



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Ilha Solteira

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS COM ATIVIDADE AMIOLÍTICA

Ana Carolina Glória de Oliveira

Ilha Solteira - SP
Julho, 2017

Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Cursos: Eng^a Agrônômica, Ciências Biológicas, Eng. Civil, Eng. Elétrica, Eng. Mecânica, Física, Matemática e Zootecnia.
Avenida Brasil Centro, 56 CEP 15385-000 Ilha Solteira São Paulo Brasil pabx (18)
3743 1000 fax (18) 3742 2735 scom@adm.feis.unesp.br www.feis.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

SELEÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS COM ATIVIDADE AMIOLÍTICA

Ana Carolina Glória de Oliveira

Prof^a. Dr^a. Heloiza Ferreira Alves Prado

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Engenharia, Câmpus de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ilha Solteira - SP
Julho, 2017

Dedico a minha Mãe Cleide e meu Pai Francisco que me educaram e me possibilitaram mais essa conquista, meus exemplos de vida fundamentais. Aos meus tios Maria Lucia e Dorival (*in memmorian*) sei que de algum lugar olham por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, força e coragem que me permitiu concluir mais uma etapa na minha vida acadêmica.

Aos meus amados pais Cleide e Francisco por me apoiarem, pela paciência, pela compreensão nos momentos difíceis. Pelo investimento financeiro, incentivando-me a nunca desistir, dando tudo de si para me proporcionarem mais essa conquista.

Ao meu irmão Álvaro pelo amor, apoio, incentivo, pelas palavras de carinho e de preocupação.

A Maria Vitória por ser um anjo na minha vida, carregado de amor e ternura.

A minha orientadora Prof^ª. Heloiza por acreditar e confiar na minha capacidade. Por todo tempo dedicado, pela paciência, pela orientação nesse trabalho, por todos os ensinamentos e por me mostrar que fiz a escolha certa. Vejo em você a profissional que quero ser.

Aos meus familiares pelo carinho e por torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus amigos que continuaram presentes em minha vida apesar da distância. Que aguardavam um final de semana ou feriado para reencontros carregados de alegria e risadas.

A Karen, Eloisa, Mayecha, Carolini e Paula, por estarem comigo em todos os momentos.

Aos amigos que conheci ao longo desses quase 5 anos, pelas histórias compartilhadas, momentos de descontração e aquele bom ombro amigo longe de casa.

A Poliana e a Rafaella, pela convivência, paciência, pelas conversas sem fim. Dividir o mesmo espaço físico por muito tempo não é das tarefas mais fáceis, mas vocês foram incríveis.

A Bruna Cardozo, pelas comidas compartilhadas, por me acolher no seu apartamento quando precisei.

A Tatiana David que no momento de desespero foi a luz no fim do túnel, que me emprestou o notebook para escrever esse trabalho, já que o meu me deixou na mão.

Aos colegas do laboratório de microbiologia e processos biotecnológicos. Em especial Leticia e Lumena por uma colaboração mais efetiva.

Aos meus colegas de curso e faculdade pela convivência e aprendizado diário.

A todos os professores que tive ao longo da vida, cada um teve sua parcela de contribuição para minha formação profissional.

Aos funcionários da UNESP que direta ou indiretamente me ajudaram em algum momento.

Desde já agradeço a banca examinadora por disporem de seu tempo para contribuir com esse trabalho.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram até aqui, meus sinceros agradecimentos.

“Quanto mais eu estudo a natureza, mais eu fico maravilhado com as obras do Criador. A ciência, me aproxima de Deus”.

(Louis Pasteur)

RESUMO

As amilases são enzimas que hidrolisam o carboidrato de reserva, amido. O amido é um polímero de glicose de alta massa molecular, encontrado em muitas plantas como a principal fonte de reserva nutricional, além de fornecer de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem. Várias enzimas hidrolíticas são capazes de degradar o amido, elas quebram as ligações na molécula do amido, reagindo em presença de água, resultando em uma nova extremidade não redutora. Tais enzimas podem ser classificadas em amilases transferases, que hidrolisam as ligações do tipo α -1,4, e amilases desramificantes, aquelas que hidrolisam as ligações do tipo α -1,6. Tendo em vista a grande diversidade microbiana em diferentes biomas nacionais, presente trabalho teve como objetivo isolar linhagens fungicas com potencial na produção de enzimas amilolíticas. Os microrganismos estudados nesse ensaio foram coletados em área do Bioma Amazônia na bacia do rio Teles Pires, localizada no município e Paraníta-MT. Os microrganismos foram cultivados utilizando Ágar Padrão para Contagem (PCA) com adição de cloranfenicol para inibir o crescimento bacteriano. Para os ensaios de produção enzimática foi adotada cultivo em estado sólido (CES), utilizando farelo de trigo como substrato. O processo fermentativo se deu em frascos Erlenmeyr contendo 5 g do substrato e 10 mL de solução salina, os quais foram inoculados com 5 disco de 0,5 cm diâmetro e incubados em estufa tipo BOD a 30 °C, por 96 horas. Após esse período foi adicionado 50 mL de água para obtenção da solução enzimática bruta. A determinação da atividade amilolítica foi realizada pelo método dextrinizante proposto por PONSASAWADI; YAGISAWA (1987) e FUWA (1954). Cinco isolados se destacaram na produção de amilase, sendo os isolados AC – 6.1, AC – 17.1, AC – 6.3, AC – 21.4 e AC – 21.3 com atividades enzimáticas média de $\pm 105,24$ U/mL.

ABSTRACT

Amylases are enzymes that hydrolyze a carbohydrate reserve, starch. Starch is a high molecular weight glucose polymer found in many plants as a major source of nutritional reserve, and provides 70-80% of the calories consumed by man. Several hydrolytic enzymes are capable of degrading the starch. Hydrolytic action breaks down α -1,4-glycosidic bonds in the starch molecule, reacting in the presence of water, resulting in a new non-reducing end. Such enzymes can be classified as amylases and transferases, which hydrolyze α -1,4-glycosidic bonds, and debranching amylases, those which hydrolyze α -1,6-glycosidic bonds. Considering the great microbial diversity in different national biomes, this work aimed to isolate fungal strains with potential in the production of amylolytic enzymes. The microorganisms studied in these trials were collected in the Amazon Biome area in the Bacia do Rio Teles Pires, located in the Paranaíta-MT city. The microorganisms were cultured using Plate Count Agar (PCA) with addition of chloramphenicol to inhibit bacterial growth. Solid - State Cultivation (SSC) were applied to enzymatic production assays, using wheat bran as a substrate. The fermentation process was carried out in Erlenmeyer flasks containing 5 g of substrate and 10 mL of saline solution. The flasks were inoculated with 5 disks of 0.5 cm diameter and it was transferred for incubator BOD type at 30 °C for 96 hours. After this period 50 mL of water was added to obtain the crude enzymatic solution. Amylolytic activity was determined by dextrinizing method proposed by PONSASAWADI; YAGISAWA (1987) and FUWA (1954). Five filamentous fungi stand out in amylase production, such as AC - 6.1, AC - 17.1, AC - 6.3, AC - 21.4 and AC - 21.3. These isolates shown mean amylase enzymatic of ± 105.24 U / mL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmulas estruturais do amido: amilose.	11
Figura 2 - Fórmulas estruturais do amido: amilopectina.	12
Figura 3 - Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido.	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características do amido encontrado em diferentes fontes vegetais.	12
Tabela 2 - Origem microbiana e características dos sistemas de produção para algumas α -amilases.	18
Tabela 3 - Características de culturas isoladas em áreas de Cerrado, com crescimento a 30° C.	21
Tabela 4 - Atividade amilolítica para isolados fungicos, sob cultivo em estado sólido, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, a 30 °C, por 96 horas.	22

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Revisão bibliográfica	11
2.1 Amido	11
2.2 Amilase	13
2.3 α -amilase	15
2.4 Microrganismos produtores de enzimas	16
2.4.1 Meios de cultura para produção	16
2.4.2 Cultivo em estado sólido	16
2.5 Produção de α -amilase	17
2.6 Aplicações de α -amilase	19
3. Materiais e métodos	19
3.1 Isolamento de microrganismos	19
3.2 Produção de enzimas	20
3.2.1 Cultivo em estado sólido	20
3.2.2 Determinação de atividade enzimática	20
4. Resultados e discussões	20
4.1 Isolamento de microrganismos	20
4.2 Produção de enzimas	21
5. Conclusão.....	23
6. Referências bibliográficas.....	24

1. INTRODUÇÃO

A consciência sobre a importância de conservar a biodiversidade vem crescendo paralela ao avanço da destruição. Os recursos naturais passaram a ser vistos com maior valor, visto que podem dar origem a novos medicamentos, alimentos e produtos industriais (DURIGAN et al., 2011).

O Brasil possui a maior cobertura de florestas tropicais do mundo especialmente concentrada na região Amazônica. O país abriga uma imensa diversidade biológica, o que faz dele o principal entre os países detentores de megadiversidade do planeta (LEWINSOHN; PRADO, 2002 citado por MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2002).

O Bioma Amazônia, o maior bioma brasileiro é caracterizado por dois grandes ecossistemas, vegetação de terra firme e vegetação de várzea. Nesses ambientes destacam-se a heterogeneidade florística que inclui várias espécies de valor econômico. Os solos de terra firme apresentam características físicas adequadas para o uso agrícola. As várzeas apresentam na sua maioria alta fertilidade e baixa acidez (EMBRAPA, 2006).

A Amazônia possui grande importância para a estabilidade ambiental do Planeta. Nela estão fixadas mais de uma centena de trilhões de toneladas de carbono. Sua massa vegetal libera em torno de sete trilhões de toneladas de água anualmente para a atmosfera, e seus rios descarregam cerca de 20% de toda a água doce que é despejada nos oceanos pelos rios existentes no globo terrestre (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2002).

No plano nacional e internacional, a Amazônia do século XXI é muito mais do que um ícone de representação de seu valor como natureza para o equilíbrio planetário. Ela é uma fronteira para a ciência e a tecnologia, em era marcada pelo avanço das biotecnologias e da engenharia genética (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2002)

Os microrganismos representam a forma de vida mais abundante e diversificada do planeta. Devido a sua grande diversidade desempenham funções de grande relevância para a manutenção dos ecossistemas, uma vez que estão relacionados a cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos que influenciam diretamente nos processos do solo (ZELLER, 2001).

Dentre os microrganismos presentes no solo os fungos são os que vêm despertando maior interesse, devido à grande diversidade de enzimas que secretam com potencial para aplicações biotecnológicas (SAHA, 2003).

Tendo em vista a grande diversidade microbiana em diferentes biomas nacionais, buscou-se selecionar microrganismos fungicos a partir de amostras de solo coletadas em área do Bioma Amazônia da bacia do Rio Teles Pires, localizada no município de Paranaíta-MT, com potencial na produção de enzima amilolítica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Amido

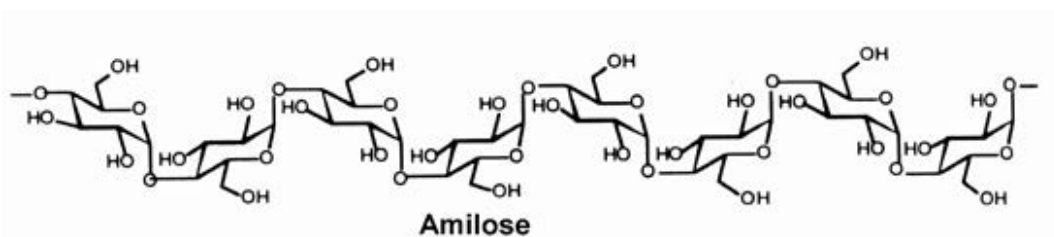
O amido é um dos mais importantes açúcares na vida dos organismos, um homopolissacarídeo de reserva, composto de monômeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas α -1,4, acumulado em células de plantas, tecidos fotossintetizantes (folhas), na forma de grânulos no interior dos plastídios, incluindo cloroplastos, bem como órgãos heterotróficos, como tubérculos e sementes (GUIMARÃES, 2016).

Os vegetais acumulam amido em suas folhas fotossintetizantes durante o dia e durante a noite utilizam para manter a respiração, o crescimento na ausência de luz e a exportação de sacarose (GEIGENBERGER, 2011). Existem duas vias metabólicas distintas responsáveis pela utilização do amido: a hidrolítica, onde se obtém maltose, e a fosforolítica, responsável pelo carbono para reações dos cloroplastos na presença de luz (WEISE et al., 2011).

O amido pode ser encontrado sob duas formas estruturais: a amilose, e a amilopectina (YOSHIMOTO et al., 2000). São observadas no grânulo de amido, em média, 25% e 75% de amilose e amilopctina, respectivamente (GUIMARÃES, 2016).

A amilose é constituída de unidades de D-glicose (α -D-glucopiranosil) unidas entre si por ligação glicosídica do tipo α -1,4, mais simples e não ramificada, (Figura 1) (POLIZELI; SILVA, 2016). As cadeias assumem forma helicoidal e cada volta espiral é composta de seis unidades de glicose (POLIZELI; CARVALHO; POLIZELI, 2016)

Figura 1 - Fórmulas estruturais do amido: amilose.

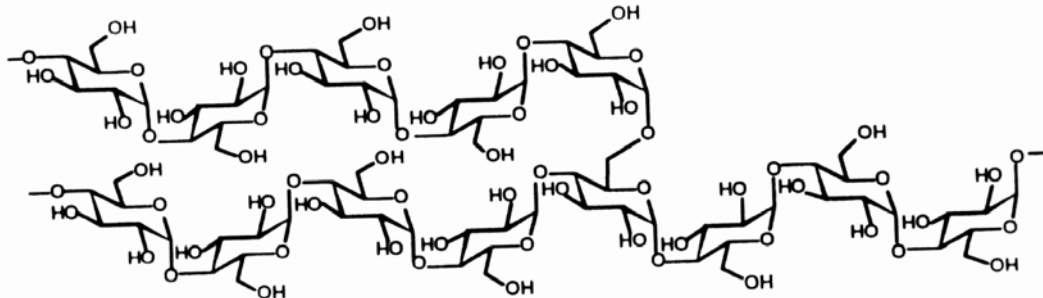


Fonte: ALVES - PRADO, 2005.

A amilopectina mais complexa, constituída por unidades de glicose unidas por ligações α -1,4 com ramificações α -1,6, (Figura 2) apresenta uma estrutura organizada, a qual forma a base do grânulo de amido (POLIZELI; SILVA, 2016). Segundo Guimarães (2016) a amilopectina também é responsável pela cristalinidade do grânulo, que através das diferenças na estrutura cristalina, permite que o amido seja classificado em três diferentes tipos: amidos

de cereais (tipo A); amidos de tubérculos (tipo B); e amidos de vagens (tipo C). Na tabela 1 são observadas essas características

Figura 2 - Fórmulas estruturais do amido: amilopectina.



Fonte: ALVES PRADO, 2005.

O amido é a fonte energética mais utilizada pelo homem, presente em muitos produtos derivados de tubérculos, leguminosas e cereais (PARADA; AGUILERA, 2011). A maioria dos processamentos industriais envolve a hidrólise desse polímero, que resulta nos chamados “hidrolisados de amido”, independentemente do catalisador ou do grau de fracionamento. Grande parte da produção de amido é destinada a indústria de alimentos, contribuindo para a melhoria das propriedades funcionais destes (GUZMÁN-MALDONADO; PAREDE-LÓPEZ, 1995).

Tabela 1 - Características do amido encontrado em diferentes fontes vegetais.

Características	Batata	Mandioca	Milho	Trigo
Morfologia do grânulo	Oval, esférica	Oval, truncada	Circular, poligonal	Circular, bimodal
Dimensão do grânulo	5-100	4-35	2-30	1-45
Fosfato (% m/v)	0,08	0,01	0,02	0,06
Proteína (% m/v)	0,06	0,1	0,35	0,4
Lipídio (% m/v)	0,05	0,1	0,7	0,8

Fonte: Modificada de Jobling, 2004.

A maior parte do amido usado é quimicamente modificado, o que amplia o leque de aplicações para diferentes setores, como o têxtil, farmacêutico, indústrias de adesivos, explosivos, papel, construção civil, metais, cosméticas e de mineração (GUIMARÃES, 2016).

Além destes setores também é utilizado como material termoplástico, na produção de embalagens, recipientes e materiais descartáveis como copos, pratos e talheres (WANG et al., 2003). Do ponto de vista ecológico é extremamente interessante para a preservação ambiental, visto que esse tipo de material é degradado em menos tempo pela ação microbiana (CORRADINI et al., 2005). Outro setor de grande destaque é como fonte de energia renovável, utilizado na produção de bioetanol, uma vez que as reservas de combustíveis fósseis são limitadas (FETTKE et al., 2009).

É necessário um sistema multienzimático para a completa degradação da molécula de amido dada a sua complexidade estrutural. Esse sistema é denominado de: sistema amilolítico, que compreende vários tipos de amilases com diferentes especificidades (SILVA; POLIZELI, 2016).

2.2 Amilases

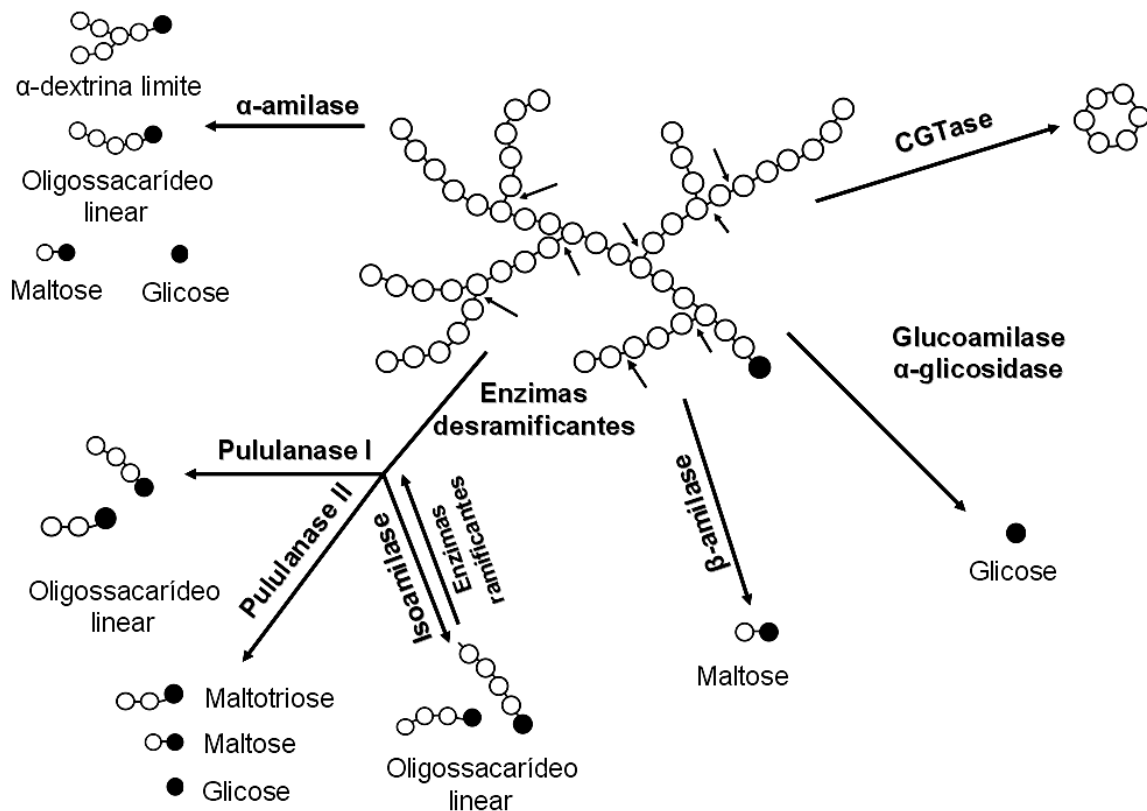
Mais de 5.000 enzimas diferentes foram identificadas, mas constantemente outras são descobertas. As enzimas amilolíticas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo responsáveis pela reciclagem do carbono contido em amiláceos em geral, animais, plantas, fungos, leveduras e bactérias (POLIZELI; CARVALHO; POLIZELI, 2016).

Segundo Pandey et al. (2000), as amilases estão entre as mais importantes enzimas industriais e são de grande importância na biotecnologia. Além de serem usadas como aditivos em detergentes, elas podem ser empregadas na sacarificação do amido e nas indústrias de alimentos, fermentação, papel e têxtil. Com o advento de novas fronteiras biotecnológicas, o espectro de aplicação das amilases tem se expandido para muitas outras áreas, incluindo a clínica, farmacêutica, médica e químico-analítica e representam 30% do mercado de enzimas (SOCCOL et al., 2017)

A utilização de enzimas amilolíticas em substituição as substâncias químicas na produção de derivados de amido têm apresentado algumas vantagens. Primeiro, quanto à especificidade das enzimas na produção de xaropes de açúcar com propriedades químicas e físicas conhecidas. Segundo que a hidrólise enzimática é mais branda resultando em poucas reações intermediárias e menor escurecimento.

Alguns autores sugeriram critérios para a classificação das amilases, devido a sua grande diversidade. Uma das classificações foi proposta por Reddy et al. (2003) e Castro et al. (2001) de acordo com seu modo de ação. Na FIGURA 3 estão representadas os grupos de amilase classificados por endoamilases, exoamilases, desramificadoras e as transferases.

Figura 3 – Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. (•) molécula glicose com extremidade redutora; (o) molécula de glicose sem extremidade redutora; (□) indicam o ponto de clivagem preferido na molécula de amido.



Fonte modificada: ALVES-PRADO (2005).

As endoamilases (EnA): hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4 ao longo da molécula de amido, produzindo cadeias de oligossacarídeos com tamanhos variados, mas fundamentais para a liquefação do amido. Pertencem a esse grupo as α -amilases.

As exoamilases (ExA): hidrolisam, sucessivamente, as ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora da molécula, produzindo açúcares de menor massa molar como a glicose ou a maltose. Exemplos: β -amilases, glucoamilases (GA) e α -glicosidases.

As amilases desramificadoras (DA): como a isoamilase e a pululanase, atuam especificamente nas ligações glicosídicas α -1,6 do pululano, amido, amilopectina e oligossacarídeos relacionados, formando maltotriose. As isoamilases também são consideradas enzimas desramificadoras, mas diferem das pululanases por serem incapazes de hidrolisar o pululano e terem ação restrita sobre a dextrina-limite.

As transferases: hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 da molécula doadora e transferem parte do doador para um aceptor glicosídico com a formação de uma nova ligação glicosídica.

2.3 α -amilase

A α -amilase foi a primeira enzima utilizada em indústrias alimentícias e de bebidas e na panificação. Recebe também o nome de α -1,4-D-glucanoglucano-hidrolases e glicogenase. Suas principais aplicações estão relacionadas ao processo de liquefação do açúcar, na indústria de bebida fermentada e na produção de adesivos, detergentes, ração animal e indústria papelreira (POLIZELI; CARVALHO; POLIZELI, 2016).

Uma grande variedade de microrganismos, desde Archaea até Bacteria e Eukarya, conta com α -amilases. De acordo com o grau de hidrólise do substrato elas podem ser divididas em duas categorias: as que fazem sacarificação e hidrolisam de 50% a 60% do substrato, e aquelas que fazem liquefação e hidrolisam entre 30% e 40% do amido (PANDEY et al., 2000).

As α -amilases possuem ainda subfamílias formadas por amilases multifuncionais com estruturas catalíticas únicas (LI et al., 2011). E tem uma grande aplicação nas indústrias de alimentos e açúcares, como a amilase produzida pela bactéria termofílica *Bacillus* sp. ZW2531-1 (WANG et al., 2009).

2.4 Microrganismos produtores de enzimas

A primeira etapa da produção microbiana de uma enzima de interesse consiste na aquisição do microrganismo produtor, que pode ser de uma linhagem selvagem ou modificada (genética clássica ou técnicas de biologia molecular). A linhagem pode ser adquirida de coleções de cultura científicas, selecionadas a partir de amostras de solo, água, tecidos vegetais, fezes de animais entre outras fontes. Idealmente o microrganismo deve apresentar características como: ser seguro do ponto de vista biológico (*status* GRAS – *generally recognized as safe*), apresentar elevada capacidade de síntese e excreção de enzima, suportar condições ambientais adversas, relacionadas com a pressão osmótica, temperatura e força iônica do meio, e ser tolerante a presença de substâncias tóxicas que podem ser geradas no processo de tratamento da matéria prima ou pelo próprio metabolismo celular (BON et al., 2008).

O processo de produção de enzimas compreende um conjunto de operações que incluem o tratamento da matéria prima, o preparo de meios de propagação e produção, a esterilização e transformação do substrato em produto por via bioquímica, seguida de separação e purificação dos mesmos. A maior parte dos processos ocorre com culturas puras, sob condições assépticas (BON et al., 2008).

2.4.1 Meios de cultura para produção de enzimas

As características físico-químicas do meio de cultivo são de fundamental importância, não apenas para o crescimento celular como também para o rendimento em produto (ATLAS, 1997; MEDIGAN et al., 2000 citado por BON et al., 2008). Processos microbianos industriais podem utilizar meios de composição quimicamente definidos. Nesse caso, os componentes do meio são qualitativa e quantitativamente conhecidos (EUROPEAN COMMISSION, 2002; KRISHNA, 2005; SPENCER-MARTINS, SÁ-NOGUEIRA, 2005 citado por BON et al., 2008).

A matéria-prima é um dos componentes mais relevantes nos custos de produção, sendo esta uma das razões para o interesse no aproveitamento de resíduos agroindústrias e ou florestais. Industrialmente as amilases (EC 3.2.1.) tem sido produzidas a partir de resíduos como farelo de trigo, palha de trigo, bagaço de maçã, soja e resíduos da panificação alguns deles enriquecidos com amido ou não (SOCCOL et al., 2017). Em geral a escolha da matéria prima deve considerar características como, composição adequada para o crescimento do microrganismo e formação do produto de interesse, apresentar baixo custo de obtenção, ter elevada disponibilidade (BON et al., 2008).

A escolha da fonte de carbono é muito importante, pois a síntese de diversas enzimas está sujeita a repressão catabólica. A glicose, apesar de ser em geral, excelente fonte para crescimento celular, tem sido citada como repressora para produção de algumas enzimas, como, por exemplo, α -amilase (MADIGAN et al.; 2000 citado por BON et al., 2008). Como fonte de nitrogênio inorgânico, o sulfato de amônio é o sal mais utilizado devido seu baixo custo. A uréia, por sua vez, é utilizada como fonte de nitrogênio orgânico. Entre as principais fontes de nitrogênio complexa temos as soluções balanceadas de sais e minerais (EUROPEAN COMMISION, 2002; SANT'ANNA JR., 2001 citado por BON et al., 2008).

2.4.2 Cultivo em estado sólido (CES)

O cultivo em estado sólido é definido como processo em que o crescimento microbiano e a formação de produto ocorrem na superfície de substratos sólidos na ausência de água livre. Os substratos normalmente utilizados são produtos de origem agrícola, como trigo, milho, arroz, soja, além de substratos não convencionais, como os resíduos agroindustriais. Geralmente a operação de cultivo em estado sólido pode ser realizada sem agitação mecânica, com agitação ocasional ou contínua, e colunas recheadas com circulação de líquido (MITCHELL et al., 2000; PANDEY et al., 2000; PANDEY et al., 2001; KRISHNA, 2005; COUTO; SANROMÁN, 2006).

O cultivo em estado sólido apresenta diversas vantagens, entre as quais estão, a simplicidade dos meios de cultivo, ausência de equipamentos sofisticados, baixo grau de umidade, o que reduz problemas de contaminação e reduzido consumo de energia. Entretanto, existem fatores limitantes como, dificuldades no aumento de escala, dificuldades de controle de variáveis físico-químicas, tais como pH, temperatura, oxigênio e grau de mistura (BON et al., 2008).

Diversas enzimas são produzidas a partir de cultivo sólido, como amilases, proteases, xilanases e celulases. Entre os microrganismos, os fungos filamentosos são os que melhor se adaptam a esse tipo de cultivo. Sua forma de crescimento, sua boa tolerância a baixa quantidade de água confere aos fungos vantagens com relação aos microrganismos unicelulares (KRISHNA, 2005; COUTO; SANROMÁN, 2006).

2.5 Produção de α -amilase

A utilização de microrganismos em bioprocessos ganhou importância devido à produção de inúmeras enzimas com características físico-químicas variadas e com excelentes potenciais para aplicação industrial (IWASHITA, 2002). Dentre as amilases a maioria são sintetizadas por fungos e com maior frequência estão as α -amilases, produzidas por muitos gêneros de fungos filamentosos (PANDEY et al., 2000). Industrialmente diferentes microrganismos são empregados como *Aspergillus oryzae*, *Bacillus* spp., *Thermomyces* sp. e *Macrophomina phaseolina*. A maior atividade (39.900 U g⁻¹ em 4 dias) foi obtida com resíduos de soja e com resíduos de panificação fermentados utilizando o fungo filamentoso *Thermomyces* sp em reator cilíndrico de 4,5 litros (SOCCOL et al., 2017). Na Tabela 2, há exemplos de sistemas de produção e outras espécies fúngicas relatadas como produtoras de α -amilase.

Destacam-se ainda, com *Aspergillus niger* UO-1 (HERNÁNDEZ et al., 2006); *Aspergillus tamaritii* (MOREIRA et al., 1999); *Talaromyces emersonii* (BUNNI et al., 1989); *Scytalidium thermophilum* (AQUINO et al., 2003) e *Rhizomucor pusillus* A (SILVA et al., 2005); *Aspergillus flavus* TF-8 (SINGH; GUPTA, 2014); *Lichteimia ramosa* e *Thermoascus aurantiacus* (OLIVEIRA et al., 2016).

Tabela 2 - Origem microbiana e características dos sistemas de produção para algumas α -amilases

Microrganismo	Bioreator	cultivo	Substrato	Atividade amilolítica	Referencia
<i>Aspergillus flavus</i> TF-8	frasco	CES	torta de semente da Sal (<i>Shorea robusta</i>)	14,3 U/mL	Singh; Gupta, 2014
<i>Aspergillus niger</i>	frascos	CSub	Casca de inhame		Uguru et al., 1997
<i>Aspergillus niger</i> UO-1	frascos	CSub	Água residuária de cervejaria + 4% amido	70,3 U/mL	Hernández et al., 2006
			Água residuária de indústria carne + 4% amido	60 U/mL	
<i>Aspergillus niveus</i>	frascos	CSub	meio Khanna com amido solúvel	81,7 U/mg proteína	Silva et al., 2005
<i>Aspergillus oryzae</i> S2	frascos	CES	Amido e farelo de soja	22.118 U/g substrato	Sahnoun et al., 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	frascos	CES	Farelo de trigo	1.490 U/g	Chen et al., 2014
<i>Aspergillus</i> sp	frascos	CES	Farelo trigo	167 U/mL	Chimata et al., 2010
<i>Lichtheimia ramosa</i>	frasco	CES	Farelo trigo	32 U/mL	Oliveira et al., 2016
<i>Monascus sanguineus</i>	frascos	CES	casca de beterraba em pó	0,029 U/mL	Tallapragada et al. (2017)
			casca de laranja	0,028 U/mL	
			casca de cebola	0,017 U/mL	
<i>Thermascus aurantiacus</i>	frasco	CES	Farelo trigo	4,4 U/mL	Oliveira et al., 2016
<i>Thermomyces</i> sp	Reator de 4,5 L	CES	Resíduos da indústria de soja e de panificação	39.900 U/g	Cerda et al., 2016

Fonte: Próprio autor

CES: cultivo em estado sólido; CSub: Cultivo Submerso

2.6 Aplicações α -amilase

O uso de enzimas é preferido ao uso de compostos químicos, devido ao alto rendimento e pelos inúmeros produtos que podem ser obtidos. Xaropes de frutose, um adoçante de baixa caloria e alto poder adoçante, feitos através da isomerização de xarope de glicose se tornou o principal uso de hidrolisados de amido (CRABB; SHETTY, 1999).

Na panificação, a α -amilase é adicionada à massa para degradar o amido danificado da farinha a pequenas dextrinas. A adição de α -amilase de malte ou fúngica resulta no aumento do volume do pão e uma melhor textura do produto final. Para atrasar o envelhecimento, melhorar a textura, volume e sabor dos produtos tornando-os mais atrativos ao consumidor. Na indústria de bebidas fermentadas a matéria prima na produção das mesmas normalmente é a cevada, mas o objetivo é hidrolisar o amido em glicose através de leveduras para a fermentação alcoólica (NOGUEIRA; BENASSI, 2016).

Na indústria de detergentes, a adição de amilases substitui a inserção de componentes tóxicos para o meio ambiente, uma vez que são biodegradáveis. Na indústria papelreira é usada para diminuir a viscosidade da goma de amido empregada durante o processamento do papel. As amilases comercializadas para esse fim são produzidas por *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* (GUPTA et al., 2003).

A indústria têxtil tem utilizado as amilases para remoção da pasta de amido aplicada ao fio com a finalidade de aumentar a resistência do mesmo a frisão durante o processamento. Essa pasta, quando não totalmente removida, dificulta o processamento final das roupas como tingimento, clareamento ou outro tipo de acabamento (NOGUEIRA; BENASSI, 2016).

As aplicações industriais dessas enzimas são inúmeras, mas talvez a de maior importância seja no processo de liquefação do amido nas indústrias de xaropes, álcool e bebidas fermentadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento de Microrganismos

Foram utilizadas 25 amostras de solo coletadas em área do Bioma Amazônia na bacia do Rio Teles Pires, pelo Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini, da UNESP, Campus de Ilha Solteira. Foi diluído 1,0 grama de cada amostra do solo em frascos contendo 99 ml de água peptonada. Foram feitas diluições decimal. Em seguida, alíquotas de 100 μ L foram distribuídas por plaqueamento em superfície sob placas de Petri contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA) com adição de cloranfenicol, para inibir o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas

em estufa tipo BOD a 30°C. Após crescimento, as colônias morfologicamente diferentes entre si foram transferidas para outra placa de Petri contendo o mesmo meio de cultura, para purificação. As culturas puras foram estocadas em tubos com ágar inclinado e Castellani.

3.2. Produção de amilase

3.2.1. Cultivo em Estado Sólido (CES)

Para a produção enzimática foi adotado o processo de cultivo em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato. O processo se deu em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 5 g de substrato umedecido com 10 mL de solução salina e posteriormente esterilizados em autoclave. Os frascos foram inoculados com 5 discos de 0,5 cm de diâmetro e transferidos para incubadora tipo BOD a 30°C por 96 horas. A composição da solução salina foi de 0,26% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,22% K_2HPO_4 , 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,03% CaCl_2 . Após esse período, a solução enzimática bruta foi extraída pela adição de 50 mL de água estéril em cada frasco, os quais permaneceram sob agitação de 100 ciclos por minuto, em temperatura ambiente por 1 hora. Decorridos esse tempo o material foi filtrado utilizando gaze e centrifugado a 10.000 rcf por 10 min a 5°C. O sobrenadante líquido foi utilizado como extrato bruto enzimático para a determinação da atividade enzimática para α -amilase.

3.2.2 Determinação de atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada pelo método dextrinizante descrito por PONSASWADI; YAGISAWA (1987) e FUWA (1954). Nesse método 0,1 mL de enzima foi adicionada a 0,3 mL de solução amido solúvel a 0,5% em tampão acetato pH 5,5 100 mM e incubada por 10 minutos a 55°C. Após esse tempo a reação foi paralisada com 4,0 mL de HCl 200 mM e adicionado 0,5 mL de solução de iodo (0,3% KI-0,03% I_2) em seguida adicionado 10 mL de água para leitura a 700 nm. Uma unidade de atividade dextrinizante foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% a intensidade de cor azul do complexo de iodo-amido por minuto.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Isolamento de microrganismos

Foram selecionados 38 isolados, das quais suas características morfológicas estão descritas na Tabela. Esses isolados foram submetidos ao cultivo em estado sólido para análise do potencial enzimático dos mesmos.

Tabela 3. Características morfológicas de culturas isoladas em áreas do Bioma Amazônia, com crescimento a 30° C.

Isolados	Características morfológicas			Isolados	Características morfológicas		
AC – 6.1	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 20.3	Colônia	filamentosa,	
	branca				esbranquiçada		
AC – 6.2	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 21.1	Colônia	filamentosa,	cor
	branca				branca		
AC – 6.3	Colônia	filamentosa,		AC – 21.2	Colônia	filamentosa,	cor
	esverdeada				branca		
AC – 6.4.1	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 21.3	Colônia	filamentosa,	cor
	branca				branca		
AC – 6.5	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 21.4	Colônia	filamentosa,	cor
	branca				branca		
AC – 7.3.1	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 21.5	Colônia	filamentosa,	cor
	cinza escuro, esporos brancos				branca		
AC – 11.2	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 21.6	Colônia	filamentosa,	cor
	branca				branca		
AC – 15.1	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 22.1	Colônia	filamentosa,	cor
	branca				branca		
AC – 16.1.1	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 22.2	Colônia	filamentosa,	cor
	branca				branca		
AC - 17.1	Colônia	filamentosa,	verde	AC – 22.3	Colônia	filamentosa,	cor
	escuro				branca		
AC - 17.3	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 22.4	Colônia	filamentosa,	cor
	branca				branca		
AC - 17.4	Colônia	filamentosa,		AC – 23.1	Colônia	filamentosa,	cor
	esverdeada				verde		
AC – 18.1	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 23.2	Colônia	filamentosa,	cor
	rosa, esporos brancos				branca		
AC – 18.2	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 25.1	Colônia	filamentosa,	cor
	rosa, esporos brancos				branca		
AC – 18.3	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 25.2	Colônia	filamentosa,	cor

	rosa, esporos brancos				branca		
AC – 18.4	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 25.3	Colônia	filamentosa,	cor
	branca				branca		
AC – 18.5	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 25.4	Colônia	filamentosa,	cor
	branca				branca		
AC – 18.6	Colônia	filamentosa,		AC – 25.5	Colônia	filamentosa,	cor
	esbranquiçada				branca		
AC – 20.2	Colônia	filamentosa,	cor	AC – 25.6	Colônia	filamentosa,	cor
	rosa, esporos brancos				branca		

Fonte: Próprio autor

4.2 Produção de enzimas

Os valores obtidos da atividade enzimática das 38 culturas isoladas estão representados na Tabela 4. Os isolados AC – 6.1, AC – 17.1, AC – 6.3, AC – 21.3 e AC – 25.3, apresentaram as atividades mais altas para o método dextrinizante. Os isolados AC – 6.1, AC – 17.1, AC – 6.3, AC – 21.3 e AC – 25.3 apresentaram boa atividade amilolítica quando comparado a alguns dados de literatura, como nos estudos de Oliveira et al. (2016) utilizou *Lichtheimia ramosa* e *Thermascus aurantiacus*, isolados a partir de bagaço da cana de açúcar e serapilheira, respectivamente, do fragmento de floresta sazonal do Atlântico no município de Dourados-MS. Esses dois fungos filamentosos foram cultivados em farelo de trigo como única fonte de carbono e apresentou atividades amilolíticas, após 120 horas de cultivo, de 32,07 U/mL para *L. ramosa* e de 4,42 U/mL para *T. aurantiacus*.

Tabela 4. Atividade amilolítica para isolados fungicos, sob cultivo em estado sólido, utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, a 30 °C, por 96 horas.

Isolados	Ativ. Amilase (U/mL)	Isolados	Ativ. Amilase (U/mL)
AC – 6.1	140,16 ± 17,21	AC – 20.3	5,53 ± 2,50
AC – 6.2	0,09 ± 0,013	AC – 21.1	18,46 ± 0,84
AC – 6.3	124,07 ± 37,49	AC – 21.2	0,09 ± 0,01
AC – 6.4.1	23,33 ± 4,08	AC – 21.3	72,95 ± 11,05
AC – 6.5	17,93 ± 0,78	AC – 21.4	0,97 ± 0,81
AC – 7.3.1	2,25 ± 3,19	AC – 21.5	46,96 ± 3,19
AC – 11.2	31,39 ± 11,94	AC – 21.6	0,09 ± 0,08

AC - 15.1	27,32 ± 15,50	AC - 22.1	0,18 ± 0,07
AC - 16.1.1	0,27 ± 0,05	AC - 22.2	0,19 ± 0,07
AC - 17.1	126,32 ± 24,21	AC - 22.3	9,67 ± 0,77
AC - 17.3	0,18 ± 0,12	AC - 22.4	28,83 ± 12,3
AC - 17.4	0,02 ± 0,31	AC - 23.1	0,79 ± 0,05
AC - 18.1	0,45 ± 0,07	AC - 23.2	0,14 ± 0,07
AC - 18.2	0,97 ± 0,01	AC - 25.1	53,75 ± 10,62
AC - 18.3	0,27 ± 0,08	AC - 25.2	54,23 ± 24,97
AC - 18.4	0,11 ± 0,05	AC - 25.3	62,74 ± 6,21
AC - 18.5	0,05 ± 0,04	AC - 25.4	55,03 ± 5,04
AC - 18.6	6,15 ± 1,71	AC - 25.5	51,87 ± 12,9
AC - 20.2	0,26 ± 0,23	AC - 25.6	53,56 ± 4,62

Fonte: Próprio autor

Singh e Gupta (2014) estudando a α -amilase produzida por *Aspergillus flavus* TF-8 adquirido da coleção de culturas microbianas e banco de genes do Institute of Microbial Technology (IMTECH) em Chandigarh na Índia, usando torta de semente da Sal (*Shorea robusta*) como única fonte de carbono foi obtida uma atividade máxima de 1,8 U/mL após 60 horas de cultivo a 30 °C. Em condição otimizada o mesmo autor obteve atividade amilolítica de 14,3 U/mL. Tallapragada et al. (2017) estudando α -amilase produzida por *Monascus sanguineus* isolado da Romã (*Punica Granatum*) no município de Bangalore na Índia, utilizou diferentes fontes de carbono agroindustriais para cultivo a 30 °C por 360 horas, e obteve atividades amilolíticas de 0,029 U/mL em casca de beterraba em pó, 0,028 U/mL em casca de laranja e 0,017 U/mL em casca de cebola. As condições otimizadas do meio com beterraba em pó resultaram em atividade amilolítica máxima de 0,84 U/mL. Guimarães et al. (2006) testou para atividade amilolítica 16 fungos filamentosos coletados a partir de material orgânico em decomposição e/ou amostras de solo do Bioma Cerrado em municípios do Estado de São Paulo. Os autores utilizaram cultivo submerso, em diferentes meios, contendo 1% de amido como substrato a 40 °C por 120 horas. O isolado IF-II coletado da *Inga heterophyta* no município de Ilha Solteira, foi o que apresentou maior atividade para amilase, 160,8 U/mL. Carvalho et al. (2008) em estudo com *Bacillus* sp. SMI-2, isolado de amostras de solo coletadas no Bioma Mata Atlântica, no município de Campos dos Goytacazes-RJ, utilizando para cultivo meio contendo baixa concentração de amido solúvel suplementado

com proteínas do soro de leite e peptona, com cultivo a 50°C por 32 horas, obteve atividade amilolítica de 57,70 U/mL.

Oliveira et al. (2006) utilizando isolados de Rizóbia nativos da Amazônia central, em meio de cultivo para levedura (YMA) contendo amido de milho (maizena) como fonte de carbono, obteve como maior índice de atividade enzimática amilolítica 3,1 IE². No estudo com *Mucor circinelloides* isolados a partir de esterco de animais herbívoros no Bioma Caatinga, em dois locais do município de Recife-PE, Alves et al. (2002) utilizou como substrato amido solúvel, Tween 20, e pectina cítrica com cultivo a 28°C por 72 horas e obteve em f. *circinelloides* como maior índice de atividade enzimática amilolítica 8,5 IE².

5. CONCLUSÃO

A região de estudo no bioma Amazônia é promissora na seleção de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas. Foram isolados 38 fungos filamentosos, sendo que cinco desses isolados apresentam potencial no estudo de amilase fúngica e podendo ser realizado ensaios que visem a otimização do sistema de produção da enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. H.; TAKAKI, G. M. C.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 33, p. 325-330, 2002.

ALVES-PRADO, H. F. **Purificação e caracterização de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) produzida por *Paenibacillus campinasensis* H69-3 e *Bacillus clausii* E16: caracterização das ciclodextrinas, clonagem e sequenciamento do gene da CGTase de *Bacillus clausii* E16**. 2005. 166 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Campus de Rio Claro. 2005.

ALVES-PRADO, H. F.; GOMES, E; SILVA, R. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 5, n. 98, p.189-196, 2002.

AQUINO, A. C. M. M.; JORGE, J. A.; TEREZINHA, H. F.; POLIZELI, M. L. Studies on a thermostable alpha- amylase from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 61, p. 323-328, 2003.

BON, E. P. S.; JR, N. P.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA. Bioprocessos para produção de enzimas. In.: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Org.) **Enzimas em biotecnologia produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2016. Cap. 5, p. 100-112.

BRASIL – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF, 2002.404 p.

BUNNI, L.; MCHALE, L.; MCHALE, A.P. Production, isolation and partial characterization of an amylase system produced by *Talaromyces emersonii* CBS 814.70. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 11, p. 370-375, 1989.

CARVALHO, R. V.; CORRÊA, T. L. R.; SILVA, J. C. M.; VIANA, A. P.; MARTINS, M. L. L. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e tecnologia de alimentos**. v. 28, n. 2, p. 380-386, 2008.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non-conventional processes. **Biomass Conv. Bioref**. v. 1, p. 245-255, 2011.

CERDA, A.; EL-BAKRY, M.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Long term enhanced solid-state fermentation: Inoculation strategies for amylase production from soy and bread wastes by *Thermomyces* sp. in a sequential batch operation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. vol. 4, p. 2394-2401, 2016.

CHEN, B.; WU, Q.; XU, Y. Filamentous fungal diversity and community structure associated with the solid state fermentation of Chinese Maotai-flavor liquor. **International Journal of Food Microbiology**. vol. 179, p. 80-84, 2014.

CHIMATA, M. K.; SASIDHAR, P.; CHALLA, S. Production of extracellular amylase from agricultural residues by a newly isolated *Aspergillus* species in solid state fermentation. **African Journal of Biotechnology**. vol. 9, n. 32, p. 5162-5169, 2010.

CORRADINI, E.; LOTTI, C.; MEDEIROS, E. S.; CURVELO, A. A. S.; MATTOSO, L. H. C. Estudo Comparativo de Amidos Termoplásticos Derivados do Milho com Diferentes Teores de Amilose. **Polimeros: Ciência e Tecnologia**. v. 15, p. 268-273, 2005.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry. **A review Journal Food Engineering**. v. 73, p. 291-302, 2006.

CRABB, W. D.; SHETTY, J. K. Commodity Scale Production of Sugars from Starches. **Ecol. Ind. Microbiol**. v. 2, p. 252-256, 1999.

DURIGAN, G.; MELO, A. C. G.; MAX, J. C. M.; BOAS, O. V.; CONTIERI, W. A.; RAMOS, V. S. **Manual para recuperação da vegetação de cerrado**. 3ª Edição Revisada e Atualizada – março 2011.

EMBRAPA: A Embrapa nos biomas brasileiros. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/82598/1/a-embrapa-nos-biomas-brasileiros.pdf>. Acesso em: 20 de junho de 2017.

FETTKE, J.; HEJAZI, M.; SMIRNOVA, J.; HÖCHEL, E.; STAGE, M.; STEUP, M. “Eukaryotic Starch Degradation: Integration of Plastidial and Cytosolic Pathways”. **Journal of Experimental Botany**. v. 60, n. 10, p. 2907-2922, 2009.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**. v. 41, p. 583-603, 1954.

GEIGENBERGER, P. Regulation of starch Biosynthesis in Response to a Fluctuating Environment. **Plant Physiology**. v. 155, p. 1566-1577, 2011.

GUIMARÃES, L. H. S. Amido: biossíntese, estrutura e aplicação. In.: POLIZELI, M.L.T.M.; SILVA, T.M. (Org.) **Amilases microbianas**. São Paulo: EDUSP, 2016. Cap. 1, p. 11-19.

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C. MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; JUNIOR, A. B.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, p. 474-480, 2006.

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

GUZMÁN-MALDONADO, H.; PAREDES-LÓPEZ, O. Amylolytic Enzymes and Products Derived from Starch: A Review. **Critical Review in Food Science and Nutrition**. v. 35, p. 373-403, 1995.

HAKI, G. D. E.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**. v. 89, p.17-34, 2003.

HERNÁNDEZ, M. S.; RODRÍGUES, M. R.; GERRA, N. P.; ROSÉS, R. P. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. **Journal of Food Engineering**. v. 73, p. 93-100, 2006.

IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 94, p. 530-535, 2002.

JOBLING, S. Improving Starch for Food and Industrial Applications. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 7, p. 210-218, 2004.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems – an overview. **Crit. Review Biotechnology**. v. 25, p. 1-30, 2005.

LI, F.; ZHU, X.; LI, Y.; CAO, H.; ZHANG, Y. Functional Characterization of a Special Thermophilic Multifunctional Amylase OPMA-N and its N-terminal Domain. **Acta Biochim Biophys. Sin.** v. 43, p. 324-334, 2011.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. new developments in solid state fermentation II. Rational approaches to the design operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**. v. 35, p. 1211-1225, 2000.

MOREIRA, F. G.; LIMA, F. A.; PEDRINHO, S. R. F.; LENARTOVICZ, V.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Production of amylases by *Aspergillus tamari*. **Revista de Microbiologia**. v. 30, p. 157-162, 1999.

NIGAM, P.; SINGH, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. **Enzyme and microbial Technology**. v. 17, p. 770-778, 1995.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S., CHAGAS-JUNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e tecnologia de alimentos**. v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

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 and by solid-state fermentation. **The Scientific World Journal**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. **Process Biochemistry**. v. 35, p. 1153–1169, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. Solid state fermentation in biotechnology fundamentals and applications. **Asiatech Publishers, Inc**, New Delhi, 2001.

PARADA, J.; AGUILERA, J. M. Review Starch Matrices and the Glycemic Response. **Food Science and technology International**. v. 17, n. 3, p. 187-204, 2001.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BENASSI, V. M. Aplicação industrial de amilases microbianas. In.: POLIZELI, M.L.T.M.; SILVA, T.M. (Org.) **Amilases microbianas**. São Paulo: EDUSP, 2016. Cap. 5, p. 92-99.

POLIZELI, M. L. T. M.; SILVA, T.M. **Amilases microbianas**. São Paulo: EDUSP, 2016.

POLIZELI, M. L. T. M.; CARVALHO, C.C.; POLIZELI, A.M. O sistema amilolítico. In.: POLIZELI, M.L.T.M.; SILVA, T.M. (Org.) **Amilases microbianas**. São Paulo: EDUSP, 2016. Cap. 2, p. 23-45.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and indentification of a cyclomaltoextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal Fermentation Technology**. v. 65, n. 4, p. 463-467, 1987.

REDDY, N.; NIMMAGADDA, A.; SAMBASIVA RAO, K. R. S. Na Overview of the Microbial α -amylase Family. **African Journal Biotechnology**. v. 2, n. 12, p. 645-648, 2003.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 30, p. 279-291, 2003.

SAHNOUN, M.; KRIAA, M.; ELGHARBI, F.; AYADI, D.-Z.; BEJAR, S.; KAMMOUN, R. *Aspergillus oryzae* S2 alpha-amylase production under solid state fermentation: Optimization of culture conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**. vol. 75, p. 73-80, 2015.

SILVA, T. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; CARVALHO, A. F. A.; DASILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Production of saccharogenic and dextrogenic amylases by *Rhizomucor pusilus* A13.36. **The Journal of Microbiology**. v. 43, n. 6, p. 561-568, 2005.

SINGH, S.; GUPTA, A. Comparative fermentation studies on amylase production by *Aspergillus flavus* TF-8 using Sal (*Shorea robusta*) deoiled cake as natural substrate: Characterization for potential application in detergency. **Industrial Crops and Products**. v.57, p. 158-165, 2014.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; JUNIOR LETTI, L. A.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments and

innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>. *In Press*, Available online 22 March 2017.

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, p. 95-101, 2017.

UGURU, G.C.; AKINYANJU, J. A.; SANI, A. The use of yam peel for growth of locally isolated *Aspergillus niger* and amylase production. **Enzyme and Microbial Technology**. vol. 21, n. 1, p. 48-51, 1997.

WANG, X. L., YANG, K. K.; WANG, Y. Z. PROPERTIES OF Starch Blends with Biodegradable Polymers. **Journal of Macromolecular Science: Polymer Reviews**. v. 43, p. 385-409, 2003.

WANG, Y.; LI, F.; GAO, C. H. & ZHANG, Y. J. Characterization of a Novel Mesophilic Bacterial Amylase Secreted by ZW2531-1, a Strain Newly Isolated from Soil. **Chem. Res. Chin. Univ.** v. 25, p. 198-202, 2009.

WEISE, S. E.; VAN WIJK, K. J; SHARKEY, T. D. The Role of Transitory Starch in C3, CAM, and C4 Metabolism and Opportunities for Engineering Leaf Starch Accumulation. **Journal of Experimental Botany**. v. 62, n. 9, p. 3118, 2011.

YOSHIMOTO, Y.; TASHIRON, J.; T. & TAKEDA, Y. Molecular Structure and Some Physicochemical Properties of High Amylose Barley Starch. **Cereal Chemistry**. v. 77, p. 279-285, 2000.

ZELLER, V.; BARDETT, R. D.; TAPPEINE, U. Site and management effects on soil microbial properties of subalpine meadows: a study of land abandonment along a north-south gradient in the European Alps. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 33, p. 639-649, 2001.