

**DAVID SPRESSÃO DE LIMA JUNIOR**

**Amilases do fungo endofítico *Paecilomyces* sp SF 021: Estudos de produção, caracterização e aplicação na hidrólise do amido**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Alonso Bocchini**  
**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Heloíza Ferreira Alves do Prado**

**Araraquara**  
**2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

L732a Lima Junior, David Spressão de  
Amilases do fungo endofítico *Paecilomyces* sp SF 021: estudos de produção, caracterização e aplicação na hidrólise do amido / David Spressão de Lima Junior. – Araraquara - SP : [s.n.], 2020  
66 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Daniela Alonso Bocchini  
Coorientador: Heloiza Ferreira Alves do Prado

1. Amilases. 2. Fungos endofíticos. 3. Planejamento experimental. 4. Fermentação em estado sólido. 5. Hidrólise.  
I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Amilases do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021: Estudos de produção, caracterização e aplicação na hidrólise do amido"

**AUTOR: DAVID SPRESSÃO DE LIMA JÚNIOR**

**ORIENTADORA: DANIELA ALONSO BOCCHINI**

**COORDENADORA: HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof.ª, Dr.ª. DANIELA ALONSO BOCCHINI  
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES  
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto

  
Prof. Dr. JONAS CONTIERO  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biotecnologia - UNESP - Rio Claro

Araraquara, 02 de março de 2020

## DADOS CURRICULARES

### APRESENTAÇÃO

David Spressão de Lima Junior

Nascimento: 15/08/1992, Marília – SP.

Endereço de acesso ao currículo Lattes: [lattes.cnpq.br/2622722366127237](http://lattes.cnpq.br/2622722366127237)

Nome em citações bibliográficas: LIMA JUNIOR, D. S.; LIMA JR, D. S.

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

Bacharel em Engenharia Biotecnológica (2013-2017)

Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Ciências e Letras de Assis

#### 1. Atividades acadêmicas relevantes Capítulo de livro submetido para publicação:

PEREIRA SCARPA, JOSIANI DE CÁSSIA; BOCCHINI, DANIELA ALONSO; GOMES, ELENI; GOMES, JOSÉ ERICK GALINDO; OLIVEIRA, RAISA DÉLI; LIMA JUNIOR, DAVID SPRESSÃO; PEREIRA, WALDIR EDUARDO SIMIONI; OKAMURA, GABRIELA; NASCIMENTO, CARLOS EDUARDO. Microbial plant degrading enzymes: catalysis and application. In. **Natural Materials based Green Composites 2: Biomass.**

#### 2. Participação em eventos científicos:

##### -IX Simpósio de Microbiologia Aplicada (2019)

Apresentação na forma de painel do trabalho “Studies of amylase production by the endophytic fungi *Paecilomyces* sp. SF 021.”

##### -XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP (2017)

Apresentação na forma de painel do trabalho “Avaliação da produção de enzimas por *Sporidiobolus pararoseus* Sia 33.1 usando palha de cana e soro de leite.”

##### - VII Simpósio de Microbiologia Aplicada (2015)

Apresentação na forma de painel do trabalho “Determinação da temperatura ideal de crescimento de leveduras em meio contendo bagaço de cana”.

##### - VII Simpósio de Microbiologia Aplicada (2015)

ELSNER, V. H. P. ; LIMA JR, D. S. ; ORNELA, P. H. O. ; SHINYA, T. Y. ; OLIVA NETO, P.

Co autoria no trabalho apresentado na forma de painel “Determinação da temperatura ideal de crescimento de leveduras para incremento proteico”.

**- XX Simpósio Nacional de Bioprocessos e XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas (2015)**

SHINYA, T. Y. ; ELSNER, V. H. P. ; **LIMA JR, D. S.** ; MORAES, F. T. ; NUNEZ, E. G. F. ; OLIVA NETO, P.

Co autoria no trabalho apresentado na forma de resumo expandido “Produção de enzimas lignocelulolíticas por *Rhodotorula mucilaginosa*: Um novo bioprocesso utilizando bagaço de cana em cultivo submerso”.

**- II Workshop de Bioenergia (2014)**

SHINYA, T. Y. ; **LIMA JR, D. S.** ; ELSNER, V. H. P. ; ORNELA, P. H. O. ; MORAES, F. T. ; OLIVA NETO, P.

Co autoria no trabalho apresentado na forma de painel “Avaliação da produção de xilanase por levedura utilizando bagaço de cana como substrato”.

**3. Outros:**

**Estágio docência**

Estágio realizado junto aos cursos de Química e Química Tecnológica, na Disciplina “Bioquímica Geral e Experimental I”, sob supervisão da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Alonso Bocchini.

Período: Segundo semestre letivo de 2019

Carga horária: 60 horas

Regência de classe – Tema: Lipídeos: Estrutura e função

## DEDICATÓRIA

*À minha mãe, Ângela Eliza Busetto, por seu amor e apoio incondicionais e ao meu padrinho, Áureo Busetto, por todo o incentivo, apoio e inspiração ao longo de toda a trajetória acadêmica.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me ter me dado a força, proteção e iluminado meu caminho até aqui.

Aos meus familiares, meu mais sincero e profundo agradecimento a todos vocês, em especial à minha mãe Ângela Eliza, ao meu padrinho Áureo Busetto e à minha madrinha Fátima Aparecida Busetto, e à minha avó querida, Adelina, que ao longo de todos estes anos, não pouparam esforços, em nenhum momento, para que eu continuasse seguindo meu sonho. Obrigado por todo o apoio financeiro e emocional e por, principalmente, acreditarem nos meus sonhos junto comigo e por acreditarem em mim. Sem os inúmeros esforços de cada um de vocês, cada um à sua maneira, nada disso seria possível. Que Deus me permita um dia retribuir devidamente todos vocês, por todo esforço, dedicação e amor.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Alonso Bocchini por ter acreditado em mim e por ter me aceito em seu laboratório e grupo de pesquisa. Obrigado pela sua orientação, pelos seus ensinamentos, pelos inúmeros conselhos, pela sua amizade e pela sua compreensão e paciência nos diversos momentos em que foram necessárias. Obrigado!

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Heloiza Ferreira Alves do Prado pela co-orientação, ensinamentos e por sua disponibilidade e prontidão ao longo destes dois anos de trabalho.

A pessoa que esteve ao meu lado frente todas às dificuldades e momentos difíceis destes dois anos, Cintia Marcelo de Oliveira. Obrigado por sempre me apoiar, por não ter deixado com que eu desistisse, acreditado em mim quando eu mesmo não fui capaz e por ter sonhado os meus sonhos junto comigo. Obrigado por todo o seu apoio, por ter sido meu porto seguro, minha amiga, confidente e por sempre me ajudar a lembrar de seguir no caminho do meu objetivo maior. Você é incrível. À você, nada menos que o melhor. Obrigado por tudo!

Aos amigos José Aparecido de Oliveira (Cidão), Cleusa Marcelo (Cleclê) e Ricardo Marcelo de Oliveira (Ricardin), por toda a ajuda que me deram, por terem me acolhido e por terem sido minha segunda família. Muito obrigado. Que Deus continue os abençoando.

Aos amigos que a Pós Graduação me presenteou: Fauller Henrique, Jonatas Ângelo e Beatriz Campanhol, por tornarem essa caminhada mais leve e alegre. Pelos momentos de descontração e também pelos de desabafo, muito obrigado.

Aos irmãos que a vida me presenteou, Khalil Nogueira Nicolau e Pedro Henrique Lopes Cardoso (Bigode), por serem minha inspiração, meus exemplos e por todo o apoio e parceria ao longo destes anos.

A Cristina Spressão Doretto pela ajuda financeira durante o início do mestrado.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Regina Pombeiro Sponchiado e ao Prof Dr Rubens Monti por terem aceito o convite para avaliar o trabalho durante o Exame de Qualificação e por suas considerações e sugestões para o trabalho.

Ao Prof Dr Luis Henrique Souza Guimarães e ao Prof Dr Jonas Contiero por terem aceito o convite para avaliar o trabalho final e por suas considerações e sugestões para o trabalho

Ao Prof Dr Gustavo Nakamura Alves Vieira pela indispensável ajuda durante os ensaios de planejamento experimental.

Ao Prof Dr Fernando Massarin por ter cedido, gentilmente, a glucoamilase comercial utilizada neste trabalho.

Ao Instituto de Química de Araraquara, juntamente com todos os seus funcionários, pela estrutura, oportunidade e serviços prestados.

Ao CNPq, pela bolsa de pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.



## EPÍGRAFE

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”*

**Theodore Roosevelt**

## RESUMO

O presente trabalho visou o estudo da produção de amilases pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021, por fermentação submersa (FSbm) e em estado sólido (FES), além da aplicação das enzimas na hidrólise do amido. Os melhores resultados foram obtidos pelo cultivo por FES, destacando-se o farelo de trigo como substrato e, então, ferramentas de planejamento experimental foram empregadas para a otimização das variáveis quantidade e umidade inicial do substrato e quantidade de discos de inóculo, levando a um aumento de 62,53% na atividade amilolítica sacarificante da solução enzimática bruta obtida (de  $300 \pm 18$  para  $497,6 \pm 21,92$  U/g). As amilases obtidas sob condições otimizadas foram caracterizadas quanto a pH e temperatura ótimos de atividade, sendo as melhores atividades sacarificantes obtidas em pH 5,1 e 48 °C. As enzimas apresentaram estabilidade frente a uma ampla faixa de pH (3,5-10,-5), mantendo a atividade sacarificante residual acima de 80%. Quanto a termoestabilidade, a atividade sacarificante residual manteve-se acima de 80% em temperaturas entre 35 e 45 °C. A solução enzimática bruta obtida sob as condições de cultivo otimizadas foi aplicada na hidrólise do amido batata e mandioca e os rendimentos obtidos foram 51,4 e 54,1% (25,69 e 27,09 mg glicose/mL de hidrolisado), respectivamente, em 24 horas. Estes rendimentos correspondem a aproximadamente 57 e 67%, respectivamente, dos rendimentos máximos obtidos com o uso de glucoamilase comercial, sob as mesmas condições de hidrólise.

**Palavras chave:** amilases; fungo endofítico; fermentação submersa; fermentação em estado sólido; otimização; hidrólise enzimática.

## ABSTRACT

This work aimed to study the production of amylases by the endophytic fungus *Paecilomyces* sp. SF 021, by submerged fermentation (SmF) and solid-state fermentation (SSF), and the application of amylases in the hydrolysis of starch. Better results were obtained by solid-state cultivation, highlighting the use of wheat bran as substrate. Then, experimental design tools were used for optimize the variables substrate amount, substrate initial moisture and amount of inoculum discs, leading to an increase of 62.53% in the saccharifying amyolytic activity of the crude enzyme solution (from  $300 \pm 18$  up to  $497.6 \pm 21.92$  U/g). The amylases obtained under optimized conditions were characterized regarding optimum pH and temperature of activity, with the best saccharifying activities obtained at pH 5.1 and 48°C. The enzymes also showed stability over a wide pH range (3.5 – 10.5), maintaining residual saccharifying activity above 80%. In terms of thermo stability, residual saccharifying activity remained above 80% at temperatures between 35 and 45°C. The crude enzymatic solution obtained under optimized conditions was applied in the hydrolysis of potato and cassava starch leading to yields of 51.4 and 54.1% (25.69 and 27.09 mg of glucose / mL of hydrolyzate), respectively, in 24 hours. These yields correspond to approximately 57 and 67%, respectively, of the maximum yields obtained using commercial glucoamylase, under the same conditions.

**Keywords:** *amylases; endophytic fungus; submerged fermentation; solid-state fermentation; optimization; enzymatic hydrolysis.*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fórmulas estruturais do amido. .... 19
- Figura 2.** Representação esquemática da ação das enzimas envolvidas na degradação do amido. .... 20
- Figura 3.** Curva analítica de glicose utilizada para a determinação das atividades amilolíticas sacarificantes. .... 31
- Figura 4.** Atividades amilolíticas sacarificantes obtidas pelos cultivos de *Paecilomyces* sp. SF 021, por FES (U/g) e FSbm (U/mL), utilizando diferentes subprodutos agroindustriais como fontes de carbono ..... 38
- Figura 5.** Atividades amilolíticas dextrinizantes obtidas pelos cultivos de *Paecilomyces* sp. SF021, por FES (U/g) e FSbm (U/mL), utilizando diferentes subprodutos agroindustriais como fontes de carbono. .... 39
- Figura 6.** Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na atividade de amilase sacarificante. .... 44
- Figura 7.** Superfícies de resposta obtidas para os efeitos do teor de umidade e quantidade de substrato; quantidade de discos de inóculo e quantidade de substrato; quantidade de discos de inóculo e teor de umidade. .... 46
- Figura 8.** Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis quantidade e teor de umidade inicial do substrato e quantidade de discos de inóculo para a máxima atividade amilolítica sacarificante. .... 47
- Figura 9.** Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na atividade amilolítica sacarificante das amilases. .... 51
- Figura 10.** Superfície de resposta obtida para os efeitos do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica sacarificante das amilases. .... 53
- Figura 11.** Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e temperatura no planejamento fatorial do tipo face centrada  $2^2$ , para a máxima atividade amilolítica sacarificante. .... 54

**Figura 12.** Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a estabilidade de amilases. ... 56

**Figura 13.** Hidrólise de amidos de diferentes fontes, a 48 °C, utilizando a solução enzimática bruta obtida através do cultivo do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021 ou glucoamilase comercial de *Aspergillus niger*. ..... 58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Delineamento de Composto Central Rotacional, valores codificados e reais de cada variável.....	33
<b>Tabela 2.</b> Valores codificados e reais utilizados no planejamento fatorial do tipo face centrada $2^2$ para estudo do efeito do pH e temperatura sobre a atividade das amilases. ....	34
<b>Tabela 3.</b> Ensaio do delineamento composto central rotacional (DCCR), em níveis codificados e reais.....	41
<b>Tabela 4.</b> Análise de variância (ANOVA) para a atividade de amilases. ....	45
<b>Tabela 5.</b> Planejamento fatorial do tipo face centrada $2^2$ , valores codificados e reais das variáveis pH e temperatura e atividade sacarificante relativa das amilases. ....	49
<b>Tabela 6.</b> : Análise de variância (ANOVA) para a atividade amilolítica sacarificante das amilases. ....	52

# Sumário

1.	Introdução.....	15
2.	Objetivos .....	17
3.	Revisão Bibliográfica.....	18
3.1.	Amido .....	18
3.2.	Amilases .....	19
3.3.	Aplicações industriais das amilases .....	22
3.4.	Produção de amilases .....	24
3.5.	Fermentação em Estado Sólido (FES), Fermentação Submersa (FSbm) e produção de enzimas .....	26
4.	Materiais e Métodos .....	28
4.1.	Microrganismo.....	28
4.2.	Produção de enzimas .....	28
4.2.1.	Pré inóculo.....	28
4.2.2.	Fermentação em Estado Sólido (FES) .....	28
4.2.3.	Fermentação Submersa (FSbm).....	29
4.3.	Determinação das atividades enzimáticas .....	30
4.3.1.	Atividade amilolítica sacarificante .....	30
4.3.2.	Atividade amilolítica dextrinizante.....	31
4.4.	Otimização das condições de cultivo para produção de amilases por FES .....	32
4.4.1.	Delineamento de Composto Central Rotacional .....	32
4.5.	Caracterização físico-química das amilases .....	33
4.5.1.	Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da enzima .....	34
4.5.2.	Estabilidade das enzimas frente a variações de pH e temperatura .....	34
4.6.	Ensaio de hidrólise do amido.....	35
4.7.	Quantificação de glicose presente no hidrolisado .....	35
5.	Resultados e Discussão .....	37
5.1.	Produção de amilases por FES e FSbm.....	37
5.2.	Otimização da produção de amilases pelo cultivo por FES .....	40
5.2.1.	Delineamento de Composto Central Rotacional .....	40
5.3.	Caracterização físico química das amilases.....	49
5.3.1.	Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas.....	49
5.3.2.	Estabilidade das enzimas frente a variações de pH e temperatura .....	55
5.4.	Hidrólise enzimática do amido .....	57
6.	Conclusões.....	60
7.	Referências Bibliográficas .....	61





## 1. Introdução

Fungos são de grande interesse para a Biotecnologia especialmente pela capacidade de crescimento em diferentes substratos, incluindo resíduos naturais como a biomassa vegetal, e consequente produção de enzimas de ampla aplicabilidade industrial, entre as quais amilases (TROIANO, ORSAT e DUMMONT, 2020) . A capacidade de degradação de biomassa e subprodutos agroindustriais via secreção de enzimas é uma característica que tem auxiliado na redução dos impactos gerados a partir do acúmulo e descarte destes materiais no meio ambiente, uma vez que podem ser empregados para o cultivo dos fungos tanto por fermentação submersa (FSbm)(HANSEN *et al.*, 2015) como por fermentação em estado sólido (FES) (GRAMINHA *et al.*, 2008;CARLILE, WATKINSON e GOODAY, 2001).

Os fungos endofíticos, caracterizados por habitarem o interior das plantas conferindo-lhes proteção contra insetos, microrganismos patogênicos e fitófagos, são reconhecidamente importantes produtores de compostos bioativos como anticancerígenos, antimicrobianos e antiinflamatórios (NISA *et al.*, 2015). Tais fungos são também potenciais produtores de enzimas de degradação de material vegetal (BORGES *et al.*, 2009), uma vez que produzem hidrolases extracelulares como parte do seu mecanismo de resistência para superar as defesas do hospedeiro e/ou para obter nutrientes do solo (KUSARI, SING e JAYABASKARAN, 2014).

Vantagens como custo-benefício, menor demanda por tempo e por espaço para produção e facilidade de modificação e otimização dos processos de obtenção justificam a crescente aplicação das enzimas microbianas nos processos industriais (SIVARAMAKRISHNAN *et al.*, 2006). As amilases destacam-se neste contexto sendo responsáveis por cerca de 30% do mercado mundial de enzimas, sendo aplicadas em diversos processos industriais (MOBINI-DEHKORDI, M.; JAVAN, 2012), além de ocuparem o segundo lugar em número de patentes, fatores que evidenciam sua relevância e valor comercial (KUMAR *et al.*, 2014).

Dada a diversa aplicabilidade industrial das amilases, sobretudo das  $\alpha$ -amilases e glucoamilases, a busca por novos microrganismos produtores tem sido uma constante. Além disso, o crescente interesse pelo desenvolvimento de processos economicamente viáveis para a obtenção destas enzimas torna os subprodutos agroindustriais, de baixo valor agregado e de grande disponibilidade no país, importantes ferramentas para o alcance deste objetivo, uma vez que sua utilização contribui não apenas para a redução dos custos dos processos, mas também, para a minimização de problemas ambientais resultantes de seu acúmulo (MOBINI-DEHKORDI, M.; JAVAN, 2012).

O uso de planejamentos de experimentos tem sido bastante explorado quando se deseja otimizar a produção de enzimas microbianas, uma vez que esta técnica possibilita a triagem de parâmetros que influenciam diretamente no processo em desenvolvimento, oferecendo vantagens como a obtenção de maior precisão estatística na resposta analisada juntamente com a estimativa de níveis ótimos e da existência de interação entre os parâmetros analisados. Desta forma, esta ferramenta contribui para a redução do número de experimentos realizados em escala laboratorial e, conseqüentemente, dos custos experimentais, além de ser importante para ampliação de escala de bioprocessos (TAHARA e ROZENFELD., 2019).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo geral a avaliação da influência das condições de cultivo sobre a produção de amilases pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021, a caracterização físico-química das enzimas e a aplicação na hidrólise do amido. A influência de diferentes subprodutos lignocelulósicos na produção das amilases foi avaliada, tanto por FES quanto por FSbm, tendo sido selecionada a primeira opção de cultivo, empregando-se farelo de trigo não lavado como substrato. Delineamentos experimentais foram então utilizados para verificar a influência da quantidade e umidade inicial do substrato, e da quantidade de discos de inóculo na produção das enzimas. Foi realizada ainda a caracterização físico-química das amilases obtida sob condições otimizadas de cultivo e estas foram empregadas na hidrólise do amido para quantificação da liberação de glicose.

## 6. Conclusões

O fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021 mostrou-se versátil quanto a utilização de diferentes subprodutos lignocelulósicos/amilolíticos como substrato para seu crescimento, sendo uma interessante fonte de amilases especialmente quando cultivado por fermentação em estado sólido. Como um gênero de fungo endofítico pouco explorado no contexto da produção/aplicação de amilases, os resultados obtidos no presente trabalho contribuem com a prospecção de novas fontes microbianas destas enzimas.

Os planejamentos experimentais foram ferramentas importantes para a obtenção das amilases pelo cultivo do microrganismo por fermentação em estado sólido, contribuindo para um aumento de aproximadamente 62,5% na atividade amilolítica sacarificante da solução enzimática bruta obtida inicialmente.

A caracterização físico-química das amilases produzidas por *Paecilomyces* sp. SF021 indicou a estabilidade sob ampla faixa de pH e ainda sob temperaturas entre 35 e 45°C o que indica um bom potencial para aplicação industrial.

Por fim, o resultados obtidos pelos experimentos de sacarificação do amido reportados no presente trabalho apontam para o potencial de aplicação das amilases de *Paecilomyces* sp. SF021 na obtenção de glicose e estimulam estudos futuros envolvendo a otimização das condições do processo, visando uma competitividade com as amilases comerciais atualmente empregadas.

## 7. Referências Bibliográficas

- ABD-ELHALEM, B. T. *et al.* Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. **Annals of Agricultural Sciences**, p. 193–202, 2015.
- AI, Y.; JANE, J. L. **Understanding Starch Structure and Functionality**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2018.
- ANFINSEN, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. **Science**, v. 181, n. 4096, p. 223–229, 1973.
- ASTRAY, G. *et al.* A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1631–1640, out. 2009.
- BALLESTEROS, I. *et al.* Enzymatic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particle sizes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 187–192, 2002.
- BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 175–185, 2012.
- BARROS, F. F. C. **Desenvolvimento de um bioprocesso utilizando-se resíduos para produção de amilases por *Rhizopus oligosporus* e etanol por *Saccharomyces cerevisiae***. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociência, 2015.
- BASTIAN, E. Y. O.; ROCCO, J. L. S. **Guia Técnico Ambiental da Indústria Têxtil**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://www.sinditextilsp.org.br/guia\\_p%2Bl.pdf.pdf](http://www.sinditextilsp.org.br/guia_p%2Bl.pdf.pdf)>. Acesso em: 2 jul. 2019.
- BELLO PEREZ, L. A.; AGAMA-ACEVEDO, E. **Starch**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.
- BERTOFT, E. Understanding starch structure: Recent progress. **Agronomy**, v. 7, n. 3, 2017.
- BHARATHIRAJA, S. *et al.* **Production of Enzymes From Agricultural Wastes and Their Potential Industrial Applications**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 80
- BON, E. P. S. *et al.* Bioprocessos para produção de enzimas. *In: Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado*. [s.l.: s.n.]. p. 95–123.
- BORGES, W. S. . *et al.* Endophytic Fungi: Natural Products, Enzymes and Biotransformation Reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137–1163, 2009.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. Fungi and Biotechnology. *In: The Fungi*. [s.l.: s.n.]. p. 461–542.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 3, p. 225–622, 1939.

- CASTRO, A. M. *et al.* Economic analysis of the production of amylases and other hydrolases by *Aspergillus awamori* in solidstate fermentation of babassu cake. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1–9, 2010.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181–188, 2010.
- CEGARRA, J. Biotecnologia aplicada aos processos de química têxtil. **Química Têxtil**, v. 58, p. 5–14, 2000.
- COPELAND, L. *et al.* Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1527–1534, 2009.
- CORREA, R. C. G. *et al.* Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467–1478, 2014.
- EL-FALLAL, A. *et al.* Starch and Microbial  $\alpha$ -Amylases: From concepts to Biotechnological Applications. *In*: CHANG, C.-F. (Ed.). . **Carbohydrates: Comprehensive Studios on Glycobiology and Glycotechnology**. [s.l.] Intech, 2012. .
- ESCARAMBONI, B. *et al.* Ethanol biosynthesis by fast hydrolysis of cassava bagasse using fungal amylases produced in optimized conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 368–377, 1 fev. 2018.
- EZEJI, T. C.; BAHL, H. Purification, characterization, and synergistic action of phytate – resistant  $\alpha$  - amylase and  $\alpha$  - glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 1, p. 27–38, 2006.
- FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amilose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583–603, 1954.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2/3, p. 85–101, 2003.
- GRAMINHA, E. B. N. *et al.* **Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition****Animal Feed Science and Technology**, 2008.
- GUERRA, N. P. *et al.* Use of Amylolytic Enzymes in Brewing. **Beer in Health and Disease Prevention**, p. 113–126, 1 jan. 2009.
- GUPTA, R. *et al.* Microbial  $\alpha$ -amylases: A biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599–1616, 2003.
- HANSEN, G. H. *et al.* Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327–1341, 2015.

- HATA, Y. *et al.* Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (koji) and in submerged culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 6, p. 532–537, 1997.
- HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation: are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301–306, 2005.
- HORVÁTHOVÁ, V.; JANECEK, Š.; ŠTURDIK, E. Amylolytic enzymes : their specificities , origins and properties. *Biologia*, Bratislava, v. 55, n. 6, p. 605–615, 2000. **Biologia**, v. 55, n. 6, p. 605–615, 2000.
- ISHIDA, H. *et al.* Regulation of the glucoamylase-encoding gene (*glaB*), expressed in solid-state culture (koji) of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 301–307, 1998.
- ITO, S. *et al.* Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: Enzymatic properties, genetics, and structures. **Extremophiles**, v. 2, n. 3, p. 185–190, 1998.
- KAPOOR, N. *et al.* Production of cellulase enzyme by *Chaetomium* sp. using wheat straw in solid state fermentation. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, p. 1199–1206, 2010.
- KARAM, E. 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.
- KNIGHT, I. M.; MAZZIEIRO, G. Aplicação das enzimas amilolíticas em panificação. **Higiene alimentar**, v. 14, n. 72, p. 35–46, 2000.
- KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 358–363, 2006.
- KUMAR, V. *et al.* Global scenario of industrial enzyme market. *In*: BENIWA, V.; SHARMA, A. K. (Eds.). . **Industrial Enzymes**. [s.l.] Nova Science Publishers, 2014. p. 91–111.
- 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.
- KUSARI, S. .; SING, S. .; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 297 –303, 2014.
- MAMO, G.; GESSESSE, A. Production of raw-starch digesting amyloglucosidase by *Aspergillus* sp GP-21 in solid-state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 622–626, 1999.
- MARTINS, S. *et al.* Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365–373, 2011.

MICHELIN, M. *et al.* Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus *Paecilomyces variotii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 17–25, 2008.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MOBINI-DEHKORDI, M.; JAVAN, F. A. Application of alpha-amylase in biotechnology. **Journal of Biology and Today's World**, v. 1, n. 1, p. 15–20, 2012.

MOHANAN, N.; SATYANARAYANA, T. Amylases ☆. **Reference Module in Life Sciences**, p. 1–20, 2018.

MOLLER, M. S.; SVENSSON, B. Structural biology of starch-degrading enzymes and their regulation. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 40, p. 33–42, 2016.

MOREIRA, F. . *et al.* The use of  $\alpha$ -methyl-d-glucoside, a synthetic analogue of maltose, as inducer of amylase by *Aspergillus* sp in solid- state and submerged fermentations. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 15–19, 2001.

NAJAFI, M. F.; DEOBAGKAR, D.; DEOBAGKAR, D. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$  - amylase from *Bacillus subtilis* AX20. **Protein Expression and Purification**, v. 41, p. 349–354, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 6. ed. [s.l.] Artmed, 2014.

NISA, H. . *et al.* Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50–59, 2015.

OKUNOWO, W. O. *et al.* Media studies on *Myrothecium roridum* Tode: a potential biocontrol agent for water hyacinth. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 1, n. 4, p. 55–56, 2010.

OLIVEIRA, A. P. A. *et al.* Production and catalytic properties of amylases from *Lichtheimia ramosa* and *Thermoascus aurantiacus* by Solid-State Fer. **The Scientific World Journal**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

OLSEN, H. S.; FALHOLT, P. The role of enzymes in modern detergency. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 1, n. 4, p. 555–567, out. 1998.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2/3, p. 81–84, 2003.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C. *et al.* Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microspores* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 4, p. 329–334, 2008.

- PEIXOTO, S. C. *et al.* Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology**, v. 6, p. 269–273, 2003.
- PONGSAWASDI, P. .; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal Fermentation Technology**, v. 65, n. 4, p. 463–467, 1987.
- RAMAMOORTHY, N. K.; SAMBAVI, T. R.; RENGANATHAN, S. A study on cellulase production from a mixture of lignocellulosic wastes. **Process Biochemistry**, v. 83, p. 148–158, 2019.
- RAVIRAJA, N. S.; MARIA, G. L.; SRIDHAR, K. R. Antimicrobial evaluation of endophytic fungi inhabiting medicinal plants of the western ghats of India. **Engineering in Life Sciences**, v. 6, p. 515–520, 2006.
- SALEEM, A.; EBRAHIM, M. K. H. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. **Journal of Taibah University for Science**, 2013.
- SAMMARTINO, M. Enzymes in Brewing. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 156–164, 2015.
- SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. **Useful Microbial Enzymes-An Introduction**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 2017
- SCHMIELE, M.; SAMPAIO, U. M.; PEDROSA SILVA CLERICI, M. T. **Basic Principles: Composition and Properties of Starch**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661–686, 2005.
- SILVA, T. DA. Fungal Amylases: Applications and Functional Properties. *In: Fungal Enzymes*. [s.l.] CRC Press, 2013. .
- SINGH, P.; KUMAR, S. Microbial Enzyme in Food Biotechnology. **Enzymes in Food Biotechnology**, p. 19–28, 2018.
- SINGH, R. S.; SINGH, T.; PANDEY, A. **Chapter 1 - Microbial Enzymes-An Overview**. [s.l.] Elsevier B.V., 2019.
- 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.
- SINGHANIA, R. R. *et al.* **Recent advances in solid-state fermentation** **Biochemical Engineering Journal**, 15 abr. 2009.
- SINGHANIA, R. R. *et al.* Industrial Enzymes. *In: Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 473–497.



SIVARAMAKRISHNAN, D. . *et al.*  $\alpha$ -Amylases from microbial sources: an overview on recent developments. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 173–184, 2006.

SOCCOL, C. R. *et al.* Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52–71, jan. 2017.

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

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. *In*: BACON, C. W.; WHITE, J. . (Eds.). . **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 3–29.

SYNOWIECKI, J. The use of starch processing enzymes in the food industry. **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications**, p. 19–34, 2007.

TAHARA, S. .; ROZENFELD., H. **Planejamento de experimentos - DOE**. Disponível em: <<http://www.portaldeconhecimentos.org.br/index.php/por/Conteudo/Planejamento-de-Experimentos-DOE>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. **Current developments in solid-state fermentation****Biochemical Engineering Journal**, 15 dez. 2013.

TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMMONT, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, n. October 2019, p. 109472, 2020.

VEEN, B. A. VAN DER. Engineering reaction and product specificity of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. p. 1–75, 2000.

VIHINEN, M.; MANTSALA, P. VIHINEN M.; MANTSALA, P. Microbial amylolytic enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, p. 329–418, 1989.

WANG, S.; LIANG, Y.; LIANG, T. Purification and characterization of a novel alkali-stable  $\alpha$ -amylase from *Chryseobacterium taeanense* TKU001, and application in antioxidant and prebiotic. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 745–750, 2011.