

# Produção de Alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em Resíduo de Cascas de Mandioca

## Alpha-Amylase Production by *Aspergillus Niger* in Cassava Peels Waste

Ellen Abreu da Cruz<sup>a</sup>; Meline Cunha Melo<sup>a</sup>; Nivio Batista Santana<sup>a\*</sup>; Marcelo Franco<sup>a</sup>; Renata Sampaio Mafra de Santana<sup>a</sup>; Leandro Soares Santos<sup>a</sup>; Zanon Santana Gonçalves<sup>a</sup>;

<sup>a</sup>Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, Brasil

\*Email: niviobs@yahoo.com.br

Recebido: 28 de março de 2011; Aceito: 10 de junho de 2011.

### Resumo

A mandioca e seus produtos estão presentes em grande parte das mesas brasileiras. Entretanto, o processo de beneficiamento gera resíduos como cascas e fibras, etc. Neste trabalho, avaliou-se a produção de  $\alpha$ -amilase por *Aspergillus niger*, em resíduo do descascamento de mandioca, com diferentes teores de umidade. A maior atividade de  $\alpha$ -amilase (54,08 UA) foi determinada no tratamento com menor teor de umidade (45% UBU). Quanto a temperatura e pH ótimos para a atividade enzimática, encontrou-se os valores de 80 °C e pH 6,0. O modelo estatístico linear que mais se adequou aos dados mostrou que não houve influência significativa do tempo de fermentação, sendo a variação da atividade influenciada em maior parte pela umidade do resíduo.

**Palavras-chave:** Manihot. Resíduos. Enzimas. Biotecnologia.

### Abstract

Cassava and its products are present at most Brazilian tables. However, the beneficiation process generates waste such as peel, fibers etc. In this study, we evaluated the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus niger* in cassava peeling residue at different moisture content. The highest activity of  $\alpha$ -amylase (54.08 AU) was determined in the treatment with lowest moisture content (45% UBU). Optimum temperature and pH for the enzymatic activity, we found values of 80 °C and pH 6.0. The linear statistical standard that better fit to the data showed no significant influence of fermentation time, once the variation of activity was most influenced by the residual moisture.

**Keywords:** Manihot. Waste Products. Enzymes. Biotechnology.

### 1 Introdução

A produção nacional anual de mandioca é estimada em 23 milhões de toneladas, sendo os maiores registros nos Estados do Pará, Bahia, Paraná, Rio Grande do Sul e Maranhão. A indústria farinheira é a principal consumidora das raízes produzidas, utilizando aproximadamente 80% da produção brasileira de mandioca<sup>1</sup>. Embora não existam dados absolutos a respeito da quantidade total de resíduos produzidos a partir da industrialização farinheira, sabe-se que cerca de 10% da mandioca total utilizada na fabricação de farinha é eliminada na forma de casca e aproximadamente 3% a 5% na forma de farinha de varredura<sup>2</sup>.

A casca de mandioca é o resíduo obtido durante o início da fabricação da farinha de mandioca, sendo constituído de casca, entrecasca e pontas de mandioca e apresentando elevado teor de umidade (85%). De acordo com Prado *et al.*<sup>3</sup>, a casca de mandioca desidratada apresenta 58,1% de amido, 3,4% de proteína bruta e 28,6% de fibra em detergente neutro.

O Brasil produz grande quantidade de subprodutos agroindustriais, tais como bagaço de laranja (indústria cítrica) e farelo de trigo, de arroz, mandioca. Estes resíduos, que geralmente são descartados no meio ambiente sem nenhum tratamento, apresentam baixo custo e possibilidade de

utilização em processos que venham gerar produtos de alto valor comercial e baixo custo de produção<sup>4</sup>.

Há uma tendência crescente em converter resíduos industriais e agroindustriais em produtos de valor, os quais podem resultar em reduções potenciais do volume de resíduos, além dos custos de eliminação das frações remanescentes<sup>5</sup>. Compostos de valor podem ser retirados ou sintetizados a partir de diferentes resíduos da indústria através da produção de enzimas, por exemplo<sup>6</sup>.

Rattanachomsri *et al.*<sup>7</sup>, afirmam que devido a sua natureza orgânica rica, baixo conteúdo de cinzas, combinado com a fácil hidrólise, baixo custo de cultivo e falta de competição com outros usos industriais, a polpa de mandioca é um substrato ideal para a produção microbiana de produtos de valor agregado. Produtos como farinha ou fécula e resíduos como o bagaço da mandioca já foram utilizados como substrato para a produção de enzimas e outros produtos biotecnológicos<sup>7-11</sup>.

Dentre as várias possibilidades para utilização destes resíduos, a Fermentação em Estado Sólido (FES) é uma tecnologia amplamente estudada para a produção de enzimas de interesse industrial. Esta tecnologia é utilizada há bastante tempo na obtenção de produtos de grande importância comercial, principalmente no Oriente<sup>4</sup>. Lonsane e Ghildyal<sup>12</sup>

em uma extensiva revisão sobre a produção de enzimas por FES relatam a produção em escala industrial de alguns tipos de enzima, entre as quais pectinases,  $\alpha$ -amilases e glucoamilases. Já os relatos de produção em escala de laboratório são muitos e incluem além das já citadas, as proteases, celulases, lipases, catalases e xilanases.

Os meios de cultivo utilizados em FES, na sua maioria, são produtos agrícolas ou sub-produtos de agroindústrias tais como o farelo de arroz<sup>13</sup>, bagaço de mandioca<sup>14</sup>, torta de babaçu<sup>15</sup> e farelo de trigo<sup>16</sup>.

Recentemente, o potencial uso de microrganismos como fonte biotecnológica de enzimas relevantes para processos alimentícios tem estimulado o interesse na exploração da atividade enzimática extracelular<sup>8</sup>. Dentro deste contexto, os fungos desempenham importante papel no processo de bioconservação, pois podem reduzir a quantidade de resíduos, minimizar a poluição, formar produtos de interesse às indústrias de alimentos, papel, fármacos, entre outros<sup>17</sup>. Estes representam os microrganismos mais promissores pela variedade de produtos. A espécie *Aspergillus niger* é de grande destaque pela a grande variedade de produtos que esta espécie é capaz de produzir e o fato do *A. niger* ser considerado um microrganismo GRAS (reconhecido como de uso seguro) na produção de alimentos<sup>18</sup>.

Várias enzimas extracelulares estão comercialmente disponíveis e vastamente utilizadas na indústria. Entre elas, amilases estão envolvidas na assimilação de materiais a base de amido<sup>5</sup>.

As amilases são uma classe de hidrolases vastamente distribuídas na natureza. Estas agem especificamente sobre as ligações glicosídicas do amido. Atua na digestão, como as amilases salivar e pancreática, na germinação de grãos e no crescimento microbiano<sup>19,20</sup>. Existem diversos tipos de enzimas amilolíticas e elas têm utilizações em vários tipos de indústrias como a do papel, têxtil, panificação, produção de xaropes, álcool, bebidas, dentre outras. Vários autores relatam a utilização de fungos na produção de enzimas<sup>21-24</sup>.

O estudo proposto buscou verificar a utilização de *Aspergillus niger* para a produção de enzimas amilolíticas utilizando como substrato o farelo das cascas e entrecasas da mandioca, bem como caracterizar a enzima produzida.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Material

O resíduo do descascamento de mandioca foi obtida de comerciante local de Itapetinga-Ba.

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Obtenção e preparo do resíduo

O resíduo foi lavado, desidratado a 70 °C em secador de bandejas e triturado em moinho de facas elétrico para obtenção de uma farinha sem granulometria definida.

#### 2.2.2 Produção de esporos

Para produção de esporos do fungo, foram utilizados meio Agar-agar e PDA (*Potato Dextrose Agar*) em erlenmeyers de 500 mL autoclavados (121,0 °C por 15 minutos) e incubados a 35 °C por sete dias. Após esse tempo foi obtida a solução de esporos e feita à contagem em câmara de Neubauer.

#### 2.2.3 Inoculação e fermentação

Um mL da solução contendo 10<sup>7</sup> esporos/mL foi inoculada em 10 g de resíduo de farelo de casca de mandioca em erlenmeyers de 125 mL e incubada a 35 °C em estufa bacteriológica, durante 120 horas. O efeito da umidade do resíduo foi avaliado por meio de quatro tratamentos. Água destilada foi adicionada ao resíduo seco, de maneira a se obter aproximadamente 45, 55, 65 e 75 % de umidade em base úmida (UBU).

#### 2.2.4 Obtenção do extrato enzimático bruto

A cada 24 horas foi obtido o extrato enzimático com a adição de 50 mL de água destilada em 5 g de resíduo fermentado e deixado sob agitação em shaker de bancada Quimis, por 30 minutos a 37 °C, seguido de filtração com papel filtro e centrifugação a 3000 RPM por 15 minutos (Centrifuga CentriBio 310).

#### 2.2.5 Determinação da atividade enzimática

A partir do extrato foram feitas as determinações de atividade amilolítica inoculando 1 mL de extrato enzimático em 1 mL de solução de amido 1% em tampão citrato pH 7 e seguindo a determinação de açúcares redutores pelo método de DNS, utilizando solução de glicose como padrão. Uma unidade de amilase (UA) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de glicose por minuto nas condições utilizadas<sup>24</sup>.

#### 2.2.6 Determinação da concentração de proteína no extrato

A proteína no extrato foi determinada pelo método de Bradford (1976) a  $\lambda$  595nm, em espectrofotômetro Photonics Bel 2000UV, utilizando albumina sérica bovina como padrão.

#### 2.2.7 Purificação parcial da enzima

Ao extrato bruto obtido foi adicionado um volume 6 vezes maior de Acetona PA, e em seguida centrifugado a 3.000 RPM por 15 minutos. O precipitado foi suspenso em água destilada e utilizado nas determinações do efeito do pH e da temperatura na atividade da enzima.

#### 2.2.8 Influência do pH e da temperatura na atividade da enzima

O extrato parcialmente purificado obtido foi analisado como no item 2.2.5, variando o pH do substrato entre 3 a 10, utilizando-se diferentes tampões. Para avaliação da influência da temperatura, a atividade enzimática do extrato foi avaliada como no item 2.2.5 variando-se a temperatura na faixa entre 20 a 80 °C<sup>32</sup>.

### 2.2.9 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi feito em Delineamento Inteiramente casualizado, disposto em arranjo fatorial com 4 níveis do fator umidade, 45, 55, 65 e 75% UBU e 5 níveis do fator tempo, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação. Os resultados foram submetidos à ANOVA e teste de regressão, avaliando a influência da interação Umidade X Tempo e dos fatores individualmente. Os dados foram analisados através do software SAS (*Statistical Analysis System*).

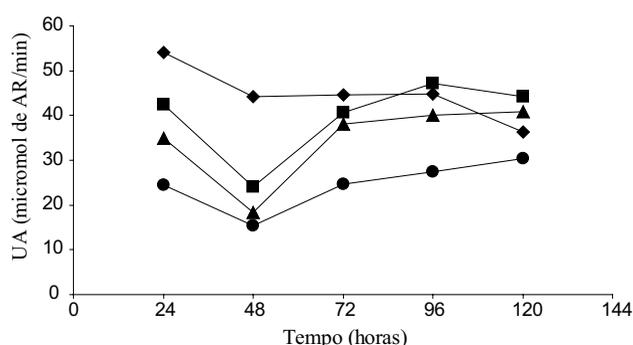
### 3 Resultados e Discussão

Na Tabela 1 são apresentados os valores de atividade amilolítica em função dos tratamentos avaliados.

**Tabela 1:** Atividade amilolítica (UA) em função da umidade dos resíduos e do tempo de fermentação

Tempo (h)	Umidade dos resíduos (%UBU)			
	45%	55%	65%	75%
24	54,09	42,44	34,87	24,39
48	44,19	24,17	18,34	15,43
72	44,62	40,62	38,07	24,68
96	44,84	47,17	40,11	27,52
120	36,40	44,19	40,84	30,35

Pode-se notar o comportamento da fermentação através da Figura 1. Conforme demonstrado, todos os tratamentos apresentaram redução nos valores de atividade amilolítica entre 24 e 48 horas de incubação.



**Figura 1:** Influência do tempo de fermentação e da umidade do substrato na atividade de amilase de *A. niger*. ◆ - T1 (45% de umidade), ■ - T2 (55% de umidade), ▲ - T3 (65% de umidade), ● - T4 (75% de umidade)

De acordo com os resultados da ANOVA, houve diferença significativa entre os valores de UA (atividade amilolítica) entre os tratamentos avaliados. Ao analisar o efeito da interação Umidade X Tempo, esta foi não significativa ( $P < 0,05$ ) em relação à variável dependente UA. Analisando-se os fatores Umidade e Tempo separadamente, observou-se que não houve influência significativa da variável tempo ( $P < 0,05$ ) e que a

maior influência sobre a produção da enzima se deveu-se a variação na umidade. Foram avaliados os modelos linear e quadrático para explicar a variação da atividade enzimática, em função das variáveis Umidade e Tempo. O modelo que melhor explica a produção das enzimas é apresentado abaixo:

$$UA = 13,6203 - 0,1194 U \quad (1)$$

Onde: UA é a atividade das enzimas e U é a umidade do resíduo.

De acordo com o modelo ajustado, há tendência de queda na atividade enzimática com aumento da umidade independentemente do tempo de fermentação. O tratamento 1 apresentou maior atividade com valores de 54,08 UA entre todos os tratamentos testados. Isso pode ser explicado pela maior afinidade do fungo por baixos valores de umidade.

Estudos relatam que o crescimento de *A. niger* não é afetado por baixas atividades de água (0,887) em temperaturas de 25 a 35 °C<sup>25,26</sup>. Shaktimay *et al.*<sup>11</sup> afirmam que acima de 60% de capacidade de retenção de umidade houve decréscimo da atividade da  $\alpha$ -amilase termoestável de *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 cultivada em FES utilizando resíduo fibroso de mandioca. O declínio pode ser atribuído a menor porosidade, baixa transferência de oxigênio e aeração e adsorção da enzima nas partículas do substrato. *A. Níger* e *A. terreus*, cultivados em resíduo de mandioca com 70% de umidade a 28±1 °C, apresentaram picos de atividade amilolítica com 6 dias de fermentação. Ao final de 10 dias de fermentação, não foi possível detectar atividade da enzima nestas fermentações<sup>27</sup>. Kunamneni *et al.*<sup>30</sup> encontraram maior atividade de amilase de *Thermomyces lanuginosus* em 120 horas de fermentação em umidade inicial para o substrato de 90%. Teores de umidade acima de 80% podem levar a contaminação bacteriana, acompanhado de contaminação fúngica. Alto teor de umidade também diminui a porosidade, a difusão de oxigênio e a eliminação de dióxido de carbono. Por outro lado um baixo teor de umidade pode levar a um menor crescimento<sup>14</sup>.

Valores elevados de atividade enzimática nas primeiras horas de fermentação podem ser explicados pela baixa disponibilidade de açúcares redutores da matéria-prima, necessários para o desenvolvimento do microrganismo.

Essa baixa disponibilidade estimula o mecanismo de expressão das enzimas necessárias para geração de açúcares simples<sup>20</sup>. Entre 48 e 72 horas de fermentação todos os tratamentos apresentaram aumento na atividade enzimática, a exceção de T1 que se manteve praticamente constante. A elevação após 48 horas pode ser devido ao consumo do açúcar gerado até então, causando esgotamento de substrato e reativando o mecanismo de expressão da enzima. Em 96 horas, os tratamentos 2, 3 e 4 continuaram apresentar aumento da atividade. Após esse período, os tratamentos 1 e 2 começaram mostrar redução na atividade, possivelmente por esgotamento de nutrientes ou por acúmulo de produtos inibidores da síntese enzimática ou do crescimento

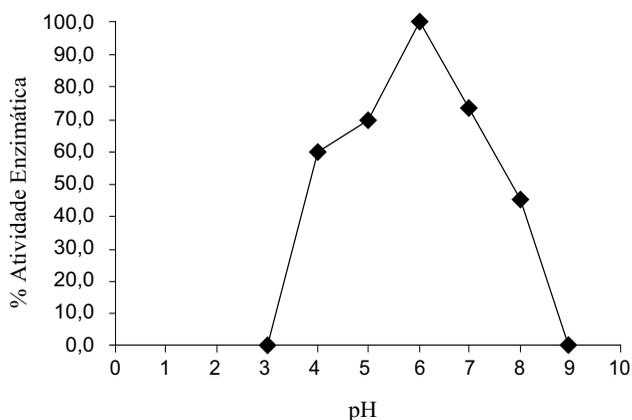
celular. Enzimas geralmente apresentam mecanismo de controle da expressão que podem ser estimulados ou inibidos por produtos do meio. Os produtos finais de cada via metabólica são frequentemente inibidores das enzimas que catalisam os primeiros passos da via. Esse mecanismo é conhecido como *Feedback* negativo ou autoalimentação<sup>20</sup>. Biazus *et al*<sup>28</sup> observaram que a concentração de produtos gerados pelas enzimas faz com que parte destas sejam inibidas e sua atividade reduza a um valor constante<sup>29</sup>, sendo também observado no presente trabalho. O decréscimo na atividade da enzima com aumento do tempo de incubação pode ser devido a produção de co-produtos resultante do metabolismo microbiano, além do esgotamento de nutrientes, inibindo o crescimento do fungo e a formação da enzima<sup>24,31</sup>. A Tabela 2 mostra os resultados obtidos para o teor de proteína dos extratos enzimáticos no período de maior atividade enzimática. Pode-se observar que o tratamento com 45% de umidade apresentou o maior resultado também neste parâmetro.

**Tabela 2:** Teor de proteína nos extratos após 24 horas de cultivo

Umidade	Proteína (mg/L)
45	9,70
55	5,49
65	8,76
75	3,21

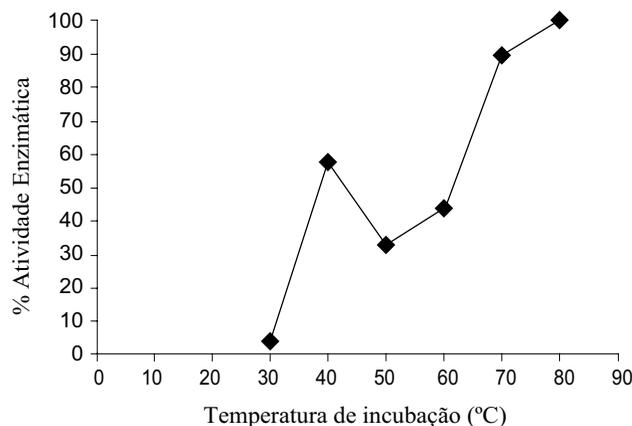
O processo de precipitação com acetona foi eficiente no sentido de concentrar as enzimas. Nota-se que a atividade da enzima precipitada foi cerca de duas vezes maior que no extrato bruto. A atividade do extrato bruto antes da purificação apresentou valor médio de 24,07 UA. Após a purificação parcial com acetona, esse valor atingiu média de 47,47 UA. Varalakshmi *et al*.<sup>33</sup> relatam aumento na atividade de 1,49 vezes para amilase de *A. niger* JG 24 purificada com sulfato de amônio.

As Figuras 2 e 3 abaixo apresentam o efeito do pH e da temperatura respectivamente na atividade da enzima parcialmente purificada.



**Figura 2:** Efeito do pH de incubação na atividade amilolítica residual

Pode-se notar um pico de atividade quando o pH de incubação foi igual a 6,0. Em pH 3,0 a atividade é praticamente nula. Acima do pH 6,0 também há redução grande da atividade. Omemu *et al*<sup>23</sup> relata um valor de ideal de pH para amilase de *A. niger* de 4,0, havendo redução em valores superiores a esse. Enzimas com valores de pH ideal próximos a neutralidade são interessantes para a utilização em detergentes<sup>32,33</sup>. Varalakshmi *et al*.<sup>33</sup> relatam valores de pH ótimo de para amilase de *A. niger* em pH 9,5. Alva *et al*.<sup>24</sup> relataram picos de atividade de amilase de *A. niger* JGI 12 em pH 5,8, 7,5 e 9,0.



**Figura 3:** Efeito da temperatura de encubação na atividade amilolítica residual

Pode-se notar na Figura 3 que ocorre um pico de atividade a 40 °C, seguida de redução a 50 °C e elevação contínua até atingir o pico a 80 °C. Diferentes picos de atividade podem indicar a síntese de outra enzima amilolítica como a amiloglucosidase<sup>24</sup>.

Negi e Banerjee<sup>6</sup> caracterizaram a amilase de *A. awamori* nakazawa (MTCC 6652) e relatam que esta enzima apresenta temperatura ótima de 70 °C e pH 4,0. Isso mostra a estabilidade da enzima em condições usadas em processos industriais, o que torna o uso desta enzima ferramenta importante em processos alimentícios, de limpeza e outras indústrias. Varalakshmi *et al*.<sup>33</sup> relatam pico de atividade da amilase de *A. niger*, cultivado em fermentação submersa, a 30 °C com valor mínimo a 70 °C.

#### 4 Conclusão

A utilização deste resíduo como substrato para a produção de biomoléculas de interesse industrial pode se tornar uma alternativa para o aproveitamento e desta de forma reduzir os descartes na natureza. Melhores resultados foram encontrados para o tratamento 1 (45% UBU), enquanto que para os outros tratamentos. O processo de precipitação com acetona foi eficiente para purificação parcial da enzima, preservando sua estrutura e aumentando sua atividade. O pH ideal para a ação da enzima foi de 6,0. A temperatura de maior atividade para a enzima foi 80 °C, entretanto, seria necessário avaliar a estabilidade desta enzima nessa temperatura por períodos mais longos.

## Referências

- SEAB/DERAL/CEPA/PR. Acompanhamento da situação agropecuária no Paraná. [acesso em 5 out 2010]. Disponível em <http://www.pr.gov.br/seab/mandioca.pdf>.
- Caldas Neto SF, Zeoula LM, Branco AF. Mandioca e resíduos das farinhas na alimentação de ruminantes: pH, concentração de amônia e eficiência microbiana. In: Anais da 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2000; Viçosa, Minas Gerais. Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2000. p.457
- Prado IN, Martins AS, Alcalde CR, Zeoula LM, Marques JÁ. Desempenho de novilhas alimentadas com rações contendo milho ou casca de mandioca como fonte energética e farelo de algodão ou levedura como fonte protéica. *Rev Bras Zootec* 2000;29(1):278-87.
- Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem* 2000;35:1153-69.
- Pengthamkeerati P, Numsomboon S, Satapanajaru T, Chairattananakorn P. Production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae* from cassava bagasse and wastewater sludge under solid-state fermentation. *Environmental Prog Sust Energy* 2011;30(1).
- Negi S, Banerjee R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. *Food Res Int* 2009;42(4):443-8.
- Rattanachomsri U, Tanapongpipat S, Eurwilaichitr L, Champreda V. Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. *J Biosci Bioeng* 2009;108(4):357.
- Swain MR., Kar S, Ray RC. Exo-polygalacturonase production by *Bacillus subtilis* CM5 in solid state fermentation using cassava bagasse. *Braz J Microbiol* 2009;40:636-48.
- Ogbonna CN, Okoli EC. Conversion of cassava flour to fuel ethanol by sequential solid state and submerged cultures. *Process Biochem* 2010;45:1196-200.
- Yuwa-Amornpitak T. Ethanol production from cassava starch by selected fungi from tn-koji and *Saccharomyces cerevisiae*) *Biotechnology* 2010;9(1):84-8.
- Shaktimay K, Tapan KD, Ramesh CR. Optimization of thermostable  $\alpha$ -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 in solid-state fermentation using cassava fibrous residue. *Braz Arch Biol Technol* 2010;53(2):301-9.
- Lonsane BK, Ghildyal NP. Exoenzymes solid substrate cultivation. London: Elsevier; 1992.
- Palma MB. Produção de Xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Tese [Doutorado em Engenharia Química] – Universidade Federal de Santa Catarina; 2003.
- Dalsenter FDH, Viccini G, Barga MC, Mitchell DA, Krieger NA. Mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. *Process Biochem* 2005;40:801-7.
- Palma MB, Pinto AL, Gombert AK, Seitz KH, Kivatinitz SC, Castilho LR *et al.* Lipase production by *penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Appl Biochem Biotechnol* 2000;84-86:1137-45.
- Nagel FJ, Van As H, Tramper R, Rinzema A. Water and glucose gradients in the substrate measured with NMR imaging during solid-state fermentation with *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol Bioeng* 2002;79:653-63.
- Israel CM. Utilização do resíduo do processamento do palmito para a produção de enzimas hidrolíticas por fungos do gênero *Polyporus*. Dissertação [Mestrado em Engenharia Ambiental] – Universidade Regional de Blumenau; 2005.
- Rodrigues ABC, Almeida CAV, Rocha CP, Coutinho Filho U, Cardoso VL. Fermentação de resíduos de arroz e maracujá na produção de invertase e amilase por *Aspergillus Niger*. Anais do 9º Encontro Interno e 23º Seminário de Iniciação Científica. Disponível em <http://www.ic-ufu.org/cd2009/PDF/IC2009-0337.pdf>
- Hizukuri S. Starch: analytical aspects. In: Eliasson A-C. Carbohydrates in food. New York: Marcel Dekker; 1996.p. 347-429.
- Whitaker JR. Principles of enzymology for the food Sciences. New York: Marcel Dekker; 1994.
- Moreira FG, Lima FA, Pedrinho SRF, Lenartovicz V, Souza CGM, Peralta RM. Production of amylases by *Aspergillus tamarii*. *Rev Microbiol* 1999;30:157-62
- Nandakumar MP, Thakur MS, Raghavarao KSMS, Ghildyal NP. Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. *Lett Appl Microbiol* 1999;29:380-4.
- Omemu AM, Akpan I, Bankole MO, Teniola OD. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM07 isolated from the soil. *Afr J Biotechnol* 2005;4(1):19-25.
- Alva S, Anupama J, Savla J, Chiu YY, Vyshali P, Shruti M *et al.* Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. *Afr J Biotechnol* 2007;6(5):576-81.
- Gupta A, Gautam N, Modi DR. Optimization of  $\alpha$ -amylase production from free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. *J Bio Pharm Res* 2010;1(1):1-8.
- Palacios-Cabrera H, Taniwaki MH, Hashimoto JM, Menezes HC. Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. *Braz J Microbiol* 2005;36(1):24-8.
- Pothiraj C, Balaji P, Eyini M. Raw Starch Degrading Amylase Production by Various Fungal Cultures Grown on Cassava Waste. *Mycobiology* 2006;34(3):128-30.
- Biazus JPM, Souza RR, Santana JCC, Tambourgi EB. Otimização da secagem do malte de Zea mays. *Cienc Tecnol Aliment* 2006;26(4):787-92.
- Dantas BF, Aragão CA, Cataneo AC, Cavariani C, Nakagawa J, Rodrigues JD. Atividade amilolítica de sementes das cultivares de milho Saracura (BRS4154) e CATI AL34 submetidas ao alagamento. In: Anais do 24º Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2002, Florianópolis. Santa Catarina. Sete Lagoas: ABS; Embrapa Milho e Sorgo; Epagri 2002.
- Kunamneni A, Permaul K, Singh S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *J Biosci Bioeng* 2005;100(2):168-71.
- Shafique S, Bajwa R, Shafique S. Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular alpha-amylase activity. *Pak J Bot* 2009;41(2):897-905.
- Carvalho RV, Côrrea TLR, Silva JCM, Mansur LRCO, Martins MLL. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol* 2008;39:102-7.
- Varalakshmi KN, Kumudini BS, Nandini BN, Soomon R, Suhas R, Mahesh B, *et al.* Productions and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore. *Polish J Microbiol* 2009;58;(1):29-36.

