

Producción de amilasas por cepas de hongos anamorfos aislados de la hojarasca de *Quercus* sp

Figueroa Ceballos, Ricardo; Morales Esquivel, Osberth; Bran González, María del Carmen
Producción de amilasas por cepas de hongos anamorfos aislados de la hojarasca de *Quercus* sp
Revista Científica, vol. 29, núm. 1, 2019
Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala

Producción de amilasas por cepas de hongos anamorfos aislados de la hojarasca de *Quercus* sp

Amylase production of strains of anamorphic fungi isolated from leaf litter of *Quercus* sp

Ricardo Figueroa Ceballos figueroaricard@gmail.com

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala

Osberth Morales Esquivel

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala

María del Carmen Bran González

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala

Revista Científica, vol. 29, núm. 1, 2019

Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala

Recepción: 11 Octubre 2019

Aprobación: 22 Noviembre 2019

Resumen: Los hongos anamorfos son un grupo de microorganismos de gran importancia ya que producen una amplia variedad de sustancias como parte de su metabolismo secundario, así como enzimas útiles en la degradación de diferentes sustratos. Algunas de estas enzimas son las amilasas, las cuales degradan el almidón a dextrina, maltosa o glucosa libre, por lo que tienen aplicación a nivel industrial en la fabricación de detergentes y textiles y en la producción de alimentos. En este estudio se evaluó el potencial de 40 cepas de hongos anamorfos para la producción de amilasas, las cuales fueron obtenidas a partir de hojarasca de *Quercus* sp del Astillero Municipal de Tecpán-Guatemala (N 14° 46' 48.81", O 91° 0' 27.42") y del Parque Ecológico Senderos de Alux, San Lucas Sacatepéquez (N 14° 36' 43.41", O 90° 38' 15.92"). La producción de amilasas se midió cualitativamente a través del índice de actividad enzimática, evidenciado por la detección de halos de degradación en agar almidón, y se cuantificó espectrofotométricamente con la medición de la actividad amilolítica de los extractos enzimáticos. De las cepas evaluadas 37 (92.5 %) produjeron amilasas. Las actividades amilolíticas de las cepas nativas de hongos anamorfos coincidieron con las reportadas para especies de uso industrial. La cepa que presentó la mayor actividad amilolítica (625 [13.09] UA/dl) fue *Virgaria nigra* SL12517, la cual es similar a la reportada en la literatura para otros hongos utilizados en procesos industriales. Los resultados de este estudio muestran un considerable potencial amilolítico en hongos anamorfos de la hojarasca de *Quercus* sp.

Palabras clave: enzimas, degradación, capacidad amilolítica.

Abstract: Anamorphic fungi is a group of microorganisms of great importance since they produce a wide variety of substances as part of their secondary metabolism, as well as enzymes useful in the degradation of different substrates. Some of these enzymes are amylases, which degrade starch to dextrin, maltose or free glucose. Therefore, having industrial application for the manufacture of detergents, food, and textiles. In this study, we evaluated the potential of 40 strains of anamorphic from *Quercus* sp, leaf litter collected in the Municipal Regional Park Astillero Municipal de Tecpán, in Chimaltenango (N 14° 46' 48.81", O 91° 0' 27.42") and the Ecological Park Senderos de Alux, in San Lucas Sacatepéquez (N 14° 36' 43.41", O 90° 38' 15.92"). The production of amylases was evaluated through the index of enzymatic activity, which was evidenced by the detection of starch agar degradation halo on starch agar, as well as by the

measurement of the amylolytic activity of the enzyme extracts. Of the strains evaluated, 37 (92.5 %) produced amylases. The amylolytic activities of the anamorphic fungi native strains correspond with those reported for species of industrial use. The strain that showed the highest amylolytic activity (625 [13.09] UA / dl) was *Virgaria nigra* SL12517, which is similar to that reported for other fungi used in industrial processes. This shows the amylolytic potential of anamorphic fungi of *Quercus* sp. leaf litter.

Keywords: enzymes, degradation, amylolytic capacity.

Introducción

Las amilasas son un grupo de hidrolasas que pueden romper específicamente el enlace α -glicosídico del almidón y están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se encuentran en plantas, animales y microorganismos donde cumplen una función nutricional ya que permiten la digestión de los hidratos de carbono. Esta enzima se divide en tres clases importantes, la α -amilasa (1,4- α -D-glucano-glucanohidrolasa), la β -amilasa (1,4- α -D-glucano-maltohidrolasa) y la γ -amilasa (1,4- α -D-glucano-glucohidrolasa) (Ramachandran et al., 2004). Los hongos producen principalmente α -amilasas, las cuales rompen aleatoriamente el enlace 1,4- α -D-glucosídico entre unidades de glucosa adyacentes dentro de la cadena de amilosa lineal (Saleem & Ebrahim, 2013). Las α -amilasas fúngicas constituyen un 25 % del mercado mundial de enzimas y son ampliamente utilizadas en procesos biotecnológicos ya que tienen la ventaja de que son rentables y facilitan la modificación y optimización de los procesos de producción (Karnwal & Nigam, 2013), por lo que son de utilidad tanto en la industria de producción de alimentos, cerveza, enzimas pancreáticas, textiles y de los detergentes (Gudynaite-Savitch & White, 2016).

Las amilasas fúngicas para uso industrial se producen a partir de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus* aislados de sustratos ricos en almidón (Pandey, Soccol & Mitchell, 2000). Sin embargo, los hongos anamorfos también son un grupo de interés, debido a que tienen la capacidad de degradar sustratos complejos como la hojarasca que está compuesta principalmente de celulosa, lignina y almidón. Dicha capacidad se debe al potencial que tienen para producir enzimas tales como celulasas, lacasas y amilasas (Gamboa & García, 2008; Rubbo & Kiesecker, 2004).

A pesar del potencial biotecnológico que tienen los hongos anamorfos para la producción de enzimas, en Guatemala no existen estudios al respecto, por lo que el objetivo de esta investigación fue analizar la capacidad de 40 cepas de hongos anamorfos saprobios nativos para la producción de α -amilasas. La capacidad productora de dichas enzimas se midió cualitativamente a través del índice de actividad enzimática, evidenciado por la detección de halos de degradación en agar almidón, y se cuantificó espectrofotométricamente con la medición de la actividad amilolítica de los extractos enzimáticos obtenidos a partir de salvado de trigo. Cabe resaltar que la producción de enzimas a nivel local es de suma importancia principalmente para la industria productora de alimentos, cerveza, textiles y detergentes ya que eliminaría los costos de importación

de dichas enzimas. Asimismo, este estudio muestra la capacidad que tienen los hongos anamorfos nativos para la producción de α -amilasas.

Materiales y métodos

Procedencia de las cepas

Se utilizaron 40 cepas nativas de hongos anamorfos aisladas a partir de hojarasca de *Quercus* sp del Astillero Municipal de Tecpán-Guatemala, Chimaltenango (N 14° 46' 48.81", O 91° 0' 27.42") y del Parque Ecológico Senderos de Alux, San Lucas Sacatepéquez, Sacatepéquez (N 14° 36' 43.41", O 90° 38' 15.92"), las cuales están almacenadas en el cepario de hongos saprobios y micorrícicos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Se realizaron cultivos axénicos de las cepas en agar papa dextrosa (PDA), los cuales fueron incubados durante 15 días a 25 °C. Posteriormente se tomaron círculos de 0.5 cm de diámetro del micelio de cada una de las cepas y se transfirieron en condiciones de esterilidad a agar almidón al 1.0 % (AAL), para su adaptación y producción de biomasa para los ensayos posteriores (Lagunes et al., 2015).

Producción de amilasas en agar almidón (AAL)

Las cepas fúngicas fueron inoculadas nuevamente en el medio AAL y se incubaron a 25 °C durante 18 días. La producción de amilasas se detectó por la formación de un halo de hidrólisis alrededor de las colonias, mediante la adición de yodo en yoduro de potasio (0.026 % I₂ + 0.26 % KI) como revelador. El índice de actividad enzimática se calculó por medio de la fórmula . Se realizaron cinco repeticiones por cada cepa fúngica (Pandey et al., 2000).

Producción de amilasas por fermentación en fase sólida y extracción de enzimas

A partir de las cepas fúngicas desarrolladas en cajas de Petri con agar almidón, se realizó una suspensión de esporas o micelio en Tween 80 al 0.01 %. Cada suspensión fue inoculada en frascos de 100 ml con tapa de rosca que contenían salvado de trigo (Preparados con 10 g de salvado de trigo adicionado con 5 ml de agua destilada y esterilizados durante 15 min a 121 °C y 1 atm), y se incubaron a 28 °C durante siete días para la producción de amilasas. Las enzimas se extrajeron agregando 50 ml de una solución acuosa de NaCl al 1.0 % a los frascos con salvado de trigo, con posterior agitación en una incubadora de rotación orbital durante 30 min. Los extractos obtenidos se filtraron y fueron almacenados a 5 °C (Pandey et al., 2000).

Evaluación de la actividad amilolítica de los extractos

La actividad amilolítica de los extractos se evaluó con la adición de 0.5 ml de una solución de almidón soluble 0.2 M en acetato de sodio 0.1 M y 10.0 μ l del extracto acuoso, con posterior incubación a 37 °C por 30 min. Transcurrido este lapso, se agregó una solución de yodo en yoduro de potasio (0.006 % I₂ + 0.06 % KI) en HCl 0.2 M, la cual reaccionó con el almidón residual y se determinó por medio de

absorbancia por espectrofotometría en un equipo VWR V-1200 a 640 nm (Queen, Rajalakshmi, & Komathi, 2017). La absorbancia basal se midió posterior a la preparación de los reactivos y se utilizó almidón soluble como control positivo. La cuantificación se expresó en unidades amilolíticas por decilitro (UA/dl) a través de la fórmula. Se realizaron 5 repeticiones por cepa. Las unidades amilolíticas determinan la cantidad de enzima contenida en 100.0 ml de muestra, que puede hidrolizar 10.0 mg de almidón en 30 min (Sarmiento, Vargas, Pedroza, Matiz, & Poutou, 2003).

Análisis estadístico

Se calculó la media y la desviación estándar para el índice de actividad y la actividad enzimática de cada cepa fúngica. La normalidad de los datos se evaluó con una prueba de Shapiro-Wilk. Para evidenciar si existía o no diferencias entre los índices de actividad y las actividades enzimáticas de las 40 cepas, se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (.05 de significancia). Los resultados fueron procesados en el programa R® (Zaferanloo, Bhattacharjee, Ghorbani, Mahon, & Palombo, 2014).

Resultados

De las 40 cepas de hongos anamorfos saprobios aislados de la hojarasca de *Quercus* sp, 37 produjeron amilasas, de éstas *Virgarianigra* SL12517 mostró la mayor actividad enzimática (625.13 UA/dl), seguido por *Aspergillus niger* SL14917 (621.63 UA/dl) y *Aspergillus* sp SL15317 (558.57 UA/dl). La menor actividad la mostró *Mariannaeaelegans* TP13819 (1.52 UA/dl) y la cepa TP16919 (1.52 UA/dl). *Chloridium* sp SL10619, TP13019 y *Helicosporium* sp SL10819 no mostraron actividad amilolítica. De las cepas que produjeron amilasas 20 mostraron índices de actividad mayores a 100, en tanto que los extractos acuosos correspondientes mostraron actividades enzimáticas mayores a 50 UA/dl (Tabla 1).

Tabla 1

Índices de actividad y actividad amilolítica de los extractos de las cepas que mostraron actividades mayores a 100 y actividad enzimática mayor a 50 UA/dl.

Hongo anamorfo		Índice de actividad ¹	Actividad enzimática (UA/dl) ²
<i>Aspergillus</i> SL15019	sp	99.26 (1.84)	36.55 (4.00) ^{ab}
<i>Beltrania</i> SL10119	<i>querna</i>	94.52 (23.42)	23.42 (1.61) ^b
<i>Beltrania</i> TP12819	<i>querna</i>	98.88 (12.08)	32.18 (1.21) ^{ab}
<i>Cladosporium</i> TP16519	sp	99.03 (26.04)	26.04 (6.58) ^{ab}
<i>Mariannaea elegans</i> TP13819		99.32 (1.49)	1.52 (4.35) ^c
<i>Paecilomyces</i> TP17019	sp	97.59 (12.66)	43.56 (1.59) ^a
<i>Paecilomyces</i> TP17219	sp	96.00 (16.74)	15.53 (3.40) ^b
<i>Penicillium</i> SL15819	sp	99.38 (5.10)	43.56 (5.56) ^a
<i>Penicillium</i> SL15919	sp	98.77 (3.56)	40.06 (1.63) ^a
<i>Penicillium</i> SL16219	sp	99.44 (6.17)	47.07 (1.87) ^a
<i>Stachybotryna</i> SL12019	sp	98.33 (12.36)	5.02 (2.95) ^c
<i>Stachybotryna</i> TP14619	sp	96.92 (11.67)	29.55 (1.84) ^a
<i>Thozetella cubensis</i> SL12219		97.59 (47.07)	47.07 (7.21) ^a
<i>Thozetella</i> SL12319	<i>nivea</i>	99.17 (5.41)	43.56 (4.58) ^a
<i>Thozetella</i> TP14719	<i>nivea</i>	97.71 (9.75)	26.04 (8.75) ^a
Cepa TP16819		98.08 (10.77)	29.55 (8.12) ^a
Cepa TP16919		97.41 (8.40)	1.52 (1.71) ^c

¹ La relación halo/colonia fue medida en milímetros a los 18 días de incubación, media (desviación estándar). ² Unidades amilolíticas por decilitro. a, b, c Letras distintas indican diferencia significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p < .05$), media (desviación estándar).

Las cepas *Aspergillus* sp SL15019, *Beltrania querna* SL10119 y TP12819, *Cladosporium* sp TP16519, *Mariannaea elegans* TP13919, *Paecilomyces* sp TP17019 y TP17219, *Penicillium* sp SL15819, SL15919 y SL16219, *Stachybotryna* sp SL12019 y TP14619, *Thozetella cubensis* SL12219, *Thozetella nivea* SL12319 y TP14719, así como las cepas TP16819 y TP16919 mostraron índices de actividad menores a 100 y sus extractos acuosos correspondientes mostraron actividades enzimáticas menores a 50 UA/dl (Tabla 2).

Tabla 2

ndices de actividad y actividad amilolítica de los extractos de las cepas que mostraron actividades menores a 100 y actividad enzimática menor a 50 UA/dl.

Hongo anamorfo	Índice de actividad ¹	Actividad enzimática (UA/dl) ²
<i>Aspergillus</i> sp SL15019	99.26 (1.84)	36.55 (4.00) ^{ab}
<i>Beltrania querna</i> SL10119	94.52 (23.42)	23.42 (1.61) ^b
<i>Beltrania querna</i> TP12819	98.88 (12.08)	32.18 (1.21) ^{ab}
<i>Cladosporium</i> sp TP16519	99.03 (26.04)	26.04 (6.58) ^{ab}
<i>Mariannaea elegans</i> TP13819	99.32 (1.49)	1.52 (4.35) ^c
<i>Paecilomyces</i> sp TP17019	97.59 (12.66)	43.56 (1.59) ^a
<i>Paecilomyces</i> sp TP17219	96.00 (16.74)	15.53 (3.40) ^b
<i>Penicillium</i> sp SL15819	99.38 (5.10)	43.56 (5.56) ^a
<i>Penicillium</i> sp SL15919	98.77 (3.56)	40.06 (1.63) ^a
<i>Penicillium</i> sp SL16219	99.44 (6.17)	47.07 (1.87) ^a
<i>Stachybotrina</i> sp SL12019	98.33 (12.36)	5.02 (2.95) ^c
<i>Stachybotrina</i> sp TP14619	96.92 (11.67)	29.55 (1.84) ^a
<i>Thozetella cubensis</i> SL12219	97.59 (47.07)	47.07 (7.21) ^a
<i>Thozetella nivea</i> SL12319	99.17 (5.41)	43.56 (4.58) ^a
<i>Thozetella nivea</i> TP14719	97.71 (9.75)	26.04 (8.75) ^a
Cepa TP16819	98.08 (10.77)	29.55 (8.12) ^a
Cepa TP16919	97.41 (8.40)	1.52 (1.71) ^c

¹ La relación halo/colonia fue medida en milímetros a los 18 días de incubación, media (desviación estándar). ² Unidades amilolíticas por decilitro. a, b, c Letras distintas indican diferencia significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (p < .05), media (desviación estándar).

Discusión

El índice de actividad amilolítica mostró que el 92.5 % de las cepas de hongos anamorfos produjeron amilasas. Dichas cepas fueron colectadas a partir de hojarasca de *Quercus* sp la cual posee glucanos como celulosa y almidones como parte de su composición, y constituye la principal fuente de carbono para los microorganismos descomponedores en las primeras etapas, por lo tanto se esperaba un alto potencial amilolítico por parte de los hongos anamorfos estudiados (Leitner et al., 2012).

De las cepas evaluadas en este estudio *V. nigra* SL12517 presentó la actividad amilolítica más elevada (625 UA/dl), la cual sobrepasa a las encontradas por Puri y Loveleen (2013), que produjeron α -amilasas también a partir de salvado de trigo y obtuvieron valores de entre 272 UA/dl y 411 UA/dl. De modo similar, *A. niger* SL14917 presentó la segunda actividad más alta (621.63 UA/dl) que es comparable con la misma especie reportada por Tester, Qi y Karkalas (2006), para la degradación de residuos agroindustriales, en donde demostraron su efectividad en la descomposición de almidones crudos bajo diferentes condiciones de pH y temperatura. *Aspergillus* ha sido ampliamente utilizado para la producción de α -amilasas debido a su capacidad de utilización de diferentes fuentes de carbono, peptonas y a sus bajos requerimientos nutricionales (Mathew, Vezhacharickal, Sajeshkumar & Ashokan, 2016).

Spier, Woiciechowski, Vandenberghe y Soccol (2006) y Villalba, Bula, Juan y Ávila (2008) encontraron que *A. niger* tiene un alto potencial para la producción de amilasas en residuos agroindustriales como el almidón de yuca, bagazo de caña y salvado de trigo. Respecto a las otras especies de *Aspergillus*, mostraron actividades amilolíticas de entre 183.60–558.57 UA/dl, se ha reportado que dicho género muestra la capacidad para degradar almidón mediante la inducción en sustratos como el salvado de trigo o de maíz, así como potencial aplicación en la industria de producción de alimentos y elaboración de textiles (Alva et al., 2007; Mojsov, 2012; Mojsov et al., 2018).

Respecto a *Aspergillus* sp SL15217, SL15317, *B. rhombica* SL10217, *Brachysporiella* sp SL10317, *Chaetopsinasplendida* SL10517, las cepas TP16819, TP16919, *Paecilomyces* sp TP17117 y *Penicillium* sp SL15417, SL16417, SL15717, SL16017, SL16117, SL16317, mostraron actividades enzimáticas de entre 100 y 400, valores que son similares a los reportados por Castro y colaboradores (2011), acerca de la capacidad de los hongos de los géneros *Penicillium*, *Rhizopus* y *Aspergillus* como productores de enzimas amilasas, celulasas y xilanasas para aplicaciones industriales. Asimismo, se observó una baja actividad enzimática con *C. splendida* SL10517 y *Phialocephalahumicola* SL11417 y TP14117.

Por otra parte, Vanegas–Zamora, Méndez y Murillo (2015) utilizaron cepas de *Aspergillus* sp, *Rhizopus oryzae* y *Penicillium* sp en subproductos del arroz para la producción de α -amilasas y obtuvieron resultados de entre 1000–4000 UA/dl y Mazumdar y Maumdar (2018) que a partir de *Aspergillus oryzae* en cáscaras de plátano, obtuvieron actividades de hasta 645 UA/dl, dichas actividades amilolíticas son mayores a los obtenidos en este estudio debido a que optimizaron variables tales como el periodo de fermentación, la temperatura de incubación, el pH inicial del medio y la concentración del sustrato.

Cabe resaltar que el potencial de los hongos anamorfos nativos asociados a la hojarasca de *Quercus* sp para la producción de α -amilasas es promisorio para su uso a nivel industrial a través de su producción a gran escala utilizando el salvado de trigo y otros residuos agroindustriales, ya que dichos hongos tienen la capacidad de desarrollarse en sustratos con pocos nutrientes y presentan actividades comparables a las cepas que se utilizan en la actualidad para la producción de α -amilasas.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala por el cofinanciamiento del presente estudio DIGI-USAC-4.8.63.6.10-2018, a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por el apoyo y aval otorgado y a la Inga. Liuba Cabrera, Coordinadora del Programa Universitario de Investigación en Alimentación y Nutrición, por la asistencia técnica y administrativa.

Referencias

- Alva, S., Anupama, J., Savla, J., Chiu, Y., Vyshali, P., Shruti, M., & Ruchi, K. (2007). Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. *African journal of biotechnology*, 6(5), 576-581.
- Castro, A., Andréa, T., Carvalho, D., Teixeira, M., Reis-Castilho, L., & Freire, D. (2011). Valorization of residual agroindustrial cakes by fungal production of multienzyme complexes and their use in cold hydrolysis of raw starch. *Waste and biomass valorization*, 2(3), 291-302. doi:10.1007/s12649-011-9075-5
- Gamboa, M., & García, S. (2008). Potencial biológico y creatividad química de hongos microscópicos del trópico americano. En G. Heredia. *Tópicos sobre diversidad, ecología y biotecnología de los hongos microscópicos* (pp. 253-272). Veracruz: Prograf.
- Gudynaite-Savitch, L., & White, T.C. (2016). Fungal biotechnology for industrial enzyme production: focus on (Hemi)cellulase production strategies, advances and challenges. En M. Schmoll & C. Dattenböck (Eds.). *Gene expression systems in fungi: advancements and applications* (pp. 395-439). Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- Karnwal, A., & Nigam, V. (2013). Production of amylase enzyme by isolated microorganisms and its application. *International journal of pharma and bio sciences*, 3(4), 354-360.
- Lagunes, M., López, A., Ramos, A., Trigos, A., Salinas, A., & Espinoza, C. (2015). Actividad antibacteriana de extractos metanol:cloroformo de hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(1), 87-94.
- Leitner, S., Wanek, W., Wild, B., Haemmerle, I., Kohl, L., Keiblinger, K., ... Richter, A. (2012). Influence of litter chemistry and stoichiometry on glucan depolymerization during decomposition of beech (*Fagus sylvatica* L.) litter. *Soil biology & biochemistry*, 50(2012), 174-187.
- Mathew, J., Vezhacharickal, P., Sajeshkumar, N., & Ashokan, A. (2016). Amylase production by *Aspergillus niger* through submerged fermentation using starchy food byproducts as substrate. *International journal of herbal medicine*, 4(6), 34-40.
- Mazumdar, A., & Maumdar, H. (2018). Bio-processing of banana peel for alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid state fermentation. *The clarion*, 7(1), 36-42.
- Mojsov, K. (2012). Microbial alpha-amylases and their industrial applications: a review. *International journal of management, it and engineering*, 2(10), 583-609.
- Mojsov, K., Andronikov, D., Janevski, A., Jordeva, S., Kertakova, M., Golomeova, S., ... Ignjatov, I. (2018). Production and application of alpha-amylase enzyme in textile industry. *Tekstilna industrija*, 1, 23-28.
- Pandey, A., Soccol, C., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I bioprocesses and products. *Process biochemistry*, 35(10), 1153-1169. doi:10.1016/S0032-9592(00)00152-7
- Puri, S., & Loveleen, A. (2013). Production and optimization of amylase and glucoamylase using *Aspergillus oryzae* under solid state fermentation. *International journal of research in pure and applied microbiology*, 3(3), 83-88.

- Queen, J., Rajalakshmi, G., & Komathi, S. (2017). Screening of amylase producing microbes from rhizosphere soil and its potential application in baking bread. *European journal of biotechnology and bioscience*, 5(5), 63-72.
- Ramachandran, S., Patel, A., Nampoothiri, K., Chandran, S., Szakacs, G., Soccol, C., & Pandey, A. (2004). Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. *Brazilian archives of biology and technology*, 47(2), 309-317. doi: 10.1590/S1516-89132004000200019
- Rubbo, M. & Kiesecker, M. (2004). Leaf litter composition and community structure: translating regional species changes into local dynamics. *Ecology*, 85(9), 2519-2525.
- Saleem, A., & Ebrahim, M. (2013). Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah, Saudi Arabia. *Journal of taibah university for science*, 8, 90-97. doi: 10.1016/j.jtusci.2013.09.002
- Sarmiento, V., Vargas, D., Pedroza, A., Matiz, A., & Poutou, R. (2003). Producción de alfa-amilasa con células libres e inmovilizadas de *Thermus* sp. *Revista MVZ Córdoba*, 8(2), 310-317.
- Spier, M., Woiciechowski, A., Vandenberghe, L., & Soccol, C. (2006). Production and Characterization of Amylases by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agro industrial products. *International journal of food engineering*, 2(3), 1-19. doi:10.2202/1556-3758.1116
- Tester, R., Qi, X., & Karkalas, J. (2006). Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal feed science and technology*, 130(1), 39-54. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.01.016
- Vanegas-Zamora, R., Méndez, J., & Murillo, W. (2015). Potencial amilolítico de microorganismos asociados al arroz cultivados a partir de almidón extraído de subproductos del grano. *Revista de la academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales*, 39(153), 514-519.
- Villalba, P., Bula, A., Juan, H., & Ávila, A. (2008). Yucca (*Manihot esculenta* Crantz) starch polysaccharide dextrination through biological procedures. *Interciencia*, 33(4), 314-316.
- Zaferanloo, B., Bhattacharjee, S., Ghorbani, M., Mahon, P., & Palombo, E. (2014). Amylase production by *Preussia minima*, a fungus of endophytic origin: optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS. *BMC Microbiology*, 14(55), 1-12. doi:10.1186/1471-2180-14-55