

# Produção de amilase por fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Aspergillus niger* e determinação do pH e temperatura ótimos na atividade enzimática

RODRIGUES, Eliana Maria Gonçalves

## Resumo

A utilização de enzimas comparadas aos catalisadores químicos convencionais apresenta alto grau de especificidade, menor impacto ambiental e são altamente eficientes. Das várias enzimas produzidas as amilases são amplamente estudadas, devido à importância que apresentam na hidrólise do amido. A fermentação em estado sólido consiste em uma técnica de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos na ausência de água livre. Os fungos filamentosos são os mais adaptáveis a crescerem em substratos sólidos, pois são capazes de crescer com pouca água e muitos sólidos presentes. Os substratos utilizados neste tipo de fermentação são, em geral, resíduos ou subprodutos da agroindústria. Partindo deste contexto, o presente trabalho teve o intuito de realizar o reaproveitamento de um subproduto, oriundo da indústria cervejeira, como substrato de uma fermentação no estado sólido, para a produção de amilase, usando o fungo *Aspergillus niger*, além de fazer a caracterização da atividade enzimática em relação ao pH e temperatura ótima na determinação da atividade enzimática. A metodologia aplicada foi a produção das enzimas amilolíticas pela fermentação em estado sólido, utilizando como substrato bagaço de malte de cevada em solução de sais (sulfato de amônio 3,3 g/L e fosfato de potássio 1,5 g/L); a determinação da atividade amilolítica e os resultados foram analisados estatisticamente através do Programa Action Stat, onde foram feitas estimativas dos efeitos das variáveis e suas interações, considerando um nível de significância de 95%. Os resultados da produção da amilase por fermentação em estado sólido demonstraram através das análises que o modelo se ajusta a um linear, tendo como variável significativa a temperatura e umidade, sendo as melhores condições de trabalho o valor de temperatura de 36°C, umidade de 50% e tempo de fermentação 72 horas. Nos ensaios da determinação das atividades enzimáticas foi possível identificar o valor de pH e temperatura ótimos, sendo os valores de 5,0 e 65°C, respectivamente.

**Palavras-chave:** enzimas, fungo filamentosos, bagaço de malte, bioprocessos

## Abstract

The use of enzymes compared to conventional chemical catalysts has a high degree of specificity, lower environmental impact and are highly efficient. Of the various enzymes produced, amylases are widely studied due to their importance in starch hydrolysis. Solid state fermentation consists of a technique of growth of microorganisms on solid substrates in the absence of free water. Filamentous fungi are the most adaptable to grow on solid substrates because they are capable of growing with little water and many solids present. The substrates used in this type of fermentation are, in general, residues or by-products of

agroindustry. Based on this context, the present work aims to reuse a by-product, originating from the brewing industry, as substrate of a solid state fermentation, for the production of amylase, using the fungus *Aspergillus niger*, besides characterizing the enzymatic activity in relation to pH and optimal temperature in the determination of enzymatic activity. The methodology applied was the production of amylolytic enzymes by solid state fermentation, using as substrate barley malt bagasse in salt solution (ammonium sulfate 3.3 g/L and potassium phosphate 1.5 g/L), the determination of amylolytic activity and the results were statistically analyzed through the Action Stat Program, where estimates of the effects of the variables and their interactions were made, considering a significance level of 95%. The results of the production of amylase by solid state fermentation demonstrated through the analyses that the model fits a linear, having as significant variable the temperature and humidity, being the best working conditions the temperature value of 36°C, humidity of 50% and fermentation time 72 hours. In the tests of the determination of enzymatic activities it was possible to identify the optimum pH and temperature value, the values of 5.0 and 65°C, respectively.

**Keywords:** enzymes, filamentous fungus, malt bagasse, bioprocesses

### **Resumen**

El uso de enzimas en comparación con los catalizadores químicos convencionales tiene un alto grado de especificidad, un menor impacto ambiental y son altamente eficientes. De las diversas enzimas producidas, las amilasas son ampliamente estudiadas debido a su importancia en la hidrólisis del almidón. La fermentación en estado sólido consiste en una técnica de crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos en ausencia de agua libre. Los hongos filamentosos son los más adaptables para crecer sobre sustratos sólidos porque son capaces de crecer con poca agua y muchos sólidos presentes. Los sustratos utilizados en este tipo de fermentación son, en general, residuos o subproductos de la agroindustria. Los sustratos utilizados en este tipo de fermentación son, en general, residuos o subproductos de la agroindustria. A partir de este contexto, el presente trabajo pretende reutilizar un subproducto, originario de la industria cervecera, como sustrato de una fermentación en estado sólido, para la producción de amilasa, utilizando el hongo *Aspergillus niger*, además de caracterizar la actividad enzimática en relación con el pH y la temperatura óptima en la determinación de la actividad enzimática. La metodología aplicada fue la producción de enzimas amilolíticas por fermentación en estado sólido, utilizando como sustrato bagaza de malta de cebada en solución salina (sulfato de amonio 3,3 g/L y fosfato de potasio 1,5 g/L), la determinación de la actividad amilolítica y los resultados fueron analizados estadísticamente a través del Programa de Estadísticas de Acción, donde se realizaron estimaciones de los efectos de las variables y sus interacciones, considerando un nivel de significancia del 95%. Los resultados de la producción de amilasa de fermentación en estado sólido demostraron a través de los análisis que el modelo se ajusta a un lineal, teniendo como variable significativa la temperatura y la humedad, siendo las mejores condiciones de trabajo el valor de temperatura de 36°C, humedad del 50% y tiempo de fermentación de 72 horas. En las pruebas de determinación de actividades enzimáticas fue posible identificar el valor óptimo de pH y temperatura, los valores de 5.0 y 65°C, respectivamente.

**Palabras clave:** enzimas, hongos filamentosos, bagajo de malta, bioprocesos

## INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas nos processos industriais apresenta menor impacto ambiental e consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas minimizam os efeitos indesejáveis, além de poderem ser usadas para substituir produtos químicos como compostos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que agridem e provocam o desgaste de materiais (ROCHA, 2010). Uma das alternativas empregadas para a redução do custo na produção das enzimas consiste no emprego de subprodutos agroindustriais para o cultivo de microrganismos em estado sólido, pois contém uma grande quantidade de substratos, não necessitando de grande complementação nutricional para o crescimento do microrganismo (SILVA, 2014).

A indústria cervejeira brasileira cresce a cada ano e se destaca no cenário mundial, o Brasil nos últimos anos vem desenvolvendo um enorme papel dentre os maiores produtores de cerveja mundial. O bagaço de malte ou bagaço de cevada, é um subproduto obtido no início do processo de produção de cerveja, correspondendo a cerca de 85% do total de subprodutos gerado. Constituído basicamente pelas cascas da cevada malteada, encontra-se disponível o ano todo, em grandes quantidades e a um baixo custo, rico em fibras e proteínas (ALIYU e BALA, 2011; LIMA, 2010; MELLO et al., 2013).

Em função de suas características, o bagaço do malte pode ser utilizado como suporte e fonte de nutrientes para fungos filamentosos que produzem enzimas em processos de cultivo em estado sólido. Esse tipo de processo apresenta condições de crescimento que se aproximam do habitat natural, facilitando seu desenvolvimento e conseqüentemente levando a uma grande produção de enzimas (ROCHA, 2010). A obtenção de enzimas, a partir do bagaço de malte gerariam um produto de alto valor agregado e dariam um destino adequado ao subproduto da indústria artesanal cervejeira.

As vantagens da produção de enzimas a partir dos resíduos agroindustriais são: o tempo de geração dos microrganismos é bastante curto, o que propicia um aumento rápido de massa celular; o conteúdo de enzimas dos microrganismos é geralmente mais elevado que a maioria dos vegetais; sua produção independente é mais acessível; exigem pequena disponibilidade de água e espaço e a diversificação de substratos utilizáveis, principalmente os resíduos agroindustriais, contribuindo para minimizar os problemas de perda na industrialização das frutas tropicais (OLIVEIRA et al., 2005).

Embora a fermentação submersa, ainda seja, o processo mais empregado para a produção de enzimas, existe uma forte tendência em utilizar a fermentação em estado sólido, especialmente devido à possibilidade de aproveitamento de subprodutos agroindustriais de baixo custo como fontes de matéria-prima (SINGHANIA et al., 2010). Sendo definida como o crescimento de microrganismo em substratos sólidos, na ausência de água livre a fermentação em estado sólido apresenta algumas vantagens como baixa utilização de água e energia, equipamentos menos complexos, baixo custo e maior produtividade, além de poder representar o habitat natural dos microrganismos, principalmente fungos filamentosos (RODRIGUEZ-ZUNIGA et al., 2011).

A escolha do microrganismo adequado no processo de fermentação em estado sólido é importante no sucesso da produção desejada. Os fungos são considerados os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas, sendo que um dos mais utilizados em processos fermentativos é o *Aspergillus niger*, fungo filamentosos, facilmente adaptável (ZHANG e LYND, 2004). O principal interesse na utilização de fungos consiste no fato de serem extracelulares, ou seja, liberarem as enzimas no meio e, por isso, são de fácil obtenção.

Os fungos são considerados os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas, sendo que um dos mais utilizados em processos fermentativos é o *Aspergillus niger*, fungo filamentosos, facilmente adaptável (ZHANG e LYND, 2004). De acordo com Amorim (2011), o *Aspergillus niger*, é capaz de produzir 19 tipos diferentes de enzimas como, por exemplo, xilanase, pectinase, glucoamilase,  $\alpha$ -amilase, amiloglucosidase, lipase e celulase. As celulases comerciais mais usadas são baseadas em complexos celulolíticos secretados principalmente pelas espécies do gênero *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*, que são responsáveis por aproximadamente 20% do mercado mundial, sendo fungos bem conhecidos devido sua alta capacidade em produzir enzimas (SINGHANIA et al. 2010).

A atividade enzimática pode ser medida com a enzima pura e em condições tais que permitam que a velocidade de reação seja máxima, significando que o substrato deve estar em concentração elevada, de modo a garantir que toda a enzima esteja transformada em um complexo ativado. A velocidade das reações enzimáticas varia com fatores diversos, como concentração de enzima ou de substrato, temperatura e pH. Ao comprovar, experimentalmente, a influência do pH na velocidade das reações enzimáticas se obtém curvas que indicam que as enzimas apresentam pH ótimo de atividade. A temperatura também influi na atividade enzimática e o ponto ótimo representa o máximo de atividade (LEHNINGER et al, 2002).

Sendo assim, no presente trabalho, foram realizados ensaios com o intuito de se verificar a influência das variáveis temperatura, pH e umidade sobre a produção de enzimas amilolíticas, a partir da fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *Aspergillus niger* para produção de amilase, pois apresenta como vantagem a facilidade de manipulação e habilidade de fermentar em uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo. E em seguida, foi feita a caracterização da atividade enzimática em relação ao pH e temperatura.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Microrganismo**

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a cepa de *Aspergillus niger*, inoculados em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) e incubados a 30°C em estufa bacteriológica durante 7 dias.

### **Bagaço de Malte de Cevada**

O subproduto da indústria artesanal cervejeira utilizado no experimento foi obtido em indústria local de Piracicaba-SP, onde foi seco a 60 °C em estufa por 48 horas. Posteriormente, foram armazenados até o momento de serem utilizados.

### **Produção de amilase**

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 10 gramas do bagaço de malte de cevada. Ao substrato foi adicionado solução de sais contendo sulfato de amônio 3,3 g/L e fosfato de potássio 1,5 g/L até umidade desejada. Em seguida, foi feita a esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos. Posteriormente, foi inoculado a suspensão de esporos do fungo *Aspergillus niger*. Foi realizado um estudo para determinar as variáveis significativas no processo de produção das enzimas.

### **Determinação da atividade amilolítica**

A atividade da amilase foi determinada como descrito por Okolo *et al.* (1995). A mistura de reação consistiu em 1,25 mL de amido solúvel a 1%, 0,25 mL de tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0), 0,25 mL de água destilada e 0,25 mL de extrato de enzimático. Após 10 minutos de incubação a 50°C os açúcares redutores liberados foram estimados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) conforme Miller (1959). Em seguida, foi realizada a leitura em 540 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis. O branco 0,5 mL de tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0), 1,25 mL de solução de amido 1% e 0,25 mL destilada água. Segundo Ghose (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1 μmol de açúcar redutor por mL de extrato por minuto. A partir da Equação (1) calculou-se a atividade enzimática, a qual foi expressa em U/mL.

$$\frac{U}{ml} = AR \times \frac{Vt}{0,18 \times Vc \times Th} \quad (1)$$

Onde: AR: açúcares redutores produzidos na etapa de hidrólise (mg ml<sup>-1</sup>);

Vt: volume total utilizado na hidrólise (volume do tampão + volume do caldo) (ml);

Vc: volume do caldo utilizado na hidrólise (mL);

Th: tempo de hidrólise (min);

0,18 é 1 μmol de glicose (mg).

### **Delineamento Experimental utilizado para produção de enzimas pelo fungo *A. niger*.**

As variáveis estudadas foram: Temperatura (A); pH (B) e Umidade (C).

O delineamento experimental para verificação das variáveis que influenciam na produção da amilase utilizando o fungo *Aspergillus niger* foi realizado segundo um esquema fatorial completo do tipo 2<sup>3</sup>. Os níveis dos fatores utilizados e a matriz do planejamento desse projeto fatorial é mostrada na Tabela 1.

**Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>**

Ensaio	A	B	C
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

A = Temperatura (°C) (-1 = 30; 1 = 36); B = pH (-1 = 4,5; 1 = 5,0); C = Umidade (%) (-1 = 50; 1 = 60)

### **Determinação do pH e temperatura ótimo**

O efeito do pH na atividade da amilase foi determinado pela técnica do ácido dinitrosalicílico (DNS), baseado na produção de açúcares redutores (MILLER, 1959). Foram avaliadas as variações de pH na determinação da atividade da enzima nos diferentes intervalos de pH (4, 5, 6, 7, 8) (CRUZ et al., 2011).

A temperatura foi determinada incubando-se 0,25 mL do extrato enzimático em 1,25 mL de solução de amido 1%, 0,25 mL de tampão acetato 0,1 M e pH 5,0 e 0,25 mL de água destilada. A atividade amilolítica foi realizada incubando as amostras nas temperaturas de 35, 45, 55, 65, 75 e 85°C (CARVALHO et al., 2008). Em seguida, foi feita a leitura através da técnica do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959).

### **Análise Estatística**

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente, de acordo com planejamentos predeterminados, para verificar o nível dos efeitos dos fatores em estudo.

A análise estatística dos resultados foi realizada através do Programa Action Stat, onde foram feitas estimativas dos efeitos das variáveis e suas interações, considerando um nível de significância de 95%. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativa de efeitos, teste t de “Student” e ainda em tabelas de análise de variância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo dez gramas do substrato, o qual foi formado pelo bagaço de malte de cevada. Foram adicionados ao substrato proporções de solução de sais para alcançar a umidade de 50 e 60%. Em seguida foram esterilizados, para posterior inoculação com os esporos do fungo *Aspergillus niger*. A fermentação ocorreu em 30 e 36°C, por um período de 72 horas e sem agitação (Figura 1). Após o tempo de fermentação, acrescentou-se 100 mL de água destilada, em seguida deixou-se em agitação por 150rpm durante 20 minutos e realizou-se a filtragem em papel de filtro, obtendo o caldo para determinação enzimática. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

**Figura 1: Meio de cultura fermentado composto por bagaço de malte de cevada, sais e *Aspergillus niger***



**Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> para o fungo *A.niger***

Ensaio	A	B	C	Resultado em Atividade Amilolítica (U/mL)
1	-1	-1	-1	3,30
2	+1	-1	-1	9,50
3	-1	+1	-1	4,20

4	+1	+1	-1	10,10
5	-1	-1	+1	3,95
6	+1	-1	+1	2,00
7	-1	+1	+1	4,00
8	+1	+1	+1	3,20

A = Temperatura (°C) (-1 = 30; 1 = 36); B = pH (-1 = 4,5; 1 = 5,0); C = Umidade (%) (-1 = 50; 1 = 60)

Ao analisar a Tabela 2, observou-se que os maiores valores para a atividade enzimática amilolítica corresponde ao Ensaio 4, onde utilizou-se a menor temperatura e os maiores valores de pH e umidade.

As variáveis significativas, Temperatura (A) e Umidade (C) apresentam sinais positivo e negativo, respectivamente, o que indica que, para haver aumento da atividade enzimática, será necessário aumentar o valor da temperatura e diminuir o valor da umidade. Esta observação pode ser comprovada através da Tabela 3. De acordo com Santos et al. (2011) e Dalsenter et al. (2005) o alto teor de umidade também diminui a porosidade, a difusão de oxigênio e a eliminação de dióxido de carbono. Por outro lado, baixas quantidades de água podem resultar na redução do crescimento microbiano.

**Tabela 3: Efeitos estimados, valores do teste t de “Student” obtidos no planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> para o fungo *A. niger***

Efeitos e interações	Estimativas	T	P
Média	503,12	-	-
A	116,87	4,29	0,037*
B	34,37	1,26	0,317
C	-174,37	6,41	0,015*
AB	10,62	0,39	0,728
AC	-185,62	6,82	0,013*
BC	-3,12	0,11	0,917
ABC	18,12	0,67	0,565

A = Temperatura (°C) (-1 = 30; 1 = 36); B = pH (-1 = 4,5; 1 = 5,0); C = Umidade (%) (-1 = 50; 1 = 60); \*Significativos (t<sub>4,0,95</sub> = 2,77)

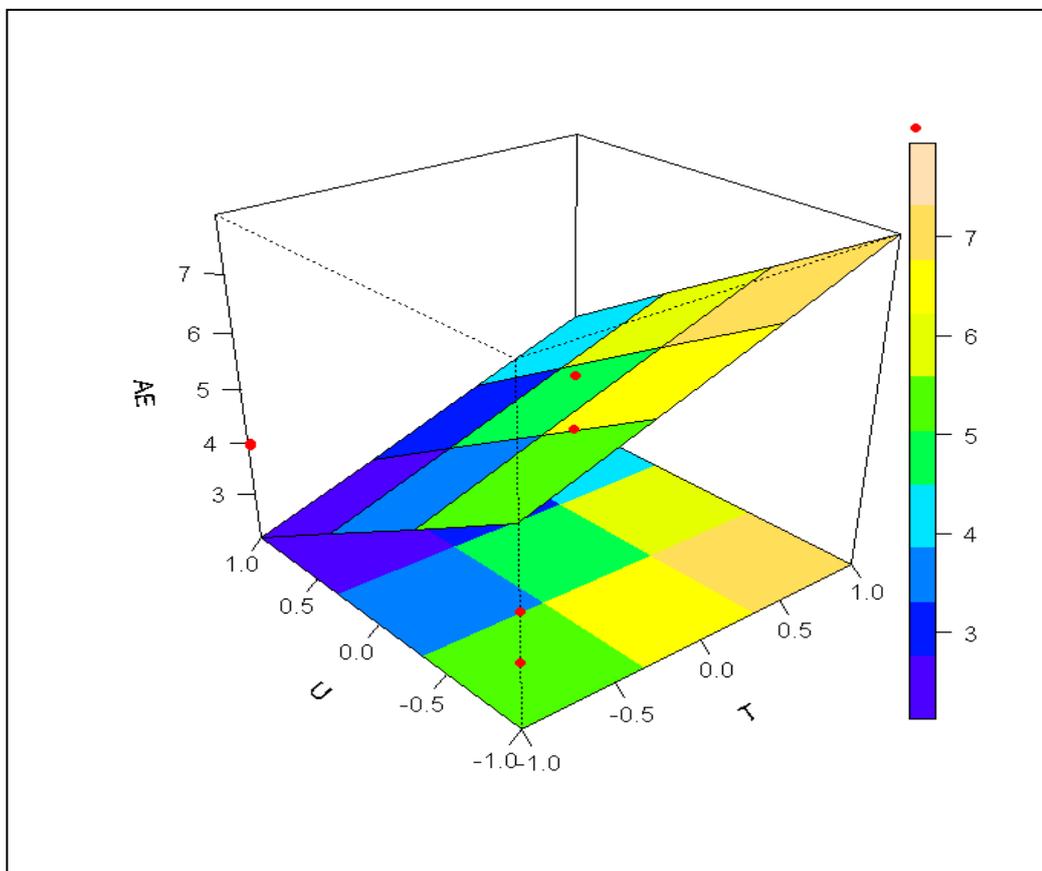
Como os resultados das análises demonstraram que o modelo se ajusta a um linear, então podemos representar o processo de produção de amilase por fermentação em estado sólido usando o fungo *A. niger*, considerando os termos que realmente influenciam no rendimento em atividade, pela Equação 2:

$$Y = 5,03 + 1,17A - 1,74C \quad (2)$$

Sendo que Y representa o rendimento em atividade, A a Temperatura (°C) e C a Umidade (%).

A metodologia da superfície de resposta foi utilizada para otimizar as condições de produção de amilase por fermentação em estado sólido usando o fungo *A. niger*, fornecendo um modelo matemático adequado para a resposta em rendimento em atividade. A superfície de resposta do modelo e as linhas de contorno estão apresentadas na Figura 2.

**Figura 2:** Superfície de resposta descrita pelo modelo da Equação 2, que representa a produção de amilase por fermentação em estado sólido usando o fungo *A. niger*



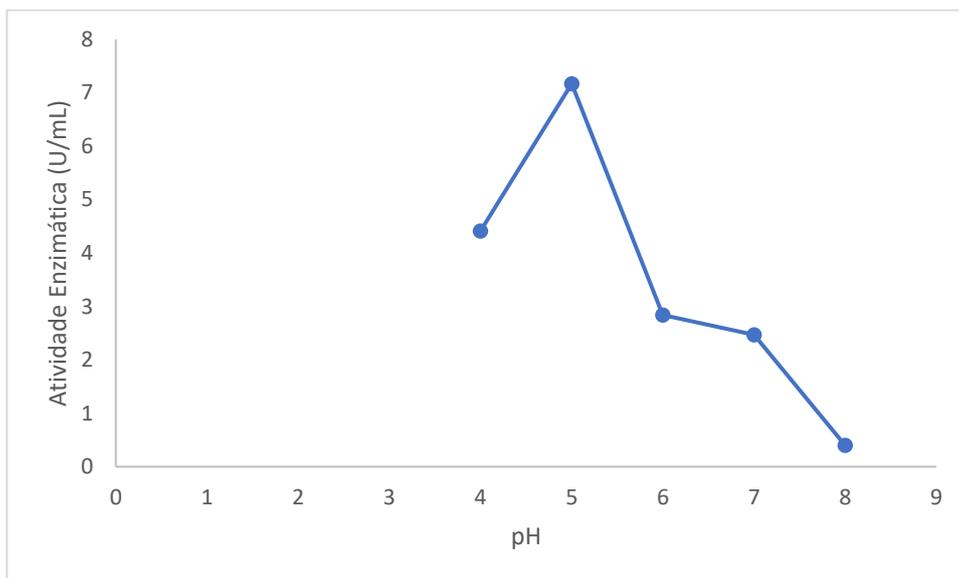
### Determinação do pH e temperatura ótimos

As amilases diferem bastante quanto a um valor específico de pH ótimo, ou seja, onde a atividade enzimática é máxima, tendo seu maior valor na faixa de 2 a 12 (MINAFRA, 2007). Para avaliar o pH da

amilase foram feitas determinações da atividade enzimática em diferentes pHs, variando de 4 a 8, conforme apresentado na Figura 3. Pode-se observar que a atividade enzimática alcançou seu valor máximo quando o pH de incubação foi igual a 5,0, este resultado comprova a escolha da utilização deste valor de pH na metodologia de determinação de atividade enzimática amilolítica proposta por Okolo et al. (1995).

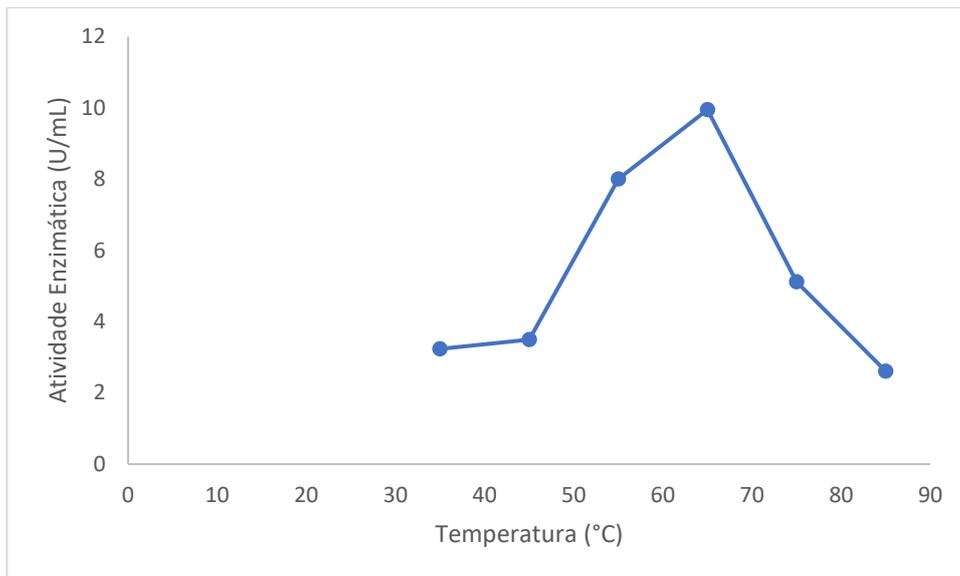
De acordo com Omenu et al (2005) o valor ideal de pH para a amilase de *A. niger* é de 4,0, ocorrendo diminuição em valores superiores. Os resultados demonstraram também que ocorre uma queda na atividade enzimática com o aumento do pH, após o máximo valor, essa diminuição ocorre provavelmente devido à desnaturação da enzima, ou seja, a perda da sua conformação original.

**Figura 3: Efeito do pH de incubação na atividade amilolítica**



Toda enzima apresenta uma temperatura ótima, na qual atinge sua atividade máxima, ou seja, é a temperatura máxima na qual possui uma atividade constante por um período de tempo. Para avaliar a temperatura ótima da amilase foram feitas determinações da atividade enzimática em diferentes temperaturas, variando de 35 a 85°C, conforme apresentado na Figura 4. Pode-se observar que o pico da atividade enzimática ocorreu em 65°C, isso indica que a enzima pode ser utilizada em processos industriais, o que a torna uma ferramenta importante em processos alimentícios. Nas temperaturas entre 75 e 85°C ocorreu uma diminuição na atividade amilolítica, decorrente de uma possível desnaturação proteica, devido ao aumento da temperatura, o que pode comprometer a utilização da enzima nestas temperaturas.

**Figura 4: Efeito da temperatura de incubação na atividade amilolítica**



## CONCLUSÃO

Através do estudo da metodologia da superfície de resposta, foi possível determinar as condições de recuperação da enzima amilase utilizando o fungo *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido com o substrato bagaço de malte de cevada em saís, obtendo um modelo matemático linear adequado para a resposta de atividade enzimática, onde a variável significativa foi a temperatura e umidade. As melhores condições de trabalho foram temperatura de 36°C, umidade de 50% e tempo de fermentação 72 horas. Já para a caracterização da atividade enzimática amilolítica, os ensaios de determinação da maior atividade para a amilase em relação ao pH e temperatura forneceu os valores de 5,0 e 65°C, respectivamente

## REFERÊNCIAS

ALIYU, S.; BALA, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*, v. 103, n. 3, p. 324-331, 2011.

AMORIM, G. A. *Fermentação de farolo de cacao por Aspergillus niger para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos de Alimentos), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga. P. 60, 2011.

CARVALHO, R. V., CÔRREA, T. L. R., SILVA, J. C. M, MANSUR, L. R. C. O, MARTINS, M. L. L. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*. V. 39: p. 102-107, 2008.

- CRUZ, E. A.; MELO, M. C.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M.; SANTANA, R. S. M.; SANTOS, L. S.; GONÇALVES, Z. S. Produção de alfa-amilase por *Aspergillus niger* em resíduo de cascas de mandioca. Unopar Científica. *Ciências Biológicas e Saúde*. V. 13 (4), p. 245-249, 2011.
- DALSENTER, F. D. H.; VICCINI, G; BARGA, M. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. A. Mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. V. 40: p. 801-807, 2005.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v.59, p. 257-268, 1987.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. Tradução da 2. Ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- LIMA, U. A. *Matérias-primas dos Alimentos*. São Paulo: Ed Blucher, 2010. 402p.
- MELLO, L. R. P. F.; VERGÍLIO, R. M.; MALI, S. Caracterização Química e Funcional do Resíduo Fibroso da Indústria Cervejeira. In: Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia, 3. 2013, Londrina. *Anais*. Londrina, 2013. P. 191-194.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MINAFRA, C. S. *Produção e suplementação com  $\alpha$ -amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger* HM2003 na dieta de frangos de corte de um a 21 dias de idade*. Tese de Doutorado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- OKOLO, B. N.; EZEUGU, L. I.; MBA, C. N. Production of raw starch digestive amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources. *Journal of Science of Food and Agriculture*, v. 69, p.109-115, 1995.
- OLIVEIRA, M. M. D, CAMPOS, A. R. N., DANTAS, J. P., GOMES, J. P., SILVA, F. L. H. Isotermas de sorção do resíduo agroindustrial de casca do abacaxi (*Ananás comosus* L. Mer). *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 9, n. 4, p. 565- 569, 2005.
- OMENU, A. M.; AKPAN, I.; BANKOLE, M. O.; TENIOLA, O. D. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. *Afr Journal Biotechnol*, v. 4, n. 1, p. 19-25, 2005.
- ROCHA, C. P. *Otimização da Produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido*. 2010. 136f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- RODRIGUEZ - ZÚNIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de Celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.
- SILVA, M. J. da Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *Trichoderma reesei* rut c-30 em meios com diferentes capacidades de indução; *UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, CENTRO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS*; Recife; 2014.
- SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microbiology Technology*, n. 46, p. 541-549, 2010.
- ZHANG, Y.-H. P.; LYND L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. *Biotechnology Bioengineering*, v. 88, p. 797-824, 2004.

RODRIGUES, Eliana Maria Gonçalves. Possui graduação em Engenharia Industrial Química pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Mestrado em Biotecnologia Industrial pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena na área de Microbiologia Aplicada e Genética de Microrganismos, Doutorado em Engenharia Química na área de Processos Biotecnológicos pela Universidade Estadual de Campinas e Pós-Doutorado pela USP. Atualmente é Professor Ensino Superior, Referência III, da Faculdade de Tecnologia de Piracicaba Dep. Roque Trevisan. Tem experiência na área de Engenharia Química, com ênfase em Purificação de Enzimas, atuando principalmente nos seguintes temas: microrganismos, enzimas, fermentação e extração líquido-líquido.