

UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR *Rhizomucor miehei*

UTILIZATION OF AGRO-INDUSTRIAL BY-PRODUCTS FOR THE PRODUCTION OF α -AMYLASE BY *Rhizomucor miehei*

Alline Vieira Bernardes¹; Eduardo da Silva Martins²; Jhansley Ferreira da Mata³; Osania Emerenciano Ferreira⁴

^{1,2,3,4} Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG – Frutal – Brasil alline.bernardes@hotmail.com;
edusmartins@yahoo.com.br; jhansley@agronomo.eng.br; osania.ferreira@hotmail.com

Resumo

*As α -amilases são enzimas com várias aplicações industriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de uma α -amilase pelo fungo *Rhizomucor miehei*, por fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. Foram avaliados os seguintes parâmetros fermentativos: substrato, tempo de cultivo, solução suplementar de nitrogênio, e pH da solução suplementar. Na caracterização físico-química da enzima, foram determinados: pH e temperatura ótimos, estabilidade ao pH e a temperatura e a “meia-vida” da enzima a 70 °C e 75 °C. O fator substrato não mostrou diferença estatística, sobre a produção da enzima. Já o tempo de cultivo proporcionou diferença significativa, sendo selecionado o tempo de 2 dias de fermentação. O fator solução nutriente proporcionou diferença significativa sobre a produção da enzima, enquanto que o pH da solução nutriente não mostrou diferença significativa. A atividade foi maior em pH 5,0, a 75 °C. O extrato enzimático apresentou elevada termoestabilidade até 55 °C, por 1 hora, e estabilidade superior a 70%, por 24h., na faixa de pH entre 3,5 e 6,0. A “meia-vida” da enzima, na ausência de substrato, foi de 7 e 3 minutos a 70 °C e 75 °C, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram que a utilização dos subprodutos agroindustriais avaliados é viável para a produção de uma α -amilase com boas características para aplicação industrial, especialmente em processos que requerem pH em torno de 4,5 a 5,5, e altas temperaturas.*

Palavras-chave: α -amilase, fungo, subprodutos agroindustriais.

1 Introdução

O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, é um dos que mais produzem subprodutos agroindustriais. A tendência atual é de aproveitar estes materiais, obtendo produtos

com alto valor agregado, como as enzimas (MENEZES, SILVA e DURRANT, 2009, MARTINS et al., 2002).

Recentemente, vários subprodutos têm sido utilizados como substratos para micro-organismos em processos fermentativos, visando à produção de enzimas. Por sua ampla disponibilidade e por representar uma fonte alternativa de baixo valor comercial, o aproveitamento destes materiais pode contribuir para a redução do custo operacional da produção enzimática, além de minimizar possíveis impactos ambientais decorrentes do seu descarte inadequado (LEITE et al., 2007).

A fermentação em estado sólido é empregada na produção de diversos tipos de enzimas com aplicação industrial. Este processo, além de geralmente ser mais eficiente que a fermentação submersa na produção enzimática, permite a utilização de diferentes resíduos e subprodutos agroindustriais como substratos para o crescimento microbiano, os quais muitas vezes são descartados e/ou usados para finalidades que pouco agrega valor aos mesmos (MARTINS et al., 2007; SILVA et al., 2005; SAXENA e SINGH, 2011).

Dentre as enzimas que podem ser obtidas por fermentação em estado sólido, estão as amilases, que constituem um dos mais importantes grupos enzimáticos com aplicações industriais, podendo ser aplicadas nas indústrias de panificação, têxtil, farmacêutica, laticínios, papel e celulose, sucroalcooleira, dentre outras (FERNANDES, 2007).

As amilases são responsáveis por aproximadamente 25% da produção mundial de enzimas, ocupando o segundo lugar, logo após as proteases. Dentre elas, a mais importante é a α -amilase, que desempenha um papel fundamental na conversão do amido em produtos de baixa massa molecular, os quais podem ser utilizados por outras enzimas do mesmo grupo (SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

As amilases produzidas por micro-organismos termofílicos ou termotolerantes têm recebido considerável atenção da indústria, por serem geralmente mais termoestáveis (CARVALHO et al., 2008). As vantagens em se usar α -amilases termoestáveis em processos industriais incluem diminuição do risco de contaminação, aumento da taxa de difusão dos reagentes e diminuição dos custos com refrigeração externa (LIN; CHYAU; HSU, 1998; CARVALHO et al., 2008). Assim, o estudo destes micro-organismos pode auxiliar a encontrar enzimas com estas características, uma vez que geralmente estas são termofílicas.

A produção industrial de enzimas é geralmente limitada pelos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos micro-organismos. Estima-se que por volta de 30 a 40% do custo envolvido na produção de enzimas esteja relacionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento do micro-organismo. Assim, o uso de substratos alternativos é de grande importância para a redução dos custos de produção (JOO; CHANG, 2005).

Amido e amiláceos foram descritos como os substratos mais adequados para a alta produção de amilases, podendo ser aproveitados resíduos agrícolas ou de processamento de amido, os quais contêm quantidades residuais de amido suficientes para esse fim (DJEKRIF-DAKHMUCHE et al., 2006).

Pelo exposto, o presente trabalho teve por objetivos avaliar a produção da enzima α -amilase pelo fungo *Rhizomucor miehei*, com o aproveitamento de subprodutos agroindustriais, determinar diferentes parâmetros fermentativos que influenciam sua produção e caracterizar a enzima.

2 Material e Métodos

Micro-organismo

Foi utilizada a linhagem fúngica *Rhizomucor miehei*, isolada do solo, em uma propriedade rural do município de Comendador Gomes/MG. O fungo foi identificado pela Coleção de Culturas – Micoteca URM, da Universidade Federal de Pernambuco.

Meios de cultivo para inóculo e substratos para a fermentação e obtenção do extrato enzimático

O fungo usado para inóculo nos diferentes substratos foi cultivado em Erlenmeyers de 500 mL, contendo meio Sabouraud com amido a 1%. O mesmo foi incubado 45 °C, até apresentar bom crescimento.

Em cada frasco contendo o fungo, foram adicionados 100 mL de solução salina esterilizada, composta inicialmente por sulfato de amônia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%. A superfície do meio foi suavemente raspada com alça de inoculação esterilizada, obtendo-se assim uma suspensão micelial.

Foram também preparados e esterilizados (121 °C/30 min) meios de cultivo em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5g dos seguintes resíduos agroindustriais como substrato: quirera de arroz, quirera de milho e farelo de sorgo, que estavam com boa disponibilidade na região. Inicialmente, os meios de cultivo para fermentação foram inoculados com a suspensão micelial, de modo que a umidade ficasse em torno de 70%, e incubados em estufa a 45 °C, durante 7 dias. A cada 24 horas foram retiradas amostras, das quais foram determinadas a atividade enzimática.

Para a obtenção do extrato enzimático, 40 mL de água destilada foram adicionados em cada Erlenmeyer. Estes foram agitados a 40 rpm em “shaker” durante 20 minutos e posteriormente o seu conteúdo foi filtrado e centrifugado a 3000g por 20 minutos. O sobrenadante foi o extrato enzimático bruto analisado.

Avaliação de diferentes condições fermentativas para a produção da enzima

Diferentes parâmetros fermentativos foram analisados, visando obter condições em que houvesse boa produção de α -amilase pelo fungo estudado. Os experimentos foram feitos em três repetições, sendo feita análise estatística dos dados. Foi analisada a influência dos seguintes fatores sobre a produção enzimática: tipo de substrato, tempo de cultivo e fonte de nitrogênio suplementar, em diferentes valores de pH.

Numa primeira etapa, foram definidos o melhor substrato e o tempo de cultivo mais adequado para a produção da enzima, nas condições avaliadas. Posteriormente, no melhor substrato e tempo de cultivo, foram alteradas estas condições fermentativas, para avaliar as alterações sobre a produção enzimática. Estas alterações são citadas abaixo.

Fontes de nitrogênio suplementares ao meio de fermentação, em diferentes valores de pH

Foram estudadas as seguintes fontes de nutrientes como aditivos ao meio de fermentação (p/v):

- Solução nutriente 1: composta por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, em pHs 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0.
- Solução nutriente 2: composta por NH_4NO_3 a 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, em pHs 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0.
- Solução nutriente 3: composta por uma suspensão 0,5% de farelo de soja em água, em pHs 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0.
- Solução 4 (controle): água, nos mesmos valores de pH.

Caracterização dos extratos enzimáticos

Determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade enzimática

O comportamento da atividade da enzima em função do pH foi estudado incubando, por 10 minutos, a solução enzimática e substrato em tampões 0,2M acetato (pH 3,0 a 5,0), citrato (pH 5,5 a 7,0), Tris (7,5 a 8,5) e glicina (pH 9,0 a 10,0), sendo dosada a atividade a 60 °C.

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 40 °C a 80 °C (com variação de 5 °C), e a atividade foi medida no pH determinado como ótimo.

Determinação da estabilidade da enzima frente a variações de pH e temperatura

A estabilidade em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-as em tampões 0,2M acetato (pH 3,0 a 5,0), citrato (pH 5,5 a 7,0), Tris (7,5 a 8,5) e glicina (pH 9,0 a 10,0), em ausência de substrato, a 25 °C, por 24 horas. Após esse período, foram tomadas amostras para ensaiar a atividade residual, nas condições de pH e temperatura determinados como ótimos para a atividade enzimática.

Com relação à estabilidade à temperatura, a enzima foi mantida por uma hora, em ausência de substrato, em temperaturas de 30 °C a 70 °C (com variação de 5 °C). Após esse período, foram tomadas amostras para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura ótimos.

A “meia-vida” da enzima foi determinada incubando o extrato enzimático, por 15 minutos a 70 °C e 75 °C, retirando alíquotas e 1 em 1 minuto, sendo posteriormente dosada a atividade enzimática nas condições de pH e temperatura ótimos, determinados anteriormente.

Medida da atividade de α -amilase (reação dextrinizante)

A atividade de α -amilase foi determinada medindo-se a diminuição da capacidade de ligação entre o amido e o iodo de uma solução de amido tratada com uma solução enzimática bruta seguindo o método descrito por Fuwa (1954), com modificações. Das soluções enzimáticas obtidas a partir da fermentação semi-sólida, foi utilizado 0,9 mL de solução de amido solúvel a 0,3% (p/v) em tampão acetato 0,25 M, pH 5,0 e 0,1 mL da solução enzimática bruta convenientemente diluída. Após incubação a 60 °C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 4,0 mL de solução de HCl 0,2 M, sendo em seguida adicionado 0,5 mL de reativo de Iodo (KI 0,30% + I₂ 0,03%). Após homogeneização, a mistura de reação foi diluída com 10 mL de água destilada.

O controle foi preparado conforme o processo descrito, porém em duas etapas: o controle do substrato (amido) foi preparado substituindo-se a enzima pelo volume equivalente em água destilada e o controle da enzima, substituindo-se a solução de amido pelo volume equivalente de tampão acetato. Em espectrofotômetro, a absorbância foi determinada a 600 nm contra um branco constituído de água destilada.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 10 mg de amido em 10 minutos nas condições de ensaio, calculada segundo a equação:

$$U = [(C - \text{Abs}) \div C] \times Q_s \div 10 \times f_d \div V_e, \quad \text{onde:}$$

U = unidade de enzima;

C = controle (soma da absorbância do controle do amido e do controle da enzima);

Abs = absorbância da amostra;

Qs = quantidade de substrato, em mg, utilizada na reação;

10 = fator de referência de hidrólise de amido (10 mg);

fd = fator de diluição;

Ve = volume de enzima utilizado na reação.

Análise Estatística

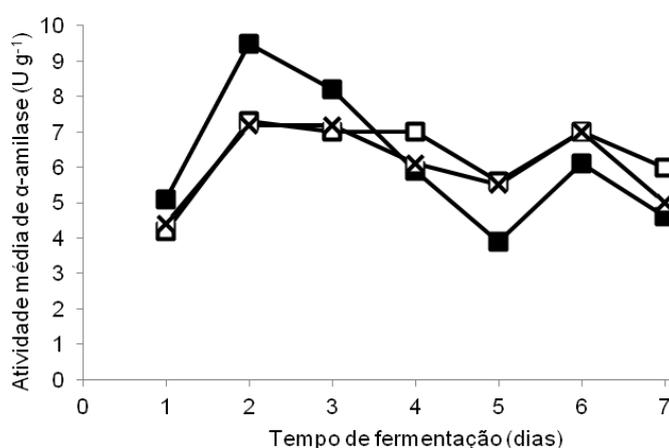
O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), usando o programa Sisvar.

3 Resultados e Discussão

Avaliação do substrato e tempo de cultivo, sobre a produção de α -amilase pelo fungo *Rhizomucor miehei*

Como pode ser observado na figura 1, houve dois picos de produção de α -amilase pelo fungo nos três substratos analisados, sendo o primeiro entre 2 e 3 dias de fermentação e o segundo, com valores menores que o primeiro, após 6 dias (Fig. 1).

Figura 1 - Produção de α -amilase pelo fungo *Rhizomucor miehei* conforme o tempo de fermentação, em diferentes substratos. -□- quirera de arroz; -■- quirera de milho; -x- farelo de sorgo.



Pelo teste de Tukey, verificou-se que o fator substrato não proporcionou diferença significativa sobre a produção da enzima (Tabela 1). Assim, o substrato escolhido para os

experimentos posteriores foi a quirera de milho, o qual produz um extrato enzimático com boa clarificação.

Já o fator tempo de cultivo, proporcionou diferença significativa, sendo que o tempo mais curto para produção, e que proporcionou diferença estatística, foi o tempo de 2 dias de fermentação (Tabela 2).

O tempo de cultivo mais adequado para a produção de amilases pelo fungo *Rhizomucor miehei* (48 horas) é inferior ao tempo encontrado por Kunamneni, Permaul e Sing (2005) para o fungo termotolerante *Thermomyces lanuginosus*, que foi de 120 horas de fermentação, em farelo de trigo como substrato. Foi também inferior ao relatado por Tiwari, Radhav e Fatima (2007), com o fungo termofílico *Penicillium rugulosum*, o qual mostrou maior produção de amilases após 72 horas de cultivo. Já no trabalho relatado por Santana, Gonçalves e Franco (2012), o fungo *Aspergillus niger* apresentou o tempo de cultivo de 24 horas como o mais adequado para a produção de amilase, por fermentação em estado sólido de farelo de cacau.

Para a produção da enzima, quanto menor for o tempo, mais viável é o processo, pois o gasto com energia e, conseqüentemente os custos de produção, são menores. Dessa forma, dentre os tempos de produção com diferença estatística significativa, foi escolhido para os experimentos posteriores o tempo de cultivo de 2 dias.

Tabela 1 - Teste de Tukey para o fator substrato.

Tratamentos	Médias e Resultados do teste
Sorgo	6.05a1
Milho	6.14a1
Arroz	6.28a1

Tabela 2 - Teste de Tukey para o fator tempo de cultivo.

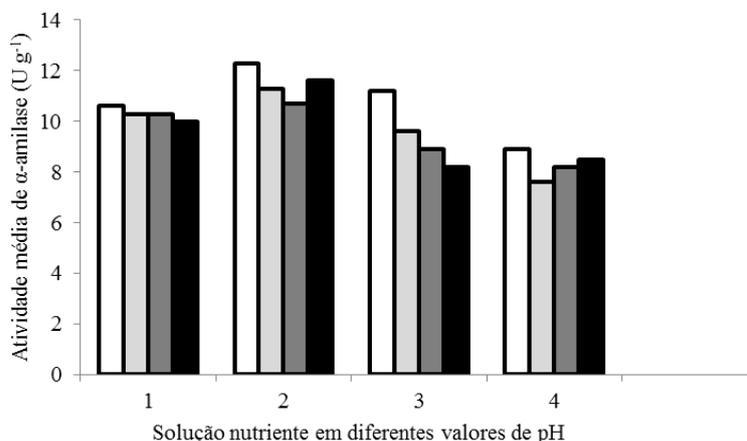
Tratamentos	Médias e Resultados do teste
1	4,55a1
5	4,98a1a2
7	5,19a1a2
4	6,32a1a2a3
6	6,71a2a3
3	7,35a3
2	7,99a3

Avaliação de fontes suplementares de nitrogênio, em diferentes valores de pH

Após definidos o substrato e o tempo de cultivo para a produção de α -amilase pelo fungo, foram feitos experimentos, também em três repetições, para avaliar o efeito de diferentes fontes

suplementares de Nitrogênio, em diferentes valores de pH, sobre a produção da enzima. O resultado pode ser visualizado na figura 2.

Figura 2 - Produção de α -amilase pelo fungo *Rhizomucor miehei* em quirera de milho, contendo diferentes soluções suplementares de Nitrogênio, com diferentes valores de pH. **1:** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%; **2:** NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, todos a 0,1%; **3:** 0,5% de farinha de soja; **4:** água. -□- pH 4,5; -▨- pH 5,0; -▩- pH 5,5; -■- pH 6,0.



Foi observado que as maiores médias de atividade enzimática ocorreram quando houve suplementação pelas soluções nutrientes 1, composta por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, e 2 (composta por NH_4NO_3 a 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,1% e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%). Com a análise estatística dos dados, pelo teste de Tukey, verificou-se que o fator solução nutriente proporcionou diferença significativa sobre a produção da enzima (Tabela 3). Já o fator pH da solução nutriente não proporcionou diferença significativa (Tabela 4).

Menores valores médios de atividade ocorreram quando não houve suplementação de fonte de nitrogênio (quando foi usado apenas água). Com suplementação com solução de farinha de soja a 1%, a produção média foi menor em relação à solução nutriente 2, com diferença significativa pelo teste de Tukey (Tabela 3). Os resultados indicam a necessidade de suplementação de nitrogênio para a maior produção de α -amilase pelo fungo avaliado, especialmente com fontes de nitrogênio inorgânicas.

Diante dos resultados obtidos, foi selecionada a solução nutriente 1, uma vez que esta contém apenas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, e mostrou resultados estatisticamente iguais aos obtidos com a solução nutriente 2, que é composta por mais nutrientes. Dessa forma, foi selecionada aquela que apresentou bom resultado e que oferece a possibilidade de uma suplementação de nitrogênio com menor custo no processo fermentativo.

Como o fator pH não mostrou diferença significativa estatisticamente, o pH escolhido para os experimentos posteriores na solução nutriente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, foi o pH 4,5, uma vez que valores de pH mais ácidos diminuem a possibilidade de contaminação bacteriana na fermentação.

Tabela 3 - Teste de Tukey para o fator solução nutriente.

Tratamentos	Médias e Resultados do teste
Água	8,32a1
Solução 3	9,47a1a2
Solução 1	10,28a2a3
Solução 2	11,47a3

Tabela 4 - Teste de Tukey para o fator pH.

Tratamentos	Médias e Resultados do teste
5,5	9,51a1
6,0	9,59a1
5,0	9,69a1
4,5	10,74a1

Assim, o extrato enzimático utilizado para a caracterização da α -amilase foi aquele obtido após 2 dias de fermentação de quirera de milho, suplementada com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 0,1%, com pH 4,5.

Caracterização físico-química da enzima produzida

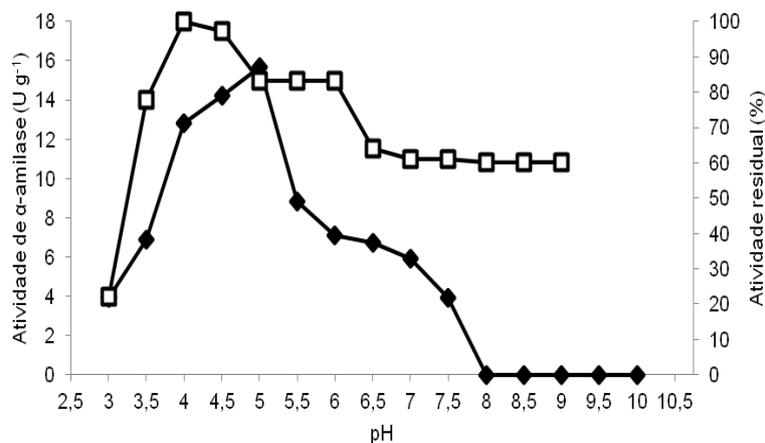
*Efeito do pH sobre a atividade da α -amilase produzida pelo fungo *Rhizomucor miehei**

Pode-se observar, pela figura 3, que a enzima tem maior atividade em valores de pH entre 4,0 e 5,0, com pH ótimo em 5,0, no valor de $15,7 \text{ U g}^{-1}$. Em valores de pH acima de 8,0, não foi detectada atividade enzimática. Assim, os dados indicam que o fungo produz uma amilase que pode ser aplicada em processos que requerem valor de pH mais ácidos, especialmente entre 4,0 e 5,0.

Este valor de pH ótimo é inferior aos valores encontrados para o fungo *Penicillium rugulosum*, que foi de 7,0 (TIWARI, RADHAV; FATIMA, 2007), e para o fungo *Thermomyces lanuginosus*, que produziu uma amilase de pH ótimo 6,0 (KUNAMNENI, PERMAUL; SING, 2005).

Com relação à estabilidade ao pH, observou-se que a enzima foi bem estável, durante 24 h, em uma ampla faixa de pH, principalmente entre 3,5 e 6,0. Em pH 3,5, apresentou 78% de estabilidade. Em pH 4,0 e 4,5 mostrou mais de 97% de estabilidade, sendo 100% estável no pH 4,5. Entre os valores de pH entre 5,0 e 5,0, a estabilidade foi de aproximadamente 83% (Fig. 3).

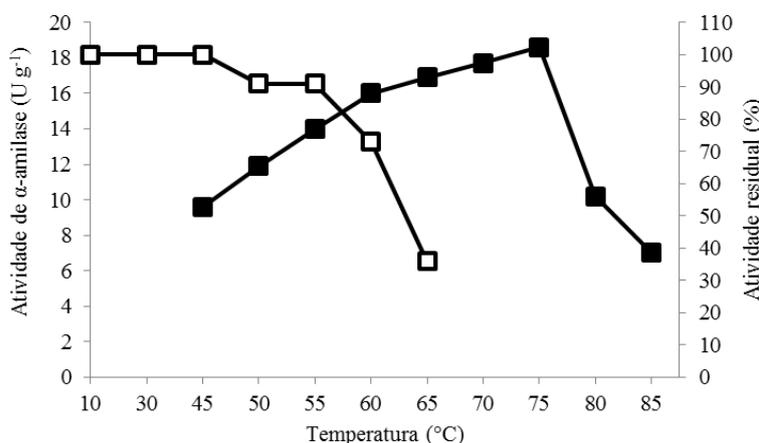
Figura 3 - Efeito do pH sobre a atividade da α -amilase do fungo *Rhizomucor miehei*. -■- Atividade de α -amilase em diferentes valores de pH; -□- Estabilidade da enzima quando exposta por 24 horas, na ausência de substrato, a diferentes valores de pH.



Efeito da temperatura sobre a atividade da α -amilase produzida pelo fungo *Rhizomucor miehei*

A temperatura ótima da amilase foi de 75°C (18,6 U g⁻¹), alta em relação à maioria dos fungos filamentosos produtores de amilase relatados na literatura. A atividade enzimática aumentou gradativamente nas temperaturas de 45°C a 75°C e, acima de 75°C, decresceu (Fig. 4).

Figura 4 - Efeito da temperatura sobre a atividade da α -amilase do fungo *Rhizomucor miehei*. -■- Atividade de α -amilase em diferentes temperaturas; -□- Estabilidade da enzima quando exposta por 1 hora, na ausência de substrato, a diferentes temperaturas.



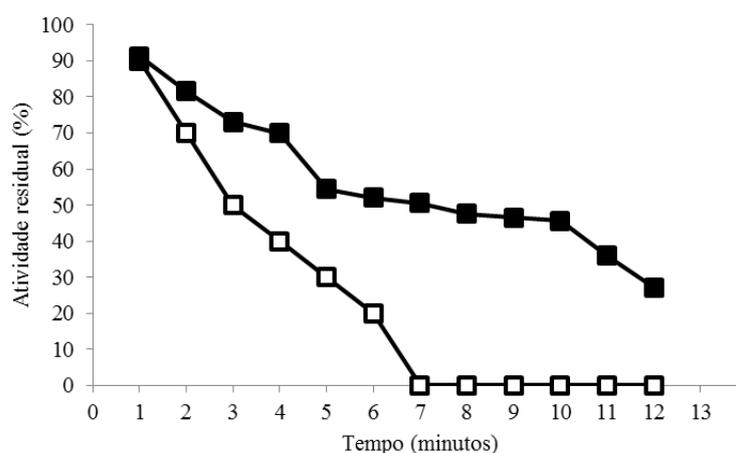
A temperatura ótima encontrada por Kunamneni, Permaul e Sing (2005) para o fungo termotolerante *Thermomyces lanuginosus* foi 50°C. Já para o fungo *Penicillium rugulosum*, foi 57°C (TIWARI, RADHAV e FATIMA, 2007).

Com relação à termoestabilidade, a enzima apresentou mais de 90% de estabilidade, quando incubada por 1 hora, nas temperaturas entre 40 °C e 55 °C. A 60 °C, a estabilidade foi de 73% (Fig. 4).

Como a temperatura ótima da amilase produzida pelo fungo foi entre 70 e 75 °C, foi feito um experimento para determinar a “meia-vida” (tempo no qual a atividade enzimática cai pela metade, quando exposta nestas temperaturas na ausência de substrato).

Foi observado que a “meia-vida” da enzima foi de 7 minutos a 70 °C e de 3 minutos a 75 °C (Fig. 5).

Figura 5 - “Meia-vida” da α -amilase do fungo pelo fungo *Rhizomucor miehei*. -
■- 70 °C; -□-75 °C.



4 Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que a utilização de subprodutos agroindustriais é viável para a produção de α -amilase pelo fungo estudado, com boas características para aplicação industrial, especialmente em processos que requerem pH em torno de 4,0 a 5,0, e altas temperaturas.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade do Estado de Minas Gerais, através do Programa PAPq/UEMG/ESTADO, pelas bolsas de Iniciação Científica e Bolsa de Professor Orientador concedidas.

Abstract

*The α -amylases are enzymes with various industrial applications. The aim of this study was to evaluate the production of α -amylase by fungus *Rhizomucor miehei* in solid state fermentation with the use of agro-industrial by-products as substrate. The following fermentative parameters were evaluated: substrate, cultivation time, additional solution of nitrogen, and pH of the additional solution. On the physicochemical characterization of the*

enzyme were determined: optimum pH and temperature, pH and temperature stability and the "half-life" of the enzyme at 70 °C and 75 °C. The substrate factor not showed statistical difference on the enzyme production. On the other hand, the time of cultivation yielded significant differences, with time of 2 days of fermentation being selected. The nutrient solution provided significant difference on the production of the enzyme, while the pH of the nutrient solution not showed significant difference. The activity was higher at pH 5.0 and 75 °C. The enzymatic extract showed highly thermal stability up to 55 °C for 1 hour, and stability above 70%, for 24h., in the pH range between 3.5 and 6.0. The "half-life" of the enzyme in the absence of substrate was 7 and 3 minutes at 70 °C and 75 °C, respectively. The results showed that the use of agro-industrial by-products is viable for the production of α -amylase with appropriate characteristics for industrial application, especially in processes which require a pH about 4.5 to 5.5 and high temperatures.

Keywords: α -amylase, fungal, agro-industrial by-products.

Referências

CARVALHO, R. V. et al. 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. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000200017>

DJEKRIF-DAKHMOCHE, S. et al. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **Journal of Food Engineering**, v. 73, n. 2, p. 190-197, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.021>

FERNANDES, L. P. et al. Produção de Amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, p. 43-51, 2007.

FUWA, H. A. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amilose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 583-603, 1954.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.05.010>

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. <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.100.168>

LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.136, p.251 - 258, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-007-9058-y>

LIN, L. L.; CHYAU, C. C.; HSU, W. H., Production and properties of a raw starch-degrading amylase from the thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. TS-23. **Biotechnology Applied and Biochemistry**, v. 28, n. 1, p. 61-68, 1998.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 949-954, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00300-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00300-4)

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; LEITE, R. S .R.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 91, n. 3, p.291 – 299, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-006-9114-6>

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, n. 1, p. 68-78, 2009. <http://dx.doi.org/10.4013/ete.2009.51.05>

SANTANA, R. S. M.; GONÇALVES, Z. S.; FRANCO, M. Produção de amilase a partir da fermentação em estado sólido do farelo de cacau. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 1981-1987, 2012.

SAXENA, R.; SINGH, R. Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1334-1342, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000400014>

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2885-2889, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.008>

SOUZA, P.M.; MAGALHÃES, P.O. Application of microbial α -amylase in industry: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850-861, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>

TIWARI, K. L.; JADHAV, S. K.; FATIMA, A. Culture condition for the production of thermostable α -amylase by *Penicillium rugulosum*. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 2, n. 1, p. 21-24, 2007.

Submetido em 14 mar. 2014; Aceito para publicação em 07 abr. 2014.