

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL/BIOPROSPECÇÃO**

**Gabriela Totino Ulian Antonioli**

**POTENCIAL CATALÍTICO DE AMILASES PRODUZIDAS POR  
CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DOS FUNGOS ‘*MONILIA SITOPHILA*’ E  
‘*FUSARIUM VERTICILLIOIDES*’**

**Dourados**

**2018**

GABRIELA TOTINO ULIAN ANTONIOLLI

**POTENCIAL CATALÍTICO DE AMILASES PRODUZIDAS POR  
CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DOS FUNGOS ‘MONILIA SITOPHILA’ E  
‘FUSARIUM VERTICILLIOIDES’**

Dissertação apresentada como requisito para  
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós  
Graduação em Biologia Geral e Bioprospeção da  
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da  
Universidade Federal da Grande Dourados

Orientador: Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Dourados

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

A635p

Antoniolli, Gabriela Totino Ulian

Potencial catalítico de amilases produzidas por cultivo em estado sólido dos fungos "*Monilia sitophila* e "*Fusarium verticillioides*" / Gabriela Totino Ulian Antoniolli. – Dourados, MS : Universidade Federal da Grande Dourados, 2018. 30f.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite.  
Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção) – Faculdade de Ciências Biológicas. Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Enzimas industriais. 2. Amilases fúngicas. 3. Fungos – Cultivo em estado sólido. I. Título.

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFGD.**

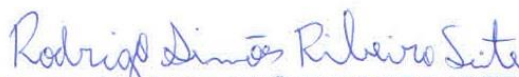
**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**

"POTENCIAL CATALÍTICO DE AMILASES PRODUZIDAS POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DOS FUNGOS *Monilia sitophila* E *Fusarium verticillioides*"

POR

**GABRIELA TOTINO ULIAN ANTONIOLLI**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: "BIOPROSPECÇÃO".



PROF. DR. RODRIGO SIMÕES RIBEIRO LEITE  
ORIENTADOR – UFGD



PROF. DR. ALESSANDRO MINILLO  
MEMBRO TITULAR – UFGD



PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> GISELE JANE DE JESUS  
MEMBRO TITULAR – UFGD

Aprovada em 23 de março de 2018.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar, a Deus por conceder mais uma vitória em minha vida, ter me abençoado e iluminado meu caminho.

Ao meu marido Jonathan, pelo carinho, paciência e incentivo, por se fazer sempre presente nos momentos que precisei.

Aos meus pais, Kennedy e Denise, saibam que não há ciência, graduação ou mestrado que possa ensinar os valores e princípios que vocês me ensinaram. Essas lições nunca serão esquecidas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite, por todo conhecimento transmitido, por ter acreditado no meu potencial, pela oportunidade, dedicação e apoio. A você, meu carinho, meu respeito e muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Jairo Campos Gaona pela contribuição nesse trabalho, pelo isolamento de solo na região do Pantanal.

Aos amigos do grupo de enzimologia e processos fermentativos: Nayara, Flávia, Isadora, Adriana, Vinicius, Laís, Gabriela e Andreza. Pelos momentos que passamos juntos, pela parceria e amizade, por serem parte importantes na conclusão desse trabalho.

A UFGD, CAPES e CNPq pelo apoio e suporte financeiro.

Ao programa de Pós Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, meu muito obrigada.

## RESUMO GERAL

As amilases são enzimas de grande importância no mercado, com aplicação em indústrias de alimentos, farmacêutica, têxtil e no setor de energia. No entanto, o custo de produção dessas enzimas em escala industrial ainda é elevado. Entre as alternativas existentes para diminuir estes custos está a utilização de resíduos agroindustriais como substrato no cultivo de microrganismos. O objetivo do trabalho foi otimizar a produção de amilases por *Monilia sitophila* e *Fusarium verticillioides*, caracterizar bioquimicamente as amilases produzidas e avaliar suas propriedades catalíticas. A maior produção de amilase pelo fungo *M. sitophila* foi obtida utilizando farelo de trigo, com 60% de umidade, 35°C em 120 horas de cultivo (341,30 U/g) e para o fungo *F. verticillioides* foi obtida utilizando farelo de trigo, com 70% de umidade, 30°C em 72 horas de cultivo (360,21 U/g). A amilase produzida por *M. sitophila* apresentou maior atividade catalítica em pH 4,5 a 60°C e foi estável entre o pH 3,0-5,5, mantendo sua atividade catalítica por 1 hora a 50°C. A amilase produzida pelo fungo *F. verticillioides* apresentou maior atividade catalítica em pH 5,0 a 50°C. Essa enzima foi estável entre o pH 5,0-7,0 e manteve sua atividade catalítica por 1 hora a 45°C. Ambas as enzimas apresentaram potencial de hidrolisar amidos provenientes de diferentes origens vegetal. Nos resultados obtidos a partir da cromatografia de camada delgada foi observado a presença de exoamilases, assim como a liberação de monômeros de glicose.

**Palavras-chave:** enzimas industriais, cultivo em estado sólido, amilases fúngicas.

## ABSTRACT

Amylases are enzymes of great importance in the market, with applications in the food, pharmaceutical, textile and energy industries. However, the production cost of these enzymes on an industrial scale is still high. Among the existing alternatives to reduce these costs is the use of agroindustrial residues as a substrate in the cultivation of microorganisms. The objective of this work was to optimize amylase production by *Monilia sitophila* and *Fusarium verticillioides*, to characterize biochemically produced amylases and to evaluate their catalytic properties. The highest production of amylase by the *M. sitophila* fungus was obtained using wheat bran, with 60% humidity, 35°C in 120 hours of cultivation (341.30 U/g) and for the fungus *F. verticillioides* was obtained using wheat bran, with 70% humidity, 30°C in 72 hours of cultivation (360.21 U/g). The amylase produced by *M. sitophila* had higher catalytic activity at pH 4.5 at 60°C and was stable between pH 3.0-5.5, maintaining its catalytic activity for 1 hour at 50°C. The amylase produced by the fungus *F. verticillioides* presented higher catalytic activity at pH 5.0 at 50°C. This enzyme was stable between pH 5.0-7.0 and maintained its catalytic activity for 1 hour at 45°C. Both enzymes had the potential to hydrolyze starches from different plant sources. In the results obtained from the thin layer chromatography the presence of exoamylases was observed, as well as the release of glucose monomers.

**Keywords:** industrial enzymes, solid-state cultivation, fungal amylases.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO I

Figura 1: Estrutura do amido a)amilose e b)amilpectina. ....13

Figura 2: Ação das enzimas envolvidas na degradação do amido.....14

### CAPITULO II

Figura 1: Produção de amilase por cultivo em estado sólido com diferentes umidades iniciais, farelo de trigo, 96 horas, 28°C. A) *M. sitophila* B) *F. verticillioides*. ....23

Figura 2: Produção de amilase por cultivo em estado sólido com diferentes temperaturas, farelo de trigo, na umidade ótima para cada fungo, 96 horas. A) *M. sitophila* B) *F. verticillioides*. ....24

Figura 3. Produção de amilase por cultivo em estado sólido com diferentes tempos de cultivo, farelo de trigo, na umidade e temperatura ótima para cada fungo. A) *M. sitophila* ;B) *F. verticillioides*. ....25

Figura 4: pH e temperatura ótima das amilases produzidas por (A e B) *M. sitophila* ;(C e D) *F. verticillioides* .....26

Figura 5: Estabilidade ao pH e temperatura. (A e B) *M. sitophila*; (C e D) *F. verticillioides*. ....27

Figura 6: Hidrólise enzimática de diferentes fontes de amido. A) *M. sitophila* ;B) *F. verticillioides*. ....29

Figura 7: Cromatografia de camada delgada A) *M. sitophila* ;B) *F. verticillioides*. ....30

### LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Produção de amilase em diferentes substratos por cultivo em estado sólido pelos fungos *M. sitophila* e *F. verticillioides*, 96 horas de cultivo, 70% de umidade a 28°C.....22



## SUMÁRIO

<b>CAPITULO I</b> .....	11
<b>1. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
1.1 Tecnologia enzimática .....	11
1.2. Processos de cultivo microbiano para produção de enzimas.....	11
1.3. Amido.....	12
1.4 Enzimas amilolíticas.....	13
1.5 Aplicações industriais de enzimas amilolíticas .....	14
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	16
<b>CAPITULO II</b> .....	19
<b>POTENCIAL CATALÍTICO DE AMILASES PRODUZIDAS POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO DOS FUNGOS <i>MONILIA SITOPHILA</i> E <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i></b> .....	19
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
2.1) Microrganismos.....	20
2.2) Inóculo.....	21
2.3) Cultivo em estado sólido .....	21
2.4) Extração das enzimas.....	21
2.5) Determinação da atividade amilolítica.....	21
2.6) Caracterização bioquímica das enzimas.....	21
2.7) Avaliação do potencial catalítico para amido de diferentes fontes .....	22
2.8) Cromatografia de produtos de hidrólise .....	22
2.9) Análise estatística dos resultados.....	22
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
3.1 Produção de amilase por cultivo em estado sólido.....	22
3.2) Caracterização bioquímica das amilases produzidas.....	26

<b>3.3) Produção de amilase utilizando diferentes fontes de amido.....</b>	<b>28</b>
<b>3.4) Cromatografia de produtos de hidrólise .....</b>	<b>29</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>31</b>

## **CAPITULO I**

### **1. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **1.1 Tecnologia enzimática**

Os processos industriais que envolvem reações químicas estão presentes na maioria das manufaturas de produtos ou bens consumidos pelo homem. Catalisadores químicos vem sendo utilizados nesses processos. O uso de enzimas como catalisadores de importantes reações químicas vem chamando a atenção da comunidade científica e industrial. Geralmente, os processos industriais que empregam enzimas são fáceis de controlar, eficientes energeticamente e requerem condições mais brandas de operação (MONTEIRO & SILVA, 2009; ORLANDELLI et al., 2012).

A tecnologia enzimática concilia o desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias-primas renováveis e a preservação ambiental, tornando-se um dos campos mais promissores para a síntese de compostos de alto valor agregado, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e altamente específicas, diminuindo a formação de subprodutos indesejáveis. Tais características contribuem para a utilização de enzimas em processos industriais (BON et al., 2008).

A indústria faz amplo uso da tecnologia enzimática, em diversos setores como na alimentação, saúde, têxtil, papel e celulose. As enzimas podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbianas. Embora as enzimas obtidas de fontes vegetais e animais sejam muito utilizadas, as enzimas industriais são geralmente obtidas a partir de microrganismos (MONTEIRO & SILVA, 2009).

Os microrganismos apresentam elevada variabilidade metabólica, permitindo a produção de enzimas com diferentes características, as quais podem ser aplicadas em vários processos industriais. Além disso, as enzimas podem ser produzidas por processos fermentativos, com o controle de alguns parâmetros como umidade, temperatura e tempo de cultivo. Diante desse fato, a pesquisa de novas enzimas ou o melhoramento do desempenho de catálise de enzimas se faz necessário (COURI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2006).

#### **1.2. Processos de cultivo microbiano para produção de enzimas**

A produção de enzimas pode ser realizada por cultivo submerso (CS) ou cultivo em estado sólido (CES). O cultivo submerso consiste na introdução do

microrganismo em meio líquido na forma de inóculo. Os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio líquido, facilmente acessíveis para os microrganismos (SINGHANIA et al., 2009).

O cultivo em estado sólido é definido como o processo de crescimento do microrganismo na superfície de substratos sólidos na ausência de água entre as partículas do substrato. Os substratos tradicionalmente utilizados são resíduos agroindustriais como: farelo de trigo, farelo de soja, sabugo de milho, palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz. A estrutura desses substratos têm como principais componentes amido, lignina, celulose, hemicelulose e proteína, que são utilizados como fontes de carbono e energia para o crescimento microbiano (BON et al., 2008; FERREIRA et al., 2015).

Diferentes tipos de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos. No entanto, os fungos filamentosos são os mais adaptáveis a esse processo, pois apresentam tolerância a baixa atividade de água e sua forma de crescimento em hifas conferem vantagens em relação aos outros microrganismos (BON et al., 2008; SANTOS et al., 2012).

O cultivo em estado sólido apresenta algumas vantagens como: condições de crescimento do microrganismo semelhantes ao seu ambiente natural, utilização de substratos de baixo valor agregado, menor contaminação e maior concentração de produto final. Entretanto, existem alguns fatores limitantes como menor acessibilidade ao substrato e dificuldades no controle de variáveis como pH, temperatura, oxigênio e heterogeneidade do substrato (BEHERA & RAY, 2016; SINGHANIA et al., 2009).

A produção agrícola no Brasil gera grandes quantidades de resíduos agroindustriais. O cultivo em estado sólido se apresenta como uma técnica capaz de propor meios alternativos para a utilização desses resíduos, assim como de agregar valor a essas matérias-primas, através da produção de enzimas de interesse biotecnológico (GONÇALVES et al., 2013; PINTO et al., 2005).

### **1.3. Amido**

O amido é o mais importante polissacarídeo de reserva do reino vegetal, podendo ser encontrado em sementes de cereais, tubérculos e raízes como milho, cevada, trigo, arroz, batata e mandioca. Dois tipos de polímeros estão presentes no

amido, a amilose (15-25%) e a amilopectina (75-85%). Essas duas frações apresentam estruturas moleculares que diferem na solubilidade em água, tamanho molecular e suscetibilidade a degradação enzimática (PANDEY et al., 2000; SOUZA & MAGALHÃES, 2010).

Amilose é um polímero linear constituído de até 6000 resíduos de glicose ligados por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4. Amilopectina consiste em pequenas cadeias lineares de 10 a 60 resíduos de glicose unidos por ligações  $\alpha$ -1,4. Essas cadeias estão unidas entre si, através de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6. O número de resíduos de glicose, varia de acordo com a fonte de amido (BON et al., 2008; MORAES, 2004).

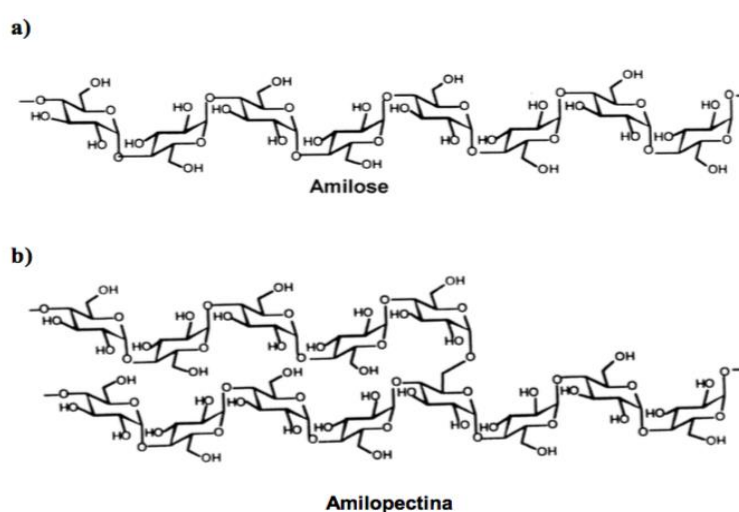


Figura 1: Estrutura do amido a)amilose e b)amilopectina.

#### 1.4 Enzimas amilolíticas

A hidrólise enzimática do amido depende da ação conjunta de diferentes enzimas. Basicamente existem quatro grupos: endoamilases, exoamilases, enzimas desramificantes e transferases (MORAES, 2004; PANDEY et al., 2000).

As endoamilases rompem as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 presentes na parte interna das cadeias de amilose ou amilopectina. A  $\alpha$ -amilase é um exemplo de endoamilase, cujo produto final são oligossacarídeos de tamanho variado com configuração  $\alpha$  podendo ser lineares ou ramificados (NELSON & COX, 2011; SOUZA & MAGALHÃES, 2010).

As exoamilases hidrolisam ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 como a  $\beta$ -amilase, ou ambas as ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 como a glicoamilase e  $\alpha$ -glicosidase. Essas enzimas

agem sobre os resíduos externos de glicose da amilose e amilopectina produzindo glicose (glicoamilase e  $\alpha$ -glicosidase) ou maltose e  $\beta$ -dextrinas limites ( $\beta$ -amilase) (GUPTA et al., 2003; NELSON & COX, 2011).

Enzimas desramificantes que hidrolisam exclusivamente as ligações  $\alpha$ -1,6 da amilopectina: isoamilase e pululanase tipo I. A diferença entre essas enzimas está na habilidade de hidrolisar pululana, um polissacarídeo com unidades de maltotriose ligadas por ligações  $\alpha$ -1,6. Pululanases hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,6 em pululana e amilopectina, enquanto que isoamilases são capazes de hidrolisar apenas amilopectina (MORAES, 2004).

As transferases, ou modificadoras de amido, quebram as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador para um acceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica. As ciclodextrinas glicosiltransferases, produzem oligossacarídeos cíclicos de 6, 7 ou 8 resíduos de glicose e dextrinas ramificadas de alto peso molecular (PANDEY, 2000).

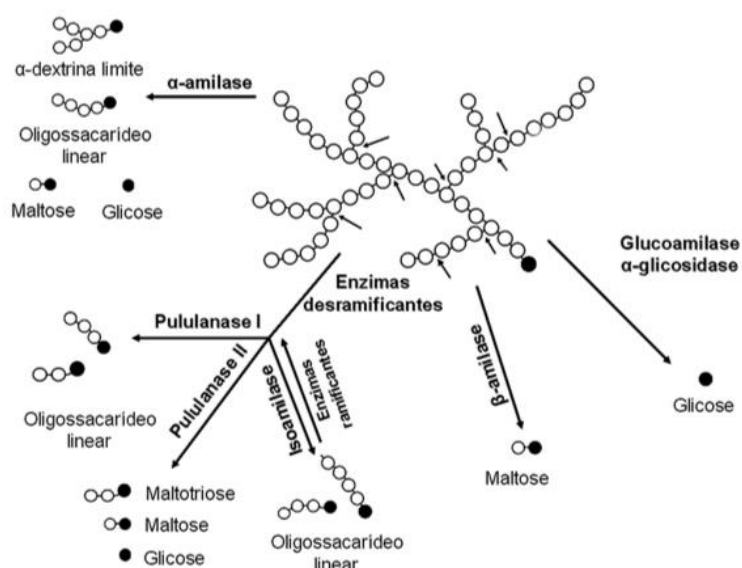


Figura 2: Ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (●) extremidade redutora; (°) extremidade não redutora; (→) ponto de clivagem na molécula de amido (Fonte modificada: MORAES, 2004; BON et al., 2008).

### 1.5 Aplicações industriais de enzimas amilolíticas

O amido e seus derivados são essenciais na nutrição humana e são alvo de diversas aplicações industriais. As enzimas usadas no processamento do amido são

geralmente designadas por amilases (BON et al., 2008). Na indústria, a conversão enzimática do amido em monômeros de glicose inclui as etapas de liquefação e sacarificação. Na liquefação ocorre a dissolução do amido em água a alta temperatura, reduzindo o grau de polimerização do amido. As  $\alpha$ -amilases são utilizadas nessa etapa para converter o amido (30 a 40%) em dextrinas solúveis com diferentes graus de polimerização, diminuindo a viscosidade do amido. Na etapa de sacarificação, as dextrinas são hidrolisadas em maltose e/ou glicose pelas  $\beta$ -amilases e glicoamilases, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2015; SANTOS et al., 2012).

Uma das principais aplicações das enzimas amilolíticas consiste na produção de xarope de glicose, que pode ser aplicado na indústria de alimentos e bebidas ou em processos fermentativos visando a produção de álcool combustível (BON et al., 2008; SOUZA & MAGALHÃES, 2010).

Na indústria da panificação as amilases são utilizadas para promover a decomposição do amido, função realizada pela  $\alpha$ -amilase, levando a formação de maltose, o que aumenta a maciez e a textura da massa e do miolo, mantendo o pão fresco por mais tempo (COURI et al., 2008). As amilases fúngicas na indústria cervejeira convertem substratos amiláceos a monossacarídeos antes da fermentação alcoólica (MORAES, 2004).

O processo de produção de álcool de amido é similar ao processo fermentativo de caldo de cana-de-açúcar. As principais diferenças estão no preparo da matéria-prima e no sistema de fermentação. Na produção de etanol a partir de materiais amiláceos, é necessário a conversão do amido em açúcares fermentescíveis. O amido é hidrolisado a glicose através da ação de duas enzimas ( $\alpha$ -amilase e glicoamilase) antes da etapa de fermentação (BON et al., 2008; FERREIRA et al., 2015).

Atualmente, as amilases são utilizadas na fabricação de produtos de limpeza, no processo de fabricação de cereais para alimentação infantil, na indústria de papel, no pré-tratamento da ração animal para melhor a digestibilidade e na indústria têxtil para desengomagem de tecidos (MORAES, 2004; SOUZA & MAGALHÃES, 2010).

## REFERÊNCIAS

- BEHERA, S.S., RAY, R.C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v.86, p.656-669, 2016.
- BON, E.P.S., PEREIRA, N.J., GOOTTSCHALK, L.M.F., PEREIRA, P.S., ROSEIRO, J.C., FERRARA, M.A. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A; FERRARA, M. A. & COELHO, R. R. R. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro. Editora Interciência Brasil, p. 95-106, 2008.
- COURI, S., PARK, Y., PASTORE, G., DOMINGOS, A. Enzimas na produção de alimentos e bebidas. In: BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A; FERRARA, M. A. & COELHO, R. R. R. (Eds.). **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro. Editora Interciência Brasil, p. 153-173, 2008.
- FERREIRA, O.E., MONTIJO, N.A., MARTINS, E.S., MUTTON, M.J.R. Production of  $\alpha$ -amylase by solid state fermentation by *Rhizopus oryzae*. **African Journal of Biotechnology**, v.14, n.7, p.622-628, 2015.
- GONÇALVES, F.A., LEITE, R.S.R., RODRIGUES, A., ARGANDOÑA, E.J.S., FONSECA, G.G. Isolation, identification and characterization of a novel high level  $\beta$ -glucosidase-producing *Lichtheimia ramosa* strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n.2, p.377-384, 2013.
- GUPTA, R., MOHOPATRA, H., GOSWAMI, V.K., CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: A Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v.38, v.11, p.1599-1616, 2003.
- MONTEIRO, V.N., SILVA, R.N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, n.5, p. 9-23, 2009.



MORAES, L.M.D.P. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto, p.223-241, 2004.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

OLIVEIRA, V.M. de., SETTE, L.D., FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Revista MultiCiência: Construindo a História dos Recursos Naturais**, n.7, 2006.

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

ORLANDELLI, R.C., SPECIAN, V., FELBER, A.C., PAMPHILE, J.A. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., SOCCOL, V.T., SINGH, D., MOHAN,R. Advances in Microbial Amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. p.135-152, 2000.

PINTO, G.A.S., BRITO, E.S.D., ANDRADE, A.M.R., FRAGA, S.L.P., TEIXEIRA, R. B., Fermentação em Estado Sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **EMBRAPA, Comunicado Técnico.**, 1 ed., Fortaleza, 2005.

SANTOS, L.D., KOTOVICZ, V., BARANA, A.C., ALMEIDA, M.M. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori*. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.6, n.1, p.655-664, 2012.

SINGHANIA, R.R., PATEL, A.K., SOCCOL, C.R., PANDEY, A. Recent advances in solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, n.1, p.13-18, 2009.

SOUZA, P.M., MAGALHÃES, P.O. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry – a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, n.4, p.850-861, 2010.



A pedido da autora o Capítulo 2 foi retirado do pdf.

## REFERÊNCIAS

- ADENIRAN, H.A., ABIOSE, S.H. Partial purification, characterization and hydrolytic activities of amylases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus niger* cultured on agricultural residues. **African Journal of Biotechnology**, p.1465-1477, v.11, n.6, 2012.
- BAKRI, Y., JAWHAR, M., ARABI, M.I.E. Enhanced amylase production by *Fusarium solani* in solid state fermentation. **Pakistan Journal Science Industrial Research**, v.57, n.3, p.123-128, 2014.
- BANSAL, N., TEWARI, R., SONI, R., SONI, S.K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, v.32, n.7, p.1341-1346, 2012.
- BEHERA, S.S., RAY, R.C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, p.656-669, n.86, 2016.
- CAVALHEIRO, G.F., SANGUINE, I.S., SANTOS, F.R.S., COSTA, A.C., FERNANDES, M., PAZ, M.F., FONSECA, G.G., LEITE, R.S.R. Catalytic properties of amylolytic enzymes produced by *Gongronella butleri* using agroindustrial residues on solid state fermentation. **BioMed Research International**, v.2017, n.2017, p.1-8, 2017.
- CRUZ, E.A., MELO, M.C., SANTANA, N.N., FRANCO, M., SANTANA, R.S.M., SANTOS, L.S., GONÇALVES, Z.S. Produção de alfa-amilase por *Aspergillus niger* em resíduo de casca de mandioca. **Unopar Científica. Ciências Biológicas e Saúde**, v.13, p.245-249, 2011.
- FERREIRA, O.E., MONTIJO, N.A., MARTINS, E.S., MUTTON, M.J.R. Production of  $\alpha$ -amylase by solid state fermentation by *Rhizopus oryzae*. **African Journal of Biotechnology**, v.14, n.7, p.622-628, 2015.

FREITAS, L.S., MARTINS, E.S., FERREIRA, O.E. Produção e caracterização parcial de  $\alpha$ -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. *Revista Brasileira de Biociências*, v.12, n.4,p.226-232, 2014.

GARCIA, N.F.L., SANTOS, F.R.S., GONÇALVES, F.A., PAZ, M.F., FONSECA, G.G., LEITE, R.S.R. Production of  $\beta$ -glucosidase on solid state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial waste: characterization and catalytic properties of the enzymes extract. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.18, n.4, p.314-319, 2015.

GONÇALVES, F.A., LEITE, R.S.R., RODRIGUES, A., ARGANDOÑA, E.J.S., FONSECA, G.G. Isolation, identification and characterization of a novel high level  $\beta$ -glucosidase-producing *Lichtheimia ramosa* strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.2, n.4, p.377-384, 2013.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitic Chemistry**, v.3; p.426-428, 1959.

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

OLIVEIRA, A.P.A., SILVESTRE, M.A., GARCIA, N.F.L., ALVES-PRADO, H.F., RODRIGUES, A., PAZ, M.F., FONSECA, G.G., LEITE, R.S.R. Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by solid-state fermentation. **The Scientific World Journal**, v.2016, p.1-11, 2016.

SALEEM, A.E., EBRAHIM, M.K.H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. **Journal for Science of Taibah University**, v.8, n.2, p.90-97, 2014.

SANTOS, L.D., KOTOVICZ, V., BARANA, A.C., ALMEIDA, M.M. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori*. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.6, n.1, p.655-664, 2012.

SILVA, T. M.; MALLER, A.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; JORGE, J, A.; POLIZELI, M. L. T. M. Evidence of high production levels of thermostable dextrinizing and saccharogenic amylases by *Aspergillus niveus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 15, p. 1874-1881, 2013.

SOCCOL, C.R., COSTA, E.S.F.C., LETTI, L.A.J., KARP, S.G., WOICIECHOWSKI, A.L., VANDENBERGHE, L.P.S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research & Innovation**, v.1, n.1, p.52-71, 2017.

SOUZA, P.M., MAGALHÃES, P.O. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry – a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, .4, 2010.

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.

YOON, L.W., ANG, T.N., NGOH, G.C., CHUA, A.S.M. Fungal solid state fermentation and various methods of enhancement in cellulose production. **Biomass and bioenergy**, v.67, p.329-338, 2014.

ZHANG, Q., HAN, Y., XIAO,H. Microbial  $\alpha$ -amylase: A biomolecular overview. **Process Biochemistry**, v.53, p.88-101, 2017.