtidos, bem como para calcular a atividade relativa. A atividade foi quantificada como descrito no subitem 2.3.1 e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4.3 Estabilidade térmica de α -amilase purificada

A estabilidade térmica da α -amilase purificada foi determinada mantendo a enzima em tampão acetato 0,1 M (pH 6), sem e com a adição de CaCl_2 a 2,5 mM, em temperaturas de 40, 50 e 60 °C. Alíquotas foram retiradas durante 1 h de cultivo, sendo as amostras após a reação resfriadas em banho de gelo. Posteriormente foi realizado a quantificação da atividade enzimática (subitem 2.3.1) e utilizado a amostra controle (tempo 0h) para calcular a atividade relativa.

2.4.4 Avaliação da hidrólise do amido e liberação de glicose

Alíquotas de 100 μL de EEB foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 1,9 mL de solução de amido a 3% ($\text{p} \cdot \text{v}^{-1}$) e mantidos ao longo de 180 min a 50 ± 2 °C. A cada 20 min uma amostra foi retirada e quantificada quanto à concentração de amido e glicose.

O amido foi quantificado pelo método iodo/iodeto (FUWA, 1954; PALUDO *et al.*, 2018) usando uma curva padrão. Assim como, foi utilizado uma metodologia

adaptada da OAC (996.11, 1995) como um comparativo. Os resultados dos dois métodos foram similares, então foi optado pela utilização do método iodo/iodeto.

A concentração de glicose foi determinada pelo método que utiliza uma oxidase/peroxidase (GOD/POD) (NGUYEN *et al.*, 2002; RAMESH, MURTY, 2014).

2.4.5 Avaliação da atividade enzimática após a liofilização

O método de congelamento a vácuo foi realizado a -45 ± 2 °C em um liofilizador de bancada (Liobras, Liotop L101, Brasil) por 16h. Posteriormente, a enzima liofilizada foi quantificada quanto a atividade enzimática para o fator de concentração.

2.4.6 Determinação da massa molar enzimática por eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A massa molar de α -amilase foi determinada pela técnica SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), conhecida também por separação em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970). As amostras foram tratadas como descrito por Vaz (2011) e Spier *et al.* (2011) e descrito detalhadamente no Apêndice 7.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras foram realizadas em replicatas e avaliadas no software Statistic® 7.0, para Windows (Statsoft®, Estados Unidos). Estas replicatas foram analisadas em relação a homogeneidade dos grupos, assim como, a diferenças entre as médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) a um nível de confiança em 95%.

3 RESULTADOS

3.1 DOWNSTREAM

3.1.1 Purificação por precipitação de α -amilase por *salting-out* e avaliação de métodos de dessalinização

A purificação de baixa resolução foi realizada para retirada de componentes do meio de cultivo que poderiam interferir posteriormente. Os dados obtidos pelo processo de *salting-out*, utilizando-se a dessalinização por unidades de UF e diálise são mostrados na Tabela 4.

TABELA 4 – DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ESPECÍFICA, PERDA E CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA AO LONGO DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO PARCIAL.

Amostra	Ativ. Total (U)	Proteína Total (mg)	Ativ. Específica (U·mg ⁻¹)	Rendimento (%)	Perda (%)	Conc. (vezes)
EEB*	956,40	0,75	1.275,04	100,00	0,00	1,00
Diálise	666,13	0,11	6.062,16	69,65	30,35	4,75
Unidade de Ultrafiltração R (10 kDa)	428,97	0,02	19.736,26	44,85	55,15	15,48

*Extrato enzimático bruto;

Fonte: A autora, (2023).

A saturação do extrato enzimático por sulfato de amônio ocorreu em 65%, uma concentração média em relação ao que é reportado na literatura. Fincan *et al.* (2021), por exemplo, observaram a concentração ideal para a precipitação da α -amilase em 70% de sulfato de amônio, enquanto, para Al-Dhabi *et al.* (2020) esta concentração foi observada entre 50 e 60% e em estudo de Kikani *et al.* (2019) entre 50 e 70%.

Em contrapartida, muitas das precipitações por *salting-out* reportadas anteriormente necessitaram de uma maior concentração de sulfato de amônio (média de 80%) para que houvesse a precipitação da proteína (PAUL *et al.*, 2017; MULAY; DEOPURKAR, 2017; KARIM *et al.*, 2018; ABD-ELAZIZ *et al.*, 2020; BHATT *et al.*, 2020, LAKSHMI *et al.*, 2020; KALIA *et al.*, 2021).

A atividade específica encontrada no presente estudo (1275,04 U·mg⁻¹) é 3,36 vezes maior do que a reportada por Frantz *et al.* (2019), os quais observaram valores de 378,90 U·mg⁻¹. Estes autores também estudaram o *C. comatus* em meio semelhante, resíduo agroindustrial, porém com concentrações diferentes dos componentes do meio. A α -amilase produzida por *B. subtilis* apresentou uma atividade específica (891,79 U·mg⁻¹) semelhante à produzida pelo *C. comatus* quando cultivada em resíduos agroindustriais (BHATT *et al.*, 2020).

O estudo realizado por Karim *et al.* (2018), demonstrou atividade específica da amilase de 18,88 U·mg⁻¹ para o fungo filamentoso *Aspergillus flavus*. Shafique e Shafique (2017), avaliaram a atividade específica da α -amilase de *Aspergillus niger* e observaram uma atividade de 0,156 U·mg⁻¹. O *Bacillus atrophaeus* NRC1 apresentou atividade específica de 567,1 U·mg⁻¹, diferença relacionada com a utilização do meio sintético, com menor quantidade de nutrientes, para a produção enzimática, bem como a cepa estudada (ABD-ELAZIZ *et al.*, 2020). Os valores reportados nos estudos citados foram pelo menos 34,7 vezes menores do que os apresentados pela enzima precipitada e dessalinizada por membranas de UF do presente estudo.

O método de *salting-out* é relativamente simples se comparado as cromatografias, e o alto valor de concentração em relação a outros estudos reportados na literatura demonstra que é uma técnica efetiva quando se trata de purificação e concentração enzimática. Além disso, é menos onerosa que várias outras técnicas utilizadas atualmente. Vale ressaltar que este método é de baixa resolução, não podendo haver a garantia da purificação completa do produto final, entretanto, é possível observar, por meio dos resultados obtivos, que o produto final possui importante potencial enzimático.

3.1.1.1. Dessalinização da enzima precipitada pelo método de diálise

Após a precipitação por *salting-out* foi realizado a dessalinização utilizando dois métodos, um por meio das membranas de diálise e outro pela unidade de UF de 10kDa.

A dessalinização por diálise foi realizada mantendo-se a enzima precipitada na membrana de diálise *overnight* a 4 ± 2 °C, para a remoção dos íons do sal. A atividade específica da α -amilase após a precipitação concentrou 4,75 vezes a enzima em comparação aos valores obtidos no EEB. O aumento da atividade específica após a purificação parcial indica a remoção de agentes não proteicos presentes no EEB (UGUR *et al.*, 2014).

A combinação de precipitação por sulfato de amônio e dessalinização por diálise apresentou uma perda de 30,35% e o rendimento do processo foi de 69,65%. Os resultados do presente estudo podem ser favoravelmente comparados com uma α -amilase parcialmente purificada produzida a partir de *A. awamori* que apresentou uma concentração de 2,81 vezes após esta mesma combinação de operações (KARAM *et al.*, 2017).

A diálise utilizada por Lakshmi *et al.* (2020) apresentou um fator de concentração de 2,42 vezes, em que a atividade específica observada foi de 203 U·mg⁻¹. Neste estudo foi utilizado cromatografia como processo de purificação, com uma concentração de 4,64 vezes. Karim *et al.* (2018), por sua vez, estudaram a purificação de α -amilase produzida por *Aspergillus flavus*. Neste processo a máxima concentração (2,55 vezes) foi alcançada também após o processo de cromatografia. Porém, após todas as etapas apenas 11,73% da atividade foi mantida, diferente do apresentado no presente estudo em que houve a permanência de 69,65% da atividade enzimática após utilizar a membrana de diálise.

3.1.1.2. Dessalinização da enzima precipitada por unidades de ultrafiltração

A dessalinização da proteína por meio das unidades de UF teve um rendimento de 44,85%. A atividade específica de α -amilase reportada por Frantz *et al.* (2019), que também utilizou as unidades de UF de 10 kDa para dessalinizar a enzima parcialmente purificada foi de 557,97 U·mg⁻¹, enquanto o presente estudo apresentou uma atividade específica de 19.736,26 U·mg⁻¹.

Em contrapartida, a maior atividade específica obtida no estudo de Dey e Banerjee (2014) foi de 627,5 U·mg⁻¹, após a purificação por cromatografia Sephadex® G-100. Aisien e Igbinosa (2019) também utilizaram a mesma cromatografia para purificar e concentrar α -amilase produzida por *A. flavus*, *A. niger* e *P. expansum*, observando a maior atividade para *A. flavus* com 1.053 U·mg⁻¹.

Bhatt *et al.* (2020), obtiveram um fator de concentração enzimático de 1,91 vezes quando precipitaram a enzima com sulfato de amônio, em uma concentração maior (80%) deste reagente do que o utilizado no presente trabalho. Entretanto, o método de cromatografia foi utilizado e concentrou 3,01 vezes a enzima nos estudos de Bhatt *et al.* (2020). Em contrapartida, os autores observaram uma concentração de α -amilase 15,48 vezes utilizando apenas a UF na membrana de 10 kDa. Priyadarshini *et al.* (2020), observaram uma concentração superior a 26% quando utilizaram cromatografia para purificar a amilase produzida por *Bacillus cereus*.

O método de dessalinização que apresentou maior concentração de α -amilase foi o método por unidades de UF de 10 kDa, este método concentrou 3,26 vezes mais a enzima do que pelo método de diálise. A menor abertura dos poros e maior seletividade da membrana acarretou na retenção das moléculas de interesse e as concentrou.

3.1.2 Purificação utilizando separação por membranas em escala laboratorial

A enzima purificada utilizando o método de separação por membranas com as unidades de UF em escala laboratorial (Tabela 5) obtiveram altos valores de concentração, pela equação 3. O processo em escala laboratorial obteve um rendimento (Equação 4) final de 46,76%, considerando que o permeado na membrana de 10 kDa representou apenas 2,43% da atividade relativa e foi descartado. O retido da membrana de UF de 10 kDa é a fração de interesse maior no presente estudo.

TABELA 5 - ATIVIDADE ESPECÍFICA, PERDA (%) E CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE NO PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO/CONCENTRAÇÃO POR UNIDADES DE ULTRAFILTRAÇÃO.

Amostra	Ativ. Total (U)	Proteína Total (mg)	Ativ. específica (U.mg ⁻¹)	Rendimento (%)	Perda (%)	Conc. (vezes)
EEB*	554,20	0,38	1.477,68	100,00	0,00	1,00
R' (100 kDa)	509,33	1,22	416,79	91,90	8,10	0,28
P'' (100 KDa)	418,91	0,01	29.314,56	69,47	30,53	19,84
R' (10 KDa)	373,07	0,02	22.937,33	46,76	53,24	15,52
P'' (10 KDa)	28,83	0,17	167,16	2,43	97,57	0,11

*Extrato enzimático bruto; 'Retido; ''Permeado;

Fonte: A autora, (2023).

A purificação utilizando apenas os sistemas de unidades de UF concentraram a enzima em 15,52 vezes comparada ao EEB inicial. É possível observar que houve uma alta concentração de proteína no retido da membrana de 100 kDa (19,84 vezes), isto, pode ser decorrente do encrustamento da membrana pelo processo de filtração e a presença de outras biomoléculas no extrato bruto.

A purificação parcial apenas com as unidades de UF foi tão eficiente quando a precipitação com sulfato de amônio. Além de apresentar uma perda semelhante, apesar de passarem por etapas diferentes. Isto é importante para entender o comportamento da enzima em diferentes combinações de etapas para a purificação de baixa resolução. Além de que sem a utilização do sulfato de amônio para a precipitação da enzima há menos geração de resíduos.

3.1.3 Purificação utilizando separação por membranas em escala piloto

O processo de separação por membranas em escala piloto foi realizado para avaliar o processo e a viabilidade deste. Estudos preliminares avaliaram a pressão ideal para operação de cada membrana. A membrana de microfiltração apresentou o melhor fluxo do permeado em uma pressão de 0,1 bar com uma vazão de 100 g·h⁻¹, assim como a membrana de UF de 100 kDa. A membrana de UF de 10 kDa operou de forma eficiente na pressão de 3,0 bar e uma vazão de 200 g·h⁻¹.

Na tabela 6 encontram-se os valores da permeabilidade hidráulica ao longo das etapas de clarificação e concentração de α -amilase, assim como, o grau de obstrução de cada membrana utilizada. O maior grau de obstrução foi observado na membrana de MF (80,39%), sendo decorrente da maior quantidade de sólidos em suspensão. A turbidez do extrato antes da filtração foi de 200 NTU e o retido da membrana de MF foi de 1000 NTU.

TABELA 6 – PERMEABILIDADE HIDRÁULICA LIMPA E SUJA E GRAU DE OBSTRUÇÃO DAS MEMBRANAS.

Membrana	Permeabilidade hidráulica – Limpa ($\text{kg.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}$)	Permeabilidade hidráulica – Suja ($\text{kg.m}^{-2}.\text{h}^{-1}.\text{bar}$)	Grau de obstrução (%)'
MF ¹	302,19	59,24	80,39
UF-100kDa ²	270,90	185,34	31,58
UF-10kDa ³	119,93	25,69	79,58

'Grau de obstrução = $(1 - \text{Permeabilidade suja} / \text{Permeabilidade limpa}) \%$; ¹membrana de microfiltração; ²membrana de ultrafiltração 100 kDa; ³membrana de ultrafiltração 10 kDa.

Fonte: A autora, (2023).

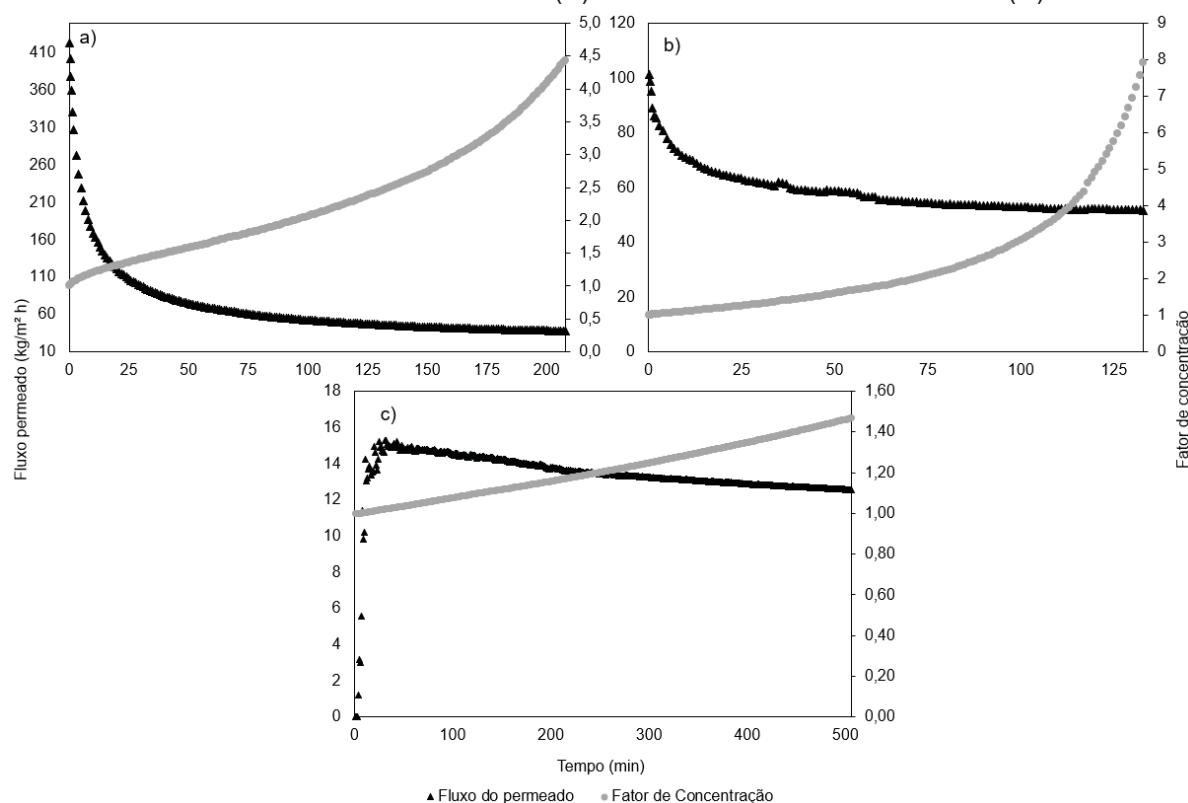
A membrana de UF de 100 kDa apresentou o menor grau de obstrução (31,58%), em contrapartida, a UF de 10 kDa apresentou um valor (79,58%) próximo ao da membrana de MF (80,39%). A queda no fluxo da membrana de MF e UF de 10 kDa, bem como, o maior grau de obstrução em comparação a membrana de UF de 100 kDa ocorreu devido à entrada de partículas de várias dimensões nos poros das membranas entupindo os poros (BAKER, 2004). Assim como, nestas membranas pode ter um alto grau de obstrução devido à adsorção das moléculas na superfície ou também devido ao depósito das espécies presentes no extrato (BARROS *et al.*, 2003).

No processo de clarificação buscava-se obter um EEB livre de turbidez com uma perda reduzida de atividade enzimática. A turbidez do EEB foi reduzida em todas as membranas avaliadas de forma satisfatória, variando de 201 NTU (EEB) para 0 NTU (permeado da UF de 100 kDa).

A turbidez diminuiu drasticamente após a etapa de MF, demonstrando a eficiência desta para a clarificação. A MF com a membrana de 0,44 μm resultou em um EEB com uma turbidez de 1 NTU comparado com uma turbidez inicial de 201. Nas outras etapas esse parâmetro manteve-se estabilizado.

Na Figura 2 (a) está apresentado o fator de concentração e o fluxo do permeado durante a MF realizada na membrana de polieterimida com uma pressão de 0,1 atm. Na Figura 2 (b) aparece os valores relacionados a membrana UF de 100 kDa de polietersulfona em pressão de 0,1 atm e na Figura 2 (c) com a membrana de UF de 10 kDa a uma pressão de 3,0 atm.

FIGURA 2 - PERFIL DE FLUXO DE PERMEADO E FATOR DE CONCENTRAÇÃO PARA MF (A); MEMBRANA DE UF DE 100 kDa (B) E MEMBRANA DE UF DE 10 kDa (C).



*Foi utilizado pressão de 0,1 atm para a membrana de MF e UF 100 kDa, e para a membrana de UF de 10 kDa a de 3,0 atm.

Fonte: A autora, (2023).

O fator de concentração na membrana de MF foi de 4,43 vezes, para a membrana de UF de 100 kDa foi de 7,92 vezes e para a UF de 10 kDa de 1,47 vezes. O fluxo do permeado manteve-se em uma média de $38 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ após 208 min na membrana de MF, porém, correspondeu a uma redução de 91% deste fluxo do permeado. Na UF de 100 kDa esse valor foi de $51 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ após 133 min com uma redução no fluxo de 48,96%. A membrana de UF de 10 kDa apresentou um fluxo do permeado de $12,56 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ após 506 min com a redução do fluxo do permeado de apenas 11,79%. Apesar da UF de 10 kDa ser importante no processo para concentrar a enzima, o processo até a membrana UF de 100 kDa mostrou-se melhor, pois houve menor perda no processo e uma concentração superior que UF de 10 kDa.

Essa redução contínua do fluxo de permeado pode estar associada aos efeitos da polarização por concentração, como a adsorção de moléculas de soluto na superfície da membrana formada por compostos de alta massa molar (BHATTACHARJEE *et al.*, 2018). Bem como, devido à alta concentração próxima da membrana, que resulta em um fluxo difusivo contrário.

O sistema de separação por membranas em escala piloto (Tabela 7) obteve um rendimento de 32,03% das enzimas, considerando que o permeado na membrana de 10 kDa representou apenas 0,05% da atividade total da cinética. O permeado da membrana de MF apresentou uma perda de 47,50% em relação ao extrato bruto.

TABELA 7 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA TOTAL, PROTEÍNA, ATIVIDADE ESPECÍFICA, PERDA (%) E CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE NO PROCESSO DE CLARIFICAÇÃO/CONCENTRAÇÃO POR SEPARAÇÃO COM MEMBRANAS EM ESCALA PILOTO.

Amostra	Ativ. Total (U)	Proteína Total (mg)	Ativ. específica (U.mg ⁻¹)	Rendimento (%)	Perda (%)	Conc. (vezes)
EEB ¹	323.897,71	1.232,52	262,79	100,00	0,00	1,00
R MF ¹	81.697,73	78,03	1.046,99	25,22	74,78	3,98
P MF	259.405,36	234,67	1.105,27	80,09	19,91	4,21
R 100 kDa ²	76.684,72	77,44	990,22	23,68	76,32	3,77
P 100 kDa	99.269,36	254,32	390,33	30,65	69,35	1,49
R 10 kDa ³	12.342,15	20,89	590,60	3,81	96,19	2,25
P 10 kDa	31,33	22,07	1,42	0,01	99,99	0,01

¹EEB -Extrato enzimático bruto; ¹MF – membrana de microfiltração; ²100 kDa – membrana de ultrafiltração de 100 kDa; ³10 kDa – membrana de ultrafiltração de 10 kDa. R – Retido; P – permeado; Fonte: A autora, (2023).

O alto grau de obstrução da membrana de MF pode ter acarretado o alto teor de proteína presente no retido da membrana de microfiltração. Por meio da turbidez também é possível perceber a alta concentração de compostos no extrato retido nesta etapa do processo, um aumento de 201 para 986 NTU. As frações retidas (R MF e R 100 kDa) obtiveram um alto valor de perda, 74,78% e 76,32%, respectivamente. Isto, é positivo para este processo, pois quanto menor rendimento houver nessas frações menor perda haverá na fração de interesse. Entretanto, devido a todos esses fatores, pode ter ocasionado o encrustamento dessas membranas e perda da maior parte de α -amilase ao longo do processo.

A enzima foi concentrada em 2,25 vezes comparada a enzima inicial. No processo de purificação parcial pela separação com membranas houve a perda de 96,19% da atividade relativa de α -amilase. Isto, pode ser decorrente do alto grau de obstrução ocorrido na membrana de MF e formação de espuma ao longo do processo. O sistema em escala piloto utilizado para as análises ocasionou a formação de espuma, mesmo que em pequenas quantidades. As enzimas podem sofrer desnaturação devido à agitação, pois há a incorporação de bolhas de ar e adsorção de moléculas de proteína na interface ar-líquido.

Estudos reportados na literatura apresentam rendimentos baixos mesmo utilizando métodos de purificação de alta resolução em comparação a separação por

membrana. Priyadars *et al.* (2020), obtiveram um rendimento de apenas 3,2% utilizando cromatografia, para Abd-Elaziz *et al.* (2020) esse valor foi de 8,2. Kohli *et al.* (2020) obtiveram 22,41%, Karim *et al.* (2018) apenas 11,73%, para Lakshmi *et al.* (2020) por sua vez, o rendimento foi de 35% e Bhatt *et al.* (2020) foi de 31,35. Kikani *et al.* (2019) avaliaram a cromatografia de troca iônica e de exclusão de tamanho para a purificação de uma amilase por *Anoxybacillus rupiensis* TS-4 e os rendimentos foram de 34,72 e 38,33%, respectivamente.

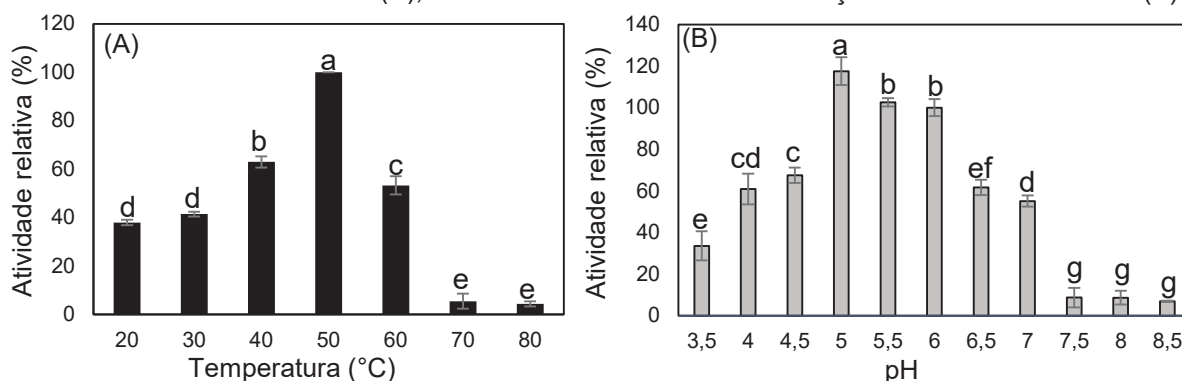
Apesar do rendimento ter sido apenas de 3,81%, ainda pode ser considerado viável se houver uma adaptação do sistema para evitar a formação de espumas. O pré-tratamento do EEB também seria uma alternativa para evitar a alta obstrução da membrana de MF e a diminuição das perdas da enzima. Tais adaptações aumentariam a aplicabilidade do processo, pois este mostrou-se suficiente para uma purificação de α -amilase produzida por *C. comatus* sem que haja a necessidade de um método refinado. Outra alternativa seria a parada do processo de purificação na etapa da utilização da UF de 100 kDa, pois o rendimento estaria da média de vários já reportados na literatura. Além de que na membrana UF de 100 kDa é possível reter grande parte dos lipídeos, açúcares e outros compostos maiores.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DA α -AMILASE PURIFICADA

3.2.1. Efeito do pH e da temperatura na atividade de α -amilase produzida por *C. comatus* em cultivo submerso

A enzima purificada foi caracterizada quanto a temperatura ideal (Figura 3(A)) para atividade enzimática, bem como, o pH (Figura 3(B)). A α -amilase purificada obteve a temperatura ótima de 50 °C, mantendo uma atividade superior a 45% nas temperaturas de 30, 40 e 60 °C. As temperaturas de 20 e 30 °C não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, bem como as de 70 e 80 °C. A atividade enzimática teve uma diminuição abrupta nas temperaturas acima de 70 °C.

FIGURA 3 - ATIVIDADE RELATIVA DE α -AMILASE EM RELAÇÃO A TEMPERATURA DE REAÇÃO DO EXTRATO PURIFICADO (A); ATIVIDADE RELATIVA EM RELAÇÃO A DIFERENTES PH (B).



* Em cada figura as letras minúsculas diferentes indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as colunas. As letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: A autora, (2023).

A temperatura ideal encontrada no presente trabalho também foi reportada para a α -amilase sintetizada por *T. pseudokoningii* (ABDULAAL, 2018), para *C. comatus* (FRANTZ *et al.*, 2019; PALUDO *et al.*, 2018), para a cepa *R. oryzae* (ALMEIDA *et al.*, 2017) e *Aspergillus flavus* (KARIM *et al.*, 2018). A maioria das α -amilases reportadas na literatura produzidas por microrganismos mostraram temperaturas ótimas em uma faixa de 25 °C-60 °C (JONATHAN; ADEOYO, 2011; KUSUDA *et al.*, 2006). Em contrapartida, temperaturas superiores a esta acarretaram na diminuição da atividade ou inativação da enzima.

A α -amilase purificada apresentou um pH ótimo de 5,0 (Figura 3(B)), com um acréscimo de 17,53% na atividade relativa da amostra controle (pH 6,0). Na faixa de pH entre 5,0 e 6,0, a atividade enzimática foi superior ou igual a 100%. Porém, na faixa de pH de 4,0, 4,5, 6,5, e 7,0 foram observados valores em torno de 60% de atividade relativa. Em contrapartida, nos pH 7,5, 8,0 e 8,5 esta atividade foi menor que 7% e não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Frantz *et al.* (2019) constataram que para α -amilase de *C. comatus*, produzida em resíduo agroindustrial, o pH ideal também foi 5,0. Enquanto estudos reportados por Paludo *et al.* (2018) com esse mesmo microrganismo utilizando em meio sintético, a enzima teve pH ideal de 6,0. A enzima purificada demonstrou o mesmo comportamento que o reportado por Frantz *et al.* (2019), isto pode estar relacionado a interferência dos componentes presentes no extrato bruto. Ferrari *et al.* (2017) reportou o pH ótimo de 5,5 e 6,5 para *Bacillus sp*, enquanto no estudo realizado por Kalia *et al.* (2021) com *T.*

reesei este foi de 5,0, assim como, Karim *et al.* (2018) para *Aspergillus flavus* e *A. goii* (LAGO *et al.*, 2021). Alguns estudos reportados na literatura mostraram que o pH de atuação de α -amilase para macromicetos teve melhor desempenho em pH ácidos, com valores entre 4,6, a 7,0 (SIQUEIRA *et al.*, 1997). Em meios com o pH alcalino (7,5; 8; 8,5) ocorreu a diminuição da atividade relativa em aproximadamente 93%.

3.2.2. Determinação do efeito dos íons metálicos na atividade de α -amilase

A influência dos íons metálicos (Tabela 8) foi avaliado nas concentrações de 1 mM, 2,5 mM e 5 mM. O teste de *Tukey* a uma significância de $p < 0,05$ foi realizado considerando cada íon separadamente em comparação a amostra controle, que foi definida como a amostra com 100% de atividade relativa.

TABELA 8 – INFLUÊNCIA DOS ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE RELATIVA DE α -AMILASE AVALIANDO A SIGNIFICÂNCIA PELO TESTE DE TUKEY ($p < 0,05$). VALORES COM A MESMA LETRA EM CADA COLUNA NÃO APRESENTA DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICATIVA.

	Atividade relativa de α -amilase (%)				
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	MgSO ₄	MnSO ₄ ·H ₂ O	Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·7H ₂ O	CuSO ₄
Controle	100,00 ^a	100,00 ^{ab}	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a
1 mM	109,39 ^a	84,13 ^c	91,78 ^b	94,33 ^a	96,02 ^{ab}
2,5 mM	116,68 ^a	106,41 ^a	98,04 ^a	82,58 ^b	85,28 ^b
5 mM	114,99 ^a	93,86 ^{bc}	98,51 ^a	90,88 ^{ab}	70,70 ^c

*teste de tukey comparando as colunas;

Fonte: A autora, (2023).

A atividade relativa de α -amilase aumentou na presença de cálcio, em todas as concentrações, sendo 2,5 mM a que obteve maior acréscimo (16%). Entretanto, não houve diferença estatística entre as amostras com cálcio e controle pelo teste de *Tukey* a $p < 0,05$ de significância. O íon magnésio (2,5 mM) ocasionou o acréscimo de 6% na atividade relativa, sendo que nas outras concentrações ocorreu uma diminuição. Em contrapartida, o manganês apresentou uma atividade estatisticamente igual ao controle tanto em 2,5 mM como em 5 mM. O íon cobre nas duas maiores concentrações (2,5 e 5 mM) inibiu a atividade enzimática, assim como o ferro. Os dois íons (Cu^+ e Fe^{2+}) não foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) que suas respectivas amostras controle.

Segundo Nwagu e Okolo (2011), o cálcio apresentou um aumento de 18% na atividade de uma amilase produzida por *Fusarium* sp, acréscimo muito semelhante ao observado no presente estudo. A presença de vários íons pode ocasionar em uma melhor interação entre o substrato e o sítio catalítico da enzima (Pasin *et al.*, 2017). Isto, possibilita que mesmo que não haja uma diferença estatística para o cálcio e o

controle, este íon melhora a estabilidade da enzima, como é possível perceber nos resultados apresentados posteriormente.

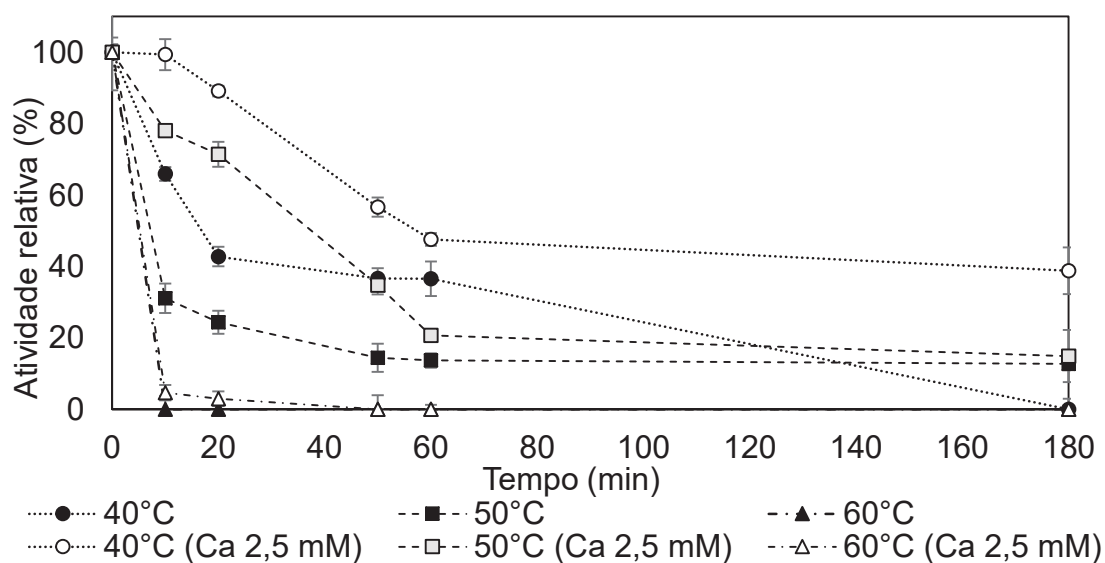
O magnésio não acarretou no aumento da atividade de α -amilase como o observado em outros estudos. Segundo Paludo et al. (2018) houve um aumento de 43% na atividade relativa da amilase. Nwagu e Okolo (2011) observaram um acréscimo de 36%, enquanto, para Frantz et al. (2019) houve um aumento 25% na atividade relativa de α -amilase. Singh et al. (2014) observaram que os íons ferro inibiram em até 50% a atividade de amilase produzida por *Streptomyces* sp., em contrapartida, a inibição para a enzima produzida por *C. comatus* no presente estudo foi de aproximadamente 30%.

As características avaliadas para a α -amilase produzida por *C. comatus*, como a temperatura ótima de atuação, pH ou a influência dos íons sobre esta são fundamentais para a indicação da aplicação ideal para este tipo de enzima. A falta de necessidade de acréscimo de íon metálico, para ocorrer uma melhora acentuada da atividade, possibilita a utilização desta para aplicações como panificação ou produção de xaropes de frutose, por exemplo.

3.2.3 Estabilidade térmica de α -amilase purificada

A α -amilase foi incubada em temperaturas de 40, 50 e 60 °C por um período de 60 min. O comportamento enzimático diferiu em cada temperatura avaliada (Figura 4).

FIGURA 4 – ESTABILIDADE TÉRMICA DE α -AMILASE PURIFICADA NAS TEMPERATURAS DE 40, 50 E 60 °C DURANTE UM PERÍODO DE 180 MIN.



Fonte: A autora, (2023).

A amilase purificada em 40°C conservou 36,54% da atividade em 60 min de reação e, após 3 h esse valor permaneceu estável. Em contrapartida, na temperatura de 50°C em 20 min a atividade relativa foi de 24,35%, porém esse valor diminuiu para 13,68% após os 60 min de reação e para 12,71% em 180 min. A 60°C a atividade enzimática caiu para 0 em poucos minutos. Conforme a temperatura de incubação aumentou ocorreu a diminuição da atividade residual, isto também foi observado para Kalia *et al.* (2021). Rodrigues *et al.* (2017), que observaram uma estabilidade maior nas temperaturas de 40 e 50°C para α -amilase de *A. niger*.

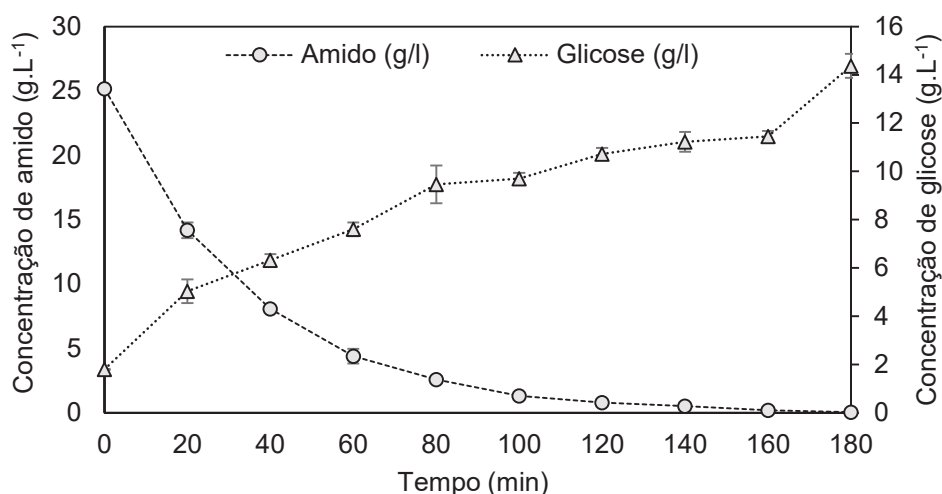
Apesar da estabilidade térmica desta enzima estudada não ser muito expressiva, foi possível perceber uma melhora com a adição de 2,5 mM do íon cálcio no tampão acetato utilizado na reação. Vários estudos relatam que as amilases contêm cálcio como grupo prostético e que a presença deste é importante para a atividade e estabilidade (GUPTA *et al.*, 2003; SOUZA; MAGALHÃES, 2010; PASIN *et al.*, 2017; ALMEIDA *et al.*, 2017). Apesar de este íon não ter apresentado diferença estatisticamente significativa na atividade, foi possível perceber uma melhora quando o parâmetro avaliado foi a estabilidade.

Isto, pode ser comprovado no presente trabalho, pois em 60 min de reação a 40 °C a atividade relativa foi 11% maior com a adição de cálcio a 2,5 mM em comparação a amostra sem o íon. Esta diferença é ainda maior nos 20 primeiros minutos, havendo a permanência de uma atividade relativa superior (46%) em comparação a amostra sem o íon. Na temperatura de 50 °C esta diferença também é maior nos 20 primeiros minutos de reação, havendo uma atividade relativa superior a 47% na amostra com a presença do íon Ca^{2+} . Em contrapartida, na temperatura de 60 °C com a presença do íon há apenas a permanência de aproximadamente 3% da atividade enzimática em 20 min em comparação a 0% sem a presença do íon. Esta melhora na estabilidade térmica utilizando tampão suplementado com o íon CaCl_2 (2,5 mM), também foi constatada por Astolpho *et al.* (2017).

3.2.4 Avaliação da hidrólise do amido e liberação de glicose

A enzima purificada foi aplicada em uma solução de amido (3% p·v⁻¹) por 180 min durante o qual a concentração de glicose e amido no meio reacional foi quantificada a cada 20 min (Figura 5). Os parâmetros de reação foram os mesmos utilizados no ensaio enzimático, como descrito no subitem 2.4.4.

FIGURE 5 – DEGRADAÇÃO DA SOLUÇÃO DE AMIDO (3% m.v⁻¹) E LIBERAÇÃO DE GLICOSE AO LONGO DE 180 MIN UTILIZANDO A ENZIMA PURIFICADA EM BANHO-MARIA A 50°C.



Fonte: A autora, (2023).

Após os 60 min de reação a enzima purificada havia hidrolisado 82,52% do amido presente no meio reacional, em 120 min esse valor foi de 96,84% e em 180 min foi de 99,78%. Considerando o custo energético e operacional para manter os equipamentos em um processo industrial, 50 °C pode ser considerado a interrupção do processo em 120 min, pois havia apenas 0,79 g·L⁻¹ de amido residual. A concentração de amido foi de 25,18 g·L⁻¹ no tempo 0 min para 0,06 g·L⁻¹ em 180 min. Vale ressaltar que a enzima foi diluída 100 vezes para aplicação neste processo visando simular a utilização em um processo real. Em sua forma concentrada o tempo de reação será muito menor do que os apresentados neste experimento, considerando que em testes realizados (dados não publicados) esta enzima degradou 20 g·L⁻¹ em menos de 5 min. Outro fator que merece destaque é que apesar de α -amilase apresentar atividade relativa de apenas 13,68% (60 min/ 50 °C), conforme estudo de estabilidade, a enzima degradou quase 100% do amido em apenas 180 min.

Os autores observaram resultados superiores a vários estudos reportados na literatura, como Sudan *et al.*, (2018) que avaliaram uma α -amilase da bactéria (*Geobacillus*) para a hidrólise do amido cru (1% p·v⁻¹) e observaram valores máximos de 91,3% após 240 min. Fincan *et al.* (2021) utilizaram a mesma enzima, mas produzida por *B. licheniformis* SO-B3 e observaram valores de hidrólise em torno de 40% em meio com concentração de 1%(p·v⁻¹). A diferença na porcentagem de degradação e tempo podem estar relacionadas a fonte de amido, por esta determinar o tamanho dos

grânulos e a proporção amilopectina/amilose, além do comprimento da cadeia (Sudan *et al.* 2018).

A glicose foi liberada ao longo da hidrólise do amido, esta tinha uma concentração inicial de $1,79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (0 min) e ao longo de 180 min esse valor aumentou 8 vezes. As concentrações da glicose em 60 min de reação foram de $7,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, em 120 min este valor era de $11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e ao final a concentração de glicose foi em torno de $14,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Além da concentração da glicose aumentar 8 vezes se comparado a concentração inicial do meio, houve a conversão de 57% do amido em glicose se considerarmos apenas este composto como resultado desta hidrólise. A avaliação da hidrólise do amido e a liberação da glicose é importante para entender o comportamento da α -amilase quando aplicada em um produto contendo amido. Isto, possibilita entender o tempo necessário para hidrólise e quanto é liberado de glicose. A α -amilase do *C. comatus* possui potencial para aplicação, entretanto ainda são necessários estudos aprofundados utilizando diferentes matrizes para uma melhor análise de comportamento da enzima.

3.2.5 Avaliação da atividade enzimática após a liofilização

Após a liofilização a α -amilase apresentou uma concentração de 18,88 vezes maior comparado a atividade inicial, o que representa uma perda de 5,78% da enzima nesta etapa. O rendimento desse processo foi de aproximadamente 2% devido à baixa concentração de sólidos no extrato purificado. Vale ressaltar que embora o rendimento tenha sido baixo no processo a utilização da liofilização se justificada pelo alto nível de atividade e a rápida degradação de substrato pela enzima. A enzima pura degradou $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de uma solução de amido em um tempo menor que 5 min.

Esse resultado demonstra o potencial desta enzima. Importante destacar que durante todo o processo visou-se a simplificação das etapas e custo, portanto não foi utilizado nenhum tipo de conservante e estabilizante para estabilizar a enzima ou assegurar a menor perda de atividade desta.

Os estudos realizados por Kohli *et al.* (2020), Lakshmi *et al.* (2020) e Fincan *et al.* (2021) realizaram a liofilização da α -amilase, mas não fizeram um comparativo de quantas vezes a enzima foi concentrada em relação a atividade inicial. Os autores utilizaram a liofilização para concentrar a enzima antes de fazerem todos os testes

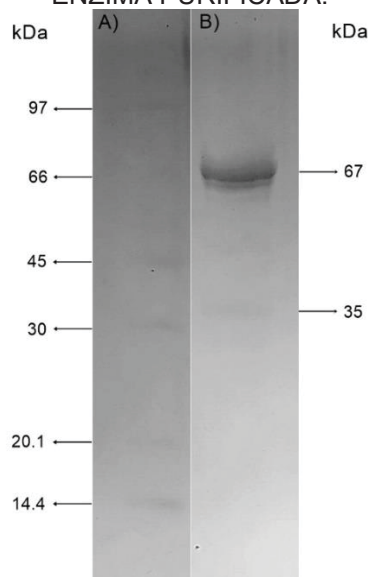
reportados em suas pesquisas. Neste sentido, não é possível comparar os resultados destes estudos com o presente trabalho.

3.2.6 Determinação da massa molar enzimática por eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes pelo método (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

Após a purificação parcial utilizando as unidades de UF de 100 e 10 kDa foi realizado o SDS-PAGE, sendo então possível avaliar o tamanho da massa molecular da amilase produzida por *C. comatus*. A α -amilase apresentou uma banda de aproximadamente 67 kDa (Figura 6), tamanho molecular semelhante a albumina do marcador padrão.

Uma segunda banda pode ser detectada em aproximadamente 35 kDa, identificada como possivelmente uma glucoamilase, enzima que também apresentou atividade no extrato parcialmente purificado ($\cong 3,1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$).

FIGURA 6 – ANÁLISE DE SDS-PAGE DE α -AMILASE PURIFICADA. A) MARCADOR PADRÃO (AMERSHAM LOW MOLECULAR WEIGHT CALIBRATION KIT FOR SDS ELECTROFORESE); B) ENZIMA PURIFICADA.



A proteína padrão utilizada foi Fosforilase b (97 kDa), Albumina (66 kDa.), Ovalbumina (45 kDa), Anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa), α -lactalbumina (14,4 kDa).

Fonte: A autora, (2023).

A presença de apenas duas bandas no gel de eletroforese demonstra a eficiência da UF para esse extrato. A massa molecular da amilase encontrada aproxima-se de vários outros estudos reportados na literatura. Ramachandran *et al.* (2004) avaliaram uma α -amilase produzida por *Aspergillus oryzae* com massa molecular de 68 kDa. Kalia *et al.* (2021) encontram na purificação de uma amilase

produzida por *Trichoderma reesei*, valor de 71 kDa. *A. flavus* por sua vez, sintetizou uma amilase com massa molecular de 54 kDa. (Karim *et al.*, 2018). Em contrapartida, a α -amilase de *T. pseudokoningii* foi de 30kDa (Abdulaal, 2018).

4. CONCLUSÃO

A α -amilase proveniente de *C. comatus* apresentou após o método de *salting-out* uma concentração da enzima de 4,75 vezes com dessalinização por meio do método de diálise, enquanto, que utilizando as unidades de UF houve uma concentração de 15,48 vezes. A separação com as unidades de Uf em escala laboratorial concentrou a enzima em 15,52 vezes, em contrapartida, na separação por membranas em escala piloto este valor foi de 2,25 vezes. Os processos testados são promissores para o uso da purificação da α -amilase de *C. comatus*, entretanto adaptações e melhorias necessitam ser realizadas. As alternativas para a purificação das enzimas podem ser aplicadas industrialmente, desde que haja o tratamento e recuperação do sal no resíduo gerado e um sistema que diminua o encrustamento das membranas e a formação de bolhas. A possibilidade de purificar essa enzima sem a necessidade de processos de purificação mais onerosos é importante para que esta α -amilase possa concorrer no mercado enzimático.

A enzima α -amilase apresentou os maiores valores de atividade enzimática em uma temperatura de 50 °C e pH 5,0. A estabilidade térmica da amilase apresentou melhora em até 47% com a adição de cálcio (2,5 mM). Entretanto, a atividade enzimática com a adição de íons ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Fe}_2(\text{SO})_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), entre eles o cálcio, não apresentaram aumento significativo na atividade comparado com o controle.

A enzima purificada e diluída 100 vezes em tampão hidrolisou ($\cong 100\%$) aproximadamente $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ em 3 h de reação. A liofilização da enzima purificada concentrou a amilase em 18,88 vezes se comparado a atividade na forma líquida. A massa molecular da α -amilase é de aproximadamente 67 kDa e a outra enzima presente no extrato purificado com uma massa molecular de aproximadamente 35 kDa.

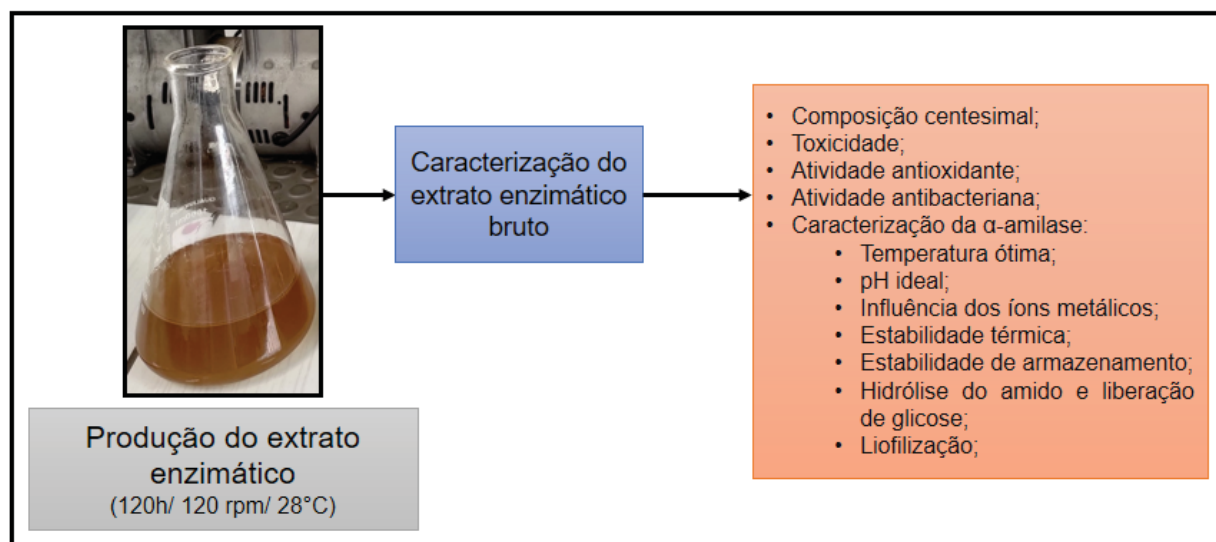
As características de α -amilase obtida demonstram seu potencial para aplicação em processos que necessitem da hidrólise completa do amido. Entretanto, mais estudos sobre a aplicação desta enzima para avaliar o comportamento em matrizes mais complexas, são importantes.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO PRODUZIDO COM SUBPRODUTO AGROINDUSTRIAL POR *C. COMATUS*



RESUMO GRÁFICO



RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido para avaliar o EEB rico em α -amilase produzido por *C. comatus* em subproduto agroindustrial visando a aplicação deste sem a etapa de purificação. Isto foi realizado avaliando a toxicidade do extrato, a atividade antioxidante e as concentrações de compostos fenólicos e flavonoides. O pH e a temperatura ideal da enzima, estabilidade térmica, influência de íons metálicos e a estabilidade enzimática após armazenamento por 721 dias também foram determinados. O extrato não apresentou toxicidade pelo teste realizado, e a atividade antioxidante foi determinada, com concentrações significantes de $213 \text{ ET} \cdot \text{mL MS}^{-1}$ para a avaliação de DPPH e $285 \text{ GAE} \cdot \text{mL MS}^{-1}$ de flavonoides. A temperatura de 50°C e pH de 6,0 foram os parâmetros ideais para a atividade enzimática, bem como, a estabilidade térmica desta enzima foi melhorada com a adição do íon cálcio. O íon estimulou o aumento de 62% da atividade de α -amilase. Além disso, o EEB manteve 64% da atividade relativa após 721 dias de armazenamento em temperatura de refrigeração e de congelamento sem a adição de conservantes. A liofilização do EEB aumentou 63 vezes a atividade de α -amilase. A α -amilase na forma bruta, diluída 20 vezes, hidrolisou aproximadamente 96% do meio reacional com $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ em 3 h. As avaliações demonstram o potencial do EEB para a utilização na forma bruta, diminuindo custos de produção, excluindo a etapa de purificação e reduzindo a geração de resíduos.

Palavras-chave: Toxicidade; antioxidantes; estabilidade enzimática; cogumelo comestível; processo verde;

1. INTRODUÇÃO

C. comatus é um cogumelo (macromiceto) comestível, pertencente a filo Basidiomycota, da família Agaricaceae, gênero *Coprinus*, conhecido como juba desgrenhada. O *C. comatus* é conhecido pelas biomoléculas que produz, as quais possuem propriedades bioativas, como atividade antioxidante (AKATA *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2010; ASATIANI *et al.*, 2007; TEŠANOVIĆ *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2009) TSAI *et al.*, 2009), atividade antimicrobiana (TEŠANOVIĆ *et al.*, 2017; ZENKOVA *et al.*, 2003), produção de enzimas (FRANTZ *et al.*, 2019; PALUDO *et al.*, 2018) e propriedades nutracêuticas (OZALP *et al.*, 2014; STOJKOVIC *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2019).

Atualmente, tem-se buscado a utilização de produtos naturais e saudáveis, principalmente após a pandemia do COVID-19. Isto pode ser percebido pela busca crescente em substituir aditivos alimentares por fontes naturais. A substituição de emulsificantes por enzimas (α -amilase) que melhorem o frescor e vida útil de alimentos da panificação na indústria alimentícia é um exemplo disto (RUAN, ZHANG, & XU, 2022; FARIAS, KAWAGUTI, & KOBLITZ, 2021). Além disso, o potencial de produção de antioxidantes por microrganismos também tem sido cada vez mais estudado devido a sua importância em diferentes segmentos industriais. Isto, principalmente por sua capacidade de atrasar ou inibir a oxidação de um dado substrato quando presentes neste meio, mesmo em baixas concentrações (TELES *et al.*, 2020).

No cenário atual, deve-se considerar a busca crescente por novas fontes para a produção de biomoléculas de interesse comercial. Bem como, cresce o interesse pela utilização de processos verdes. Os consumidores, organizações e a sociedade têm cada vez mais buscado empresas que visem diminuir o impacto ambiental, econômico e social. Empresas que se preocupem com a degradação ambiental e todos os efeitos decorrentes desta (DANGELICO; VOCALELLI, 2017; HAYASHI *et al.*, 2019; LEWANDOWSKA; WITCZAK; KURCZEWSKI, 2017).

Nesse contexto, esta pesquisa buscou avaliar a capacidade de produção de α -amilase, mas também as características dessa enzima no seu estado bruto, sem a necessidade das etapas de purificação. A atividade antioxidante, toxicidade e estabilidade de armazenamento deste produto também foi avaliada. Isto visando fornecer um produto que possua a capacidade enzimática necessária para a aplicação em alimentos com atividade antioxidante que possa agregar valor, saúde e melhora de características sensoriais e nutricionais do produto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PRODUÇÃO DO EEB

2.1.1. Microorganismo e a produção de EEB

O inóculo, a manutenção de *C. comatus* e a produção de EEB foram realizados conforme descrito por Frantz *et al.* (2019), com modificações conforme detalhado no capítulo III. Após a produção do EEB, este foi filtrado para remover a biomassa e centrifugado para separar o sobrenadante enzimático e posterior caracterização.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

2.2.1 Composição centesimal do EEB

O EEB foi submetido à análise da composição centesimal (proteínas, lipídios, fibras, cinzas e carboidratos) realizada de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC 1998), determinada em matéria seca (MS). O método de Micro-Kjeldahl determinou o teor de nitrogênio total, usando um fator de 4,38 para converter o teor de nitrogênio em proteínas totais (MILES; CHANG, 1997). O teor de carboidratos foi obtido por diferença e todas as análises aqui citadas estão descritas no Apêndice 15.

2.2.2 Toxicidade por *Artemia salina*

A toxicidade do EEB foi avaliada conforme descrito por Bellatto e Braguini (2020), com modificações. Dez náuplios (Figura 1) previamente inoculados foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 mL de EEB diluído em água salina (3% p·v⁻¹). As concentrações de EEB testadas foram 1, 2, 3 e 4% (v·v⁻¹). O controle positivo foi realizado com os náuplios em 5 mL de água salina a 3% (p·v⁻¹). O controle negativo foi realizado em solução de 5 mL com dicromato de potássio 1 mg·mL⁻¹ diluído em solução salina.

FIGURA 1 – *ARTEMIA SALINA* INOCULADA EM ÁGUA SALINA POR 24 H VISTA EM MICROSCÓPIO COM UM ZOOM DE 400 X.



Fonte: A autora, (2023).

Após 24 h, foi contado o número de náuplios sobreviventes dos grupos controle (positivo e negativo) e os tubos com as frações do extrato. A porcentagem de mortalidade foi calculada pela Equação 1.

$$Mortalidade(\%) = \left[\frac{(Teste - Controle)}{Controle} \right] \times 100 \quad (1)$$

Onde, o *Teste* é o número de náuplios vivos em tubos com EEB, e o *Controle* é o número de náuplios vivos em controle positivo.

O método de avaliação da toxicidade aguda com *Artemia salina* permite a determinação da dose letal mediana (DL_{50}); isso se refere à concentração necessária de uma determinada substância para matar 50% da população (MEYER *et al.*, 1982).

2.2.3 Atividade antioxidante, compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides totais do extrato enzimático bruto

O EEB foi submetido à análise de determinação da atividade antioxidante por meio de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS (2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico)), métodos de captura de radicais livres, pelo método de redução de ferro (FRAP) e a determinação de CFT totais, flavonoides totais.

O método de DPPH foi realizado adicionando 50 μ L do extrato e 1,95 mL de solução de DPPH em tubos de ensaio. Os tubos foram agitados em vórtex e armazenados no escuro por 30 min. Posteriormente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro UV-VIS a 517 nm (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Por sua vez, para ABTS, 3 mL de solução ABTS e 30 μ L de EEB foram adicionados ao tubo de ensaio e homogeneizados usando um vórtex (modelo 772, Fisatom, Brasil). O meio reacional foi armazenado por 2 h ao abrigo da luz, e posteriormente a absorbância foi medida em 734 nm em espectrofotômetro UV-VIS (RE *et al.*, 1999).

O método FRAP analisa a transferência de elétrons com base na capacidade de reduzir o ferro (BENZIE; STRAIN, 1996). Uma alíquota de 100 µL de extrato e 3,4 mL do reagente FRAP foram adicionados aos tubos de ensaio. Foram homogeneizados e mantidos por 30 min em banho contendo água a 37 ± 2 °C; em seguida, a absorbância foi obtida em espectrofotômetro UV-VIS a 593 nm, e o equipamento com branco foi zerado. Os métodos DPPH, ABTS e FRAP utilizaram o equivalente trolox para a curva padrão e estas estão descritas nos apêndices 9, 11 e 13.

Com modificações, o CFT foi obtido pela determinação da capacidade redutora do reagente de Folin-Ciocalteu, conforme Singleton e Rossi (1965). Uma alíquota de 20 µL de EEB e 1,68 mL de água destilada foram homogeneizados em vórtex modelo 772; na sequência, foram adicionados 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 min de repouso, 200 µL de carbonato de sódio (20% m.v⁻¹) foram adicionados e homogeneizados em vórtex, e os tubos foram armazenados sob luz por 60 min para posterior leitura das absorbâncias. As absorbâncias foram medidas a 760 nm em espectrofotômetro UV-VIS. A calibração foi realizada com ácido gálico (GA) diluído em água, e os resultados de CFT foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por g de extrato seco.

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada com base no método descrito por Arriola *et al.* (2014). Alíquotas de 1 mL de EEB foram homogeneizadas com 0,3 mL de solução de nitrito de sódio (NaNO₂) a 5% (m.v⁻¹). Em sequência, adicionou-se 0,3 mL de solução de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 10% (m.v⁻¹) e os tubos foram armazenados no escuro por 6 min. Após, 2 mL de solução de NaOH 1 M foram adicionados e homogeneizados em vórtex e a absorbância foi medida a 425 nm. A catequina foi usada como padrão para quantificação.

2.2.4 Atividade antibacteriana

O método de difusão em poço foi utilizado para investigar a atividade antibacteriana do EEB contra *S. aureus* e *E. coli*, baseado em CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute, 2003) e Laborclin (2019). A partir de culturas de microrganismos obtidas em ágar BHI a 35 °C por 24 h, foi feita uma suspensão bacteriana em solução salina 0,85 % (p.v⁻¹). Em contrapartida, a turbidez foi comparada com a escala padrão de 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ UFC·mL⁻¹). A técnica de *pour plate* foi utilizada para inocular os microrganismos.

Após a solidificação do ágar, foram feitos poços ($\varnothing$ 5 mm) no ágar e adicionado cerca de 20 μ L de EEB. O controle positivo foi realizado adicionando um solução de antibiótico (cloranfenicol 3% (p·v⁻¹) para a formação da zona de inibição. A incubação das placas foi realizada a 35 °C por 24 h. Mediram-se os diâmetros dos halos formados e calculou-se a zona de inibição pela diferença entre o diâmetro formado e o diâmetro dos poços.

2.3. AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA PRESENTE NO EEB

2.3.1 Atividade enzimática

A atividade enzimática da α -amilase foi realizada pelo método proposto por Fuwa (1954) com adaptações sugeridas por Paludo *et al.* (2018), a análise está descrita no Apêndice 4. A atividade enzimática foi expressa em U·mL⁻¹, onde U representa a quantidade de enzima capaz de converter 0,1 mg de amido por mL por min nas condições de reação (50 $\pm$ 2 °C/15 min).

2.3.2 Efeito da temperatura, pH e íons metálicos na atividade enzimática do EEB

Os efeitos da temperatura, pH e íons metálicos sobre a atividade enzimática do EEB foram avaliados individualmente.

O efeito da temperatura foi avaliado a 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C, conforme descrito por Paludo *et al.* (2018) e Frantz *et al.* (2019). Os ensaios enzimáticos foram realizados conforme item 2.3.1, alterando a temperatura.

O efeito do pH foi verificado em 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 (tampão acetato 0,1 M), 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 (tampão fosfato 0,1 M) (PALUDO *et al.*, 2018; FRANTZ *et al.*, 2019). A atividade enzimática foi quantificada conforme item 2.3.1, alterando o pH com diferentes tampões.

O efeito dos íons metálicos foi avaliado dissolvendo 1,0 mM, 2,5 mM e 5,0 mM dos íons sulfato de manganês (II) (MnSO₄·H₂O), sulfato de magnésio (MgSO₄), dihidrato de cloreto de cálcio (CaCl₂·2H₂O) e ferro (II) sulfato heptahidratado (Fe₂(SO₄)₄·7H₂O) em tampão acetato 0,1 M pH 6,0 (DU *et al.*, 2012; PALUDO *et al.*, 2018; FRANTZ *et al.*, 2019).

2.3.3 Estabilidade térmica enzimática de α -amilase

A estabilidade térmica enzimática do EEB foi estimada em 40, 50 e 60 °C. O EEB foi adicionada a tubos de ensaios contendo solução de amido 2% (m.v⁻¹) em uma proporção de 1:1 (enzima: substrato), enzima está diluída previamente 20 vezes em tampão acetato pH 6,0. Após, o meio reacional foi colocado em banho-maria nas temperaturas mencionadas por 3 h. Alíquotas foram retiradas e resfriadas a cada 10 min na primeira hora e depois em 2 e 3 h. A atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 2.3.1.

Este ensaio também foi realizado utilizando tampão acetato com adição de 2,5 mM de cálcio para verificar a influência deste íon na estabilidade térmica da enzima.

2.3.4 Estabilidade de armazenamento

A estabilidade de armazenamento foi avaliada pela determinação da atividade enzimática do EEB (conforme item 2.3.1) armazenado nas temperaturas de congelamento (0 ± 2 °C), refrigeração (4 ± 2 °C) e ambiente (25 ± 2 °C). Essa avaliação foi realizada ao longo de 721 dias, com a retirada de amostras em dias aleatórios.

2.3.5 Avaliação da hidrólise do amido e liberação de glicose

As alíquotas foram mantidas em banho maria a 50 °C por 180 min havendo a retirada de amostras para análise a cada 20 min. O amido (30 g·L⁻¹) foi quantificado pelo método iodo/iodeto (Fuwa, 1954; PALUDO *et al.*, 2018) e a concentração de glicose pelo método que utiliza uma oxidase/peroxidase (GOD/POD) (NGUYEN *et al.*, 2002; RAMESH, MURTY, 2014).

2.3.6 Avaliação da atividade enzimática após a liofilização do extrato enzimático bruto

O extrato enzimático bruto foi concentrado por meio do congelamento a vácuo (liofilização) em um liofilizador de bancada (Liobras, Liotop L101, Brasil) a -45 ± 2 °C com o auxílio de uma bomba de vácuo (D.V.P., RC.8D, Itália) com vazão nominal de 10,2 m³·h⁻¹ e pressão final de 1 Pa por 16 h. Após este período a enzima liofilizada foi avaliada quanto a atividade enzimática, descrita no subitem 2.3.1.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em triplicata. A análise estatística foi realizada por meio do software Statistic® 7.0 (Statsoft®, EUA). O teste de Tukey, nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), foi utilizado para comparação das médias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

3.1.1 Composição centesimal do EEB

O EEB foi caracterizado quanto à sua composição centesimal, considerando a necessidade de conhecer a amostra em todos os parâmetros possíveis para entender sua viabilidade para possível aplicação e consumo humano. O extrato apresentou teor de umidade de $97,01 \pm 0,015\%$, quantidade de cinzas de $0,14 \pm 0,02\%$, lipídios de $0,08 \pm 0,01\%$, proteína $1,13 \pm 0,13\%$ e carboidratos $1,64 \pm 0,15\%$, com os valores reportados em base úmida.

3.1.2. Toxicidade do EEB frente a *Artemia salina*

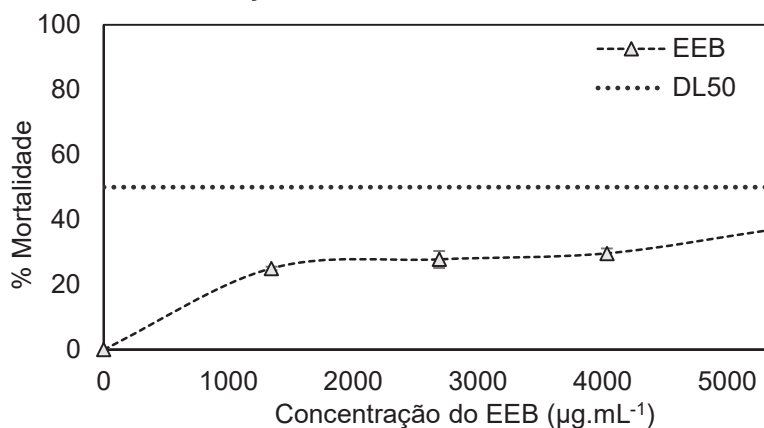
De acordo com Nguta *et al.* (2011), os extratos brutos com DL_{50} superior a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ são considerados atóxicos, valores entre $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ são levemente tóxicos, e os valores entre $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ são considerados moderadamente tóxicos. Entretanto, DL_{50} com valores menores que $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ são considerados altamente tóxicos. Como concentrações acima de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de EEB foram testadas e não atingiram DL_{50} , conforme mostrado na Figura 2, o EEB foi considerado atóxico em todas as concentrações testadas e a DL_{50} não foi calculada.

O controle positivo, com água do mar, apresentou mortalidade de 0% para *A. salina* nas condições testadas ($26 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h). O controle negativo com dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, apresentou mortalidade de 100% nas mesmas condições.

Observou-se na Figura 2 que uma concentração de EEB de $5380 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (4%) atingiu mortalidade de aproximadamente 37% dos náuplios. Por outro lado, a

mortalidade foi de 25%, 27% e 29% para as concentrações de $1345 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (1%), $2690 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (2%) e $4035 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (3%), respectivamente.

FIGURA 2 – PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DE NÁUPLIOS DE *ARTEMIA SALINA* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EEB, INCUBADOS POR 24 HORAS A 26 °C.



Fonte: A autora, (2023).

A mortalidade no presente estudo foi menos expressiva do que a apresentada pelo macromiceto *Psilocybe cubensis* no estudo de Vega-Villasante *et al.* (2013). Neste estudo a linhagem obteve mortalidade de 40% para concentrações de extrato aquoso entre 10 e $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Concentrações superiores alcançaram mortalidade de 55% e a DL_{50} foi de $135 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

O cogumelo comestível *Tylopilus violatinctus* apresentou DL_{50} de $51 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto para *Hygrophorus russula* a DL_{50} foi de $81 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e para *Cantharellus cibarius* foi de $105 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (RUIZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2017). Ruiz-González *et al.* (2017) também investigaram a toxicidade de *Hygrophoropsis aurantiaca* e *Macrolepiota mastoídea*, mas estes não apresentaram toxicidade dentre os parâmetros estipulados na metodologia. Nieto *et al.* (2008) testaram as cepas *Pleurotus pulmonarius* e *Pleurotus ostreatus*, e semelhante a este estudo, essas cepas não apresentaram toxicidade, com DL_{50} maior que $1.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

O EEB produzido pela cepa *C. comatus* pode ser considerado atóxico e pode ser consumido, considerando os parâmetros estipulados na metodologia utilizada.

3.1.3 Atividade antioxidante do EEB

A atividade antioxidante foi quantificada a partir do EEB (aquoso) produzido por *C. comatus* em cultivo submerso. Os valores encontrados representam o que é

sintetizado com a enzima α -amilase, principal produto, sem nenhum incremento ou estímulo para o aumento dessa atividade antioxidante.

A determinação de DPPH, ABTS, FRAP, CFT e FT foram estimadas e seus valores estão descritos na Tabela 1. Os métodos analisados são comumente utilizados para a determinação de antioxidantes em alimentos por serem rápidos, sensíveis, replicáveis e simples (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

TABELA 1 – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT), FLAVONÓIDES TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DPPH, ABTS E FRAP DO EEB AQUOSO.

Atividade Antioxidante	EEB <i>C. comatus</i>
DPPH ($\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$)	213,34 $\pm$ 1,60
ABTS ($\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$)	11,28 $\pm$ 0,46
FRAP ($\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$)	0,33 $\pm$ 0,04
CFT (mg EAG $\cdot$ g MS $^{-1}$)	8,01 $\pm$ 0,39
Flavonoides totais (mg EC $\cdot$ g MS $^{-1}$)	285,39 $\pm$ 3,53

Média $\pm$ desvio padrão; ET: equivalente de Trolox; EAG: equivalente de ácido gálico; EC: Equivalente a catequina; MS matéria seca;

Fonte: A autora, (2023).

A atividade antioxidante por DPPH do EEB foi de 213,34 $\pm$ 1,60 $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$, superior ao relatado por Bach *et al.* (2019). Na avaliação de 5 macromicetos comestíveis, os autores obtiveram atividades variando de 50,64 $\pm$ 0,37 $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$ para *Agaricus brasiliensis* a 13,12 $\pm$ 0,00 $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$ para *Flammulina velutipes* (BACH *et al.*, 2019). Por outro lado, o valor encontrado no método ABTS foi de 11,28 $\pm$ 0,46 $\mu\text{mol TE}\cdot\text{g g MS}^{-1}$, inferior ao obtido por Bach *et al.* (2019) para *Lentinula edodes* e *A. brasiliensis*, com atividades antioxidantes de 34,57 $\pm$ 2,77 $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$ e 128,60 $\pm$ 2,02 $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$, respectivamente.

Estudos reportados na literatura demonstram que extratos que são tipicamente à base de água têm valores de DPPH superiores a extraídos com metanol (NGUYEN *et al.*, 2014; TEŠANOVIĆ *et al.*, 2017).

No estudo de Zengin *et al.* (2016), as cepas *Trametes gibbosa* e *Trametes hirsuta*, quando extraídas com água como solvente, apresentaram atividade antioxidante por meio de DPPH de 5,86 $\pm$ 0,32 e 6,06 $\pm$ 0,15 ($\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$), respectivamente. Os extratos com metanol apresentaram as respectivas atividades de 4,09 $\pm$ 0,14 e 3,09 $\pm$ 0,01 ($\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$), valores inferiores aos obtidos para o extrato aquoso. Para a análise ABTS, as atividades antioxidantes para *Trametes gibbosa* e *Trametes hirsuta* foram 8,45 $\pm$ 0,24 e 14,15 $\pm$ 0,07 ($\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$) em água e 8,35 $\pm$ 0,12 e 9,68 $\pm$ 0,06 ($\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$) em metanol, respectivamente.

O método de transferência de elétrons de ferro, FRAP, que se baseia na produção do íon Fe^{2+} pela redução do íon Fe^{3+} que está presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) apresentou um valor de $0,33 \pm 0,04 \mu\text{mol ET} \cdot \text{g MS}^{-1}$ no extrato. Por sua vez, Zengin *et al.* (2016) os valores obtidos para FRAP foram $3,57 \pm 0,14$ e $8,96 \pm 0,05 (\mu\text{mol ET} \cdot \text{g MS}^{-1})$ em água e $5,50 \pm 0,11$ e $6,05 \pm 0,03 (\mu\text{mol ET} \cdot \text{g MS}^{-1})$ em metanol.

Ao comparar diferentes estudos reportados na literatura que avaliam o potencial antioxidante de fungos de diversas fontes, as diferenças nessas atividades estão muito relacionadas as propriedades específicas de cada cepa, além, do solvente utilizado em cada preparação do extrato (TEŠANOVIĆ *et al.*, 2017; NGUYEN *et al.*, 2014; VAZ *et al.*, 2010). Além disso, esta diferença pode estar relacionada às diferentes frações fúngicas de que o extrato pode ser extraído, como corpo de frutificação, micélio, *pellets* e extratos (TEŠANOVIĆ *et al.*, 2017).

Vale ressaltar que cada método utilizado no presente trabalho para avaliar atividade antioxidante tem um meio de ação diferente, indo desde captura de radicais livres específicos como DPPH e ABTS, a redução de um componente químico como o método FRAP, por exemplo. Isto pode explicar a diferença encontrada em cada análise realizada.

A concentração de CFT foi de $8,01 \pm 0,39 \text{ mg EAG} \cdot \text{g MS}^{-1}$, semelhante à relatada por Silva (2015) para macromicetos comerciais extraídos com metanol. *P. eryngii* obteve a maior concentração $9,19 \text{ mg EAG} \cdot \text{g MS}^{-1}$ e *C. cibarius* foi a menor com $2,58 \text{ mg EAG} \cdot \text{g MS}^{-1}$, e *P. ostreatus* obteve um valor em torno de $4 \text{ mg EAG} \cdot \text{g MS}^{-1}$. Martínez-Escobedo *et al.* (2021) estudaram 4 cepas de macromicetos e 2 tiveram quantidade de compostos fenólicos inferior $6,05$ e $1,54 \text{ mg EAG} \cdot \text{g MS}^{-1}$ e uma delas um valor semelhante ao reportado ao presente estudo, $8,75 \text{ mg EAG} \cdot \text{g MS}^{-1}$.

Em contrapartida, Reis *et al.* (2012) reportaram para *P. ostreatus* um valor de $12,54 \text{ mg EAG} \cdot \text{g MS}^{-1}$ e Orhan e Ustun (2011) para *C. cibarus* $31,48 \text{ mg EAG} \cdot \text{g extrato}^{-1}$, utilizando uma extração com etanol. Tal fato, demonstra como não apenas a cepa avaliada, mas como também a forma de extração influência na concentração dos compostos fenólicos. Comportamento também observado por Fonseca (2017), em que a utilização da mesma cepa *P. ostreatus* em meios diferentes ocasionando uma variação de 25 a 56 ($\text{mg EAG} \cdot \text{g MS}^{-1}$), e cepas diferentes inoculadas no mesmo substrato também obtiveram diferentes concentrações de compostos fenólicos, *P. lecomtei* e *F. hepatica*, 52 e 25 ($\text{mg EAG} \cdot \text{g MS}^{-1}$), respectivamente.

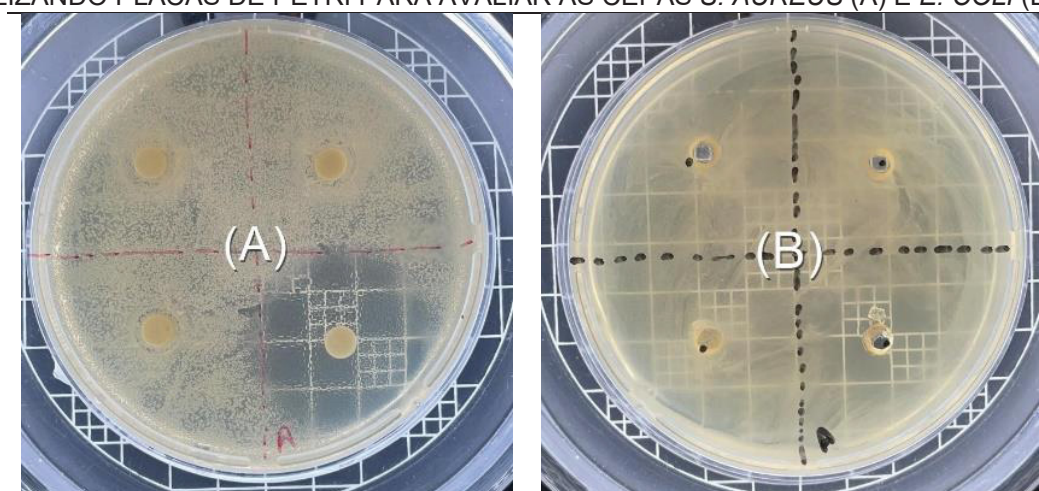
O teor de FT foi superior aos reportados por Boonthatui *et al.* (2021), que avaliou diferentes estados de maturação do cogumelo *Schizophyllum common*, com valores de 0,422 mg EC·g MS⁻¹ a 0,910 mg EC·g MS⁻¹. A diferença no teor de CFT e FT pode ter ocorrido pelo estresse oxidativo gerado nesta cepa. O aumento do estresse oxidativo ocasiona o aumento da produção de metabolitos defensivos (BOONTHATUI *et al.*, 2021). O que pode ter ocorrido no presente estudo, onde o teor de flavonoides foi de 285,39±3,53 mg EC·g MS⁻¹.

A concentração dos compostos antioxidantes presentes no EEB é interessante não apenas por apresentar concentrações semelhantes às encontradas nos macromicetos *in natura* ou em extratos extraídos destes com solvente químicos, como também por acontecer sem a necessidade de nenhum tipo de estímulo ou extração. Além disso, a presença desses compostos pode ser de extrema importância quando adicionados em alimentos, por exemplo, para a diminuição da ação dos agentes oxidantes.

3.1.4 Atividade antibacteriana do EEB

Embora alguns estudos mostrem a atividade antibacteriana dos macromicetos, o EEB avaliado no presente estudo não apresentou este comportamento quando utilizado para inibir *S. aureus* e *E. coli*, como mostrado na Figura 3.

FIGURA 3 – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA REALIZADA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM POÇOS UTILIZANDO PLACAS DE PETRI PARA AVALIAR AS CEPAS *S. AUREUS* (A) E *E. COLI* (B).



Keypour *et al.* (2008) avaliaram um extrato clorofórmico de *Ganoderma lucidum* e obtiveram resultados positivos para a atividade antibacteriana, assim como, Quereshi *et al.* (2010) que também avaliaram este cogumelo e obtiveram resultados positivos em

extratos com acetona. Sivakumar *et al.* (2006), avaliaram diversos extratos de *Osmoporus odoratus* e o extrato aquoso apresentou atividade antibacteriana. Kandasamy *et al.* (2020), em contrapartida, investigaram o potencial do macromiceto *Pleurotus sajor-caju* e obtiveram uma boa resposta inibitória contra *Salmonella typhi* multirresistente.

O EEB produzido por *C. comatus* em meio aquoso, utilizando a metodologia de infusão em poços, não apresentou atividade inibitória em relação às cepas testadas. Isto pode estar diretamente ligado à composição do meio, que possui certa porcentagem de proteínas, carboidratos e lipídios, o que pode ter resultado em maior crescimento das cepas. Assim como, a avaliação dessa atividade inibitória em apenas duas cepas pode ter limitado a detecção da ação inibitória do extrato frente a outros microorganismos, ou a concentração de compostos antibacterianos seja pequena para ocorrer a inibição do crescimento.

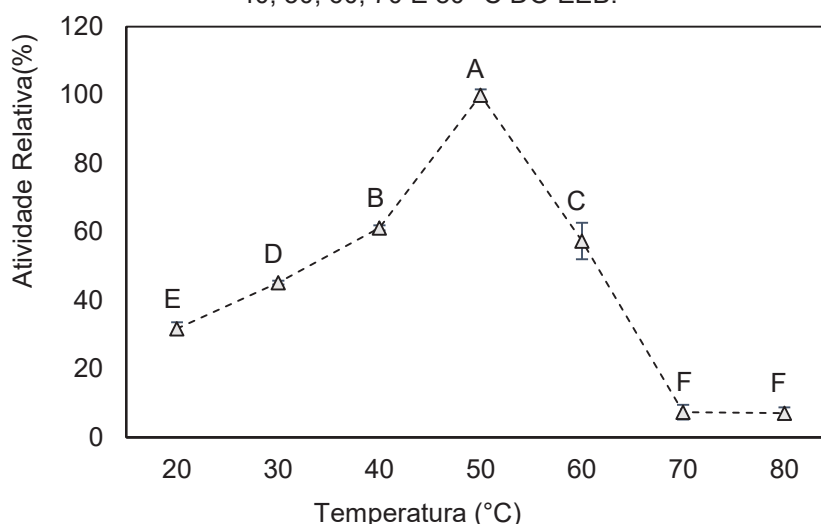
3.2 AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA PRESENTE NO EEB

3.2.1 Efeito da temperatura, pH e íons metálicos na atividade enzimática do EEB

O pH, temperatura e influência dos íons metálicos são parâmetros que influenciam a atividade enzimática, portanto, a α -amilase foi avaliada em sua forma bruta quanto a esses parâmetros.

A α -amilase teve seu pico de atividade a uma temperatura de 50 °C (Figura 4), mantendo 40% dessa atividade relativa nas temperaturas de 30, 40 e 60 °C, em contrapartida, a 20 °C a atividade foi de 31%. Entretanto, nas temperaturas de 70 e 80 °C houve a perda de 93% da atividade relativa, o que pode estar relacionado à perda da conformação da α -amilase devido ao aumento da temperatura (TAMBO *et al.*, 2018). Nas temperaturas mais altas (70 e 80 °C) não houve diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$), enquanto todas as outras diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) entre si.

FIGURA 4 – ATIVIDADE RELATIVA DA α -AMILASE COM TEMPERATURA DE REAÇÃO DE 20, 30, 40, 50, 60, 70 E 80 °C DO EEB.

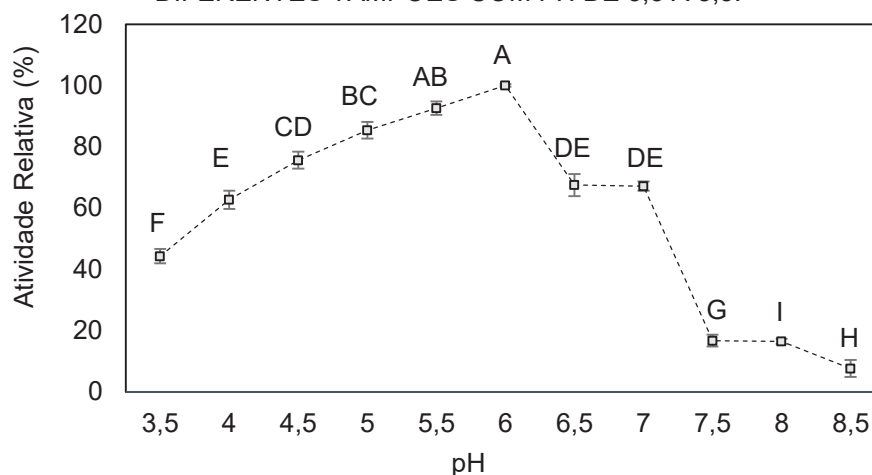


* As letras minúsculas diferentes indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) e as iguais indicam que não diferença significativa ($p < 0,05$).
 Fonte: A autora, (2023).

Frantz *et al.* (2019) também observaram uma temperatura ideal de 50 °C para esta mesma cepa. Segundo Frantz *et al.* (2019) na temperatura de 60 °C houve uma permanência da atividade relativa superior a 60 % e, a 40 °C, por sua vez, esse valor foi maior que 80%. Em contraste, embora Paludo *et al.* (2018) observaram também uma temperatura ideal de 50 °C para *C. comatus*, nas temperaturas de 30, 40 e 60 °C a atividade relativa foi de aproximadamente 40%, enquanto a 70 °C houve perda de 92% dessa atividade. Almeida *et al.* (2017) estudaram a cepa *R. oryzae* que também apresentou temperatura ótima de 50 °C. As enzimas que atuam nessa faixa de temperatura podem ser aplicadas em indústrias de panificação e cervejaria, por exemplo.

O pH ótimo (Figura 5) para α -amilase no extrato bruto foi de 6,0 com uma atividade relativa de 100%, porém, não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) do pH 5,5, pois este manteve uma atividade relativa de 92%. A faixa de pH de 4,5 a 5,0 apresentou 75% da atividade relativa quando comparado a temperatura de 50 °C, enquanto entre pH de 6,5 a 7,0 esse valor foi de aproximadamente 67%.

FIGURA 5 – ATIVIDADE RELATIVA DE α -AMILASE INOCULADA A 50 °C POR 15 MIN EM DIFERENTES TAMPÕES COM PH DE 3,5 A 8,5.



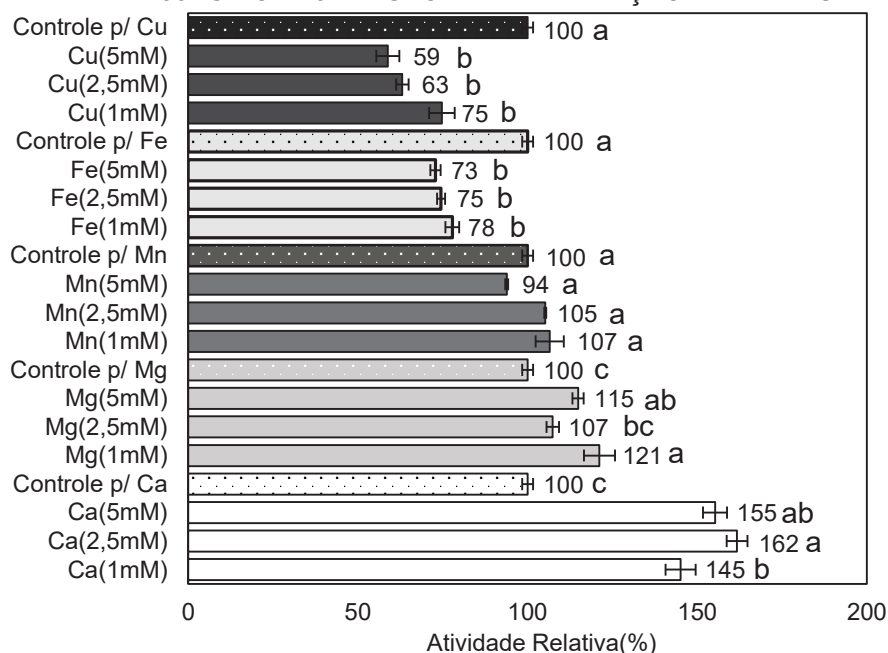
* As letras minúsculas diferentes indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) e as iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: A autora, (2023).

Por outro lado, em pH básico, a atividade relativa variou entre 16 a 5%, isto pode estar relacionado à mudança no estado de ionização que ocorre nos aminoácidos contidos na catálise (TAMBO *et al.*, 2018). A faixa de pH ácida normalmente é a ideal quando analisamos os estudos reportados na literatura quando se trata de amilases de microrganismos. *Hericium erinaceum* apresentou pH ideal de 6,0 (DU *et al.*, 2013) e para *Ganoderma lucidum* esse valor foi de 5,5 (DO; KIM, 1985), enquanto para *Ganoderma tsuage* foi de 4,5 (IRSHAD, 2012). Entretanto, para a cepa *Rhizomucor miehei* o pH ideal da enzima foi o de 5,0 (BERNARDES *et al.*, 2014) e para *R. oryzae* a α -amilase teve o pH ótimo em 6,5 (ALMEIDA *et al.*, 2017). A cepa *Coprinus comatus* quando avaliado as características de α -amilase dois valores foram relatados na literatura como pH ótimo de atuação, 6,0 (PALUDO *et al.* 2018) e 5,0 (FRANTZ *et al.*, 2019).

Em contrapartida, a influência dos íons metálicos foi mostrada na Figura 6, onde os íons foram avaliados nas concentrações de 1 mM, 2,5 mM e 5 mM. O teste de Tukey com significância de $p < 0,05$ foi realizado considerando cada íon separadamente em relação à amostra controle, definida como a amostra com 100% de atividade relativa sem adição de nenhum íon.

FIGURA 6 – ATIVIDADE RELATIVA DA α -AMILASE COM A INFLUÊNCIA DOS ÍONS METÁLICOS EM COMPARAÇÃO A AMOSTRA CONTROLE SEM ADICIONAR ÍONS METÁLICOS INOCULADOS A 50 °C POR 15 MINUTOS PARA A REAÇÃO ENZIMÁTICA.



* As letras minúsculas diferentes indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) e as iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$). A amostra controle foi utilizada como o padrão e comparada estatisticamente com as amostras nas concentrações 5, 2,5 e 1 mM, isto para cada íon metálico.

Fonte: A autora, (2023).

A atividade relativa da α -amilase aumentou na presença de cálcio, em todas as concentrações testadas, sendo 2,5 mM a de maior aumento (62%), com diferença estatística ($p < 0,05$) entre as amostras com cálcio e a controle. Corroborando estudos já relatados na literatura sobre a α -amilase ser uma metaloenzima no qual o cofator é o cálcio. O cálcio aumentou a atividade da enzima devido à capacidade deste íon interagir com aminoácidos carregados negativamente, elevando a estabilização da conformação da enzima (TAMBO *et al.*, 2018).

O aumento da atividade também foi observado com os íons de magnésio, no qual as concentrações de 1 e 5 mM tiveram influência positiva significativa na atividade enzimática. Em contrapartida, o magnésio não aumentou significativamente a atividade, como observado em outros estudos, 43% no estudo relatado por Paludo *et al.* (2018), e 36% na pesquisa de Nwagu e Okolo (2011). Mas apresentou valores semelhantes aos relatados por Frantz *et al.* (2019) de 25%.

O manganês não apresentou diferença estatística da amostra controle, enquanto o cobre e o ferro reduziram a atividade. Singh *et al.* (2014) observaram que o íon ferro inibiu em até 50% a atividade de uma amilase produzida por *Streptomyces*

sp., em contrapartida, a inibição de α -amilase produzida por *C. comatus* no presente trabalho foi de aproximadamente 25%.

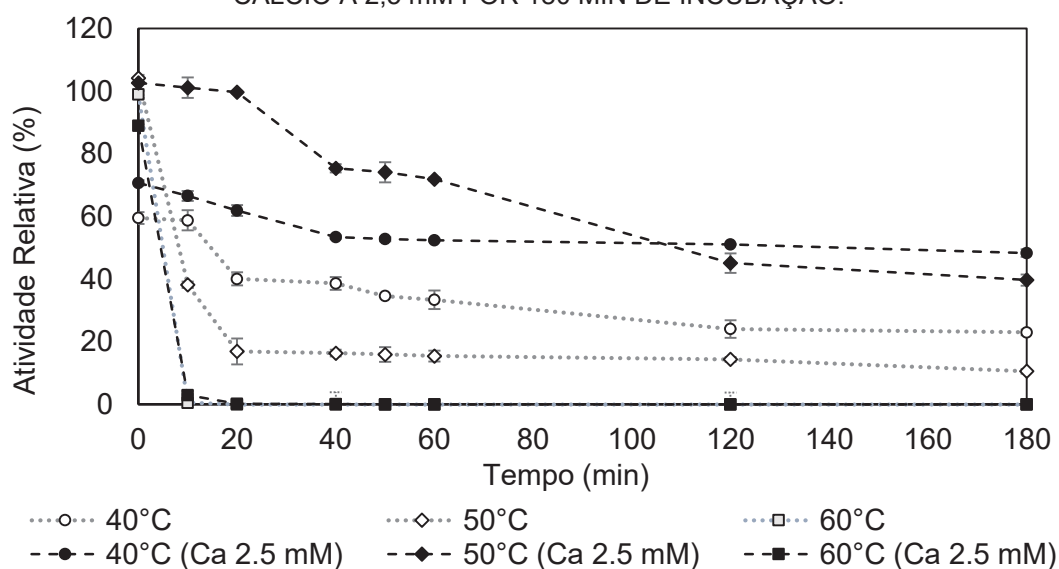
Os parâmetros ótimos de processo para a α -amilase produzida por *C. comatus* são fundamentais para a aplicação desta enzima futuramente. Pois com estes parâmetros é possível decidir a aplicação, como panificação, cervejarias, produção de xaropes, tratamento de resíduos, indústria de detergentes, entre outras.

3.2.2 Estabilidade térmica enzimática

A α -amilase presente no EEB foi incubada a 40, 50 e 60 °C por 180 minutos, apresentando um comportamento diferente para cada temperatura conforme mostrado na Figura 7.

Na temperatura de 40 °C, aproximadamente 65% da atividade foi conservada nos primeiros 40 min, 58% em 60 min, 40% da atividade em 120 min e 38% em 180 min. A 50 °C a atividade permaneceu em torno de 20% após 20 min de reação, enquanto a 60 °C não houve atividade após 10 min.

FIGURA 7 – ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA A 40, 50 E 60°C, COM E SEM ADIÇÃO DE CÁLCIO A 2,5 mM POR 180 MIN DE INCUBAÇÃO.



Fonte: A autora, (2023).

Astolpho *et al.* (2017) concluíram após testes realizados com uma α -amilase de *Bacillus licheniformis* que a termoestabilidade enzimática pode ser melhorada com a adição do íon CaCl_2 , com uma melhora de 34% na presença do íon em comparação a enzima apenas em tampão. Isto pode ser constatado com os testes realizados no

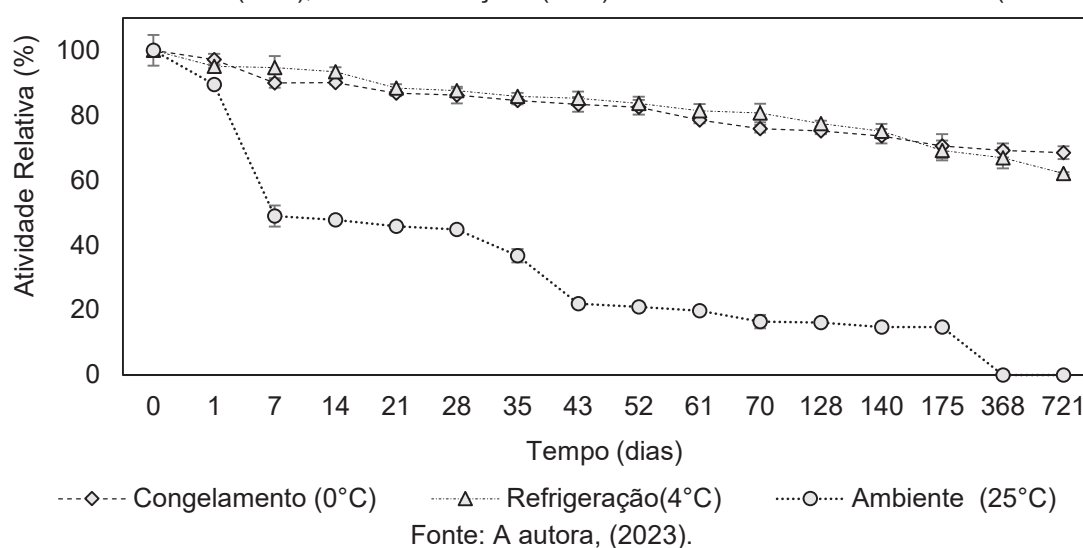
presente estudo, onde houve a adição de 2,5 mM de cloreto de cálcio, resultando em uma melhora de 30% da atividade enzimática a 40 °C e 20% a 50 °C. Por outro lado, a 60 °C, não houve melhora significativa na estabilidade térmica da enzima.

A enzima manteve uma atividade relativamente estável após 40 min de reação, a 40 e 50 °C com e sem cálcio. Isto é importante, pois demonstra que mesmo que tenha ocorrido a diminuição da atividade relativa ainda pode ocorrer a hidrólise do amido nestas temperaturas, mesmo que mais lentamente. Bem como, isto demonstra a possibilidade de utilização dessa enzima em processos relativamente longos.

3.2.3 Estabilidade de armazenamento

O EEB (Figura 8), centrifugado e filtrado para remoção de biomassa, foi avaliado ao longo de 368 dias e uma vez em 721 dias, utilizando-se apenas as temperaturas como fator de conservação da viabilidade enzimática. A determinação da atividade ao longo do armazenamento é importante, pois ajuda a entender a durabilidade e viabilidade da enzima e o potencial de comercialização.

FIGURA 8 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EXTRATO BRUTO POR 721 DIAS EM TEMPERATURA DE CONGELAMENTO (0 °C), REFRIGERAÇÃO (4 °C) E TEMPERATURA AMBIENTE (± 25 °C).



A α -amilase apresentou conservação significativa da atividade mesmo após 1 ano de armazenamento ($\cong 68\%$). Nas temperaturas de refrigeração e congelamento a enzima manteve 62% e 68% da atividade relativa, respectivamente, em 721 dias. Isto não pode ser observado quando o EEB foi armazenado em temperatura ambiente, pois, com apenas 7 dias, observou-se atividade relativa residual de apenas 48%, sendo em

torno de 15% de 61 à 175 dias. Após 368 dias houve atividade enzimática remanescente.

Uma enzima, a lipase, produzida por *Aspergillus niger*, um fungo filamentoso, manteve apenas 16% de atividade em 60 dias de armazenamento e em 150 dias não houve mais atividade remanescente, mesmo em temperatura de refrigeração (MURUCI *et al.*, 2012). Entretanto, uma fitase produzida pelo mesmo fungo filamentoso manteve uma estabilidade quando armazenada a 4 °C de 57,5% após 180 dias de armazenamento sem a adição de conservantes (SPIER *et al.* 2011). Os estudos reportados na literatura normalmente utilizam conservantes ou técnicas de imobilização para avaliar a estabilidade de armazenamento das enzimas. Entretanto, poucos estudos abordam a análise desse parâmetro utilizando a enzima sem nenhum tipo de processamento.

A enzima avaliada no presente trabalho ainda não foi explorada em outros estudos quanto ao armazenamento em diferentes temperaturas e sua atividade relativa ao longo do tempo. A permanência de 60% da atividade relativa por quase dois anos sem adição de nenhum tipo de conservante demonstra a estabilidade que a α -amilase presente no EEB possui em temperaturas de refrigeração e congelamento. Isto permite, a utilização deste extrato com maior certeza de que há a presença de atividade enzimática no EEB, a diminuição de custos com imobilização ou adição de conservantes.

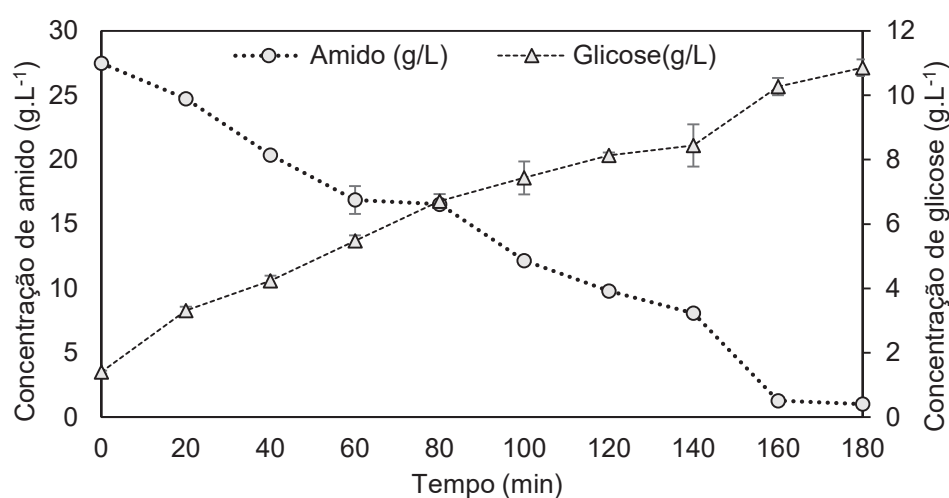
3.2.4 Avaliação da hidrólise do amido e liberação de glicose com a aplicação do EEB

O EEB foi aplicado em solução de amido a 3% ($p \cdot v^{-1}$) durante 180 min e a concentração de amido e glicose presente neste meio reacional foi quantificada ao longo do tempo (Figura 9). No período de 60 min de reação a α -amilase presente no EEB hidrolisou 38,65% do amido, em 120 min este valor era de 64,34% e ao final desse processo (180 min) houve a hidrólise de 96,31% do substrato. O amido residual ao final do processo foi de $1,01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, foi degradado neste teste aproximadamente 26,5 g de amido. Vale ressaltar que a enzima estava diluída 20 vezes para simular uma aplicação em que há a utilização da enzima no processo de forma diluída.

Sudan *et al.*, (2018) avaliaram a hidrólise do amido cru por uma α -amilase produzida pela bactéria *Geobacillus*, essa degradação variou de 40% a 61% com 2 h

de reação, dependendo da fonte de amido, com valores máximos de 91,3% de hidrólise após 4h de reação. Esses valores estão próximos aos encontrados no presente estudo, apesar de as concentrações de amido e enzimas serem diferentes. Essas diferenças na hidrólise do amido podem ser atribuídas ao tamanho dos grânulos, à proporção de amilose e amilopectina e ao comprimento da cadeia, por exemplo (Sudan *et al.* 2018). Fatores estes que variam conforme a safra, solo, tipo de grão e época do ano que foi cultivada.

FIGURE 9 – DEGRADAÇÃO DA SOLUÇÃO DE AMIDO (3% m.v⁻¹) E LIBERAÇÃO DE GLICOSE AO LONGO DE 180 MIN EM BANHO-MARIA A 50 °C.



Fonte: A autora, (2023).

Du *et al.* (2018) avaliaram a hidrólise de 1% (m.v⁻¹) de diversos amidos e observaram uma taxa de hidrólise máxima de 57,52% para o amido de milho em 16h de reação e 61,33% em 24 horas. Valores inferiores aos encontrados no presente estudo, que utilizou concentração de amido de 3% (m.v⁻¹). A α -amilase de *B. licheniformis* SO-B3 hidrolisou 38,9% de amido de milho (1% m.v⁻¹) e 41,3% (1% m.v⁻¹) de trigo em 4 h de reação, taxas também inferiores às reportadas no presente trabalho (Fincan *et al.* 2021).

A hidrólise do amido pelas amilases presentes no EEB, principalmente α -amilase, e uma pequena presença de glucoamilase (dados não publicados), liberando diversos açúcares redutores, entre eles a glicose. Após 180 min de reação, a concentração final de glicose no meio foi de 10,85 g.L⁻¹, e em 120 min esse valor era de 8,13 g.L⁻¹, e 5,47 g.L⁻¹ em 60 min. O extrato enzimático em sua forma bruta conseguiu aumentar em 7,8 vezes o nível de glicose presente no meio. Isto demonstra

seu potencial para ser utilizado em indústrias que necessitam de alta concentração de glicose, como de panificação, cervejarias, de produção de xarope. Vale ressaltar que apesar do EEB ter sido mantido com a solução de amido por 180 min a 50 °C, onde diminuiu em 89,91% a atividade relativa da enzima, como mostrado no subitem 3.2.2, conseguiu hidrolisar mais de 95% do amido.

O estudo demonstra o potencial deste extrato para a utilização na hidrólise de amido. Isto, mesmo que este não tenha passado por nenhum processo de purificação, além da centrifugação para retirada dos sólidos em suspensão.

3.2.5 Avaliação da atividade enzimática após a liofilização do extrato enzimático bruto

A enzima liofilizada apresentou uma aparência gelatinosa e a atividade enzimática foi 63 vezes maior do que a atividade no extrato enzimático bruto. A atividade foi superior a encontrada na enzima purificada liofilizada (Capítulo III) isto pode estar ligada a força iônica pela presença de diversos componentes no meio.

Apesar de o rendimento ser por volta de 2%, pela baixa concentração de sólidos presentes no meio e alta quantidade de água, para aplicações com um alto nível de exigência é viável a utilização desse processo. Vale ressaltar que o EEB liofilizado conseguiu degradar mais de 20 g·L⁻¹ em menos de 5 min (testes prévios), assim como a enzima purificada. Isto corrobora o potencial da utilização do EEB sem as etapas de purificação, pois além da presença de compostos antioxidantes, este ainda apresenta uma atividade superior à enzima purificada liofilizada. Uma avaliação de custos e comparativo com as amilases do mercado (Destaques gerais do trabalho), demonstrou que além do EEB liofilizado apresentar um menor custo para a produção em comparação as enzimas utilizadas como comparativo este apresenta uma atividade enzimática 3 vezes maior.

4 CONCLUSÃO

O extrato enzimático bruto de α -amilase produzido por *C. comatus* não apresentou toxicidade frente a *Artemia salina*, mesmo em concentrações superiores as utilizadas neste tipo de metodologia. O EEB mostrou-se uma rica fonte de antioxidantes sem a necessidade de incremento no meio, obtendo valores iguais ou superiores aos reportados na literatura para extratos extraídos do macromiceto. Os valores obtidos são

importantes, pois demonstram a possibilidade da utilização deste EEB para inibir a atividade oxidativa em alimentos.

As condições de temperatura e o pH ideais para a atividade enzimática de α -amilase produzida por *C. comatus* foram 50 °C e 6,0. Os íons cálcio e manganês estimularam a atividade enzimática da amilase em concentrações de 2,5 mM e 1 mM, respectivamente. Bem como, o íon cálcio (2,5 mM) conseguiu melhorar a estabilidade térmica da enzima em até 30%. A enzima em seu estado bruto apresentou alta estabilidade quando armazenada em temperatura de congelamento e refrigeração, mantendo atividade relativa superior a 60% após quase 2 anos de armazenamento sem a adição de conservantes.

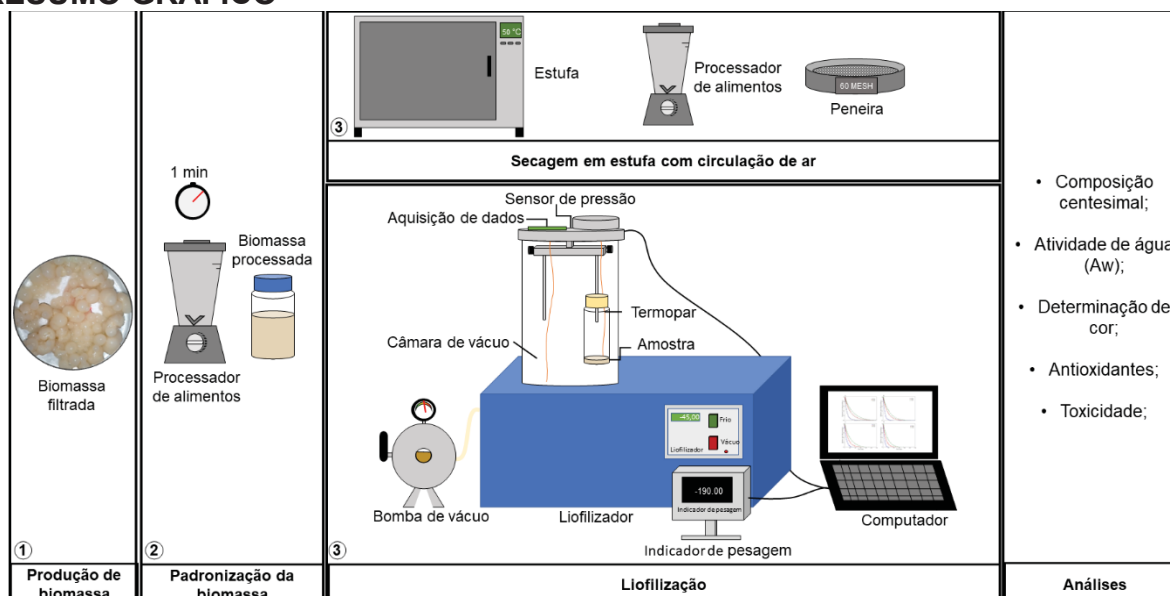
Vale ressaltar que ao aplicar esta enzima em uma solução de amido com 3% ($\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$) houve uma hidrólise superior a 95% após 180 min de reação e o aumento de 9,46 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose do valor inicial presente no meio. A enzima bruta em sua forma liofilizada aumentou mais de 63 vezes a atividade enzimática em relação a atividade inicial. Este estudo demonstra a viabilidade de aplicação desta enzima em sua forma bruta, diminuindo os custos com a purificação, além dos resíduos que seriam gerados nas etapas de *Downstream*. O processo desenvolvido no presente trabalho pode ser considerado um processo verde, pois não há a geração de resíduos considerando que a biomassa que seria o resíduo deste processo foi aproveitada para os estudos reportados no capítulo posterior. Entretanto, é necessário a realização de estudos para avaliar a aplicação desta EEB em diferentes matrizes para analisar o comportamento da mesma.

CAPÍTULO V

CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DO *COPRINUS COMATUS* E PRODUÇÃO DE FARINHA PROTEICA COMO FORMA DE REAPROVEITAMENTO DO RESÍDUO EM FORMA DE *PELLETS* DO CULTIVO SUBMERSO



RESUMO GRÁFICO



SEPARAÇÃO DA BIOMASSA (1); PADRONIZAÇÃO DA BIOMASSA (2); SECAGEM POR ESTUFA COM CIRCULAÇÃO DE AR OU EM LIOFILIZADOR (3); E CARACTERIZAÇÃO DA FARINHAS PRODUZIDAS;

RESUMO

O mercado mundial de alimentos tem crescido cada vez mais, provocando o aumento da busca por novas fontes de alimentos ricos em nutrientes para suprir essa demanda. Visando isto, buscou-se aproveitar a biomassa produzida na síntese enzimática para a produção de um pó rico em proteínas (farinha de *C. comatus*). A biomassa (BU) produzida na forma de *pellets* foi desidratada tanto por liofilização (BL), como em estufa com circulação de ar a 50 °C (BE) para avaliar a produção da farinha. Após o processamento, essas amostras foram avaliadas quanto a composição centesimal, compostos antioxidantes (DPPH, ABTS, CFT, FRAP e flavonoides), quanto a cor, atividade de água (Aw) e toxicidade. As duas farinhas produzidas apresentaram uma alta concentração de proteína, superior a 26%, com a presença de antioxidantes, principalmente flavonoides (concentração superior a 1000 mg EC·g seca⁻¹) e se mostraram atóxicas quando avaliadas pela metodologia de *Artemia salina*. Entretanto, a amostra BE apresentou menor quantidade de proteína e também uma coloração escura em decorrência da temperatura utilizada no processamento. Por isto, a amostra BL demonstrou maior potencial para a comercialização se comparada a BE. Por meio deste estudo foi possível perceber que é viável utilizar o subproduto da síntese de α -amilase para a produção de um novo produto.

Palavras-chave: pó proteico; flavonoides; atóxico; antioxidantes; farinha de cogumelo;

1. INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos tem aumentado e aumentará até 2050, pois a estimativa é de mais de 9,7 bilhões de pessoas no mundo. Para suprir essa demanda a produção agrícola necessitará de um crescimento de 70% (WORLDMETER, 2021; ONU, 2019; STOJKOVIĆ *et al.*, 2013). Por isso, torna-se necessário a busca por novas fontes de proteínas e outros nutrientes, essenciais para a saúde, de forma rápida e com menor demanda de espaço (GONZÁLEZ *et al.*, 2020; VALVERDE *et al.*, 2015). A proteína é importante para a saúde dos seres vivos, pois desempenha diversas funções no organismo, seja fazendo parte dos tecidos corporais, como hormônios e enzimas, como também sendo fonte de energia (VALVERDE *et al.*, 2015).

Os cogumelos comestíveis (macromicetos) representam uma opção viável para suprir essa demanda crescente, pois além de possuírem um teor considerável de proteínas (19 a 37%), quando desidratados, também possuem inúmeros outros benefícios (GONZÁLEZ *et al.*, 2020; VALVERDE *et al.*, 2015). Os macromicetos possuem baixo teor de calorias, quantidade satisfatória de fibras, um baixo teor de gorduras e possuem um perfil completo de aminoácidos essenciais. Além disso, apresentam propriedades medicinais e nutracêuticas, como terpenos, antioxidantes, minerais, vitaminas, também possuem conteúdo enzimático e características organoléticas que os fazem ser considerados uma iguaria (GONZÁLEZ *et al.*, 2020; KUMAR, 2019; RATHORE H. *et al.*, 2019).

A produção destes pode ser considerada rápida e com menor custo quando comparada as de origem animal, destacando-se o tempo de cultivo, o qual para o cogumelo varia de 30 a 40 dias até a colheita, enquanto para o gado de corte o tempo normalmente é entre 18 a 28 meses. O custo do kg de macromicetos é em torno de R\$ 3,84 enquanto para a produção de carne bovina esse valor gira em torno de R\$ 5,22 por kg. Além disso, para o cultivo de macromicetos é necessário um pequeno espaço para a produção em grande quantidade. Uma fazenda de 500 m² pode produzir por ano uma média de 18.000 kg. O maior custo para a produção de macromicetos é o substrato utilizado para o crescimento deste, porém diversos estudos têm sido feitos para avaliar a possibilidade da utilização de resíduos industriais (GIRO DO BOI, 2021; MARTINS DA CRUZ; GUZATTI, 2019; ARAUJO *et al.*, 2016).

O objetivo deste estudo é explorar a viabilidade da utilização da biomassa de *Coprinus comatus*, produzido em resíduo industrial, para o desenvolvimento de um suplemento rico em proteínas, em forma de pó, para o consumo humano. Isto,

possibilitará a diminuição de resíduos gerados no processo de produção enzimática, por está cepa, além de aumentar o valor agregado ao subproduto que acabaria sendo descartado. Diminuindo assim a geração de resíduos para está indústria enzimática e propondo uma alternativa promissora de uma nova fonte proteica para suprir a demanda mercadológica e aumentar a rentabilidade industrial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DA BIOMASSA DE *C. COMATUS*

A biomassa avaliada nessa pesquisa foi obtida como um subproduto da produção do EEB. A produção foi realizada em cultivo submerso utilizando como substrato um meio de cultivo composto por 48,5 g·L⁻¹ do subproduto FFM, 4,0 de ureia e 8,0 de K₂HPO₄ com o pH 6,0, previamente autoclavados (121 °C/15 min). O cultivo foi realizado por 120h, após, o extrato enzimático foi utilizado para outras etapas desse projeto e a biomassa armazenada sob congelamento por 3 meses para posterior análises.

2.2. PRODUÇÃO DO PÓ DE MACROMICETO POR ESTUFA COM CIRCULAÇÃO DE AR E POR LIOFILIZAÇÃO DA BIOMASSA ÚMIDA

2.2.1 Produção do pó de macromiceto da biomassa em forma *pellets* por estufa com circulação de ar

Os *pellets* do *C. Comatus* foram dispostos em recipientes de aço inox e armazenados em estufa com circulação de ar a 50 °C/5 h assim como descrito por Freire (2019) e Sousa (2020). A temperatura foi definida após testes prévios, e empregadas temperaturas de 40, 50 e 60 °C. A matéria-prima úmida foi previamente processada em um liquidificador industrial de aço inox e padronizados por granulometria, em peneira de 60 mesh com a abertura de 0,250 mm (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda®, Brasil). O rendimento do processo foi calculado (Equação 1) avaliando a massa final da amostra (P_f) em relação a massa inicial (P_i).

$$Rendimento (\%) = \frac{P_f \cdot 100}{P_i} \quad (1)$$

2.2.2 Produção do pó da biomassa de *C. comatus* pela técnica de liofilização

A liofilização foi realizada utilizando os *pellets* previamente congelados e posteriormente acondicionados em um sistema de liofilização por 20 h. A bomba a vácuo foi acionada com uma pressão de 0,15 mmHg durante todo o processo. Em seguida, estes foram triturados em liquidificador de inox e peneirados em peneira de 60 mesh com abertura de 0,250 mm (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda®, Brasil) para a padronização da granulometria. O rendimento foi avaliado como a equação presente no mesmo subitem 2.2.1

2.3. CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA E DO PÓ DE *C. COMATUS*.

A biomassa úmida (BU), a biomassa liofilizada (BL) e a biomassa seca em estufa de circulação (BE) foram avaliadas quanto a composição centesimal, atividade de água (aw), cor, atividade antioxidante, CFT, FT e toxicidade.

2.3.1 Composição centesimal

A biomassa, assim como, o pó de macromiceto liofilizado ou seco em estufa foram submetidas à análise da composição centesimal (proteínas, lipídios, cinzas, fibras e carboidratos) segundo os métodos propostos por a Association of Official Analytical Chemists (AOAC 1998) e do Instituto Adolfo Lutz (2008), descrito no apêndice 15. O método para determinação da concentração de proteína utilizou o fator de conversão de 4,38 de nitrogênio para proteína (MILES, CHANG, 1997).

2.3.2 Atividade de água (Aw)

A atividade de água foi determinada pelo método proposto pelo Instituto Adolfo Lutz (1985) utilizando um analisador de atividade de água (modelo, Aqualab, Pullman, EUA) a 25 °C.

2.3.3 Determinação da cor

A determinação da cor foi realizada em colorímetro MiniScan (Hunter Lab, XE plus, USA) com luminante D65 e o ângulo com 10° de inclinação. A cor foi determinada pela escala do sistema CIEL (Commission internationale de l'éclairage), utilizando as coordenadas de cromaticidade $L^*a^*b^*$ L^* (luminosidade - capacidade de refletir a luz), com valores entre 0 (preto) a 100 (branco); a^* (coordenada vermelho/verde), variando

de -a* (verde) até +a* (vermelho), e b* (coordenada azul/amarelo), variação entre o -b* (azul) até +b* (amarelo).

2.3.4 Atividade antioxidante, FT e CFT da farinha de cogumelo

As amostras foram submetidas à análise de atividade antioxidante, compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides totais. O teor de flavonoides total foi determinado pelo método de Arriola *et al.* (2014) utilizando como padrão da curva de calibração a catequina, por sua vez, CFT foi baseado em Singleton e Rossi (1965) e utilizou ácido gálico. Os dados foram expressões em mg EC·g MS⁻¹ e mg EAG·g MS⁻¹, respectivamente. A determinação da atividade antioxidante pelo método redução de ferro (FRAP) foi realizado como proposto por Benzie e Strain (1996), utilizando uma curva padrão com trolox e expressa em $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$. Os métodos que capturam de radicais ABTS e DPPH, foram baseados em Re *et al.* (1999) e Brand-Williams *et al.* (1995), respectivamente, ambas utilizando curvas padrões com trolox e expressas em $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$. As análises detalhadas foram descritas no Capítulo IV e as curvas padrões estão no apêndice 9, 11 e 13.

2.3.5 Toxicidade frente a *Artemia salina* por amostras de *C. comatus*

A toxicidade de BU, BL e BE foi avaliada como descrito por Bellatto e Braguini (2020), com modificações como descrito no Capítulo IV. O método para a avaliação da toxicidade aguda por *Artemia salina* foi realizada conforme Meyer *et al.* (1982).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística foi realizada utilizando o software Statistic® 7.0 (Statsoft®, EUA) para a análise das triplicatas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS AMOSTRAS

O valor nutricional dos macromicetos varia conforme a espécie, substrato, cepa e condições de cultivo utilizados (BACH *et al.*, 2017; GONZÁLEZ *et al.*, 2021;

VALVERDE *et al.*, 2015). A Tabela 1 mostra a composição centesimal da biomassa de *C. comatus*, úmida (BU), liofilizada (BL) e seca em estufa a 50 °C (BE). O rendimento para os dois processos de secagem foi semelhante, sendo de 18,81% para a liofilização e 19,2% para a secagem em estufa. O rendimento do processo, apesar de ser abaixo de 20%, é viável, pois a proteína em pó dos macromicetos tem um alto valor comercial e o baixo custo de produção, considerando que esta biomassa seria descartada. Além disso, a produção dos *pellets* é rápida (5 dias) se comparado ao tempo necessário para a formação do corpo de frutificação (60 dias). A utilização de *pellets* como matéria-prima para a produção do pó de macromiceto reduz o custo necessário para a produção se comparado aos utilizados no mercado. Estudos realizados por Nunes (2022) mostraram que em escala industrial, utilizando o corpo de frutificação o rendimento é em média de 12%, entretanto, para Sousa (2020) utilizando shimeji foi de 10,6%, valores estes inferiores ao encontrado utilizando a biomassa em forma de *pellets*.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA BIOMASSA DE *COPRINUS COMATUS* NAS AMOSTRAS BU, BL E BE.

Amostra	Composição centesimal (%)					
	Proteína	Lipídeos	Umidade	Cinzas	Carboidratos	Fibras
BU	1,91±0,18	1,05±0,27	94,01±0,01	0,01±0,00	1,46±0,01	1,72±0,125
BL	31,23±0,56	11,72±0,12	11,46±0,11	0,59±0,02	21,00±0,74	23,99±0,89
BE	26,35±0,25	12,79±0,42	12,84±0,01	0,33±0,00	11,86±0,57	35,89±1,04

BU – biomassa úmida; BL – biomassa liofilizada; BE – biomassa seca em estufa; Dados reportados na base úmida.

A amostra BL que passou por um processo de secagem por liofilização apresentou uma concentração de proteína em base úmida superior as demais, 29,32% superior a BU e 4,88% a BE. O valor superior a BU pode estar relacionado a retirada de água, aumentando concentração dos compostos. Em contrapartida, a diferença em relação a BE pode estar relacionada a degradação da proteína a 50 °C.

O teor de proteína para macromiceto (champignon) foi de aproximadamente 37,59±0,32%, Shiitake de 20,48±0,24 e shimeji de 33,73±0,70% (FURLANI; GODOY, 2007), valores estes próximos aos encontrados no presente trabalho. Segundo Sousa (2020) o teor de proteína de farinha de shimeji foi de aproximadamente 26%, bem como, no estudo apresentado por Tolera e Abera (2017), em que na secagem em estufa (60 °C) houve a presença de 25% de proteína na amostra final. Estes valores são próximos aos encontrados na amostra BE, seca em estufa com circulação de ar a 50 °C. Entretanto, a amostra seca por liofilização apresentou um teor de 31% de proteína. Isto pode estar ligado diretamente a temperatura de processamento desta biomassa.

Vale ressaltar que a média de proteína na carne bovina está em torno de 26%, demonstrando o potencial da utilização deste macromiceto como fonte proteica alternativa.

As proteínas nos macromicetos podem suprir a quantidade de micronutrientes necessários na dieta de um ser humano adulto, como apresentado Patil *et al.* (2010), quando estudaram a cepa *Pleurotus ostreatus*. A cepa possui uma concentração em torno de 25% de proteína e destes 40% é formado por aminoácidos essenciais, quantidade que supre esta necessidade (CARRASCO-GONZÁLEZ, SERNA-SALDÍVAR, GUTIÉRREZ-URIBE, 2017; XU *et al.*, 2011).

A amostra BL também apresentou uma secagem mais eficiente que BE, com 1,38% menos de umidade. Em contrapartida, a amostra BU apresentou um valor de umidade próximo ao apresentado na literatura para macromicetos com a concentração de água em torno de 90% (MOTTA *et al.*, 2021; VALVERDE *et al.*, 2015). A umidade considerando que BU foi cultivado em um meio submerso e em forma de *pellets* pode ser justificada por estes fatos.

Segundo a Legislação Brasileira vigente para farinhas vegetais, estabelecido pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos – CNNP, o valor máximo para o teor de água é de 15%, valor este superior aos encontrados no presente estudo para BL e BE. Por sua vez, para o Codex Alimentarius (1981), valores em torno de 13% são ideais para macromicetos desidratados por dificultar a propagação de bactérias deteriorantes (JUAN *et al.*, 2013; SOUSA, 2020).

A concentração de lipídeos nas amostras secas foi entorno de 12%, valores estes superiores aos reportados na literatura por Pauli (2010) para *Oudemansiella canarii* e inferiores aos valores reportados por Ruegger *et al.* (2001) de 16%. Normalmente a fração lipídica é menos representativa nos macromicetos, por isto, estes são considerados alimentos não calóricos, mas, para a cepa *C. comatus* estes valores foram superiores. Isto, pode estar relacionado a cepa estudada, ao tipo de substrato utilizado, bem como a forma da biomassa, no caso do presente trabalho na forma de *pellets*. Na fração lipídica pode ser encontrado alguns ácidos graxos essenciais, como o ácido araquidônico, ácido linolênico (ω -6), linoleico (ω -6), e o ácido oleico (ω -9), isto torna interessante que haja uma porcentagem significativa deste composto (DEEPALAKSHMI; MIRULANI, 2014; KALAC, 2013).

Os valores de fibras variaram muito de cepa para cepa, assim como o observado por Pauli (2010), que variaram de 20% para o Champignon de Paris até 46%

para *Pleurotus salmon*. No presente estudo os valores foram de 1,72% para BU, até 35,89% para BE, sendo que BU difere tanto das outras duas amostras por ser uma biomassa úmida que possui um alto nível de umidade, diminuindo a percentagem dos outros componentes. Furlani e Godoy (2007) observaram valores para champignon de Paris (20,44%) semelhantes a BL (23,99%), enquanto Bonatti *et al.* (2004) observaram um valor de 16% para *P. salmon*. Em contrapartida, para a amostra BE (35,89%) a quantidade de fibra foi próxima ao do Shimeji (39,62%) apresentado por Furlani e Godoy (2007) e Shiitake (41%) e Shimajei (41%) apresentados por Pauli (2010). A concentração de carboidratos foi 21% para BL enquanto para BE este valor foi para 11,86%, esta diferença pode estar relacionada a degradação que ocorre em decorrência da alta temperatura no processo de secagem. Os valores observados estão semelhantes aos encontrados para *P. salmon* por Pauli (2010).

3.2 ATIVIDADE DE ÁGUA (AW)

A Aw é empregada para o controle de qualidade de alimentos, pois estabelece quanto de água livre há no alimento, disponível para reações químicas, físicas e biológicas. As amostras BL e BE apresentaram Aw de 0,383 e 0,539 respectivamente, sendo que apenas a amostra úmida (BU; 0,997) obteve uma Aw próxima a 1,0, considerada a Aw da água.

As três farinhas de *C. comatus* apresentaram diferença estatística entre si ($p \leq 0,05$) quando avaliado Aw, sendo BL a com menor atividade de água. As amostras (BL e BE) apresentaram valores inferiores ao limite estabelecido como seguro para evitar a multiplicação de microrganismos ($<0,60$) (CHISTÉ *et al.*, 2006). Considerando este parâmetro podemos sugerir que tanto BL quanto BE são estáveis microbiologicamente e podem apresentar menor grau de deterioração pela quantidade de água livre disponível.

3.3. COR DAS AMOSTRAS

A avaliação da cor para as amostras BU, BL e BE, Tabela 2, não tiveram diferença estatística em a^* para BU e BL, enquanto BE teve diferença a $p \leq 0,05$. O parâmetro b^* em contrapartida as amostras BU e BE não obtiveram diferença significativa enquanto BL apresentou. Em contrapartida, para o parâmetro L^* , todas as amostras apresentaram diferença a um nível de significância de $p \leq 0,05$.

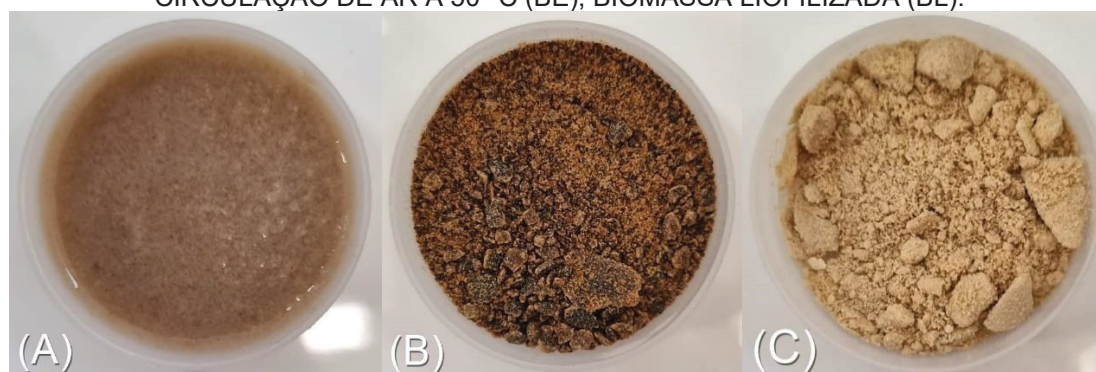
TABELA 2 – VALORES DOS PARÂMETROS DE COR ENCONTRADOS PARA AS AMOSTRAS BU, BL E BE.

Amostras	a*	b*	L*
BU	4,01 ^a	15,91 ^a	45,71 ^b
BL	4,31 ^a	19,43 ^b	59,13 ^a
BE	5,91 ^b	16,52 ^a	31,67 ^c

A estatística pelo teste de Tukey foi realizado comparando as colunas, com o mesmo parâmetro para diferentes amostras.

Fonte: A autora, (2023).

As coordenadas a* indicam se a amostra tende ao verde -a* ou ao vermelho +a*, as coordenadas b* indicam azul (-b*) e amarelo (+b*), enquanto as coordenadas L* representam a capacidade de refletir a luz, variando de preto (0) a branco (100). As imagens na figura 1 demonstram como ficaram as amostras após os processos realizado.

FIGURA 1- BIOMASSA ÚMIDA (BU, *PELLETS* TRITURADOS); BIOMASSA SECA EM ESTUFA COM CIRCULAÇÃO DE AR A 50 °C (BE); BIOMASSA LIOFILIZADA (BL).

Fonte: A autora, (2023).

Observa-se que as amostras BU e BL tenderam ao verde enquanto a BE ao vermelho, entretanto, a amostra BL tendeu mais ao amarelo que as demais amostras. A amostra BL foi a que mais apresentou capacidade para refletir a luz, sendo BU intermediária e BE mais próxima a cor preta, característica essa que pode ser percebida pela figura acima. Um importante atributo de qualidade para farinhas é a tendência à coloração amarela (ORO *et al.*, 2013). A BL foi a amostra que apresentou maior tendência a coloração amarela, possivelmente sendo a que será mais atrativa comercialmente.

A diferença de cor, principalmente na amostra BE pode estar relacionada as alterações que ocorrem durante a secagem utilizando altas temperaturas podem ser determinadas por meio das reações não enzimáticas e enzimáticas que ocorrem entre proteínas e carboidratos, formando compostos de cor marrom. Os macromicetos desidratados podem apresentar um escurecimento decorrente das altas temperaturas

de secagem. Isto ocorre devido os efeitos negativos que exercem nos pigmentos desta espécie adquirido por eles após exposição às altas temperaturas (IZLI; ISIK, 2014; KOTWALIWALE et al, 2007).

3.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, FT E CFT

Os extratos apresentaram compostos antioxidantes como demonstrado na Tabela 3.

TABELA 3 – COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT), FLAVONÓIDES TOTAIS DO EEB E SUA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE MEDIDA POR DPPH, ABTS E FRAP.

Atividade Antioxidante	BU	BL	BE
DPPH ($\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$)	63,51 $\pm$ 5,38	18,69 $\pm$ 0,27	33,39 $\pm$ 0,40
ABTS ($\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$)	250,19 $\pm$ 7,89	53,35 $\pm$ 1,08	22,43 $\pm$ 1,09
FRAP ($\mu\text{mol ET}\cdot\text{g MS}^{-1}$)	0,0	0,258 $\pm$ 0,008	0,624 $\pm$ 0,003
CFT (mg EAG·g MS ⁻¹)	141,19 $\pm$ 11,00	3,95 $\pm$ 0,15	9,82 $\pm$ 0,74
FT (mg EC·g MS ⁻¹)	4524,19 $\pm$ 15,00	2239,46 $\pm$ 95,23	1161,00 $\pm$ 82,69

Média $\pm$ desvio padrão; ET: equivalente de Trolox; EAG: equivalente de ácido gálico; EC: Equivalente a catequina; EEB: Extrato enzimático bruto; BU – Biomassa úmida; BL – Biomassa liofilizada; BE – biomassa seca em estufa.

Fonte: A autora, (2023).

A amostra BU apresentou valores superiores em DPPH, ABTS, CFT e FT, isto pode estar ligado ao fato dessa amostra não ter passado por nenhum tipo de processo térmico. Entre as amostras na forma de farinhas BL e BE, a primeira apresentou valores superiores para ABTS e flavonoides quando comparada a BE. Por sua vez, BE apresentou valores maiores de DPPH, FRAP e CFT. Esta diferença pode estar diretamente relacionada ao tipo de secagem.

A concentração de CFT foi inferior nas amostras secas se comparadas a biomassa úmida, os valores das biomassas secas foram semelhantes aos reportados na literatura por Silva (2015) quando analisaram *P. eryngii* (9,19 mg EAG·g MS⁻¹) e *C. cibarius* (2,58 mg EAG·g MS⁻¹). Entretanto, a pesquisa realizada por Martínez-Escobedo *et al.* (2021) também apresentou as concentrações na faixa dos encontrados nas biomassas secas, indo de 1,54 mg EAG·g MS⁻¹ até 8,75 mg EAG·g MS⁻¹. Em contrapartida, a biomassa úmida apresentou um teor de composto fenólicos muito superior se comparada as amostras secas (BL e BE), isto demonstra que a biomassa *in natura* contém 14 vezes a concentração de CFT e que no processo de secagem pode haver a perda desses compostos.

Segundo Sharpe *et al.* (2021) a concentração de compostos fenólicos totais variou de 48,3 $\pm$ 3,9 $\mu\text{mol GAE}\cdot\text{mg}^{-1}$ (*Inonolus obliquus*), 14,4 $\pm$ 1,5 $\mu\text{mol GAE}\cdot\text{mg}^{-1}$

(*Grifola frondosa*), $8,0 \pm 1,2 \text{ } \mu\text{mol GAE} \cdot \text{mg}^{-1}$ (*Ganoderma lucidum*), $5,3 \pm 1,2 \text{ } \mu\text{mol GAE} \cdot \text{mg}^{-1}$ (*Lentinula edodes*), $5,3 \pm 1,0 \text{ } \mu\text{mol GAE} \cdot \text{mg}^{-1}$ (*Hericium erinaceus*) e $4,8 \pm 0,9 \text{ } \mu\text{mol GAE} \cdot \text{mg}^{-1}$ (*Trametes versicolor*). Estes valores são de extratos processados dos corpos de frutificação, os quais, foram inferiores aos apresentados pela biomassa processada do *C. comatus*, que foi 2,92 vezes maior do que os resultados obtidos para *Inonolus obliquus*. Os valores obtidos para a biomassa seca estiveram entre os valores observados nas outras cepas estudadas.

O *C. comatus* apresentou maior concentração de DPPH que em estudos com as cepas *Trametes gibbosa* e *Trametes hirsuta*, por exemplo, mesmo que no estudo realizado por Zengin *et al.* (2016) a extração tenha sido realizada tanto por água quanto por metanol. Os dados observados também estão na faixa dos apresentados por Bach *et al.* (2019), que variou de $50,64 \text{ } \mu\text{mol ET} \cdot \text{g MS}^{-1}$ (*Agaricus brasiliensis*) a $13,12 \text{ } \mu\text{mol ET} \cdot \text{g MS}^{-1}$ (*Flammulina velutipes*).

Entretanto, os valores no presente estudo foram inferiores aos apresentados no EEB (Capítulo IV) em que a extração ocorreu utilizando água. Isto, pode demonstrar que a extração deste tipo de composto em água é melhor quando avaliamos a cepa *C. comatus*, que em metanol. Este tipo de comportamento também já foi reportado na literatura, em que extratos a base de água apresentam valores maiores de DPPH dos que os extraídos em metanol (NGUYEN *et al.*, 2014; TEŠANOVIĆ *et al.*, 2017).

A análise de ABTS apresentou valores superiores aos encontrados por Zengin *et al.* (2016) tanto nos extratos com água como os com metanol para a espécie *Trametes*, como também aos encontrados no extrato aquoso do EEB, Capítulo IV. Isto pode estar ligado ao fato de a cepa estudada liberar mais deste composto com a extração por metanol. Diversos estudos reportados na literatura que avaliaram o potencial antioxidante dos fungos perceberam que esta diferença pode estar ligada as propriedades específicas de cada cepa e a preparação do extrato (TEŠANOVIĆ *et al.*, 2017; NGUYEN *et al.*, 2014; VAZ *et al.*, 2010).

Os valores obtidos no presente estudo para FRAP foram semelhantes aos encontrados para o EEB no capítulo IV, principalmente quando comparados a BL. Valores estes que foram de 0,25 (BL) a 0,63 (BE) $\mu\text{mol ET} \cdot \text{g MS}^{-1}$. Apesar de as amostras terem sido extraídas com solventes diferentes, podemos perceber que estas apresentam uma baixa capacidade de transformar Fe^3 em Fe^2 , este comportamento pode estar relacionado ao fato de todo o processo do cultivo ter sido realizado em um meio de cultivo que não apresenta ou apresenta pouca concentração de ferro, não

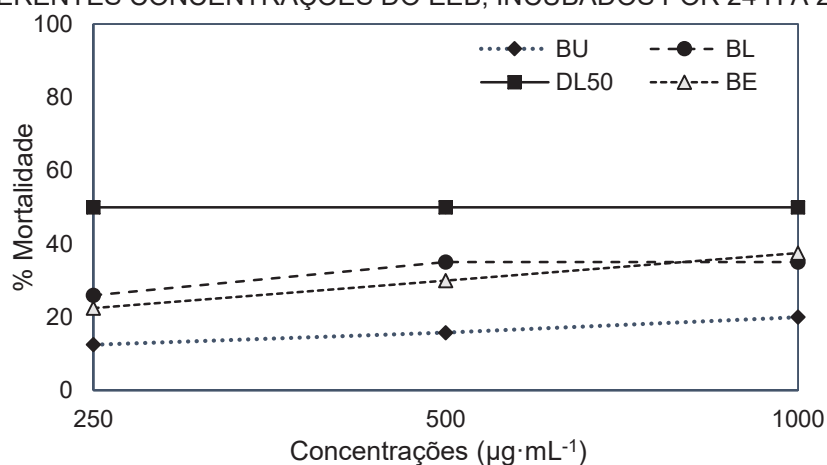
havendo a necessidade da produção deste tipo de antioxidante pela cepa. Principalmente se considerarmos que este macromiceto é conhecido pelo seu poder de biorremediação do solo contra metais pesados. Este comportamento também foi observado por Sousa (2020), quando avaliaram as farinhas de shimeji. Entretanto, os valores de FRAP mostraram-se bem inferiores do que a maioria dos avaliados por Sharpe *et al.* (2021), semelhantes apenas a *Trametes versicolor* com valores de $0,2 \pm 4,8 \mu\text{mol ET} \cdot \text{g seca}^{-1}$.

O teor de flavonoides foi 4 vezes maior ao encontrado no extrato bruto, principalmente na biomassa úmida (16 vezes), isto, pode estar ligado ao fato desta cepa ser muito conhecida pelas suas propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas entre outras características (NOWAKOWSHKI *et al.*, 2020). Também pode estar ligado ao estresse gerado nesta cepa pelos processos utilizados que podem ter acarretado estresse oxidativo, o que ocasionou a produção de metabolitos defensivos em maior escala (BOONTHATUI *et al.*, 2021).

3.5 TOXICIDADE POR ARTEMIA SALINA

As amostras não apresentaram toxicidade nas concentrações de 250, 500 e 1.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ testadas, Figura 2. Segundo Nguta *et al.* (2011) quando em valores de concentração superiores a 1.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ não há a mortalidade de 50% dos náuplios podemos considerar a amostra atóxica.

FIGURA 2 – PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DE NÁUPLIOS DE *ARTEMIA SALINA* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EEB, INCUBADOS POR 24 H A 26 °C.



Fonte: A autora, (2023).

Isto demonstra não apenas que as amostras podem ser consideradas atóxicas quando avaliadas pelo método da *Artemia salina*, mas que apesar de as amostras terem sido congeladas, não houve a formação de compostos tóxicos pelo processo de autodigestão (autólise) que ocorre na biomassa do *C. comatus* velha (NOWAKOWSKI *et al.*, 2020). O controle positivo apresentou uma mortalidade de 0%, não havendo a morte de nenhum náuplio, em contrapartida, o controle negativo apresentou uma mortalidade de 100%.

Ruiz-González *et al.* (2017) também observaram o mesmo comportamento atóxico para as cepas *Hygrophoropsis aurantiaca* e *Macrolepiota mastoídea* nos parâmetros estipulados pela metodologia. Assim como, Nieto *et al.* (2008) quando avaliaram as cepas *Pleurotus pulmonarius* e *Pleurotus ostreatus*.

O fato da biomassa do *C. comatus* não apresentar toxicidade torna possível a utilização destes subprodutos para a produção de produtos para o consumo humano, desde que haja maiores estudos para esta finalidade.

4 CONCLUSÃO

Por meio deste estudo foi possível determinar o potencial da cepa *C. comatus* na produção de diversos produtos, considerando que a biomassa utilizada para a produção da farinha foram os *pellets* produzidos na síntese enzimática. Os produtos gerados por liofilização e por meio da secagem em estufa se mostraram ricos em proteína, com valores superiores a 25%. Além de apresentarem alta concentração de flavonoides, bem como, concentrações muito parecidas com outros estudos reportados na literatura para outros antioxidantes. As amostras (BU, BL e BE) também não apresentaram toxicidade frente ao teste com *Artemia salina*, o que ressalta ainda mais o seu potencial para a produção de um novo produto a partir desse subproduto da síntese enzimática.

Vale ressaltar que o rendimento dos processos foi entre 19,29% (BE) e 18,81% (BL), valores superiores a estudos reportados na literatura. A amostra que apresentou maior potencial para a comercialização foi a BL, pois mostrou maior concentração de proteína, menor atividade de água, cor mais desejável comercialmente e maior concentração de FT. Uma média para o custo de produção em escala piloto desta amostra seria de aproximadamente R\$ 29,52 a cada 100 g produzida. Atualmente 100 g de farinha de cogumelo ou pó de cogumelo custa em torno de R\$ 161, uma

valorização de mais de 445% do preço de custo. Isto, demonstra o potencial que este subproduto tem para se tornar um produto com alto valor agregado. Entretanto, pesquisas ainda são necessárias para avaliar a viabilidade, rendimento e segurança deste produto para consumo humano e animal.

DESTAQUES GERAIS DO TRABALHO

- O processo em batelada com maior potencial foi o B2, pois utilizou 53,8% menos do subproduto FFM que B1, com uma atividade enzimática apenas 5% menor. A cada produção em batelada, apenas com a fonte de amido serão economizados aproximadamente R\$ 67, para o processo B2. Além disso, é possível interromper o processo 24 h antes do pico de produção enzimática, pois a diferença é $< 9\%$ e a economia com os custos operacionais justificaria este interrompimento.
- A FFM custa em média R\$ 2 o kg. Um kg de FFM pode produzir até 20,62 L de EEB, com uma atividade enzimática aproximada de $104.136,02 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$. O subproduto tem um peso no preço final do EEB de R\$ 0,09 a cada L, enquanto, em um meio sintético com a mesma proporção de amido P.A. este valor seria de R\$ 0,103 por L. Vale ressaltar que a atividade enzimática no meio sintético seria aproximadamente de $46.200 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$. Além da melhoria na atividade enzimática, a utilização do subproduto economizará R\$ 60 a cada 10 mil L de EEB produzido em comparação ao amido P.A.
- Com os estudos realizados no capítulo II foi possível prever o crescimento da biomassa e a produção enzimática pelo modelo matemático de Gompertz modificado e o consumo de substrato pelo modelo Logístico modificado. Além disso, estes estudos conseguiram aumentar em 34,35% a produção de α -amilase proposta por Frantz et al. (2019) utilizando uma menor concentração de FFM (53,8%).
- A purificação da α -amilase proveniente de *C. comatus*, apresentou um fator de concentração aproximadamente 15 vezes utilizando a técnica de precipitação (*salting-out*) com dessalinização com a membrana UF (10 kDa), bem como, utilizando o sistema de separação por membrana em escala laboratorial. Entretanto, esta enzima mostrou-se sensível à formação de espuma, não apresentando um bom rendimento quando utilizado um sistema piloto adaptado para testes em maior escala, a concentração foi de 2,25 vezes e perda de 96,19%.

- A enzima α -amilase purificada apresentou maior atividade enzimática nos ensaios com a temperatura de 50 °C e pH 5,0. A mesma enzima apresentou melhora de 47% na estabilidade térmica após a adição de cálcio (2,5 mM). Em contrapartida, a presença de íons metálicos não aumentou significativamente (*Tukey* $p < 0,05$) a atividade enzimática. A enzima purificada degradou 99,76% do amido em uma concentração de 30 g·L⁻¹ em 3h de inoculação. Isto, mesmo estando diluída 100 vezes e incubada a 50 °C, temperatura na qual a estabilidade térmica não é tão alta.
- A enzima purificada liofilizada teve uma atividade enzimática 18,88 vezes maior se comparado a encontrada na sua forma líquida, com uma perda aproximada de 5%. A massa molecular da α -amilase no gel de eletroforese (SDS-PAGE) foi de aproximadamente 67 kDa. Neste mesmo gel apareceu outra banda em 35 kDa que é provavelmente da enzima glucoamilase, pois esta apresentou atividade enzimática em testes prévios realizados (3 U·mL⁻¹).
- O EEB produzido por *C. comatus* é atóxico. O EEB também é uma fonte rica em compostos antioxidantes, como flavonoides (285,39±3,53 mg EC·g MS⁻¹) e compostos fenólicos totais (8,01±0,39 mg EAG·g MS⁻¹), também apresenta atividade antioxidante pelo método de DPPH (213,34±1,60 μ mol ET·g MS⁻¹), por exemplo.
- O EEB apresenta uma ótima atividade enzimática para α -amilase a 50 °C e pH 6,0, além de melhorar 30% da estabilidade térmica na presença de cálcio (2,5 mM). O EEB diluído 20 vezes hidrolisou (96%) uma solução de amido (30 g·L⁻¹) em 3 h de inoculação a 50 °C. A α -amilase apresentou uma estabilidade de armazenamento alta, mantendo mais de 60% da atividade relativa mesmo após 721 dias de armazenamento em 0 e 4 °C, sem a adição de conservantes. O EEB liofilizado concentrou a atividade enzimática da enzima mais de 63 vezes e conseguiu hidrolisar mais de 20 g·L⁻¹ de amido, mesmo diluída, em menos de 5 min.

- Todas as características do EEB, bem como, a falta da necessidade de utilização de etapas de purificação demonstram a viabilidade da utilização deste EEB. Isto, pois além de não apresentar toxicidade, apresenta bioativos com importante atividade antioxidante, alta estabilidade de armazenamento e também a possibilidade de alta concentração enzimática quando liofilizado. Além de que mesmo que não passe pelo processo de liofilização, este consegue hidrolisar o amido com uma eficiência tão alta quanto a enzima purificada.
- A biomassa em forma de *pellets* produzida no cultivo para a síntese enzimática mostrou-se uma fonte alternativa para a fabricação de um produto com alto valor agregado, a farinha de macromicetos. Isto, pode agregar ainda mais valor a todo o sistema produtivo, bem como, diminuir a geração de resíduos. Além das farinhas produzidas não apresentarem toxicidade, estas quando desidratadas, também apresentam um percentual de proteína superior à encontrada em produtos cárneos. A concentração de proteína nessas farinhas foi superior a 21%, média de proteína na carne, sendo que a produzida por liofilização apresentou maior percentual (31%).
- Os processos utilizados para a produção da farinha de macromiceto apresentaram rendimentos entre 18,81% (BL) e 19,29% (BE), valores estes sendo superiores aos encontrados na literatura quando utilizado o corpo de frutificação. Vale ressaltar que para a formação do corpo de frutificação o tempo médio é de 30 a 60 dias, enquanto para a produção dos *pellets* o tempo é 5 dias.
- As farinhas apresentaram altos valores de flavonoides superiores a $1161,00 \pm 82,69 \text{ mg EC} \cdot \text{g MS}^{-1}$, sendo a amostra BL a que obteve maior concentração entre as farinhas, maior que $2000 \text{ mg EC} \cdot \text{g MS}^{-1}$. As farinhas também apresentaram concentrações de compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP). Vale ressaltar que 100 g deste tipo de produto custa em média no mercado R\$ 161 e o preço médio para a produção em escala piloto baseado nos processos do presente estudo seria de R\$ 29

para esta quantidade. Isto, geraria um lucro de 445% neste subproduto da síntese enzimática se fosse aproveitado.

O estudo realizado teve como um dos objetivos propor a menor forma de produzir a enzima α -amilase com o menor custo possível. Visando este objetivo podemos concluir que a melhor alternativa para esta problemática é a produção do EEB e utilização deste na forma líquida ou liofilizada, sem as etapas de purificação. Além do reaproveitamento dos *pellets* produzidos para a fabricação de farinha de macomiceto. As etapas realizadas para este fim, bem como, os custos para cada um dos produtos estão apresentados no fluxograma 1 e na tabela 1, nas páginas subsequentes. Os cálculos realizados estão apresentados no apêndice 16.

No fluxograma é possível avaliar as etapas que foram realizadas, bem como, os resíduos gerados. Os resíduos demonstrados nos quadros verdes são os que podem ser reutilizados e nos quadros vermelhos são os que não apresentam uma nova destinação. Entretanto, estes resíduos são basicamente água sublimada. Nesta proposta de processo, três tipos de produtos podem ser fabricados, o EEB na forma líquida, o EEB liofilizado e a farinha de macomiceto. Vale ressaltar que o fluxograma foi realizado baseado no processo em escala laboratorial para a produção de 1 L de EEB.

Os custos apresentados na tabela 1 foram baseados nos processos para a produção em escala laboratorial e em escala piloto. Embora o custo em escala industrial possa ser menor e rendimento ser superior aos apresentados, este não foi realizado devido à complexidade do escalonamento para o processo industrial. O EEB liofilizado embora não apresente um custo muito inferior ao presente no mercado, possui uma atividade enzimática quase 3 vezes maior do que as enzimas utilizadas como comparativo. Enquanto, o custo para a produção da farinha de macomiceto liofilizada foi 5,46 vezes inferior ao valor de mercado para este tipo de produto. Em contrapartida, o EEB na forma líquida custa em média R\$ 0,56 para cada litro produzido, com uma atividade enzimática inferior aos utilizados como comparativos do mercado. Entretanto, por esta possuir um preço 46,71 vezes menor do que as demais, apresentar presença de antioxidantes e uma alta estabilidade de armazenamento, vale a análise da substituição das demais utilizadas no mercado por este produto.

FLUXOGRAMA 1 - MELHOR ALTERNATIVA PARA PRODUÇÃO, CONCENTRAÇÃO E REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUO DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE α -AMILASE PRODUZIDA POR *C. COMATUS* E OS PREÇOS DE CADA PRODUTO EM COMPARAÇÃO AO VALOR COMERCIAL.

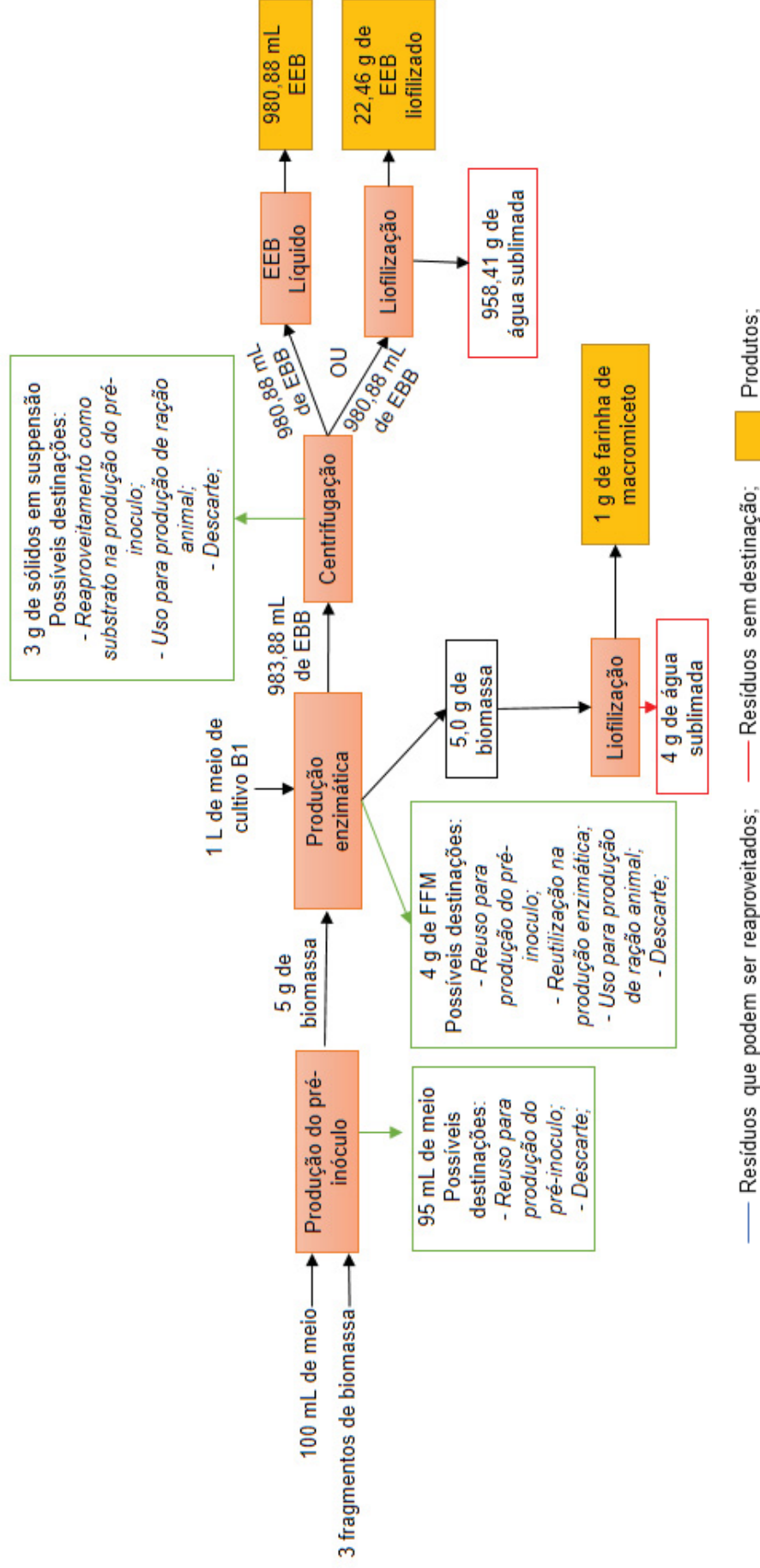


TABELA 1 – CUSTOS PARA A PRODUÇÃO EM ESCALA LABORATORIAL E ESCALA PILOTO DO EEB LÍQUIDO, EEB LIOFILIZADO E DA FARINHA DE MACROMICETO, BEM COMO, COMPARATIVO COM O PREÇO MÉDIO COMERCIAL DESTES TIPOS DE PRODUTO.

Processo	Custo escala laboratorial / Qnt. produzida	Custo em Escala piloto / Qnt. produzida	α-amilase (U/L)	α-amilase (U/L) comercial	Preço médio comercial*
EEB líquido	R\$ 47,19 / 0,98 L	R\$ 0,55 / 0,98 L R\$ 0,56 / 1 L	104.136,02	2.500.000,00	R\$ 26,16 / 1 L *
EEB liofilizado	R\$ 56,63 / 22,46 g	R\$ 1,17 / 22,46 g R\$ 52,09 / 1.000 g	8.933.330,00	3.000.000,00	R\$ 53,76 / 1.000 g*
Farinha de macromiceto	R\$ 53,073 / 1 g	R\$ 0,67 / 1 g R\$ 67,00 / 100 g	-	-	R\$ 161,3 / 100 g

* Valores baseados na bolsa de valores do dia 04/01/23=5,53
Fonte: A autora, (2023).

REFERÊNCIAS

INTRODUÇÃO

ADROIT MARKET RESEARCH, 2019. Global Alpha Amylase Market Size by Source (Fungi, Maltogenic, G4, Other Bacteria and Plant Based) by Application (Bread, Cookies & Biscuits, Desserts, Others) by Region (North America, Europe, Asia Pacific, Central & South America and Middle East and Africa) and Forecast 2018 to 2025. Disponível em: <https://www.adroitmarketresearch.com/industry-reports/alpha-amylase-market>. Acesso em 27/06/19.

ALLIED MARKET RESEARCH. Amylase Market by type (plants, bacteria, fungi), application (fruit ripening, medical diagnostics, flour improvers, malt production): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2021-2030, novembro 2022. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/amylase-market-A15505>. Acesso em: 15 dez 2022.

CARVALHO, F.; FERNANDES, P. Enzymes in sweeteners production. In: Parameswaran B., Varjani S., Raveendran S. (eds) **Green Bio-processes: Energy, Environment, and Sustainability**. Springer, Singapore, p. 151-179, 2019. Doi: 10.1007/978-981-13-3263-0_9.

DAIHA, K. G.; BRÊDA, G. C.; LARENTIS, A. L.; FREIRE, D. M. G.; ALMEIDA, R. V. Enzyme technology in Brazil: trade balance and research community. **Brazilian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 17, 2019. Doi: 10.1186/s40552-016-0029-0.

EL-ZALAKI, M. E.; HAMZA, M. A. **Edible mushrooms as producers of amylases**. Fd. Chem., 1979.

FARIAS, T. C.; KAWAGUTI, H. Y.; KOBLITZ, M. G. B. Microbial amylolytic enzymes in foods: Technological importance of the *Bacillus* genus. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, 2021. Doi: 10.1016/j.bcab.2021.102054

FARIAS, T. C.; KAWAGUTI, H. Y.; KOBLITZ, M. G. Microbial amylolytic enzymes in foods: Technological importance of the *Bacillus* genus. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, 2021.

FRANTZ, S. C.; PALUDO, L. C.; STARTZ, H.; SPIER, M. R. Production of amylases from *Coprinus comatus* under submerged culture using wheat-milling by-products: Optimization, kinetic parameters, partial purification and characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 82-92, 2019. Doi: 10.1016/j.bcab.2018.11.004.

JUJJAVARAPU, S. E.; DHAGAT, S. Evolutionary trends in industrial production of α -amylase. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 4-18, 2019. Doi: 10.2174/2211550107666180816093436.

KEKOS, D.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; MACRIS, B. J. Some nutritional factors affecting α -amylase production by *Calvatia gigantea*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 527-530, 1987.

KRUPODOROVA, T.; IVANOVA, T.; BARSHTEYN, V. Screening of Extracellular Enzymatic Activity of Macrofungi. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, p. 315–318, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 252, 2014.

PALUDO, L. C.; FRANTZ, S. C.; ANÇAY JR, R.; STUTZ, H.; DANTAS, T. L. P.; SPIER, M. R. Optimization, kinetic and bioprocess parameters of amylases production from *Coprinus comatus* under submerged culture using starch-based simple medium: Partial enzyme characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.16, p. 529-537, 2018. Doi: 10.1016/j.bcab.2018.09.022

PERALTA, R. M.; SILVA, B. P. DA; GOMES CÔRREA, R. C.; *et al.* **Enzymes from Basidiomycetes—Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology**. 2017.

PORTER, J. L.; RUSLI, R. A.; OLLIS, D. L. Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. **ChemBioChem**, v. 17, n. 3, p. 197–203, 2016.

PRECEDENCE RESEARCH. Enzymes Market (By Product: Industrial Enzymes, Specialty Enzymes; By Source: Microorganisms, Plant, Animal; By Type: Carbohydrases, Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases, Other; By Application: Food and Beverages, Meat Processing Products, Dairy products, Beverages, Bakery & Confectionary, Nutraceuticals, Other Food & Beverages, Laundry Detergents, Other) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, Regional Outlook, and Forecast 2022 – 2030, junho de 2022. Disponível em: < <https://www.precedenceresearch.com/enzymes-market>>. Acesso em: 10 dez 2022.

RESEARCH AND MARKETS. Food Enzymes – Global market outlook (2017-2026). Statistics Market Research Consulting Pvt Ltd, 2018. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/reports/4613533/food-enzymes-global-market-outlook-2017-2026#pos-38>. Acesso em: Dezembro de 2018.

RUAN, Y.; ZHANG, R.; XU, Y. Directed evolution of maltogenic amylase from *Bacillus licheniformis* R-53: Enhancing activity and thermostability improves bread quality and extends shelf life. **Food Chemistry**, 2022. Doi: 0.1016/j.foodchem.2022.132222

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. **α -Amylase. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering** - Production, Isolation and Purification of Industrial Products, 2017. Doi: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00001-4.

SINGH, R.; SINGH, A.; SACHAN, S. Enzymes used in the food industry: friends or foes. **Enzymes in Food Biotechnology**: Production, applications, and future prospects, p. 827-843, 2019. Doi: 10.1016/B978-0-12-813280-7.00048-7.

SPIER, M. R.; BEHSNILIAN, D.; ZIELINSKI, A.; KONIETZNY, U.; GREINER, R. Studies towards the stabilization of mushroom phytase produced by submerged cultivation. **The Protein Journal**, v. 34, n. 5, p. 367-379, 2015. Doi 10.1007/s10930-015-9631-0.

TIWARI, S. P.; SRIVASTAVA, R.; SINGH, C. S.; SHUKLA, K.; SINGH, R. K.; SINGH, P.; SINGH, R.; SINGH, N. L.; SHARMA, R. Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. **Journal of Global Biosciences**, v. 4, n. 1, pg. 1886-1901, 2016.

USDA – United States Department of Agriculture. World Agricultural Production. 2019. Disponível em: < <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-wheat.pdf> > Acesso em: Abril 2019.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. World agricultural production. 2019. Disponível em: < [HTTPS://APPS.FAS.USDA.GOV/PSDONLINE/CIRCULARS/GRAIN-WHEAT.PDF](https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-wheat.pdf) > ACESSO EM: ABRIL 2019.

ZILLY, A; BAZANELLA, G. C. S.; HELM, C. V.; ARAÚJO, C. A. V.; SOUZA, C. G. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Solid-State Bioconversion of Passion Fruit Waste by White-Rot Fungi for Production of Oxidative and Hydrolytic Enzymes. **Food And Bioprocess Technology**, v. 5, n. 5, p.1573-1580, 2011. Doi: 10.1007/s11947-011-0532-8

CAPÍTULO I

ABDULLAN, N.; IQBAL-ZAFAR, S. Lignocellulose biodegradation by white rot basidiomycetes: overview. **International Journal of Mushroom Sciences**, v.2, n. 3 p. 59–78, 1999.

ABITRIGO – Estimativa de moagem de trigo e consumo de farinha. 2019b. Disponível: <http://www.abitrigo.com.br/associados/arquivos/06_ESTIMATIVA_DE_MOAGEM_D_E_TRIGO_E_CONSUMO_DE_FARINHA.pdf>. Acesso em: Abril 2019a.

ABITRIGO – Trigo é a energia para o nosso corpo. 2019a. Disponível: <<http://www.abitrigo.com.br/conhecimento.php>>. Acesso em: Abril 2019b.

ADROIT MARKET RESEARCH, 2019. Global Alpha Amylase Market Size by Source (Fungi, Maltogenic, G4, Other Bacteria and Plant Based) by Application (Bread, Cookies & Biscuits, Desserts, Others) by Region (North America, Europe, Asia Pacific, Central & South America and Middle East and Africa) and Forecast 2018 to 2025. Disponível em: <https://www.adroitmarketresearch.com/industry-reports/alpha-amylase-market>. Acesso em 27/06/19.

AGROFY NEWS. Brasil produz 9,9 milhões de toneladas de farinha de trigo em 2021, 31 de maio 2022. Disponível em: <<https://news.agrofy.com.br/noticia/198969/brasil-produz-99-milhoes-toneladas-farinha-trigo-em-2021>>. Acesso em: 30 de nov 2022.

AKATA, I.; ZENGIN, G.; PICOT, C. M. N.; MAHOMOODALLY, M. F. Enzyme inhibitory and antioxidant properties of six mushroom species from the *Agaricaceae* family. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 95-99, 2019.

ALI, I.; AKBAR, A.; ANWAR, M.; PRASONGSUK, S.; LOTRAKUL, P.; PUNNAPAYAK, H. Purification and Characterization of a Polyextremophilic α -Amylase from an

Obligate Halophilic *Aspergillus penicillioides* Isolate and Its Potential for Souse with Detergents. **BioMed Research International**, 2015. DOI: 10.1155/2015/245649
 ALLIED MARKET RESEARCH. Amylase Market by type (plants, bacteria, fungi), application (fruit ripening, medical diagnostics, flour improvers, malt production): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2021-2030, novembro 2022. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/amylase-market-A15505>. Acesso em: 15 dez 2022.

ALMEIDA, P. Z.; PEREIRA, M. G.; CARVALHO, C. C.; HEINEN, P. R.; ZIOTTI, L. S.; MESSIAS, J. M.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. **Biota Neotropica**, v. 17, n. 3, 2017. Doi: 10.1590/1676-0611-bn-2017-0337.

ALPHA-amylase Baking Enzyme Market. Future Market Insights. Maio de 2022. Disponível em: <<https://www.futuremarketinsights.com/reports/alpha-amylase-baking-enzyme-market>>. Acesso em: 27 dez. 2022.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M.; ASGHER, M. Multiple Parameter Optimizations for Enhanced Biosynthesis of Exo-polygalacturonase Enzyme and its Application in Fruit Juice Clarification. **International Journal of Food Engineering**, v. 13, n. 2, 2017.

AQUINO, A. C. M. M.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Studies on a thermostable α -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2003.

BAILEY, C. J.; TURNER, S. L.; JAKEMAN, K. J.; HAYES, W. A. Effect of *Coprinus comatus* on plasma glucose concentrations in mice. **Planta med**, v. 50, n.6, p. 525-526, 1984. DOI: 10.1055/s-2007-969791

BAILEY, C. J.; TURNER, S. L.; JAKEMAN, K. J.; HAYES, W. A. Effect of *Coprinus comatus* on plasma glucose concentrations in mice. **Planta med**, v. 50, n.6, p. 525-526, 1984. DOI: 10.1055/s-2007-969791

BARD, G. C. V.; NASCIMENTO, V. V.; RIBEIRO, S. F. F.; *et al.* Characterization of Peptides from *Capsicum annuum* Hybrid Seeds with Inhibitory Activity Against α -Amylase, Serine Proteinases and Fungi. **Protein Journal**, v. 34, n. 2, p. 122–129, 2015.

BERNARDES, A. V.; MARTINS, E. S.; MATA, J. F.; FERREIRA, O. E. Utilization of agro-industrial by-products for the production of α -amylase by *Rhizomucor miehei*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 2, pg. 1439-1451, 2014. Doi: 10.3895/S1981-36862014000200012

BUSWELL, J. A.; CHANG, S. Biomass and extracellular hydrolytic enzyme production by six mushroom species grown on soybean waste. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 12, p. 1317–1322, 1994.

CANAL RURAL. Moagem de trigo no Brasil atinge 12,6 milhões de toneladas em 2021, 20 maio 2022. Disponível em:

<<https://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/moagem-de-trigo-no-brasil-atinge-126-milhoes-de-toneladas-em-2021/>>. Acesso em: 29 de nov 2022.

CARVALHO, F.; FERNANDES, P. Enzymes in sweeteners production. In: Parameswaran B., VARJANI S., RAVEENDRAN S. (eds) **Green Bio-processes: Energy, Environment, and Sustainability**. Springer, Singapore, p. 151-179, 2019. DOI: 10.1007/978-981-13-3263-0_9.

CELESTINO, J. R., DUARTE, A. C., SILVA, C. M. M., SENA, H H, FERREIRA, M. P. S. B. C., MALLMANN, N. H, LIMA, N. P. C., TAVARES, C. C., SOUZA, R. O. S., SOUZA, E. S. & SOUZA, J. V. B. 2014. *Aspergillus* 6V4, a strain isolated from manipueira, produces high amylases levels by using wheat bran as a substrate. **Enzyme Research**, v.1, n.4, 2014.

CHEN, J.; WAMG, Y-J.; XIA, Z-H. The comparison of enzyme activity of components of cellulase system from four rare edible fungus. **Journal of Shanghai Normal University (NATURAL SCIENCES)**, 2006.

KRUPODOROVA, T.; IVANOVA, T.; BARSHTEYN, V. Screening of Extracellular Enzymatic Activity of Macrofungi. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, p. 315–318, 2014.

COWIESON, A. J.; KLUENTER, A. M. Contribution of exogenous enzymes to potentiate the removal of antibiotic growth promoters in poultry production. **Animal Feed Science and Technhnology**, v. 250, p. 81-92, 2019. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2018.04.026

DAMIEN M, JOLY C, DOLE P, BLIARD C. Enhanced mechanical properties of partially beta–amylase trimmed starch for material application. **Carbohydrate polymers**, v. 80, n. 3, p. 747-752, 2010.

DAS, A. K.; NANDA, P. K.; DANDAPAT, P.; BANDYOPADHYAY, S.; GULLÓN, P.; SIVARAMAN, K.; MCCLEMENTS, D. J.; GULLÓN, B.; LORENZO, J. M. Edible Mushrooms as Functional Ingredients for Development of Healthier and More Sustainable Muscle Foods: A Flexitarian Approach. **Molecules**, v. 26, n. 9, 2021.

DELCOUR, J. A.; HOSENEY, R. C. **Principles of cereal science and technology**. 3ª ED. AACC International: St. Paul, MN, USA. 2010.

DESAI, M. **Downstream processing of proteins: Methods and Protocols**. Nova lorque: Humana Press. 2000. 229 p.

DÍAZ-GODÍNEZ, G.; TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; RODRÍGUEZ, A.; et al. Enzymatic, antioxidant, antimicrobial, and insecticidal activities of *Pleurotus pulmonarius* and *Pycnoporus cinnabarinus* grown separately in an airlift reactor. **BioResources**, v. 11, n. 2, p. 4186–4200, 2016.

DO, J. H.; KIM, S. D. Properties of Amylase produced from Higer Fungi *Ganoderma Lucidum*. **Korean Journal Applied Microbiology and Bioengineering**, v. 13, p. 6, 1985.

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. Elsevier Science & Technology Books, Amsterdam, 1995.

DU, F.; WANG, H. X.; NG, T. B. An amylase from fresh fruiting bodies of the monkey head mushroom *Hericium erinaceum*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 1, pg. 23-27, 2013.

DU, F.; WANG, H. X.; NG, T. B. An amylase from fresh fruiting bodies of the monkey head mushroom *Hericium Erinaceum*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 23–27, 2013.

EL-ZALAKI, M. E.; HAMZA, M. A. **Edible mushrooms as producers of amylases**. Fd. Chem., 1979.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 2014.

FALANDYSZ, J. Mercury bio-extraction by fungus *Coprinus comatus*: a possible bioindicator and mycoremediator of polluted soils? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 8, p. 7444-7451, 2016.

FAR, B. E.; AHMADI, Y.; KHOSROSHAHI, A. Y.; DILMAGHANI, A. Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 10, n. 3, p. 350-358, 2020. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.043>

FAROOQ, M. A.; ALI, S.; HASSAN, A.; TAHIR, H. M.; MUMTAZ, S.; MUMTAZ, S. Biosynthesis and industrial applications of α -amilase: a review. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 1281-1292, 2021.

FEN, L.; XUWEI, Z.; NANYI, L.; PUYU, Z.; SHUANG, Z.; XUE, Z.; PENGUI, L.; QICHAO, Z.; HAIPING, L. Screening of lignocellulose-degrading superior mushroom strains and determination of their CMCase and laccase activity. **Scientific World Journal**, 2014. DOI: 10.1155/2014/763108.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de alimentos de Fennema**. Tradução ADRIANO BRANDELLI [ET AL.] - 4 ED., Editora Artmed, PORTO ALEGRE, 2010.

FIB- FOOD INGREDIENTS BRASIL. Tecnologia das enzimas em panificação. São Paulo. Disponível em: <<https://revista-fi.com/artigos/panificacao/tecnologia-das-enzimas-em-panificacao>>. Acesso em: 28 dez 2022.

FLEGG, P.B.; SPENCER, D.M.; WOOD, D.A. **The biology and technology of the cultivated mushroom**. Chichester: John Wiley, 1985.

FLICKINGER, M. **Downstream Industrial Biotechnology**: recovery and purification. Nova Jersey: Wiley, 2013. 873 p.

FOMINA, M.; BURFORD, E. P.; GADD, G. M. **Fungal dissolution and transformation of minerals: Significance for nutrient and metal mobility**. 2006.

FORZZA, R.C.; org., *et al.* **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 871 p., v. 1, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

FRANTZ, S. C.; PALUDO, L. C.; STUTZ, H.; SPIER, M. R. Production of amylases from *Coprinus comatus* under submerged culture using wheat-milling by-products: Optimization, kinetic parameters, partial purification and characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 82–92, 2019. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.11.004

FUWA, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **The Journal of Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 583–603, 1954. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a126476

GOUD, M.; SURYAM, A. Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basidiomycetes. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 354–360, 2009.

GRAND VIEW RESEARCH. Enzymes Market Size Worth \$17.2 Billion By 2027 | CAGR: 7.1%. 2020. Disponível em: <<http://www.grandviewresearch.com/press-release/globalenzymes-market>>. Acesso em: outubro de 2021.

GRÖGER, H.; ASANO, Y. Introduction – Principles and Historical Landmarks of Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. In: **Enzyme Catalysis in Organic Synthesis**, Third Edition, 2012.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. 67 Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

HANEEF, M.; CESERACCIU, L.; CANALE, C.; BAYER, I.S.; GUERRERO, J.A.H.; ATHANASSIOU, A. Advanced materials from fungal mycelium: fabrication and tuning of physical properties. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-11, 2017.

HANSON, J. R. **The Chemistry of Fungi**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2008.

HARDER, W.; DYKHUIZEN, L. Physiological responses to nutrient limitations. **Ann. Rev. Microbiol.** V. 37, p 1-23, 1983

HASSAN, B. A.; ALSALAMI, N. Y.; JEBOR, M. A.; Amylase production, purification and characterization from *Escherichia coli*. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 7, p. 1691-1696, 2018.

HE, L.; MAO, Y.; ZHANG, L.; WANG, H.; ALIAS, S. A.; WEI, D. Functional expression of a novel α -amylase from Antarctic psychrotolerant fungus for baking industry and its magnetic immobilization. **BMC Biotechnology**, p. 17-22, 2017. Doi: 10.1186/s12896-017-0343-8

HUR, T.-C.; KA, K.-H.; JOO, S.-H.; TERASHITA, T. Characteristics of the Amylase and its Related Enzymes Produced by Ectomycorrhizal Fungus *Tricholoma matsutake*. **Mycobiology**, v. 29, n. 4, p. 183–189, 2001.

HUR, T.-C.; KA, K.-H.; JOO, S.-H.; TERASHITA, T. Characteristics of the amylase and its related enzymes produced by ectomycorrhizal fungus *Thicholoma matsuke*. **Mycobiology**, v. 29, n. 4, pg. 183-189, 2001.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D. Screening of *Coprinus* species for the production of extracellular peroxidase and evaluation of the enzyme for the treatment of aqueous phenol. **Journal Environmental Technology**, p. 1355-1367, 2010. Doi: 10.1080/09593332508618441

IMEN, O. M.; MAHMOUD, K. Statistical optimization of cultural conditions of an halophilic alpha-amylase production by halophilic *Streptomyces* sp. Grown on orange waste powder. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, n.4, p. 685-693, 2015. Doi: 10.1016/j.bcab.2015.08.011

INÁCIO, F. D. et al. Production of Enzymes and Biotransformation of Orange Waste by Oyster Mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. **Advances In Microbiology**, [s.l.], v. 05, n. 01, p.1-8, 2015. Doi: 10.4236/aim.2015.51001.

IRSHAD, M. Purification and characterization of α -amylase from *Ganoderma tsuage* growing in waste bread medium. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 33, p.8288-8204, 2012. Doi: 10.5897/ajb11.3643.

ISLAM, M. R.; TUDRYN, G.; BUCINELL, R.; SCHADLER, L.; PICU, R. C. Morphology and mechanics of fungal mycelium. **Scientific Reports**, v. 7, 2017. Doi: 10.1038/s41598-018-20637-1.

JENSEN, B.; OLSEN, J.; ALLERMANN, K. Purification of extracellular amylolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1988, p. 218-223, 1988.

JIANG, Man; TEN, Zhen; DING, Shaojun. Decolorization of Synthetic Dyes by Crude and Purified Laccases from *Coprinus comatus* Grown Under Different Cultures: The Role of Major Isoenzyme in Dyes Decolorization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 2, p. 660-672, 2012. Doi:10.1007/s12010-012-0031-z.

JONATHAN, S. G.; ADEOYO, O. R. Evaluation of tem wild Nigerian mushrooms for amylase and cellulase activities. **Mycrobiology**, v. 39, n. 2, p. 103-108, 2011. Doi: 10.4489/MYCO.2011.39.2.103

KAMOTO, R. J.; KASAPILA, W.; NG'ONG'OLA-MANANI, T. A. Use of fungal alpha amylase and ascorbic acid in the optimization of grain amaranth–wheat flour blended bread. **Food and Nutrition Research**, v. 62, p. 1–9, 2018.

KARIM, K. M. R.; HUSAINI, A.; SING, N. N.; et al. Purification of an alpha amylase from *Aspergillus flavus* NSH9 and molecular characterization of its nucleotide gene sequence. **3 Biotech**, v. 8, n. 204, 2018. Doi:10.1007/s13205-018-1225-z

KARN, S.; KUMAR, A. Protease, lipase and amylase extraction and optimization from activated sludge of pulp and paper industry. **Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)**, v. 57, n. 03, p. 201–205, 2019.

KASAR, S. S.; MARATHE, K. R.; BHIDE, A. J.; *et al.* A glycoprotein α -amylase inhibitor from *Withania somnifera* differentially inhibits various α -amylases and affects the growth and development of *Tribolium castaneum*. **Pest Management Science**, v. 73, n. 7, p. 1382–1390, 2017.

KATOH, S.; YOSHIDA, F. **Biochemical Engineering**: a textbook for engineer and biologistis. Nova Jersey: Wiley, p. 329, 2009.

KEKOS, D.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; MACRIS, B. J. Some nutritional factors affecting α -amylase production by *Calvatia gigantea*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 527–530, 1987.

KILIKIAN, B. V., PESSOA JR, A. **Purificação de Produtos Biotecnológicos - Operações e processos com aplicação industrial**. 2° ed. Blucher, 2020.

KIM, H. M.; KIM, S. W.; HWANG, J.; PARK, M. K.; MAHMOUD, Y. A.-G.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Influence of agitation intensity and aeration rate on the production of antioxidative exopolysaccharides from submerged mycelial culture of *Ganoderma recinaceum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 16, v. 8, 1240-1247, 2006.

KIM, S. W.; HWANG, H. J.; XU, C. P.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Effect of aeration and agitation on the production of mycelia biomass and exopolysaccharides in an entomopathogenic fungus *Paecilomyces sinclairii*. **Lett. Appl. Microbiology**, v. 36, pg. 321-326, 2003.

KUMAR, K. V.; SANKAR, R. N.; SHAILAJA, R.; SARITHA, K.; SIDDHARTHA, E.; RAMYA, S.; GIRIDHAR, D.; SAHAJA, R. V. Purification and characterization of α -amylase produced by *Aspergillus niger* using banana peels. **Journal of Cell and Tissue Research**, v. 11, n. 2, p. 2775-2780, 2011.

KUMAR, P.; SATYANARAYANA, T. Optimization of culture variables for improving glucoamylase production by alginate-entrapped *Thermomucor indicae - seudaticae* using statistical methods. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 2007, p. 1252–1259, 2007.

KUMAR, Y.; SINGH, P. K.; SINGH, A. K.; MASI, H.; PETER, J. K.; BENJAMIN, J. C.; RATH, S. Production optimization of alpha amylase from *Bacillus altitudinis*. **International Journal of Scientific Engineering and Technology Research**, v. 3, n.4, p. 564-573, 2014.

KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 2, p. 168–171, 2005.

KUSUDA, M.; UEDA, M.; KONISHI, Y.; ARAKI, Y.; YAMANAKA, K.; NAKAZAWA, M.; MIYATAKE, K.; TERASHITA, T. Detection of β -glucosidase as saprotrophic ability from an ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma matsutake*. **Mycoscience**, v. 47, p. 184-189, 2006.

KUSUDA, M.; UEDA, M.; KONISHI, Y.; *et al.* Characterization of extracellular glucoamylase from the ectomycorrhizal mushroom *Lyophyllum shimeji*. **Mycoscience**, v. 45, n. 6, p. 383–389, 2004.

LEE, J. W.; BAEK, S. J.; KIM, Y. S. Submerged Culture of *Phellinus linteus* for Mass Production of Polysaccharides. **Mycobiology**, v. 36, n. 3, p. 178, 2008.

LÉVÊQUE, E. *et al* Thermophilic archael amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, n.1, p.3-14, 2000.

LI, B.; LU, F.; SOU, X.; NAN, H.; LI, B. Antioxidant Properties of Cap and Stipe from *Coprinus comatus*. **Molecules**, v. 15, n. 3, p.1473-1486, 2010. DOI: 10.3390/molecules15031473.

LU, X; DING, S. Effect of Cu²⁺, Mn²⁺ and aromatic compounds on the production of laccase isoforms by *Coprinus comatus*. **Mycoscience**, v. 51, n. 1, p.68-74, 2010. DOI: 10.1007/s10267-009-0002-6.

LUNDKVIST H, OLSEN HS. Enzyme applications in bread making. **Biozoom** nr. 4. Novozymes, 2007.

MA, K.; RUAN, Z. Production of a lignocellulolytic enzyme system for simultaneous bio-delignification and Saccharification of corn stover employing co-culture of fungi. **Bioresour Technology**, V. 175, P. 586-93, 2015. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2014.10.161.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MAHOMOODALLY, M. F.; SUBRATTY, A. H.; GURIB-FAKIM, A., CHOUDHARY, M. I., NAHAR, K. S. Traditional medicinal herbs and food plants have the potential to inhibit key carbohydrate hydrolyzing enzymes in vitro and reduce postprandial blood glucose peaks in vivo. **Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

MANOHARACHARY, C.; SRIDHAR, K.; SINGH, R.; ADHOLEYA, A.; SURYANARAYANAN, T. S.; RAWAT, S.; JOHRI, B. N. Fungal biodiversity: Distribution, conservation and prospecting of fungi from India. **Current Science**, v. 89, n. 1, p. 58-71, 2005.

MARSHAK, D. R.; BURGESS, R. R.; KNURTH, M. **Strategies for protein purification and characterization**: A laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.

MARTINS, A. Manual para a gestão dos recursos micológicos silvestres do Baixo Alentejo. . **ADPM Associação de Defesa do Património de Mértola**, p. 7–29, 2011.

MEERA, C.; MEENAKUMARI, S.; THIRUMAVALAVAN, M.; PACHAIAPPAN, R. Isolation and characterization of α-amylase inhibitor from *Leucas aspera* (Willd) Link: α-amylase assay combined with FPLC chromatography for expedited identification. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 346–355, 2017.

MEIJER, J. J.; HOOPEN, H. J. G.; LUYBEN, K. CH. A. M.; LIBBENGA, K. R. Effects of hydrodynamic stress on cultured plant cells: A literature survey. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, n. 3, p. 234-238, 1993.

MICHELIN, M.; SILVA, T. M.; BENASSI, V. M.; *et al.* Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 16, p. 2348-2353, 2010. DOI: 10.1016/j.carres.2010.08.013.

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

MIRANDA, M. Z. de; DE MORI, C.; LORINI, I. Qualidade comercial do trigo brasileiro: safra 2007. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2010. 49 p.html. (EmbrapaTrigo. Documentos Online, 126). Disponível em:<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do126.htm>.

MOJSOV, K.; ANDRONIKOV, D.; JANEVSKI, A.; *et al.* Production and application of α -amylase enzyme in textile industry. **Tekstilna industrija**, v. 66, p. 23-28, 2018.

MORADALI, M. F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G. A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 701-724, 2007.

NAILI, B.; SAHNOUN, M.; BEJAR, S.; KAMMOUN, R. Optimization of submerged *Aspergillus oryzae* S2 α -amylase production. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. 1, pg. 185-192, 2016.

NAIZMI, A.R., REINISH, T., HINZ, H.J. Ca-binding to *Bacillus licheniformis* α - amylase (BLA). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 453, pg.16-23, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 252, 2014.

NELSON, N. A fotometric adaptaion of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-80, 1944.

NEVES, M. A. *et al.* (b) Wheat milling by-products fermentation: potential substrate for bioethanol production. **Life Science Journal**, v. 3. n. 2, p. 83-87, 2006.

NEVES, M. L. C.; PORTO, T. S.; SOUZA-MOTTA, C. M.; SPIER, M. R.; MOREIRA, K. A.; PORTO, A. L. F. Partition and recovery of phytase from *Absidia blakesleeana* URM5604 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 318, p. 34-39, 2012. DOI: 10.1016/j.fluid.2012.01.004.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDEN, G. Bioreaction engineering principles, 2nd ed. Kluwer Academic/Plenum, New York.2003.

NOBREGA, R.; BORGES, C. P.; HABERT, A. C. Processos de Separação por Membranas.In: PESSOA JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. São Paulo: Manole, 2005. Cap.4. p. 38-88.

NWAGU, T.N.; OKOLO, B.N. Extracellular Amylase Production of a Thermotolerant *Fusarium* sp. Isolated from Eastern Nigerian Soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 649-658, 2011. Doi:10.1590/S1516-89132011000400002

OZALP, F. O.; CANBEK, M.; YAMAC, M.; KANBAK, G.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D.; UYANOGLU, M.; SENTURK, H.; KARTKAYA, K.; OGLAKCI, A. Consumption of *Coprinus comatus* polysaccharide extract causes recovery of alcoholic liver damage in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 8, pg. 994-1002, 2014. DOI: 10.3109/13880209.2013.874536

OZATAY, S. Recent applications of enzymes in food industry. **Journal of Current Research on Engineering, Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 17-30, 2020. DOI: 10.26579/jocrest.52

PALMER T. **Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Chemical Chemistry**, Horwood Publication, Chichester, 2001.

PALUDO, L. C.; FRANTZ, S. C.; ANÇAY, R.; STUTZ, H.; DANTAS, T. L. P.; SPIER, M. R. Optimization, kinetic and bioprocess parameters of amylases production from *Coprinus comatus* under submerged culture using starch-based simple medium: Partial enzyme characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 529–537, 2018. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.09.022

PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, C.R., SOCCOL, T.V., SINGH, D., MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p. 135–152, 2000.

PASIN, T. M. *et al.* Purification and functional properties of a novel glucoamylase activated by manganese and lead produced by *Aspergillus japonicus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p.779-788, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.016.

PAUL, J. S.; LALL, B. M.; JADHAV, S. K.; TIWARI, K. L. Parameter's optimization and kinetics study of α -amylase enzyme of *Bacillus* sp. MB6 isolated from vegetable waste. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 123–129, 2017. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.10.005.

PERALTA, R. M.; SILVA, B. P. DA; GOMES CÔRREA, R. C.; *et al.* **Enzymes from Basidiomycetes—Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology**. 2017.

PÉREZ, S.; BERTOFT, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. **Starch/Staerke**, v. 62, n. 8, p. 389–420, 2010.

PERSISTENCE MARKET RESEARCH. Alpha Amylase market. Outubro, 2020. Disponível em: <<https://www.persistencemarketresearch.com/market-research/alpha-amylase-market.asp>>. Acesso em: 29 dez 2022.

PHILIPPOUSSIS, A.; DIAMANTOPOULOU, P. Agro-Food industry wastes and agricultural residues conversion into high value products by mushroom cultivation. **Proceeding of 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products** – p. 339-351, 2011.

PORTER, J. L.; RUSLI, R. A.; OLLIS, D. L. Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. **ChemBioChem**, v. 17, n. 3, p. 197–203, 2016.

PRECEDENCE RESEARCH. Enzymes Market (By Product: Industrial Enzymes, Specialty Enzymes; By Source: Microorganisms, Plant, Animal; By Type: Carbohydrases, Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases, Other; By Application: Food and Beverages, Meat Processing Products, Dairy products, Beverages, Bakery & Confectionary, Nutraceuticals, Other Food & Beverages, Laundry Detergents, Other) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, Regional Outlook, and Forecast 2022 – 2030, junho de 2022. Disponível em: < <https://www.precedenceresearch.com/enzymes-market>>. Acesso em: 10 dez 2022.

PRIYANKA, K.; NEERAJ, W. Extremozymes used in textile industry. **The Journal of The Textile Institute**, v. 113, n. 9, p. 2007-2015, 2022. DOI: 10.1080/00405000.2021.1948251

PROSIEX LTDA. Los hongos basidiomicetos. 2012. Disponível em: <https://inmunosetas.wordpress.com/2012/02/21/los-hongos-basidiomicetos/> Acessado em: 22 de novembro de 2020.

QUAGLIA, G. Ciencia y tecnologia de La panificación. Zaragoza: Acribia, p. 485, 1991.

RAMACHANDRAN, S. R.; PATEL, A. K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; CHANDRAN, S.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Alpha Amylase from a Fungal Culture Grown on Oil Cakes and Its Properties. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 2, p. 309-317, 2004. DOI: 10.1590/S1516-89132004000200019

RASHAD, M. M.; ABDU, H. M.; MAHMOUD, A. E.; NOOMAN, M. U. Nutritional Analysis and Enzyme Activities of *Pleurotus Ostreatus* Cultivated on Citrus Limonium and Carica Papaya Wastes. **Enzyme**, v. 3, n. 4, p. 3352–3360, 2009

RATHORE H., PRASAD S., KAPRI M, TIWARI A., S. S. Medicinal importance of mushroom mycelium: mechanisms and applications. **Journal of Functional Foods**, v. 56, p. 182–193, 2019.

RESEARCH AND MARKETS. Food Enzymes – Global market outlook (2017-2026). Statistics Market Research Consulting Pvt Ltd, 2018. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/reports/4613533/food-enzymes-global-market-outlook-2017-2026#pos-38>. Acesso em: Dezembro de 2018.

RESEARCH AND MARKETS. Food Enzymes – Global market outlook (2017-2026). Statistics Market Research Consulting Pvt Ltd, 2018. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/reports/4613533/food-enzymes-global-market-outlook-2017-2026#pos-38>. Acesso em: Dezembro de 2018.

REYES, R.G. *et al.* *Coprinus comatus*, a newly domesticated wild nutraceutical mushroom in the Philippines. **Journal of Agricultural Technology**, v.5, n.2, p 299-316, 2009.

RIBEIRO, R. M. M. G. P.; ESPERANÇA, M. N.; SOUSA, A. P. A.; NETO, A. B.; CERRI, M. O. Individual effect of shear rate and oxygen transfer on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 1, p. 1, 2021.

ROUHANA-TOUBI, A.; WASSER, S. P.; FARES, F. The Shaggy Ink Cap Medicinal Mushroom, *Coprinus comatus* (Higher Basidiomycetes) Extract Induces Apoptosis in Ovarian Cancer Cells via Extrinsic and Intrinsic Apoptotic Pathways. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v.17, n.12, pg. 1127-1136, 2015.

ROUSH, D. J.; LU, Y. Advances in primary recovery: centrifugation and membrane technology. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 3, p. 488-495, 2008.

ROY, I.; GUPTA, M. Downstream processing of enzymes/proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences India (PNSA)**, v. 2, p. 175-204. 2002.

RUBILAR, M.; JARA, C.; POO, Y.; ACEVEDO, F.; GUTIERREZ, C.; SINEIRO, J. et al. Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz): Sources of Antioxidant Compounds and α -Glucosidase/ α -Amylase Inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1630-1637, 2011.

SAHA, P., KHAN, M. F., PATRA, S. Truncated α -amylase: an improved candidate for textile processing. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 7, 2018. DOI: 10.1080/10826068.2018.1479863.

SAINI, R., SAINI, H. S., DAHIYA, A. Amylases: Characteristic and industrial applications. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 4, p. 1865-1871, 2017.

SAKTHI, S. S.; KANCHANA, D.; SARANRAJ, P.; USHARANI, G. Evaluation of Amylase Activity of the Amylolytic Fungi *Aspergillus niger* Using Cassava as Substrate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 1, p. 24–34, 2012.

SALMON, D. N. X.; PIVA, L. C.; BINATI, R. L.; RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; SPIER, M. R. A bioprocess for the production of phytase from *Schizophyllum commune*: studies of its optimization, profile of fermentation parameters, characterization and stability. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 7, p. 1067-1079, 2012.

SAN-LANG W, LIANG YC, LIANG TW. Purification and characterization of a novel alkali-stable α - amylase from *Chryseobacterium taeanense* and application in antioxidant and prebiotic. **Process Biochemistry**. 2011; 46:745-750.

SARANRAJ, P.; STELLA, D. Fungal amylase – A review. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n. 2, pg. 203-211, 2013.

SCHEUER, P. M.; FRANCISCO, A.; MIRANDA, M. Z.; LIMBERGER, V. M. Trigo: Caraterísticas e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtor Agroindustriais**, Campina Grande, v. 13, n. 2, p. 211-222, 2011.

SHARMA, A., SATYANARAYANA, T. Optimization of medium components and cultural variables for enhanced production of acidic high maltose-forming and Ca^{2+}

independent α -amylase by *Bacillus acidicola*. **J Biosci Bioeng**, v. 111, n. 5, p. 550–553, 2011.

SHARMA, A.; GUPTA, G.; AHMAD, T.; MANSOOR, S.; KAUR, B. Enzyme Engineering: Current trends and future perspectives. **Food Reviews International**, v. 37, n. 2, p. 121-154, 2021.

SHEN, J.; SUN, L-Y.; XI, J-H.; XIA, Z-H.; CHEN, J. Characteristic of cellulase from *Coprinus comatus* induced by disintegrate cellulose. **Journal of Shanghai Normal University (NATURAL SCIENCES)**, 2007.

SIMAIR, A. A. *et al.* Production and Partial Characterization of α -Amylase Enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and Potential Applications. **Biomed Research International**, p.1-9, 2017. DOI: 10.1155/2017/9173040.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. **α -Amylase. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering** - Production, Isolation and Purification of Industrial Products, 2017. DOI: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00001-4.

SINGH, R.; KAPOOR, V.; KUMAR, V. Production of thermostable, Ca^{2+} -independent, maltose producing α -amylase by *Streptomyces* sp. MSC702 (MTCC 10772) in submerged fermentation using agro-residues as sole carbon source. **Annals Of Microbiology**, v. 62, n. 3, p.1003-1012, 2012. DOI:10.1007/s13213-011-0340-4.

SIQUEIRA, A. A. Sistema para desenvolvimento de modelos microbiológicos de predição e contagem de colônias por análise computacional de fotografias. Juazeiro, BA, 2015.

SLAWINSKA, A.; KALBARCZYK, J. Evaluation of enzymatic activity of *Pleurotus ostreatus* regarding stages of mycelium development. **Acta Scientiarum Polonorum**, v. 10, n. 2, pg. 195-202, 2011.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. e. Application of microbial α -amylase in industry – A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p.850-861, 2010.DOI: 10.1590/s1517-83822010000400004.

SPIER M.R., WOICIECHOWSKI A.L., VANDENBERGHE L.P.S., SOCCOL C.R. Production and Characterization of Amylases by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation Using Agro Industrials Products. **International Journal of Food Engineering**; v. 2, p. 1-19, 2006.

SPIER, M. R.; BEHSNILIAN, D.; ZIELINSKI, A.; KONIETZNY, U.; GREINER, R. Studies towards the stabilization of mushroom phytase produced by submerged cultivation. **The Protein Journal**, v. 34, n. 5, p. 367-379, 2015. DOI 10.1007/s10930-015-9631-0.

STAJIĆ, M., PERSKY, L., FRIESEM, D., HADAR, Y., WASSER, S.P., NEVO, E., VUKOJEVI, J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme Microb. Technol.**, 38, 65-73, 2006.

STILINOVIC, N.; CAPO, I.; VUKMIROVIC, S.; RASKOVIC, A.; TOMAS, A.; POPOVIC, M.; SABO, A. Chemical composition, nutritional profile and in vivo antioxidant properties of the cultivated mushroom *Coprinus comatus*. **Royal Society Open Science**, v.7, n. 9, 2020.

STOJKOVIĆ, D., REIS, F. S., BARROS, L., *et al.* Nutrients and non-nutrients composition and bioactivity of wild and cultivated *Coprinus comatus* (O.F.Müll.) Pers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 289–296, 2013.

STUTZ, H.; ALVAREZ, D. C. Produção de cogumelos – uma experiência na região centro-sul do paraná. Ed. Crv, Curitiba, Paraná, 2017.

SUÁREZ-ARANGO, C.; NIETO, I. J. Biotechnological cultivation of edible macrofungi: An alternative for obtaining nutraceuticals. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 30, n. 3, pg.1-8, 2013. DOI: 10.1016/j.riam.2012.03.011

SUNDARRAM, A. and MURTHY, T.P.K., 2014. α -amylase production and applications: a review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, vol. 2, no. 4, pp. 166-175.

SUVD, D. *et al.* Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase: possible factors determining the thermostability. **Journal of Biochemistry**, v.129, p.461-468, 2001.

SWIFT, H. J.; BRADY, L.; DEREWENDA, Z. S.; *et al.* Structure and molecular model refinement of *Aspergillus oryzae* (TAKA) alpha-amylase: an application of the simulated-annealing method. **Acta Crystallogr B**, v. 1, n. 47, p. 535–544, 1991.

TALLAPRAGADA, P.; DIKSHIT, R.; JADHAV, A.; SARAH, U. Partial purification and characterization of amylase enzyme under solid state fermentation from *Monascus sanguineus*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 95–101, 2017. DOI: 10.1016/j.jgeb.2017.02.003.

TANG, S.; ZHANG, F.; GONG, H.; WEI, F.; ZHUANG, J.; KARSHALEV, E. ÁVILA, B. EF DE; HUANG, C.; SHOU, Z.; LI, Z.; YIN, L.; DONG, H.; FANG, R. H.; ZHANG, X.; ZHANG, L. WANG, J. Enzyme-powered Janus platelet cell robots for active and targeted drug delivery. **Science Robotics**, v. 5, n. 43, 2020. DOI: 10.1126/scirobotics.aba6137

TANG, X.; LIU, B.; DENG, Q.; ZHANG, R.; LI, X.; XU, H. Strengthening detoxication impacts of *Coprinus comatus* on nickel and fluoranthene co-contaminated soil by bacterial inoculation. **Journal of Environmental Management**, v. 206, p. 633-641, 2018.

TEIXEIRA, M. V.; FRANCEZ, Y.; COLA, A. P.; OLIVEIRA, D. V.; SILVA, E.; MUTRAN, T. J. Detec  o da Presença de Amido em Queijos do Tipo Prato e Mozzarella. **Science in Health**, pg. 79-85, 2014.

TIWARI, S. P.; SRIVASTAVA, R.; SINGH, C. S.; SHUKLA, K.; SINGH, R. K.; SINGH, P.; SINGH, R.; SINGH, N. L.; SHARMA, R. Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. **Journal of Global Biosciences**, v. 4, n. 1, pg. 1886-1901, 2016.

TONINI, R. C. G.; SANTOS, F. dos; ISHIKAWA, N. K.; TAVARES, L. B. B. Utilização de bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis*) Mart. Arecaceae como substrato de frutificação para o cultivo axênico de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, pg. 204-206, 2007.

TORRES, L. M.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Amylolytic enzymes concentration in the starch hydrolysis of ginger. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TSAI, S-Y.; TSAI, H-L.; MAU, J-L. Antioxidant properties of *Coprinus comatus*. **Journal of Food Biochemistry**, v.33, n. 3, p. 368-389, 2009. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2009.00224.x.

UDDIN, M. R.; FERDOUS, K.; RAHMAN, M. A.; ROY, A. K.; KHAN, M. R. Amylolytic Activity of *Agaricus* and Moulds for the Production of Bioethanol. **Chemical Engineering and Science**, v. 1, n. 1, p. 7-11, 2013. DOI: 10.12691/ces-1-1-2.

UENO, S. et al. Secretory enzyme production and conidiation of *Aspergillus oryzae* in submerged liquid culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 273-276, 1987.

ULZIJARGAL, E.; MAU, J-L. Nutrient compositions of culinary-medicinal mushroom fruiting bodies and mycelia. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 13, n.4, p. 343-349, 2011.

USDA – United States Department of Agriculture. World Agricultural Production. 2019. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-wheat.pdf>> Acesso em: Abril 2019.

UZIR, M. H.; DON, M. M. Biochemical Engineering: a concise introduction. **Malásia: University Sains Malaysia**, p. 109, 2008.

VANIER, N. L.; ELL HALAL, S. L. M.; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. R. Molecular structure, functionality and applications of oxidized starches: a review. **Food Chemistry**, v. 221, pg. 1546-1559, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.10.138.

VARALAKSMI, K. N.; KUMUDINI, B. N.; SOLOMON, J.; SUHAS, R.; MAHESH, B.; KAVITHA, A. P. Production and Characterization of α -Amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 Isolated in Bangalore. **Polish Journal of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 29-36, 2009.

VASIC, K.; KNEZ, Z.; LEITGEB, M. Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis from Different Lignocellulosic Sources. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 753, 2021. DOI: 10.3390/molecules26030753

VAZ, M. R. F. Influência das condições de cultivo na produção de antígenos recombinantes de *Leishmania i. chagasi* utilizando *Escherichia coli* M15 cultivada em incubador rotativo e biorreator. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, p. 1–112, 2011.

VITOLO, M. **Industrial Uses of Enzymes**. In: DOELLE, H. W.; ROKEM, J. S.; BEROVIC M. *Biotechnology: Industrial Biotechnology – Part II. Vol. VI*. EOLSS publications. p. 135-138. 2009.

VYAS, G.; SHARMA, N. Production and optimization of α -amilase from a novel thermoalkalophilic *Bacillus sonorensis* GV2 isolated from mushroom compost. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, n 81, pg 1207-1221, 2015. DOI: 10.16943/ptinsa/2015/v81i5/48339.

WAN, J.; LI, Y.; YI, R.; MONGKOLTHANARUK, W.; KINJO, Y.; TERASHITA, T.; YAMANAKA, K.; SHIMOMURA, N.; YAMAGUCHI, T.; AIMI, T. Characterization of the glycoside hydrolase family 15 glucoamylase gene from the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*. **Mycoscience**, v. 53, pg. 194-202, 2012. Doi: 10.1007/s10267-011-0153-0

WANG, Y.; ZHANG, B.; CHEN, N.; WANG, C.; FENG, S.; XU, H. Combined bioremediation of soil co-contaminated with cadmium and endosulfan by *Pleurotus eryngii* and *Coprinus comatus*. **Journal of Soils and Sediments**, v. 18, n. 6, p. 2136-2147, 2018. Doi: 10.1007/s11368-017-1762-9.

WHITEHURST, R. J. .; OORT, M. VAN; **Enzymes in food technology**. 2nd Editio ed. [s.l.] Wiley-Blackwell, 2010.

WILTSCHI, B.; CERNAVA, T.; DENNIG, A.; CASAS, M. G.; STEFFEN, M. G.; GRUBER, M. H.; HEIDINGER, P.; ACERO, E. H.; KRATZER, R.; LULEY-GOEDL, C.; MÜLLER, C. A.; PITZER, J.; RIBITSCH, D.; SAUER, M.; SCHMÖLZER, K.; SCHNITZHOFFER, W.; SENSEN, C. W.; SOH, J.; STEINER, K.; WINKLER, C. K.; WINKLER, M.; WRIESSNEGGER, T. Enzymes revolutionize the bioproduction of value-added compounds: From enzyme discovery to special applications. **Biotechnology Advances**, v. 40, 2020. Doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107520.

WU, J.-Z; CHEUNG, P. C. K.; WONG, K.-H; HUANG, N.-L. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. **Food Chemical**, v. 85, pg. 101-105, 2004.

XIAN, L.; WANG, F.; LUO, X.; FENG, Y. L.; FENG, J. X. Purification and characterization of a highly efficient calcium-independent alpha-amylase from *Talaromyces pinophilus*. 1-95. **PLoS One**, v. 10, p. 1-95, 2015. Doi: 10.1371/journal.pone.0121531

XIAO, Z.; STORMS, R.; TSANG, A. A quantitative starch-iodine method for measuring alphaamylase and glucoamylase activities. **Analytical Biochemistry**, v. 351, pg. 146-148, 2006.

XU, E.; CAMPENELLA, O. H.; YE, X.; JIN, Z.; LIU, D.; MILLER, J. N. B. Advances in conversion of natural biopolymers: A reactive extrusion (REX)-enzyme-combined strategy for starch/protein-based food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 99, p. 167-180, 2020. Doi: 10.1016/j.tifs.2020.02.018

YADA, R. Y. **Proteins in Food Processing**, Woodhead Publishing, Second Edition, Elsevier Science, 2017.

YAKUP K, COLAK A, FAIZ O, BELDUZ AO. Cloning, expression and characterization of highly thermo- and pH-stable maltogenic amylases from a thermophilic bacterium *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. 821-828, 2010.

YIN, Y.; MAO, Y.; YIN, X.; GAO, B.; WEI, D. Construction of a shuttle vector for heterologous expression of a novel fungal α -amylase gene in *Aspergillus oryzae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 988-998, 2015. DOI: 10.4014/jmb.1410.10022.

YU, J.; CUI, P-J.; ZENG, W-L.; XIE, X-L.; LIN, G-B.; ZENG, L. Protective effect of selenium-polysaccharides from the mycelia of *Coprinus comatus* on alloxan-induced oxidative stress in mice. **Food Chemistry**, v. 117, n.1, pg. 42-47, 2009. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.03.073

YU, J.; CUI, P-J.; ZENG, W-L.; XIE, X-L.; LIN, G-B.; ZENG, L. Protective effect of selenium-polysaccharides from the mycelia of *Coprinus comatus* on alloxan-induced oxidative stress in mice. **Food Chemistry**, v. 117, n.1, pg. 42-47, 2009. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.03.073

ZAGHI JR., L. L.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; Carbon-to-nitrogen ratios for *Agaricus brasiliensis* on the axenic method. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 1, 2010.

ZAIDMAN, B-Z.; WASSER, S.P.; NEVO, E.; MAHAJNA, J. *Coprinus comatus* and *Ganoderma lucidum* interfere with androgen receptor function in LNCaP prostate cancer cells. **Molecular Biology Reports**, v. 35, n.2, pg. 107-117, 2008.

ZHAO, H.; LI, H.; LAI, Q.; YANG, Q.; DONG, Y.; LIU, X.; WANG, W.; ZHANG, J.; JIA, L. Antioxidant and hepatoprotective activities of modified polysaccharides from *Coprinus comatus* in mice with alcohol-induced liver injury. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 476-485, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.067

ZHOU, S.; LIU, Y.; YANG, Y.; TANG, Q.; ZHANG, J. Hypoglycemic Activity of Polysaccharide from Fruiting Bodies of the Shaggy Ink Cap Medicinal Mushroom, *Coprinus comatus* (Higher Basidiomycetes), on Mice Induced by Alloxan and Its Potential Mechanism. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 17, n. 10, p. 957–964, 2015.

ZILLY, A; BAZANELLA, G. C. S.; HELM, C. V.; ARAÚJO, C. A. V.; SOUZA, C. G. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Solid-State Bioconversion of Passion Fruit Waste by White-Rot Fungi for Production of Oxidative and Hydrolytic Enzymes. **Food And Bioprocess Technology**, v. 5, n. 5, p.1573-1580, 2011. DOI: 10.1007/s11947-011-0532-8

ZYDNEY, A. L. Continuous downstream processing for high value biological products: A review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 3, p. 465-475, 2016.

CAPÍTULO II

ADEBAYO-TAYO, B. C.; UGWU, E. E. Influence of different nutrient sources on exopolysaccharide production and biomass yield by submerged culture of *Trametes versicolor* and *Coprinus sp.* **AU Journal of Technology**, v. 15, n. 2, p. 63-69, 2011.

AGHAEI, H.; MOHAMMADBAGHERI, Z.; HEMASI, A.; TAGHIZADEH, A. Efficient hydrolysis of starch by α -amylase immobilized on cloisite 30B and modified forms of cloisite 30B by adsorption and covalent methods. **Food Chemistry**, v. 373, n. A, 2022. Doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131425

ALPHA-amylase Baking Enzyme Market. Future Market Insights. Maio de 2022. Disponível em: <<https://www.futuremarketinsights.com/reports/alpha-amylase-baking-enzyme-market>>. Acesso em: 27 dez. 2022.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Washington, DC: Official Methods of Analysis, 1995.

BALAKRISHNAN, R.; SILVA, R. T.; HWA, T.; CREMER, J. Suboptimal resource allocation in changing environments constrains response and growth in bacteria. **Molecular Systems Biology**, v. 17, 2021. Doi: 10.15252/msb.202110597

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 1994, p. 277-294, 1994. Doi: 10.1016/0168-1605(94)90157-0

Cheng, K. C.; Demirci, A.; Catchmark, J. M.; Puri, V. M. Modeling of pullulan fermentation by using a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 353–359, 2010. Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.01.011

COBAN, H. B.; DEMIRCI, A. Enhancement and modeling of microparticle-added *Rhizopus oryzae* lactic acid production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 2, p. 323-330, 2016. Doi: 10.1007/s00449-015-1518-0

CRUZ, A. M.; GUZATTI, N. C. Custos e lucratividade na produção de bovinos no sistema de pecuária extensiva, no município de Denise-MT. **Revista UNEMAT de Contabilidade**, v. 8, n. 16, p. 155–179, 2019. Doi: 10.30681/ruc.v8i16.3434

DANTIGNY, P.; PANAGOU, E. **Predictive Mycology** (1th ed.). NewYork, NY: Nova Publishers, 2013.

FARIAS, T. C.; KAWAGUTI, H. Y.; KOBLITZ, M. G. B. Microbial amylolytic enzymes in foods: Technological importance of the *Bacillus* genus. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, 2021. Doi: 10.1016/j.bcab.2021.102054

FASIM, A.; MORE, V. S.; MORE, S. S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 68-76, 2021. Doi: 10.1016/j.copbio.2020.12.002

FRANTZ, S. C.; PALUDO, L. C.; STUTZ, H.; SPIER, M. R. Production of amylases

from *Coprinus comatus* under submerged culture using wheat-milling by-products: Optimization, kinetic parameters, partial purification, and characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 82-92, 2019. Doi: 10.1016/j.bcab.2018.11.004

FUWA, H. A. A new method for micro determination of amylase activity using amylase as the substrate. **The Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954. Doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a126476

GERMEC, M.; GÜRLER, H. N.; OZCAN, A.; ERKAN, S. B.; KARAHALIL, E.; TURHAN, I. Medium optimization and kinetic modeling for the production of *Aspergillus niger* inulinase. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, p. 217–232, 2020.

GOMES, T. A.; FONTANA, É.; ZIELINSKI, A. A. F.; NOGUEIRA, A.; SPIER, M. R. Optimizing the growth-associated β -galactosidase production by probiotic *Lactobacillus reuteri* B-14171: experimental design, culture medium volume increase, and cell growth modeling. **Scientia Plena**, v. 17, p. 1-15, 2021. Doi: 10.14808/sci.plena.2021.040203

IBRAHIM, N. A.; EID, B. M.; AMIN, H. A. Sustainable textile finishing processes and pollution control based on enzyme technology. **Green Chemistry for Sustainable Textiles**, p. 385-415, 2021. Doi: 10.1016/B978-0-323-85204-3.00018-X

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4^a Ed., São Paulo, 2008.

IRAM, N.; SHAKIR, H. A.; KHAN, M.; ALI, S.; ANWER, A.; SAEED, S.; QAZI, J. I. Statistical optimization of amylase production using grape fruit peels in submerged fermentation. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 43, n. 1, 2021. Doi: 10.4025/actascitechnol.v43i1.50538

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from a halo-tolerant *Bacillus clausii* I-52: enhanced production and simple purification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 491- 497, 2005. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02464.x

JUJJAVARAPU, S. E.; DHAGAT, S. Evolutionary trends in industrial production of α -amylase. *Recent Patents on Biotechnology*, v. 13, n. 1, p. 4-18, 2019. Doi: 10.2174/2211550107666180816093436

KARGI, F. Re-interpretation of the logistic equation for batch microbial growth in relation to Monod kinetics. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 398–401, 2009. Doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02537.x

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 7, p. 561-94, 1999. Doi: 10.1016/s0734-9750(99)00027-0

KUMARI, N.; SUSHIL; RANI, B.; MALIK, K.; AVTAR, R. Microbial amylases: Na overview on recent advancement. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 7, n. 1, p. 198-205, 2019.

LIN, C.-Y.; LAY, C. H. Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 275–281, 2004. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2003.07.002

MAHDINIA, E.; MAMOURI, S. J.; PURI, V. M.; DEMIRCI, A.; BERENJIAN, A. Modeling of vitamin K (Menaquinone-7) fermentation by *Bacillus subtilis natto* in biofilm reactors. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, n. 2019, p. 196-202, 2019. Doi: 10.1016/j.bcab.2018.11.022

MOHAMMAD, F.H.A.; BADR-ELDIN, S.M.; EL-TAYEB, O.M.; EL-RAHMAN, O.A. Polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* III. The influence of initial sucrose concentration on batch kinetics. **Biomass Bioenergy**, v. 8, n. 1995, p. 121-129, 1995.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Review of Microbiology**, v. 8, p. 371– 374, 1949. Doi:10.1146/annurev.mi.03.100149.002103

MU, Y.; WANG, G.; YU, H-Q. Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 11, p. 1302-1307, 2005. Doi: 10.1016/j.biortech.2005.05.014

OSADOLOR, O. A.; NAIR, R. B.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Empirical and experimental determination of kinetics of pellet growth in filamentous fungi: A case study using *Neurospora intermedia*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 124, p. 115-121, 2017. Doi: 10.1016/j.bej.2017.05.012

PALUDO, L. C.; FRANTZ, S. C.; ANÇAY, JR., R.; STUTZ, H.; DANTAS, T. L. P.; SPIER, M. R. Optimization, kinetic and bioprocess parameters of amylases production from *Coprinus comatus* under submerged culture using starch-based simple medium: Partial enzyme characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. 2018, p. 529-537, 2018. Doi: 10.1016/j.bcab.2018.09.022

PARIS, L. D.; SCHEUFELE, F. B.; JÚNIOR, A. T.; GUERREIRO, T. L.; HASAN, S. D. M. Produção de complexos enzimáticos por *A. niger* a partir de soja por fermentação em estado sólido. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 34, n. 2, p. 193-200, 2012. Doi: 10.4025/actascitechnol.v34i2.9447

PAUL, J. S.; LALL, B. M.; JADHAV, S. K.; TIWARI, K. L. Parameter's optimization and kinetics study of α -amylase enzyme of *Bacillus* sp. MB6 isolated from vegetable waste. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 123-129, 2017. Doi: 10.1016/j.procbio.2016.10.005

PORFIRIF, M. C.; MILATICH, E. J.; FARRUGGIA, B. M.; ROMANINI, D. Production of alpha-amylase from *Aspergillus oryzae* for several industrial applications in a single step. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1022, p. 87-92, 2016. Doi: 10.1016/j.jchromb.2016.04.015

RAMPRAKASH, B.; MUTHUKUMAR, K. Comparative study on the performance of various pretreatment and hydrolysis methods to produce biohydrogen using *Enterobacter aerogenes* RM 08 from rice mill wastewater. **International Journal of**

Hydrogen Energy, v. 40, n. 30, p. 9106-9112, 2015. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2015.05.027

RUAN, Y.; ZHANG, R.; XU, Y. Directed evolution of maltogenic amylase from *Bacillus licheniformis* R-53: Enhancing activity and thermostability improves bread quality and extends shelf life. **Food Chemistry**, v. 381, 2022. Doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132222

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial. Engenharia bioquímica** (2th ed). São Paulo, SP: Blucher, 2021.

SIQUEIRA, A. A.; CARVALHO, P. G. S.; MENDES, M. L. M.; SHIOSAKI, R. K. MicroFit: um software gratuito para desenvolvimento e ajuste de modelos matemáticos de crescimento bacteriano. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 4, p. 329-339, 2014. Doi: 10.1590/1981-6723.6414

SPIER, M. R.; LETTI, L. A. J.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. A simplified model for *A. niger* FS3 growth during phytase formation in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, 2009. Doi: 10.1590/S1516-89132009000700020

TARAFDAR, A.; SIROHI, R.; GUAR, V. K.; KUMAR, S.; SHARMA, P.; VARJANI, S.; PANDEY, H. O.; SINDHU, R.; MADHAVAN, A.; RAJASEKHARAN, R.; SIM, S. J. Engineering interventions in enzyme production: Lab to industrial scale. **Bioresource Technology**, v. 326, 2021. Doi: 10.1016/j.biortech.2021.124771

UDDIN, M. R.; FERDOUS, K.; RAHMAN, M. A.; ROY, A. K.; KHAN, M. R. Amylatic Activity of *Agaricus* and Moulds to produce Bioethanol. **Chemical Engineering and Science**, v. 1, n. 1, p. 7-11, 2013. Doi: 10.12691/ces-1-1-2

VAN GINKEL, S.; SUNG, S.; LAY, J. J. Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. **Environmental Science & Technology**, v. 35, p. 4726-4730, 2001.

VAZ, M. R. F.; ANDRADE, S. S. L.; SOUSA JR., F. C.; MARTINS, D. R. A.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R. Medium composition effect on the expression of lack antigen from *Leishmania chagasi* in *Escherichia coli*. **International Review of Chemical Engineering (Testo Stampato)**, v. 3, n. 1, p. 82-86, 2011.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN, T.; RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990. Doi: 10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990

CAPÍTULO III

ABD-ELAZIZ, A. M.; KARAM, E. A.; GHANEM, M. M.; MOHARAM, M. E.; KANSOH, A. L. Production of a novel α -amylase by *Bacillus atrophaeus* NRC1 isolated from honey: Purification and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 148, p. 292-301, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.120.

ABDULAAL, W. H. Purification and characterization of α -amylase from *Trichoderma pseudokoningii*. **BMC Biochemistry**, v. 19, n. 4, p. 4–9, 2018.

AISIEN, E. T.; H., I. I. Production, purification, and characterization of α -amylase from *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* using cassava peels as substrate. **Nig. J. Biotech**, v. 36, n. 2, p. 114–126, 2019.

ALADEJANA, O. M., OYEDEJI, O., OMOBOYE, O. O., BAKARE, M. K. Production, purification and characterization of thermostable alpha amylase from *Bacillus subtilis* Y25 isolated from decaying yam (*Dioscorea rotundata*) tuber. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 12, p. 154–171, 2020.

AL-DHABI, N. A.; ESMAIL, G. A.; GHILAN, A. M.; *et al.* Isolation and purification of starch hydrolysing amylase from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 obtained from the Jazan region of Saudi Arabia with industrial applications. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 1226–1232, 2020. DOI: 10.1016/j.jksus.2019.11.018.

ALMEIDA, P. Z., PEREIRA, M. G., DE CARVALHO, C. C., *et al.* Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian atlantic forest. **Biota Neotropica**, v. 17, n. 3, p. 0–5, 2017.

ASTOLPHO, H. A., CARMO, E. J., ASTOLFI FILHO, S. Expressão e caracterização de alpha-amilase de *Bacillus licheniformis* DSM13 em levedura *Pichia pastoris*. **Scientia Amazonia**, v. 6, n. August, p. 107–118, 2017.

BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications**. 2°. ed. California: John Referências Bibliográficas 90 Wiley e Sons, 538p.,2004.

BALAKRISHNAN, M.; JEEVARATHINAM, G.; KUMAR, S. K. S.; MMUNIRAJ, I.; SIVAKUMAR. Optimization and scale-up of α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes. **BMC Biotechnology**, 21 (33), 2021. DOI: 10.1186/s12896-021-00686-7.

BARROS S.T.D., ANDRADE C.M.G., MENDES E.S., PERES L., Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration, **Journal of Membrane Science**, v. 215, p. 2133 - 224, 2003

BEKLER, F. M.; GÜVEN, K.; GÜVEN, R. G. Purification and characterization of novel α -amylase from *Anoxybacillus ayderensis* FMB1. **Biocatalysis and Biotransformation**,p. 1–11, 2020. DOI: 10.1080/10242422.2020.1856097.

BHANJA, T.; ROUT, S.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Comparative profiles of α -amylase production in conventional tray reactor and GROWTEK bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, p. 369-376, 2007.

BHATIA, K.; MAL, G.; BHAR, R.; JYOTI, A. C., SETH, A. Purification and characterization of thermostable superoxide dismutase from *Anoxybacillus gonensis* KA 55 MTCC 12684. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2018. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.031.

BHATT, K., LAL, S., SRINIVASAN, R., JOSHI, B. Molecular analysis of *Bacillus velezensis* KB 2216, purification and biochemical characterization of alpha-amylase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3332–3339, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.205.

BHATTAACHARJEE, C.; SAXENA, V. K.; DUTTA, S. Analysis of fouling and juice quality in crossflow ultrafiltration of watermelon juice. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, 2018. Doi: 0.1590/1678-457X.15217

DEY, T. B.; BANERJEE, R. Purification, biochemical characterization and application of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 83-90, 2015. Doi: 10.1016/j.bcab.2014.10.002.

FERRARI, M., MAZZOLI, R., MORALES, S., *et al.* Enzymatic laundry for old clothes: immobilized alpha-amylase from *Bacillus* sp. for the biocleaning of an ancient Coptic tunic. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 7041–7052, 2017.

FINCAN, S. A., OZDEMIR, S., KARAKAYA, A., *et al.* Purification and characterization of thermostable α -amylase produced from *Bacillus licheniformis* So-B3 and its potential in hydrolyzing raw starch. **Life Sciences**, v. 264, n. May 2020, p. 1–9, 2021.

FRANTZ, S. C.; PALUDO, L. C.; STUTZ, H.; SPIER, M. R. Production of amylases from *Coprinus comatus* under submerged culture using wheat-milling by-products: Optimization, kinetic parameters, partial purification, and characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 82-92, 2019. Doi: 10.1016/j.bcab.2018.11.004

FUWA, H. A new method for micro determination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **The Journal of Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 583–603, 1954.

GERKE, I. B. B.; HAMERSKI, F., SCHEER, A. P., SILVA, V. R. Clarification of crude extract of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) by membrane processes: analysis of fouling and loss of bioactive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 204-212, 2017.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. 67 Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.

HAZAA, M. M., SABAE, S. Z., AREEJ, I. F. T., AYMAN S. ELDOURGHAMY, SAYED, H. Production, Purification and Characterization of Alfa-amylase produced by Bacteria from Pharaonic Lake. **Journal of Basic and Environmental Sciences**, v. 5, p. 162–173, 2018.

IQBAL, S.; NGUYEN, T.; NGUYEN, T. T.; MAISHBERGER, T.; HALTRICH, D. β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFF1: biochemical characterization and formation of probiotic galacto-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 1408-1416. 2010. DOI: 10.1016/J.CARRES.2010.03.028.

KALIA, S., BHATTACHARYA, A., KUMAR, S., MALIK, A. Utilization of starch effluent from a textile industry as a fungal growth supplement for enhanced α -amylase production for industrial application. **Chemosphere**, v. 279, p. 130554, 2021. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.130554.

KARAM, E. A., WAHAB, W. A. A., SALEH, S. A. A., *et al.* Production, immobilization and thermodynamic studies of free and immobilized *Aspergillus awamori* amylase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 694–703, 2017.

KARIM, K. M. R., HUSAINI, A., SING, N. N., *et al.* Purification of an α amylase from *Aspergillus flavus* NSH9 and molecular characterization of its nucleotide gene sequence. **3 Biotech**, v. 8, n. 204, 2018. DOI: 10.1007/s13205-018-1225-z.

KIKANI, B., KOURIEN, S., RATHOD, U. Stability and thermodynamic attributes of starch hydrolyzing α -amylase of *Anoxybacillus rupiensis* TS-4. **Starch- Starke**, v. 72, n. 1–2, 2019.

KILIKIAN, B. V., PESSOA JR, A. **Purificação de Produtos Biotecnológicos - Operações e processos com aplicação industrial**. 2° ed. Blucher, 2020.

KIZHAKEDATHIL, M. P. J., SUBATHARA, D. C. Acid stable α -amylase from *Pseudomonas balearica* VITPS19 — Production, purification and characterization. **Biotecnologia Relatório**, v. 30, p. 0–7, 2021.

KOHLI, I., JOSHI, N. C., VARMA, A. Production, purification and applications of raw starch degrading and calcium-independent α -amylase from soil rich in extremophile. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 873–881, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.160>.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680-685, 1970.

LAKSHMI, S. S., MAHESH, C. H., GAYATRI, K., MANISHA, P., AISHWARYA, K. Statistical optimization of amylase production and its purification from a palm wine isolate *Bacillus* sp., Q-164. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, n. July, p. 101820, 2020. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101820.

LUANG-IN, V., YOTCHAISARN, M., SAENGHA, W., *et al.* Isolation and Identification of Amylase-producing Bacteria from Soil in Nasinuan Community Forest, Maha Sarakham, Thailand. **Biomed Pharmacol J**, v. 12, n. 3, 2019.

MANERA, A. P., MEINHARDT, S., KALIL, S. J. Purificação de amiloglicosidase de *Aspergillus niger*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 651–658, 2011.

MARSHAK, D. R.; BURGESS, R. R.; KNURTH, M. **Strategies for protein purification and characterization: A laboratory course manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.

MULAY, Y. R., DEOPURKAR, R. L. Purification, Characterization of Amylase from Indigenously Isolated *Aureobasidium pullulans* Cau 19 and Its Bioconjugates with Gold Nanoparticles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2017.

NGUYEN, T. K.; LEE, M. W.; YOON, K. N.; KIM, H. Y.; JIN, G.-H.; CHOI, J.-H.; IM, K. H.; LEE, T. S. In vitro antioxidant, anti-diabetic, anti-cholinesterase, tyrosinase and nitric oxide inhibitory potential of fruiting bodies of *Coprinellus micaceus*. **Journal of Mushroom**, v. 12, n. 4, p. 330–340, 2014. DOI: 10.14480/jm.2014.12.4.330

NWAGU, T.N.; OKOLO, B.N. Extracellular Amylase Production of a Thermotolerant *Fusarium* sp. Isolated from Eastern Nigerian Soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p. 649-658, 2011. Doi:10.1590/S1516-89132011000400002

PALUDO, L. C., FRANTZ, S. C., ANÇAY, R., *et al.* Optimization, kinetic and bioprocess parameters of amylases production from *Coprinus comatus* under submerged culture using starch-based simple medium: Partial enzyme characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, 2018.

PASIN, T. M. *et al.* Purification and functional properties of a novel glucoamylase activated by manganese and lead produced by *Aspergillus japonicus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p.779-788, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.016.

PAUL, J. S., LALL, B. M., JADHAV, S. K., TIWARI, K. L. Parameter's optimization and kinetics study of α -amylase enzyme of *Bacillus* sp. MB6 isolated from vegetable waste. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 123–129, 2017. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.10.005.

PRIYADARSHINI, S., PRADHAN, S. K., RAY, P. Production, characterization and application of thermostable, alkaline α -amylase (AA11) from *Bacillus cereus* strain SP-CH11 isolated from Chilika Lake. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 804–812, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.149>.

RAMESH, V.; MURTY, V. R. Sequential statistical optimization of media components for the production of glucoamylase by thermophilic fungus *Humicola grisea* MTCC 352. **Enzyme Research**, v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/317940

RODRIGUES, P. O.; PEREIRA, J. C.; SANTOS, D. Q.; GURGEL, L. V. A.; PASQUINI, D.; BAFFI, Synergistic action of an *Aspergillus* (hemi-)cellulolytic consortium on sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 173-181, 2017.

SHAFIQUE, S., SHAFIQUE, S. Partial purification and characterization of α -amylase from hyperactive mutants of *Aspergillus niger* for economic enzyme production and starch hydrolysis. **Int. J. Biol. Biotech**, v. 14, n. 2, p. 159–167, 2017.

SINGH, R.; KUMAR, V.; KAPOOR, V. Partial purification and characterization of a heat stable α -amylase from a thermophilic actinobacteria, *Streptomyces* sp. MSC702. **Enzyme Research**, v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/106363

SIQUEIRA, E. M. D.; MIZUTA, K.; GIGLIO, J. R. *Pycnoporus sanguineus*: a novel source of alpha-amylase. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, p. 188-190, 1997.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. e. Application of microbial α -amylase in industry – A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p.850-861, 2010.DOI: 10.1590/s1517-83822010000400004.

SPIER, M. R.; FENDRICH, R. C.; ALMEIDA, P. C.; NOSEDA, M.; GREINER, R.; KONIETZNY, U.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Phytase produced on citric byproducts: purification and characterization. **World Journal of microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 267-274, 2011.

SUDAN, S. K.; KUMAR, N.; KAUR, I.; SAHNI, G. Production, purification and characterization of raw starch hydrolyzing thermostable acidic α -amylase from hot springs, India. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, n. 2018, p. 831-839, 2018.

TIMILSINA, P. M., PANDEY, G. R., SHRESTHAA, A., OJHA, M., KARKI, T. B. Purification and characterization of a noble thermostable algal starch liquefying alpha-amylase from *Aeribacillus pallidus* BTPS-2 isolated from geothermal spring of Nepal. **Biotechnology Reports**, v. 28, p. e00551, 2020. DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00551.

VAZ, M. R. F.; ANDRADE, S. S. L.; SOUSA JR., F. C.; MARTINS, D. R. A.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R. Medium composition effect on the expression of lack antigen from *Leishmania chagasi* in *Escherichia coli*. **International Review of Chemical Engineering (Testo Stampato)**, v. 3, n. 1, p. 82-86, 2011.

XIE, F., QUAN, S., LIU, D., *et al.* Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 47–53, 2014.

CAPÍTULO IV

AKATA, I.; ZENGIN, G.; PICOT, C. M. N.; MAHOMOODALLY, M. F. Enzyme inhibitory and antioxidant properties of six mushroom species from the *Agaricaceae* family. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 95–99, 2019. DOI: 10.1016/j.sajb.2018.01.008.

ALMEIDA, P. Z.; PEREIRA, M. G.; CARVALHO, C. C.; HEINEN, P. R.; ZIOTTI, L. S.; MESSIAS, J. M.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. **Biota Neotropica**, v. 17, n. 3, 2017. DOI: 10.1590/1676-0611-bn-2017-0337.

ARRIOLA, N. A.; Dos-SANTOS, G. D.; PRUDENCIO, E. S.; VITALI, L.; PETRUS, J. C. C.; & AMBONI, R. D. M. C. Potential of nanofiltration for the concentration of bioactive compounds from watermelon juice. **International Journal of Food Science and Tecnology**, v. 49, n. 9, p. 2052-2060, 2014.

ASATIANI, M.; ELISASHVILI, V.; WASSER, S.; REZNICK, A.; EVIATAR, N. Free-radical scavenging activity of submerged mycelium extracts from higher basidiomycetes mushrooms. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 71, p. 3090–3092, 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis*.

Washington, DC: Official Methods of Analysis, 1995.

ASTOLPHO, H. A.; CARMO, E. J.; ASTOLFI-FILHO, S. Expressão e caracterização de α -amilase de *Bacillus licheniformis* DSM13 em levedura *Pichia pastoris*. **Scientia Amazonia**, v.6, n. 3, p.107-118, 2017.

BACH, F.; ZIELINSKI, A. A. F.; HELM, C. V.; MACIEL, G. M.; PEDRO, A. C.; STAFUSSA, A. P.; ÁVILA, S.; HAMINIUK, C. W. I. (2019). Bio compounds of edible mushrooms: in vitro antioxidant and antimicrobial activities. **LWT- Food Science and Technology**, v. 107, p. 214-220, 2019.

BELLATTO, G. A., BRAGUINI, W. L. Assessment of the use of cooked *Araucaria angustifolia* seed coats extract as food for brine shrimp. **Journal of Environmental Science and Health - Part B**, v. 55, n. 9, p. 813–819, 2020. DOI: 10.1080/03601234.2020.1786327

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.

BERNARDES, A. V.; MARTINS, E. S.; MATA, J. F.; FERREIRA, O. E. Utilization of agro-industrial by-products for the production of α -amylase by *Rhizomucor miehei*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 2, pg. 1439-1451, 2014. DOI: 10.3895/S1981-36862014000200012

BOONTHATUI, Y.; CHONGSUWAT, R.; KITTISAKULNAM, S. Production of Antioxidant Bioactive Compounds during Mycelium Growth of *Schizophyllum commune* on Different Cereal Media. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences**, v. 20, n. 2, 2021. DOI: 10.12982/CMUJNS.2021.032

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5

DANGELICO, R. M.; VOCALELLI, D. Green Marketing: An analysis of definitions, strategy steps, and tools through a systematic review of the literature. **Journal of Cleaner Production**, v. 165, p. 1263–1279, 2017. DOI: 10.1016/j.jclepro.2017.07.184

DO, J. H.; KIM, S. D. Properties of Amylase produced from Higer Fungi *Ganoderma Lucidum*. **Korean Journal Applied Microbiology and Bioengineering**, v. 13, 1985.

IRSHAD, M. Purification and characterization of α -amylase from *Ganoderma tsuage* growing in waste bread medium. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 33, p. 8288–8204, 2012.

DU, F.; WANG, H. X.; NG, T. B. An amylase from fresh fruiting bodies of the monkey head mushroom *Hericium erinaceum*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 1, pg. 23-27, 2013.

FONSECA, L. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cogumelos destoxicantes e seus resíduos pós-cultivo. 2017. 64 f., il. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

FINCAN, S. A.; OZDEMIR, S.; KARAKAYA, A.; ENEZ, B.; MUSTAFOV, S. D.; ULUTAS, M. S.; SEN, F. Purification and characterization of thermostable α -amylase produced from *Bacillus licheniformis* So-B3 and its potential in hydrolyzing raw starch. **Life Sciences**, v. 264, n. 2021, p. 1–9, 2021. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118639

FRANTZ, S. C.; PALUDO, L. C.; STUTZ, H.; SPIER, M. R. Production of amylases from *Coprinus comatus* under submerged culture using wheat-milling by-products: Optimization, kinetic parameters, partial purification and characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 82–92, 2019. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.11.004

FUWA, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **The Journal of Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 583–603, 1954. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a126476

HAYASHI, C.; RODRIGUES, L.; NOGUEIRA, D. S.; AUGUSTO, P.; PAMPLIN, Z. 16 ° Congresso Nacional do Meio Ambiente. p.1–5, 2019.

KANDASAMY, S.; CHINNAPPAN, S.; THANGASWAMY, S.; BALAKRISHNAN, S.; KHALIFA, A. Z. Assessment of antioxidant, antibacterial activities and bioactive. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, p. 1575-1581, 2019. DOI: 10.1007/s10989-019-09969-2

KEYPOUR, S.; RIAHI, H.; MORADALI, M-F.; RAFATI, H. Investigation of the antibacterial activity of a chloroform extract of Ling Zhi or *Reishi* medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (*Aphylllophoromycetideae*), from Iran. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 10, n. 4, p. 345-349, 2008. DOI:10.1615/IntJMedMushr.v10.i4.70

LEWANDOWSKA, A.; WITCZAK, J.; KURCZEWSKI, P. Green marketing today: a mix of trust, consumer participation and life cycle thinking. **Management**, v. 21, n. 2, p. 28–48, 2017.

MARTINEZ-ESCOBEDO, N. A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, F. J.; GALVÁN, J. V.; ALVAREZ-PARRILLA, E. Antimicrobial activity, phenolic compounds content, and antioxidant capacity of four edible macromycete fungi from *Chihuahua*, Mexico. **TIP [online]**, v. 24, p. 1-11 2021. DOI: 10.22201/fesz.23958723e.2021.318.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31–34, 1982.

MILES, P. G.; CHANG, S. T. **Biología de las setas: fundamentos básicos y acontecimientos actuales**. Hong Kong: World Scientific, p. 133, 1997.

NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATTHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia salina* L. (*Artemiidae*). *Pharmacologyonline*, v. 2, p. 458-78, 2011.

NGUYEN, T. K.; LEE, M. W.; YOON, K. N.; KIM, H. Y.; JIN, G.-H.; CHOI, J.-H.; IM, K. H.; LEE, T. S. In vitro antioxidant, anti-diabetic, anti-cholinesterase, tyrosinase and nitric oxide inhibitory potential of fruiting bodies of *Coprinellus micaceus*. **Journal of Mushroom**, v. 12, n. 4, p. 330–340, 2014. DOI: 10.14480/jm.2014.12.4.330

NIETO, I. J. R.; SALAMA, A. M.; CATAÑO, J. E. P.; CHEGWIN, C. A. Determinación de la toxicidad de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Paxillus involutus* sobre *Artemia salina*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 3, p.186–187, 2008. DOI: 10.1016/S1130-1406(08)70044-5

MURUCI, L. N. M.; SANTOS, R. R. S.; VIANA, L. A. N., DAMASO, M. C. T.; COURI, S.; PENHA, E. M. Estudo da estabilidade a temperatura, pH e a estocagem, de lipase produzida por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida. **Xth Brazilian Seminar on Enzyme Technology**, p. 2012, 2012.

ORHAN, I.; USTUN, O. Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 386–390, 2011.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C. S.; DUARTE, A. S. F.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 230-239, 2016.

OZALP, F. O.; CANBEK, M.; YAMAC, M.; KANBAK, G.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D.; UYANOGLU, M.; SENTURK, H.; KARTKAYA, K.; OGLAKCI, A. Consumption of *Coprinus comatus* polysaccharide extract causes recovery of alcoholic liver damage in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 8, pg. 994-1002, 2014. DOI: 10.3109/13880209.2013.874536

PALUDO, L. C.; FRANTZ, S. C.; ANÇAY, R.; STUTZ, H.; DANTAS, T. L. P.; SPIER, M. R. Optimization, kinetic and bioprocess parameters of amylases production from *Coprinus comatus* under submerged culture using starch-based simple medium: Partial enzyme characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 529–537, 2018. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.09.022

QUERESHI, S.; PANDEY, A.K.; SANDHU, S.S. Evaluation of antibacterial activity of different *Ganoderma lucidum* extracts. **People's Journal of Scientific Research**, v. 3, n. 1, p. 09-14, 2010.

RAMESH, V.; MURTY, V. R. Sequential statistical optimization of media components for the production of glucoamylase by thermophilic fungus *Humicola grisea* MTCC 352. **Enzyme Research**, v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/317940

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation

decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3

REIS, F.S.; MARTINS, A.; BARROS, L.; FERREIRA, I.C.F.R. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between in vivo and in vitro samples. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1201-1207, 2012.

RUIZ-GONZÁLEZ, L. E.; VÁZQUEZ-ZEA, J. A.; VEGA-VILLASANTE, F.; GUZMÁN-DÁVALOS, L.; GUERRERO-GALVÁN, S. R. Evaluación del efecto tóxico de hongos Basidiomycota en la eclosión de quistes de *Artemia franciscana*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 4, p. 220–224, 2017. DOI: 10.1016/J.RIAM.2017.03.007

SILVA, N. G. **Estudo da Capacidade Antioxidante de Cogumelos Comestíveis**, 2015.

SINGH, R.; KUMAR, V.; KAPOOR, V. Partial purification and characterization of a heat stable α -amylase from a thermophilic actinobacteria, *Streptomyces* sp. MSC702. *Enzyme Research*, v. 2014, 2014. DOI: 10.1155/2014/106363

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SIVAKUMAR, R.; VITRICHELVAN, T.; RAJENDRAN, N. N.; DEVI, M. I.; SUNDARAMOORTHY, K.; SHANKAR, A. S. K.; SHANMUGAN, S. Antibacterial activity of mushroom *Osmoporus odoratus*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 4, p. 523-524, 2006. DOI:10.4103/0250-474X.27836.

SPIER, M. R.; FENDRICH, R. C.; ALMEIDA, P. C.; NOSEDA, M.; GREINER, R.; KONIETZNY, U.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Phytase produced on citric byproducts: purification and characterization. **World J microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 267-274, 2011.

STOJKOVIC, D.; SMILJKOVIC, M.; CIRIC, A.; *et al.* An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase linked to type-2 diabetes. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 100–103, 2019. DOI: 10.1016/j.sajb.2018.01.007.

SUDAN, S. K.; KUMAR, N.; KAUR, I.; SAHNI, G. Production, purification and characterization of raw starch hydrolyzing thermostable acidic α -amylase from hot springs, India. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, n. 2018, p. 831-839, 2018.

TELES, A. M.; EVERTON, G. O.; NASCIMENTO, A. R.; TELLIS, C.; BEZERRA, G. F. B.; ALMEIDA-SOUZA, F.; AZEVEDO-SANTOS, A. P. S.; NASCIMENTO, M. D. S. B. Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato obtido do fungo *Penicillium purpurogenum* advindo de ambiente marinho poluído do Maranhão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e576986205, 2020. DOI:10.33448/rsd-v9i8.6205

TEŠANOVIĆ, K.; PEJIN, B.; ŠIBUL, F.; MATAVULJ, M.; RAŠETA, M.; JANJUŠEVIĆ, L.; KARAMAN, M. A comparative overview of antioxidative properties and phenolic profiles of different fungal origins: fruiting bodies and submerged cultures of *Coprinus comatus* and *Coprinellus truncorum*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 430–438, 2017. DOI: 10.1007/s13197-016-2479-2

TSAI, S-Y.; TSAI, H-L.; MAU, J-L. Antioxidant properties of *Coprinus comatus*. **Journal of Food Biochemistry**, v.33, n. 3, p. 368-389, 2009. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2009.00224.x.

VAZ, M. R. F. Influência das condições de cultivo na produção de antígenos recombinantes de *Leishmania i. chagasi* utilizando *Escherichia coli* M15 cultivada em incubador rotativo e biorreator. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, p. 1–112, 2011.

VEGA-VILLASANTE, F.; RUIZ-GONZÁLEZ, L. E.; GUERRERO-GALVÁN, S. R.; GUZMÁN-DÁVALOS, L. Evaluación de la toxicidad de *Psilocybe cubensis* (Agaricales, Basidiomycota) sobre *Artemia franciscana* (Crustacea, Anostraca). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n.1, p. 54–56, 2013. DOI: 10.1016/J.RIAM.2012.06.001

ZENGİN, G.; KARANFIL, A.; UREN, M. C.; KOCAK, M. S.; SARIKURKCU, C.; GUNGOR, H.; NANCY PICOT, C. M.; MAHOMOODALLY, M. F. Phenolic content, antioxidant and enzyme inhibitory capacity of two: *Trametes species*. **RSC Advances**, v. 6, n. 77, p. 73351–73357, 2016. DOI: 10.1039/c6ra09991b

ZHAO, H.; LI, H.; LAI, Q.; YANG, Q.; DONG, Y.; LIU, X.; WANG, W.; ZHANG, J.; JIA, L. Antioxidant and hepatoprotective activities of modified polysaccharides from *Coprinus comatus* in mice with alcohol-induced liver injury. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 476-485, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.067

CAPÍTULO V

ARAUJO, W. J. DE, COSTA, A. F. DA, ROSSI, D. A., *et al.* Análise de custo da produção de champignon: estudo em uma propriedade rural no município de domingos martins-ES. **Revista Científica Intelletto**, v. 1, n. 1, p. 102–114, 2016.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Washington, DC: Official Methods of Analysis, 1995.

BACH, F., HELM, C. V., BELLETTINI, M. B., MACIEL, G. M., HAMINIUK, C. W. I. Edible mushrooms: A potential source of essential amino acids, glucans and minerals. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 11, p. 2382–2392, 2017.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.

BOONTHATUI, Y.; CHONGSUWAT, R.; KITTISAKULNAM, S. Production of Antioxidant Bioactive Compounds during Mycelium Growth of *Schizophyllum*

commune on Different Cereal Media. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences**, v. 20, n. 2, 2021. DOI: 10.12982/CMUJNS.2021.032

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5

CARRASCO-GONZÁLEZ, J.A; SERNA-SALDÍVAR, S.O; GUTIÉRREZ-URIBE, J.A. Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: **Potential use as food ingrediente**. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 58, p. 69- 81, 2017.

CHISTÉ, R. C. et. al. Qualidade da farinha de mandioca do grupo seca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 861-864, 2006.

DEEPALAKSHMI, K; MIRUNALINI, S. *Pleurotus ostreatus*: na oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. **J. Biochem. Tech.** v. 5, n. 2, p. 718-726, 2014.

FREIRE, J. O. **Cinética de secagem de cogumelos comestíveis e efeito da temperatura sobre os compostos antioxidantes**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Sudeste da Bahia, Bahia, Brasil, 2019.

FURLANI, R. P. X., GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis Nutritional value of edible mushrooms. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 154–157, 2007.

GIRO DO BOI. Fazenda reduz idade de abate em até 50% emprenhando novilhas mais cedo, 2021. Disponível em: < <https://www.girodoboi.com.br/destaques/fazenda-reduz-idade-de-abate-em-ate-50-emprenhando-novilhas-mais-cedo/#:~:text=Fazenda%20reduz%20idade%20de%20abate%20em%20at%C3%A9%2050%25%20emprenhando%20novilhas%20mais%20cedo,-Na%20Fazenda%20Mater&text=Por%20exemplo%2C%20os%20animais%20engordados,500%20quilos%20de%20peso%20m%C3%A9dio>>.

GONZÁLEZ, A., CRUZ, M., LOSOYA, C., *et al.* Edible mushrooms as a novel protein source for functional foods. **Food and Function**, v. 11, n. 9, p. 7400–7414, 2020.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª Ed., São Paulo, 2008.

IZLI, N; ISIK, E. Effect of different drying methods on drying characteristics, colour and microstructure properties of mushroom. **Journal of Food and Nutrition Research**. v. 53, n. 2, p. 105-116, 2014.

JUAN, W; CHONG, Z; ZHENTAO, Z; LUWEI, Y. Performance analysis of heat-pump dryer to dry mushroom. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 5, n. 2, p. 164-168, 2013.

KALAC, P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. **J. Sci. Food Agric.** v. 93, p. 209-218, 2013.

KOTWALIWALE, N; BAKANE, P; VERMA, A. Changes in textural and optical properties of oyster mushroom during hot air drying. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 1207- 1211, 2007.

KUMAR, K. Nutraceutical potential and processing aspects of oyster mushrooms (*Pleurotus Species*). **Current Nutrition & Food Science**, v. 15, p. 1–12, 2019.

MARTINS DA CRUZ, A., GUZATTI, N. C. Custos E Lucratividade Na Produção De Bovinos No Sistema 2019De Pecuária Extensiva, No Município De Denise-Mt. **Revista UNEMAT de Contabilidade**, v. 8, n. 16, p. 155–179.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31–34, 1982.

MILES, P. G.; CHANG, S. T. **Biología de las setas: fundamentos básicos y acontecimientos actuales**. Hong Kong: World Scientific, p. 133, 1997.

MOTTA, M. F., GERSHWIN, E., SELMI, C. Mushrooms and immunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 117, 2021.

NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATTHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia salina* L. (*Artemiidae*). **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 458-78, 2011.

NGUYEN, T. K.; LEE, M. W.; YOON, K. N.; KIM, H. Y.; JIN, G.-H.; CHOI, J.-H.; IM, K. H.; LEE, T. S. In vitro antioxidant, anti-diabetic, anti-cholinesterase, tyrosinase and nitric oxide inhibitory potential of fruiting bodies of *Coprinellus micaceus*. **Journal of Mushroom**, v. 12, n. 4, p. 330–340, 2014. DOI: 10.14480/jm.2014.12.4.330

NIETO, I. J. R.; SALAMA, A. M.; CATAÑO, J. E. P.; CHEGWIN, C. A. Determinación de la toxicidad de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Paxillus involutus* sobre *Artemia salina*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 3, p.186–187, 2008. DOI: 10.1016/S1130-1406(08)70044-5

NOWAKOWSKI, P.; NALIWAJKO, S. K.; MARKIEWICZ-ZUKOWSKA, R.; BORAWSKA, M. H.; SOCHA, K. The two faces of *Coprinus comatus*—Functional properties and potential hazards. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 11, p. 2932-2944, 2020.

NUNES, J. L. **Farinha de estipe do cogumelo shiitake (*Letinula edodes*): caracterização e desenvolvimento**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrônômicas), Unesp, Botucatu, SP, 2020.

ONU, U. N.-D. OF E. AND S. A. World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423). 2019.

ORO, T.; LIMBERGER, V. M.; MIRANDA, M. Z.; RICHARDS, N. S. P. S.; GUTKOSKI, L. C.; Francisco, A. Propriedades de pasta de mesclas de farinha integral com farinha refinada usadas na produção de pães. **Ciência Rural**, v. 43, p. 754-760, 2013.

PAULI, P. A., 2010 – **Avaliação da composição química, compostos bioativos e actividade antioxidante em cogumelos comestíveis**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Tese de Mestrado.

RATHORE H., PRASAD S., KAPRI M, TIWARI A., S. S. Medicinal importance of mushroom mycelium: mechanisms and applications. **Journal of Functional Foods**, v. 56, p. 182–193, 2019.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3

RUEGGGER M. J. S.; TORNISIELO, S. M. T.; BONONI, V. L. R.; CAPELARI, M. Cultivation of the edible mushroom *oudemansiella canarii* (jungh.) Höhn. In lignocellulosic substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 3, 2001.

RUIZ-GONZÁLEZ, L. E.; VÁZQUEZ-ZEA, J. A.; VEGA-VILLASANTE, F.; GUZMÁN-DÁVALOS, L.; GUERRERO-GALVÁN, S. R. Evaluación del efecto tóxico de hongos Basidiomycota en la eclosión de quistes de *Artemia franciscana*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 4, p. 220–224, 2017. DOI: 10.1016/J.RIAM.2017.03.007

SHARPE, E.; FARRAGHER-GNADT, A. P.; IGBANUGO, M.; HUBER, T.; MICHELOTTI, J. C.; MILENKIWIC, A.; LUDLAM, S.; WALKER, M.; HANES, D.; BRADLEY, R.; BOU-ABSALLAH, F. Comparison of antioxidant activity and extraction techniques for commercially and laboratory prepared extracts from six mushroom species. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 4, 2021.

SILVA, N. G. **Estudo da Capacidade Antioxidante de Cogumelos Comestíveis**, 2015.

SOUSA, H. C. **Caracterização e aplicação da farinha do cogumelo Shimeji (*Pleurotus ostreatus*) no processamento de hambúrgueres bovinos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Ciência de Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (BA), 2020.

STOJKOVIĆ, D., REIS, F. S., BARROS, L., *et al.* Nutrients and non-nutrients composition and bioactivity of wild and cultivated *Coprinus comatus* (O.F.Müll.) Pers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 289–296, 2013.

TEŠANOVIĆ, K.; PEJIN, B.; ŠIBUL, F.; MATAVULJ, M.; RAŠETA, M.; JANJUŠEVIĆ, L.; KARAMAN, M. A comparative overview of antioxidative properties and phenolic profiles of different fungal origins: fruiting bodies and submerged cultures of *Coprinus comatus* and *Coprinellus truncorum*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 430–438, 2017. DOI: 10.1007/s13197-016-2479-2

TOLERA, K.D; ABERA, S. Nutritional quality os oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) as affected by osmotic pretreatments and drying methods. **Food. Sci. Nutr.**, p. 1-8, 2017.

VALVERDE, M. E., HERNÁNDEZ-PÉREZ, T., PAREDES-LÓPEZ, O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. **International Journal of Microbiology**, p. 14, 2015.

VAZ, M. R. F.; ANDRADE, S. S. L.; SOUSA JR., F. C.; MARTINS, D. R. A.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R. Medium composition effect on the expression of lack antigen from *Leishmania chagasi* in *Escherichia coli*. **International Review of Chemical Engineering (Testo Stampato)**, v. 3, n. 1, p. 82-86, 2011.

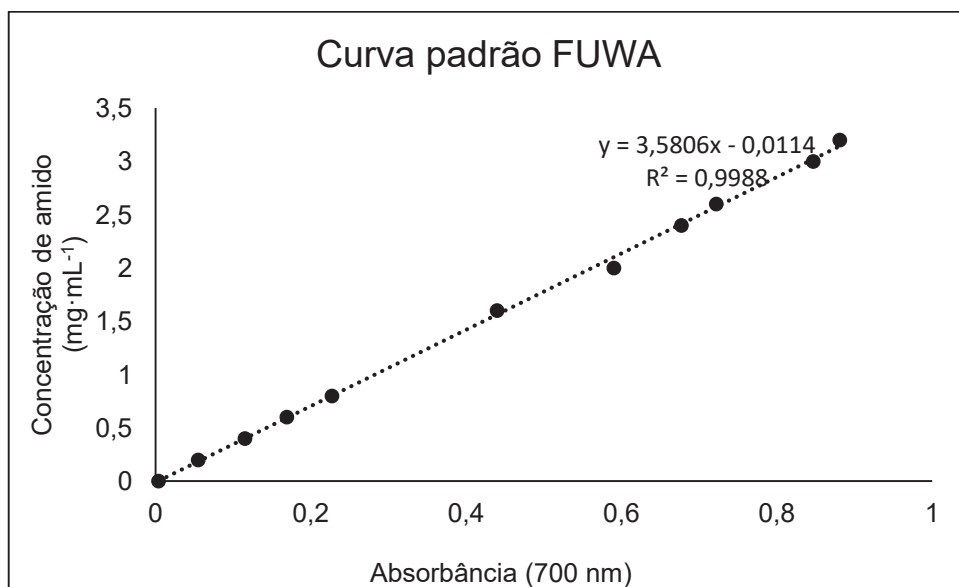
WORLDOMETER. World Population Projections, 2021. Disponível em: <<https://www.worldometers.info/world-population/world-population-projections/>>.

XU, X; YAN, H; CHEN, J; ZHANG, X. Bioactive proteins from mushrooms. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 667-674, 2011.

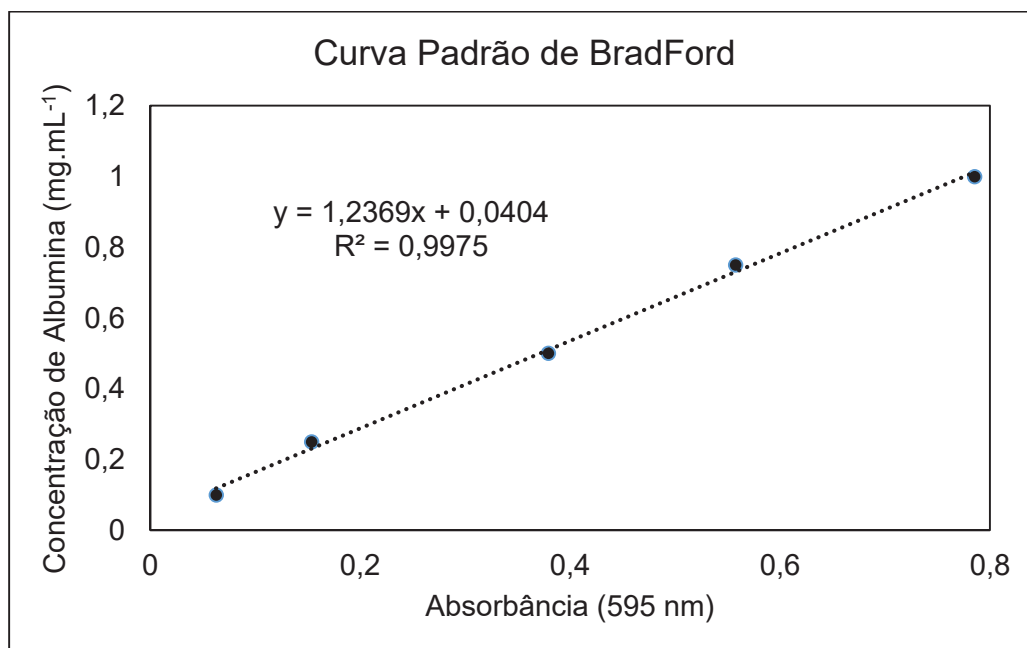
ZENGİN, G.; KARANFIL, A.; UREN, M. C.; KOCAK, M. S.; SARIKURKCU, C.; GUNGOR, H.; NANCY PICOT, C. M.; MAHOMOODALLY, M. F. Phenolic content, antioxidant and enzyme inhibitory capacity of two: *Trametes species*. **RSC Advances**, v. 6, n. 77, p. 73351–73357, 2016. DOI: 10.1039/c6ra09991b

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – CURVA PADRÃO FUWA



APÊNDICE 2 – CURVA PADRÃO BRADFORD



APÊNDICE 3 – PREPARO DO REATIVO DE BRADFORD

Em balança analítica pesar 50 mg de *Coomassie brilliant blue* G250 e dissolver em 25 mL de etanol, em seguida deixar *overnight*. A esta solução deve-se adicionar

50 mL de ácido fosfórico (85%), transferir de forma analítica para um balão volumétrico de 500mL e após, completar o volume com água milli-Q. A solução deve ser filtrada duas vezes e mantida ao abrigo da luz (em frasco âmbar envolto por papel alumínio

APÊNDICE 4 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE A-AMILASE

O extrato bruto enzimático (EBE) (20 µL) será diluído em 180 µL de tampão acetato (pH 5,0), adicionados em tubos de ensaio contendo 200 µL de solução de amido a 1% (preparada em tampão acetato, pH 6,0), e incubados em banho-maria a $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Para interromper a reação, será adicionado uma solução de ácido acético 2M (400 µL) e diluída em 20 mL de água destilada. Na sequência, será adicionado 400 µL de solução de iodo/iodeto (iodo a 0,2% p·v⁻¹, iodeto de potássio a 2% p·v⁻¹ e água destilada, 1:1:3), homogeneizada e a absorbância lida a 700 nm em um espectrofotômetro (Marca Quimis modelo Q898DPT). A atividade da α-amilase é expressa U (Unidades Internacionais), sendo que um U representa a quantidade de enzima capaz de converter 0,1 mg de amido por mL por minuto na reação sob as condições de teste ($50\pm 2^{\circ}\text{C} \cdot 15 \text{ min}$).

APÊNDICE 5 - DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA DO *COPRINUS COMATUS* AO LONGO DA INCUBAÇÃO

O método termogravimétrico foi utilizado para a determinação da biomassa formada (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). A biomassa foi separada do meio de cultivo com o auxílio de uma peneira e água destilada. A biomassa separada foi incubada em placas de Petri, previamente pesadas e após secas em estufas ($105^{\circ}\text{C}/24\text{h}$). Posteriormente, foi resfriada (30 min) em dessecador. A biomassa foi calculada pela equação (2), a qual determina a biomassa seca (X_s) em g·L⁻¹. O cálculo é realizado por meio da razão entre diferença entre os valores da massa da placa com a biomassa seca (m_2 em g), massa da placa de Petri seca (m_1 em g), e o volume do cultivo (V em L).

$$X_s = \frac{(m_2 - m_1)}{V} \quad (2)$$

APÊNDICE 6 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMIDO

A metodologia da AOAC (996.11, 1995), com adaptações de Frantz *et al.* (2019), foi utilizada para a quantificação de amido nas amostras de cultivo (o detalhamento do método pode ser visto no apêndice 5. A concentração de amido foi calculada na amostra por meio da Equação 1.

$$\text{Amido}(\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) = \Delta A \times F \times 0,01 \times 0,9 \times 5,5 \times D \quad (1)$$

Em que: ΔA = a absorbância da amostra menos a absorbância do reagente; F = é a relação de 100 μg de D-glicose pela absorbância de 100 μg de glicose (padrão que representa o fator de conversão da absorbância para μg de glicose); 0,01= é o fator utilizado para converter μg de glicose em 0,01 mL, volume da quantificação, para g de glicose por L de amostra; 0,9= é o fator de conversão de D-glicose livre em anidro-D-glicose; 5,5= é o fator de diluição que será utilizado nas amostras com as soluções das enzimas na hidrólise; D = posteriores diluições que forem necessárias.

As alíquotas retiradas serão incubadas em banho com água em ebulição por um período de 10 minutos para inativar as enzimas. Um volume de 2 mL de cada amostra será transferido para um tubo Falcon de 15 mL juntamente com 8 mL de etanol 95% v.v⁻¹, para a extração das dextrinas e glicose. Posteriormente estes tubos serão agitados em vórtex e conservado em temperatura ambiente por meia hora. Após este período, as amostras serão centrifugadas (centrífuga Centribio®, Brasil) com uma rotação de 1000g por 15 min, o sobrenadante será descartado e o retido será diluído em 1 mL de água e hidrolisado por enzimas comerciais.

Amilases serão utilizadas após estas etapas para realizar a hidrólise. A α -amilase (Spring Alfa, Granotec®, Brasil) será diluída em tampão acetato pH 5,5 e 0,1 M com a adição de 1mM de CaCl_2 em uma concentração de 100 U·mL⁻¹ e a glucoamilase (Spring AG, Granotec®, Brasil) será utilizada em uma concentração de 330 U·mL⁻¹, utilizando tampão acetato (0,1M) pH 4,5 para a diluição. Após a hidrólise enzimática será utilizado o reagente glicose oxidase/ peroxidase (Bioliq Glicose, Laborclin®, Brasil) para quantificar colorimetricamente (λ =510nm) a glicose.

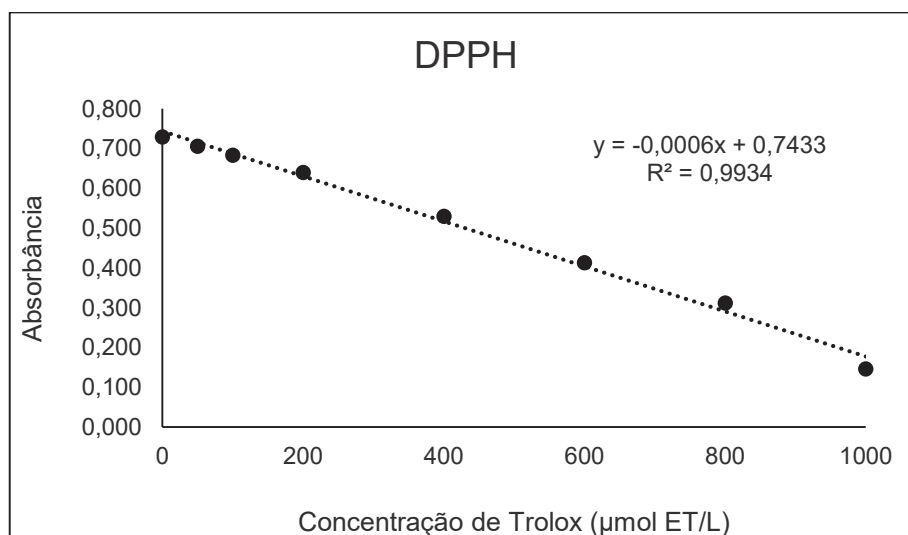
APÊNDICE 7 – SDS-PAGE

Estas amostras foram previamente diluídas em tampão (Tris-HCl 12 mmol·L⁻¹) contendo agente desnaturante (SDS) e agente redutor (β-mercaptoetanol) para realizarem a quebra das ligações dissulfeto. A SDS-PAGE foi realizado em gel do retido de sistema de membranas com 1mm de espessura e com gelatina separadora na concentração de 15% (p·v⁻¹) preparado com a solução composta de acrilamida, Tris-HCl, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), persulfato de amônio, Temed (1,2-Bis(dimethylamino)ethane) e água destilada. O gel empilhador foi feito com os mesmos compostos. Antes do gel ser corado para a revelação as corridas, estas ocorreram por 1h a 150 Volts, utilizando um tampão para a corrida. Os géis foram corados utilizando-se o agente de cor Coomassie azul brilhante R-250.

APÊNDICE 8 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE DPPH

Pesar 3,95 mg de DPPH, adicionar 50 mL de etanol, 50 mL de tampão fosfato monobásico (50 mM, pH 6,0) e posteriormente agitar até dissolução completa do reagente.

APÊNDICE 9 – CURVA PADRÃO DO DPPH



APÊNDICE 10 – REAGENTE FRAP

Solução A – Tampão acetato 300 mM, pH 3,6, foi preparado pesando 3,1 g de acetato de sódio trihidratado e dissolver em 16 mL de ácido acético glacial, após, o volume do

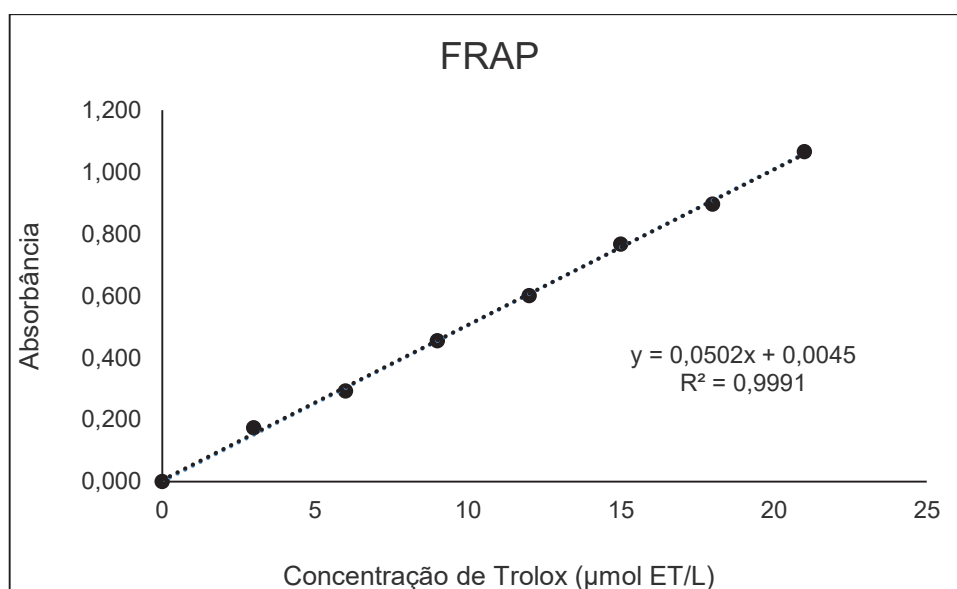
balão deve ser completado até a marca de 1 L com água ultrapura. Armazenar a solução em frasco escuro.

Solução B – TPTZ 10 mM foi preparada pesando 0,0312g do composto e completar o volume do balão de 10 mL com HCL 40 mM.

Solução C – O $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (PM 270,30) 20 mM deve ser adicionado por último (0,0541 g) em um balão de 10 mL com água ultrapura.

O reagente FRAP deve ser preparado no dia da análise em uma razão 10:1:1.

APÊNDICE 11 – CURVA PADRÃO FRAP



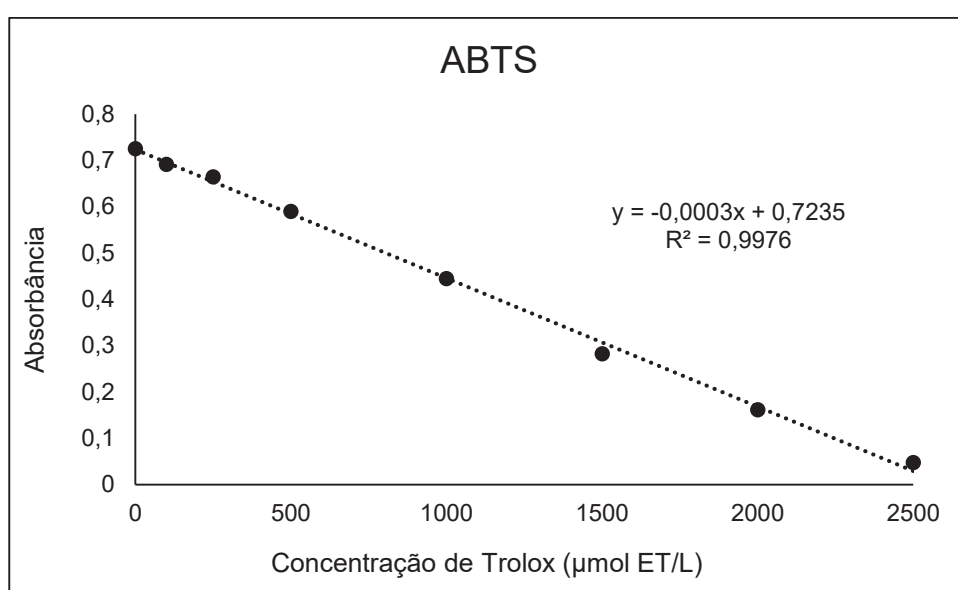
APÊNDICE 12 - REAGENTES PARA A ANÁLISE DE ABTS

Para a realização da análise de ABTS foi necessário o preparo de uma solução de ácido acético com água ultrapura, 3 mL em 1000 mL. O Tampão acetato de sódio 48,5 mol/L foi preparada pesando 6,6 g de acetato de sódio triidratado em um balão de 1000 mL, com 800 mL de solução ácida de ácido acético, até total dissolução e pH ajustado para 4,5 com ácido glacial P.A. A solução de ABTS (7 mM), foi preparada pesando 0,0392 g de ABTS em um balão de 10 mL utilizando tampão acetato de sódio. Persulfato de potássio foi pesado (0,37845 g) e dissolvido em 10 mL de tampão acetato de sódio para uma concentração de 140 mM.

Por sua vez, a solução de mistura de ABTS com persulfato de potássio foi preparada adicionando 176 µL da solução de persulfato no balão com a solução de ABTS e posteriormente mantida por 16 h em ausência de luz.

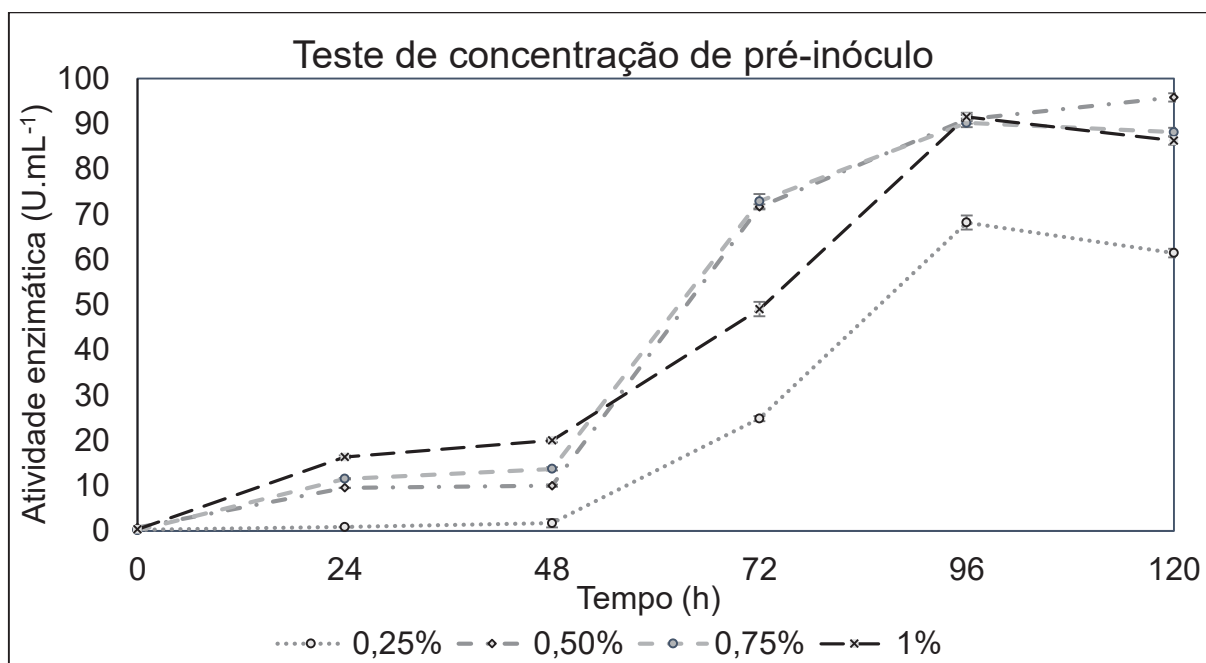
No dia da análise a solução de mistura utilizada para a reação foi feita utilizando um béquer de 250 mL, com a adição de 1 mL da solução mistura de ABTS com persulfato com 100 mL de tampão acetato de sódio 48,5 mmol/L.

APÊNDICE 13 – CURVA PADRÃO DE ABTS



APÊNDICE 14 – TESTE DA CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO

A avaliação da melhor concentração de inóculo foi realizada para determinar a concentração ideal adicionada as bateladas para maior produção enzimática. Foram avaliadas 4 concentrações 0,25, 0,5, 0,75 e 1% de pellets em cultivos realizados a 28 °C, 120 rpm por 5 dias, assim como foram realizadas as bateladas. A cada 24 horas foram retiradas amostras e feito a atividade enzimática. Todos os testes foram realizados em triplicata.



Por meio dos testes foi possível determinar que a melhor concentração a ser utilizada é a de 0,5%, concentração já empregada por Frantz et al 2019 e Paludo et al, 2018, como é possível observar na figura

APÊNDICE 15 – ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Determinação da umidade

O peso-filtro utilizado para as análises foi deixado em estufa 105°C durante 1h para a retirada de umidade, após este foi armazenado em dessecador por 20 minutos e teve sua massa aferida. Posteriormente foi pesado 5 g da amostra em cada peso-filtro e colocado em estufa a 60°C (QUIMIS®, Q316M5, Brasil), onde a cada 3 horas o peso foi aferido até se tornar constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). A umidade foi calculada utilizando a equação:

$$\% \text{ de Umidade} = \frac{(100.N)}{P}$$

Em que N é a perda de massa em gramas e P a massa da amostra.

Determinação de cinzas

A determinação de cinzas foi realizada por meio da carbonização completa da amostra em mufla 550 °C/6 h (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). A porcentagem de cinzas foi calculada utilizando a equação:

$$\% \text{ de Cinzas} = \frac{(100 \cdot N)}{P}$$

Sendo que N é a massa em gramas de cinzas e P a massa da amostra umida.

Determinação de proteínas Bruta pelo método de Kjeldahl

A determinação de proteína foi realizada seguindo o método proposto Kjeldahl (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). O fator de conversão que foi empregado para o *Coprinus comatus* foi de 4,38, pois os macromicetos possuem uma alta proporção de compostos nitrogenados. A porcentagem de proteína por amostra foi calculada utilizando a equação:

$$\% \text{ de Proteína} = \frac{V \cdot 0,0014 \cdot fc \cdot FC \cdot 100}{P}$$

Em que V é o volume gasto na titulação; fc o fator de correção da solução ácida; Fc o fator de conversão da proteína e P a massa da amostra.

Determinação do teor de lipídios totais

A determinação do teor de lipídios será realizada pelo método de extração direta em Soxhlet, utilizando éter de petróleo P.A. como solvente (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

$$\text{Lipídios totais (\%)} = \frac{100 \cdot N}{P}$$

Em que:

N equivale a massa em gramas de lipídios e P a massa em gramas da amostra.

Determinação do teor de carboidratos totais

A determinação do teor de carboidratos totais foi calculada utilizando a diferença entre a soma dos conteúdos de lipídios, umidade, cinzas e proteínas e 100%.

APÊNDICE 16 – CÁLCULO DE CUSTOS DE PROCESSO EM ESCALA LABORATORIAL (1 L) E EM ESCALA PILOTO (100 L)

Valores para 1 Litro de Extrato Enzimático Bruto (EEB) produção laboratorial

Consumo	
Produção de α -amilase em um litro (U/L)	104136,022
Farinha de fundo de moinho (FFM) (kg)	0,049
Ureia (kg)	0,004
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄) (kg)	0,008
Aguá (m ³)	0,001
Energia gasta no processo (kWh)	75,250

	Valor gasto para 1L de EEB (R\$)	
Custo para o EEB líquido	FFM	0,097
	Ureia	0,097
	KH2PO4	0,165
	Aguá (m³)	0,011
	Energia	46,825
EEB Liofilizado	Liofilizador	6,01
Custo do processo de produção de biomassa e liofilização		
Biomassa liofilizada (1g)	Liofilizador	3.43
		53.073

Gasto com água para a produção de 1 L		
Gasto de água (m³)	Custo do m³ (R\$)	Preço (R\$)
0,001	10,68	0,011

Gasto com o meio de cultura para 1 L		
Concentração do reagente (kg)	Preço (kg)	Preço (R\$)
FFM		
0,0485	2	0,097
Ureia P.a		
0,004	6,48	0,026
KH ₂ PO ₄		
0,008	20,64	0,165
Total		0,288

Cálculo do consumo de energia para 1 g de farinha de macromiceto				
Equipameto	Potência do equipamento (kW)	Custo do kWh (R\$)	Tempo de uso (h)	Preço (R\$)
Liofilizador	0,65	0,29	20	3,76
Bomba à vácuo	0,37	0,29	20	2,15
			Total	5,90

Valores para 100 Litros de Extrato Enzimático Bruto (EEB) produção em escala piloto

Consumo para a produção de 100 L	
Produção de α -amilase em um litro (U/L)	104136,02
Farinha de fundo de moinho (FFM) (Kg)	4,85
Ureia (kg)	0,40
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄) (Kg)	0,80
Água (m³)	0,10
Energia gasta no processo (kWh)	75,25

	Valor gasto para 100L de EEB (R\$)		Custo por L (R\$)	
Custo para o EEB líquido	FFM	9,700	55,51	
	Ureia	2,592		
	KH2PO4	16,512		
	Aguá (m³)	1,068		
	Energia	25,640		
EEB Liofilizado	Liofilizador	88,08	117.954	1,179

Custo do processo de produção de biomassa e liofilização				Custo para 2,28 g
Biomassa liofilizada (100 g)	Liofilizador	0,00	67,323	0,6732334

Cálculos para a Escala piloto

Cálculo do consumo de energia para 100 L de extrato				
Equipameto	Potência do equipamento (kW)	Custo do kWh (R\$)	Tempo de uso (h)	Preço (R\$)
Agitador	0,35	0,2889	216	21,841
centrifuga	2,5	0,29	5,26	3,80
Liofilizador	2,25	0,29	80	52,00
Bomba à vácuo	0,45	0,29	80	10,44
Total				88,08

Gasto com água para a produção de 100 L		
Gasto de água (m³)	Custo do m³ (R\$)	Preço (R\$)
0,1	10,68	1,068

Gasto com o meio de cultura para 100 L		
Concentração do reagente (kg)	Preço (kg)	Preço (R\$)
FFM		
4,85	2	9,700
Ureia P.a		
0,4	6,48	2,592
KH ₂ PO ₄		
0,8	20,64	16,512

Cálculo do consumo de energia para 100 g de farinha de macromiceto				
Equipameto	Potência do equipamento (kW)	Custo do kWh (R\$)	Tempo de uso (h)	Preço (R\$)
Liofilizador	2,25	0,29	20	13,00
Bomba à vácuo	0,45	0,29	20	2,61
Total				15,61

ANEXO

ANEXO 1 – TABELA DE CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO PARA SALTING-OUT

Final concentration of ammonium sulfate (% Saturation at 0°C)

Final concentration of ammonium sulfate (% Saturation at 0°C)	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	solid ammonium sulfate to add to 100 mL of solution																
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
35				0	2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3
40					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8
45						0	2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3
50							0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8
55								0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3
60									0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.9	27.9
65										0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4
70											0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9
75												0	3.2	6.6	10.1	13.7	17.4
80													0	3.3	6.7	10.3	13.9
85														0	3.4	6.8	10.5
90															0	3.4	7.0
95																0	3.5
100																	0

Note: The pH of the solution may decrease significantly on addition of ammonium sulfate. (Marshak *et al.*, 1996)