



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA E AMBIENTAIS – FCBA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

ISADORA STRANIERI SANGUINE
MATHEUS FERNANDES

**PRODUÇÃO DE AMILASE POR *GONGRONELLA* SP. ISOLADO NA REGIÃO
DE DOURADOS – MS**

Dourados/MS

18/11/2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA E AMBIENTAIS – FCBA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**PRODUÇÃO DE AMILASE POR *GONGRONELLA* SP. ISOLADO NA REGIÃO
DE DOURADOS – MS**

Isadora Stranieri Sanguine

Matheus Fernandes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
para a obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Dourados/MS

18/11/2014

ISADORA STRANIERI SANGUINE
MATHEUS FERNANDES

“Produção de Amilase por Gongronella sp. isolado na região de Dourados-MS”

Trabalho de Conclusão de curso aprovado com requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof^a. Dr^a. Kelly Mari Pires de Oliveira
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz
Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados, 18 de novembro de 2014

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradecemos a Deus pela vida, por sempre nos dar forças nas horas de desânimo e por todas as portas abertas a nós.

Agradecemos em especial aos nossos pais, pelos exemplos de vida e caráter, por toda luta para nos dar essa oportunidade de chegarmos até aqui um dia, pelo amor e atenção dedicados a nós. Sem eles com certeza não conseguiríamos realizar este sonho.

À todos de nossa família, que de alguma forma contribuíram para que nunca desistíssemos de concretizar esta etapa, nos mostrando sempre a importância de batalhar incessantemente pelos nossos sonhos.

Aos professores do curso, em especial ao nosso orientador prof. Dr Rodrigo Simões Ribeiro Leite que com paciência, dedicação e carinho compartilhou seus conhecimentos e dividiu experiências. Nosso muito obrigado professor por não ter desistido de nós e sempre ter nos dado incentivo para vencer na vida.

À todos da III Turma de Biotecnologia, que percorreram este caminho junto conosco e fizeram parte da nossa formação, mesmo aqueles que foram pra longe. Pra nós foi um imenso prazer fazer parte de uma turma tão unida e especial, vocês são inesquecíveis.

Ao nosso namorada (o), que estiveram ao nosso lado nos apoiando sempre que foi preciso, por terem sido compreensivos nos momentos difíceis, nos dando atenção e amor, tornando-os verdadeiros companheiros de nossas vidas.

Aos nossos amigos queridos, os quais estiveram presentes durante toda essa caminhada, seremos eternamente agradecidos por todo apoio, atenção e carinho que nos foi dado.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível, nossos sinceros agradecimentos.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

| | |
|---|--------|
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 12 |
| 1.1 Enzimas..... | 12 |
| 1.1.1 Definição e Denominação de Enzimas..... | 12 |
| 1.1.2 Atividade Enzimática..... | 14 |
| 1.1.3 Fatores que Controlam a Atividade Enzimática..... | 15 |
| 1.1.4 Enzimas Amilolíticas e Principais Aplicações Industriais..... | 16 |
| 1.2 Cultivo em Estado Sólido (CES)..... | 18 |
| 2. OBJETIVO..... | 19 |
| 3. MATERIAS E MÉTODOS..... | 20 |
| 3.1 Microrganismo..... | 20 |
| 3.2 Inóculo..... | 20 |
| 3.3 Produção de Amilases por Cultivo em Estado Sólido (CES)..... | 20 |
| 3.4 Extração da Enzima..... | 20 |
| 3.5 Determinação da Atividade de Amilase..... | 20 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 21 |
| 5. CONSIDERAÇÕES | FINAIS |
| | 24 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 25 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Representação dos quatro níveis de organização estrutural das proteínas (MORAES <i>et al.</i> , 2013)..... | 12 |
| Figura 2 - Representação dos mecanismos de estabilização da estrutura da proteína (GOMES <i>et al.</i> , 2007)..... | 13 |
| Figura 3 - Representação esquemática do modo de ação de algumas amilases (SILVA & POLIZELI, 2009)..... | 15 |
| Figura 4 - Esquema representativo da estrutura da amilose e amilopectina (MOURA, 2008)..... | 16 |
| Figura 5 - Produção de amilase pelo cultivo em estado sólido do fungo <i>Gongronella</i> sp. em farelo de trigo. (A) umidade inicial, (B) temperatura de cultivo, (C) tempo de cultivo..... | 22 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Representação da classificação das enzimas e seus tipos de reações (ARAUJO, 2009).....14
- Tabela 2** - Produção de amilase pelo fungo *Gongronella* sp. em diferentes resíduos agroindustriais à 30°C com 65% de umidade no meio e 120 h de tempo de cultivo.....21
- Tabela 3** - Condições ótimas de todos os parâmetros avaliados e atividade enzimática final da otimização.....23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CES – Cultivo em Estado Sólido

DNS - 3,5-acido dinitrosalisílico

et. al. – colaboradores

CES – Cultivo em Estado Sólido

pH – Potencial hidrogeniônico

sp. – espécie

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Célsius

g – Gramas

h – Horas

mL – Mililitro

U/g – Unidade de enzima por grama

μL – Microlitro

U/mL – Unidade de enzima por mililitro

PRODUÇÃO DE AMILASE POR *GONGRONELLA* SP. ISOLADO NA REGIÃO DE DOURADOS – MS

Isadora Straniere Saguine¹ Matheus Fernandes¹ Rodrigo Simões Ribeiro Leite².

Universidade Federal da Grande Dourados - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, C. Postal 533, 79804-970 Dourados-MS, E-mail: rodrigoleite@ufgd.edu.br

¹ Acadêmicos de Biotecnologia da UFGD.

² Orientador do Trabalho de Conclusão de Curso FCBA/UFGD.

RESUMO

Dentre as enzimas industriais, as amilases apresentam destaque no mercado mundial, podendo ser utilizadas em diferentes processos: obtenção de xaropes de glicose ou maltose, processamento de alimentos e bebidas, elaboração de ração animal e produção de etanol a partir de fontes amiláceas. O presente trabalho teve como objetivo delinear as condições ótimas de cultivo para produção de amilases pelo fungo filamentosso *Gongronella* sp., linhagem recentemente isolada do solo do cerrado e selecionada para produção de amilases pelo nosso grupo de pesquisa. Dentre os parâmetros fermentativos avaliados, o fungo apresentou maior produção enzimática, cerca de 63,25 U/g, quando cultivado por 96 horas em farelo de trigo com 55% de umidade inicial a 25°C. Com isso, observamos que essa espécie do gênero *Gongronella* apresenta um potencial de produção de amilase em meio de cultivo com reduzido valor industrial. Por ser uma cepa isolada em uma região de cerrado, acreditamos que tenha características específicas interessantes e assim, em seu potencial para a continuidade em pesquisas futuras visando outras biomoléculas, outra informação importante é a escassez de trabalhos científicos com esse gênero microbiano, visando em etapas futuras, a descrição das características bioquímica deste novo biocatalizador prospectado pela nossa equipe.

Palavras-chave: *Gongronella* sp; fermentação em estado sólido; resíduos agroindustriais.

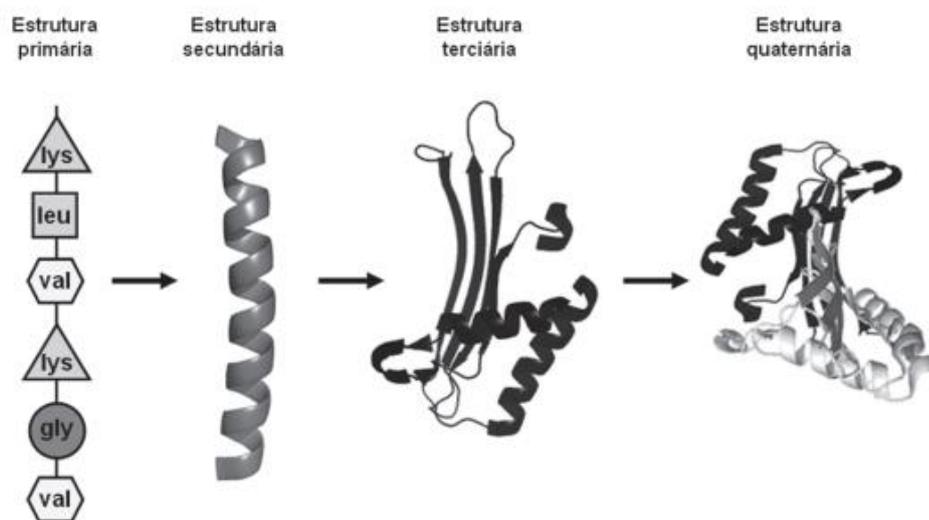
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ENZIMAS

1.1.1 DEFINIÇÃO E DENOMINAÇÃO DE ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações químicas, reduzindo a energia livre necessária para iniciar a reação, mas possuem uma grande especificidade pelos substratos, isso significa que sua atividade enzimática é controlável e seletiva (ARANTES, 2008). As enzimas são compostas por aminoácidos interligados por ligações peptídicas. Os aminoácidos apresentam em sua fórmula química um grupo amina (-NH₂), um grupo carboxílico (-COOH) e um radical R, pelo qual se diferenciam (KIELING, 2002). Conforme citado em BON et al. (2008), as proteínas podem apresentar estrutura primária, secundária, terciária e quaternária, sendo que a sua funcionalidade decorre de sua conformação tridimensional (figura 1).

Figura 1. Representação dos quatro níveis de organização estrutural das proteínas.

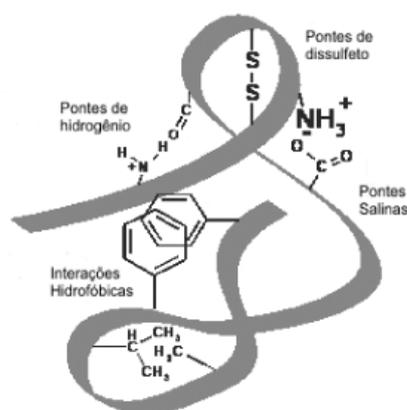


Fonte: (MORAES et al., 2013).

Na estrutura primária da molécula protéica, os aminoácidos estão ligados uns aos outros através da ligação peptídica, estabelecida entre o grupo α -carboxila de um aminoácido e o grupo α -amino do aminoácido subsequente, formando uma longa cadeia. Na estrutura secundária, a cadeia peptídica pode ter segmentos em α -hélice ou folha β -pregueada, sendo formadas e estabilizadas por pontes de hidrogênio. Já na estrutura terciária, as ligações químicas que a estabelecem e a mantêm são formadas

entre os grupos R dos aminoácidos. Grupos R com carga elétrica positiva fazem ligações eletrostáticas com grupos R com carga negativa. Existe também uma ligação covalente que mantém a estrutura terciária: são as pontes dissulfeto formadas pela oxidação de dois grupos $-SH$, cada um dos quais presente na cadeia lateral de um resíduo de cisteína, o único aminoácido a apresentar $-SH$ no grupo R. As forças que mantêm a estrutura quaternária são as mesmas da estrutura terciária como: interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações salinas, com exceção das pontes dissulfeto, entre grupos R de aminoácidos pertencentes a cadeias polipeptídicas diferentes (MARIOTTO, 2006).

Figura 2. Representação dos mecanismos de estabilização da estrutura da proteína.



Fonte: (GOMES et al., 2007).

As enzimas podem ser de origem animal, vegetal e microbiológica, sendo esta última de maior interesse para aplicação industrial por apresentarem menor custos na sua obtenção, além da possibilidade de produção em larga escala (BARATTO, 2011). Embora a maioria das enzimas sejam endocelulares, algumas são exocelulares, as quais são secretadas para fora da célula viva, como por exemplo, as amilases fúngicas (SPIER, 2005).

As enzimas são classificadas por sua especificidade de reação e pelos substratos com que reagem (tabela 1). As enzimas se denominam adicionando a terminação ase ao nome do substrato com o qual realizam reações (LAIDLER, 1954). Por exemplo, as enzimas que controlam a hidrólise da proteína são denominadas proteases e as que hidrolisam o amido são as amilases.

Tabela 1. Representação da classificação das enzimas e seus tipos de reações.

| Classes de enzimas | Reações catalisadas pelas enzimas |
|---------------------------|---|
| Oxidoredutases | Reações de oxido-redução ou transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de hidrogênio), atuando em CH-OH, C=O, C=O-, CN-NH-, NADH e NADPH. |
| Transferases | Reações de transferência de grupos funcionais entre moléculas. Grupos com 1C, aldeído ou cetona, acil, glicosil, fosfatos e enxofre. |
| Hidrolases | Reações de hidrólise (ésteres, ligações glicosídicas, peptídicas, outras ligações C-N e anidridos ácidos). |
| Liases | Reações de quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico (=C=C=, =C=O, =C=N-). |
| Isomerases | Reações de transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros. |
| Ligasas | Reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes à custa de energia (C-O, C-S, C-N, C-C). |

Fonte: (ARAUJO, 2009).

1.1.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática é a capacidade que as enzimas apresentam em reagir com determinados constituintes das células ou substratos, formando complexos ou até mesmo compostos, e sua medição se dá através de sua velocidade de reação (KIELING, 2002). A concentração de produto formado aumenta linearmente num dado intervalo, e a partir de certo tempo, a velocidade decresce, podendo esse fenômeno ser explicado,

por exemplo, quando a adição de mais reagente não aumenta a velocidade, então esta passa a ser constante porque não depende mais da concentração dos reagentes, mas de outros fatores, como aumento da temperatura que provoca desnaturação das proteínas, fazendo com que as enzimas percam sua atividade catalítica ou ainda a presença de substâncias que alteram a sua atividade, como inibidores que influenciam a ligação do substrato. (LIMA et al., 2001; BAUMER et al., 2008)

Segundo Lima et al. (2001), a escolha do método de determinação da atividade de uma enzima é muito importante e requer conhecimento prévio de alguns parâmetros como concentração enzimática, a qual permite obter uma variação linear da concentração de produto. São utilizados métodos como espectrofotometria, titulometria, fluorimetria entre outros. Uma unidade de atividade é considerada como a quantidade de enzima necessária para formação de um μmol do produto por minuto de reação em condições pré-estabelecidas.

1.1.3 FATORES QUE CONTROLAM A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Alguns fatores são capazes de controlar ou afetar a atividade catalítica de uma enzima, como o pH, a concentração de substrato ou enzima e a temperatura do meio, podendo os mesmos ser ajustados para diminuir ou aumentar a velocidade da reação (ARAUJO, 2009).

O pH por exemplo, pode influenciar na velocidade das reações enzimáticas, pois as enzimas apresentam grupos químicos ionizáveis nas cadeias laterais de seus aminoácidos e de acordo com o pH do meio, estes grupos podem ter carga elétrica positiva, negativa ou neutra. Como a conformação das proteínas depende em parte das cargas elétricas presentes, cada enzima apresenta um pH ótimo mais adequado para sua atividade catalítica. Além disso, o substrato e o sítio ativo das enzimas podem ser afetados com as variações de pH (KIELING, 2002).

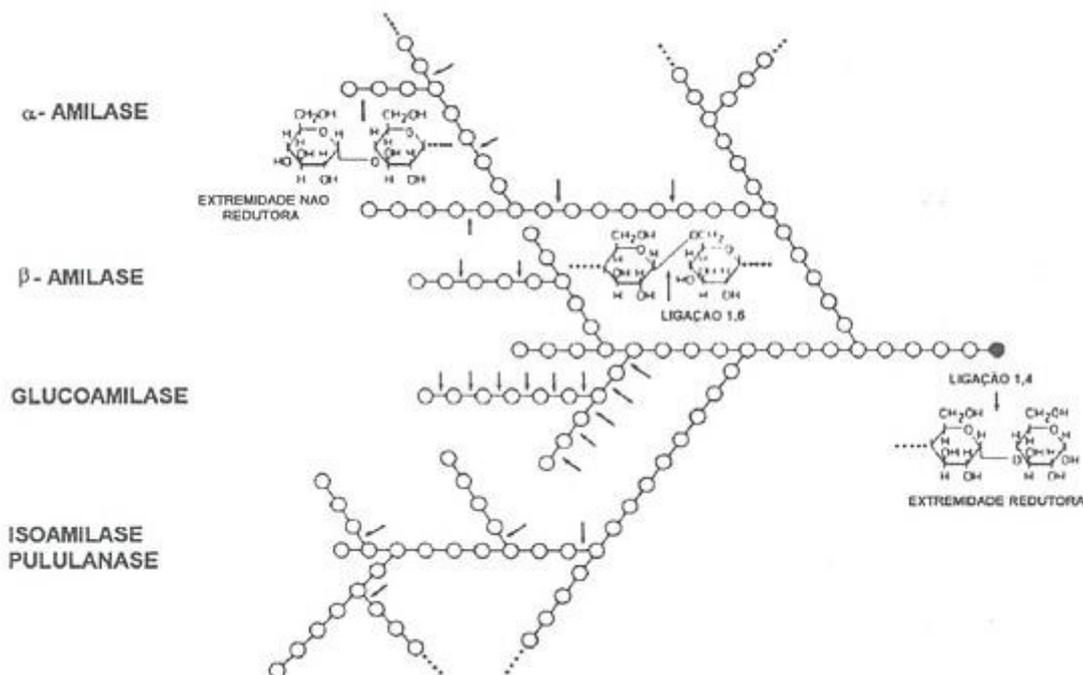
Outro fator que pode alterar a velocidade de reação é a temperatura, quanto maior, maior também será a velocidade até atingir a temperatura ótima, quando ocorre a atividade enzimática máxima. A partir dela, a velocidade começa a diminuir por desnaturação da molécula, pois em temperaturas elevadas há alteração nas conformações da estrutura da enzima, e isso influencia na ligação enzima-substrato, impedindo que a enzima exerça sua função catalítica (ARAUJO, 2009).

A velocidade de reação normalmente é diretamente proporcional à concentração de enzimas presentes e a presença de substâncias tóxicas, inibidores ou ativadores da enzima também podem acarretar em desvios na reação (Ibidem).

1.1.4 ENZIMAS AMIOLÍTICAS E PRINCIPAIS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

As amilases hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos, como dextrinas, ciclodextrinas, maltose e glicose. As amilases podem ser divididas em quatro grupos (figura 3): as α -amilases que rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases) liberando dextrinas lineares e ramificadas, as isoamilases que atuam nas ramificações do amido (desramificantes); as β -amilases que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases) tendo como principal produto maltose e as glucoamilases (amiloglicosidases) que também atuam nas extremidades não-redutoras da molécula de amido, liberando unidades de glicose (SPIER, 2005).

Figura 3. Representação esquemática do modo de ação de algumas amilases.



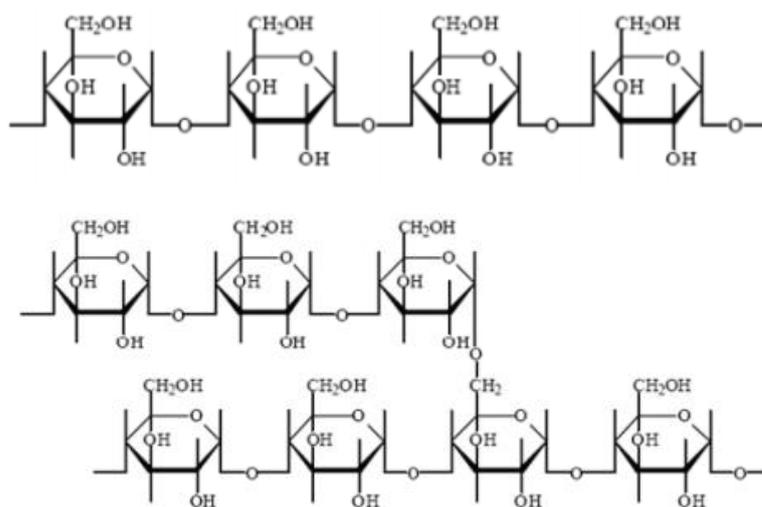
Fonte: (SILVA; POLIZELI, 2009).

Amido e amiláceos são descritos como os substratos mais adequados para o cultivo microbiano visando a produção de amilases, podendo ser aproveitado resíduos

agrícolas ou de processamento de amido, os quais contêm quantidades residuais suficientes para este fim. Vários resíduos agroindustriais têm sido utilizados para a produção de enzimas como uma fonte alternativa, por conta da sua disponibilidade e baixo custo comercial, principalmente quando se visa à produção em larga escala destas enzimas. (CARVALHO et al. , 2008)

A utilização de enzimas em processos industriais é indispensável, pois através dela pode-se melhorar a qualidade de produtos ou tornar mais fácil a obtenção dos mesmos. As amilases são enzimas responsáveis pela degradação de moléculas de amido, carboidrato formado por dois polissacarídeos: amilose e amilopectina (BARATTO et al., 2011). A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, originando uma cadeia linear. Já a amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em α -1,4 e α -1,6, formando uma estrutura ramificada (DENARDIN; SILVA, 2009). O amido é um carboidrato encontrado em abundância na natureza e utilizado como ingrediente de vários produtos alimentícios. Devido as suas propriedades físico-químicas e funcionais exclusivas, este carboidrato tem grande importância nos mais variados setores industriais (ROCHA et al. , 2008).

Figura 4. Esquema representativo da estrutura da amilose e amilopectina.



Fonte: (MOURA, 2008).

As enzimas amilolíticas são amplamente aplicadas em processos biotecnológicos, tais como nas indústrias têxteis, papel e celulose, couro, detergentes, bebidas destiladas, cervejas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do

amido (produção de xaropes), ração animal, indústria química e farmacêutica (BARATTO et al. , 2011).

1.2 CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO (CES)

Atualmente, a bioconversão de resíduos agroindustriais tem despertado interesse, uma vez que essas matérias residuais representam recursos disponíveis e utilizáveis para a síntese de produtos de valor agregado. Nesse contexto, o cultivo em estado sólido desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos. Posteriormente ao crescimento microbiano, geralmente ocorre a síntese de diversos compostos com interesse comercial, como: enzimas, antibióticos, biofertilizantes, dentre outros (PINTO et al. , 2005).

O cultivo em estado sólido pode ser definido como o crescimento de microrganismos em substratos sólidos, na ausência de água livre. O CES é vantajoso, pois além de simular o hábitat natural de microrganismos (principalmente fungos filamentosos), apresenta maior produtividade, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas a variações de temperatura e pH. Parâmetros como fonte de carbono, nitrogênio e fósforo, pH, umidade e temperatura representam variáveis operacionais determinantes neste tipo de processo (RODRIGUES-ZÚNIGA et al., 2011).

2. OBJETIVO

Delinear as condições ótimas de cultivo, em resíduos agroindustriais, para produção de amilases pelo fungo filamentoso *Gongronella* sp., linhagem recentemente isolada do solo do cerrado e selecionada para produção de amilases pelo nosso grupo de pesquisa.

3. METODOLOGIA

3.1 Microrganismo: Neste trabalho foi utilizado um fungo filamentosso mesófilo recentemente isolado do solo do cerrado, identificado como *Gongronella* sp. O isolado foi mantido em *ágar Sabouraud Dextose* a 5°C.

3.2 Inóculo: O microrganismo foi cultivado em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL do meio *ágar Sabouraud Dextose* inclinado, mantido por 48 horas a 28°C. A suspensão do microrganismo foi obtida pela raspagem suave da superfície do meio de cultura empregando 25 mL de solução nutriente (0,1% de sulfato de amônio, 0,1% sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% nitrato de cálcio). A inoculação do fungo nos substratos (resíduos agroindustriais) se deu pela transferência de 5 mL desta suspensão.

3.3 Produção de amilases por Cultivo em Estado Sólido (CES): O cultivo microbiano ocorreu em frascos erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substratos umedecidos com solução nutriente (descrita anteriormente). Todos os substratos foram devidamente lavados com água destilada e posteriormente secos em estufa a 50°C por 48 horas. O material foi esterilizado a 121°C durante 20 minutos. Após a inoculação do microrganismo, os frascos erlenmeyer foram mantidos a 28°C. Alguns parâmetros fermentativos foram avaliados visando otimizar a produção de amilase pelo microrganismo, dentre eles: utilização de diferentes resíduos como substratos (farelo de soja, sabugo de milho, palha de milho, casca de arroz, farelo de trigo), umidade inicial do meio (50, 55, 60, 65, 70 e 75 %), temperatura (20, 25, 30, 35 e 40 °C) e tempo de cultivo (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 h).

3.4 Extração da enzima: Para extração da enzima foram adicionados 50 mL de água destilada nos meios fermentados e mantidos em agitação por 1 hora. Posteriormente o material foi filtrado para a separação meio sólido do extrato enzimático.

3.5 Determinação da atividade de amilase: A atividade enzimática foi determinada pela adição de 0,1 mL de enzima em 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 contendo 1% de amido de milho (Maizena®). Após 10 minutos de reação, o açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de DNS (3,5-acido dinitrosalisílico)

descrito por Miller em 1959. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto por minuto de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a determinação das condições ótimas de produção de amilase pelo fungo *Gongronella* sp. foram utilizados os seguintes substratos: palha de milho, sabugo de milho, casca de arroz, farelo de soja e farelo de milho. As atividades enzimáticas obtidas pelo cultivo do microrganismo em cada um desses diferentes substratos podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2 - Produção de amilase pelo fungo *Gongronella* sp. em diferentes resíduos agroindustriais à 30°C com 65% de umidade no meio e 120 h de tempo de cultivo.

| Substratos | U/g | U/ml |
|-----------------|-------|------|
| Palha de Milho | 6,03 | 0,60 |
| Sabugo de Milho | 2,29 | 0,22 |
| Casca de Arroz | 2,71 | 0,27 |
| Farelo de Soja | 9,56 | 0,95 |
| Farelo de Trigo | 35,57 | 3,55 |

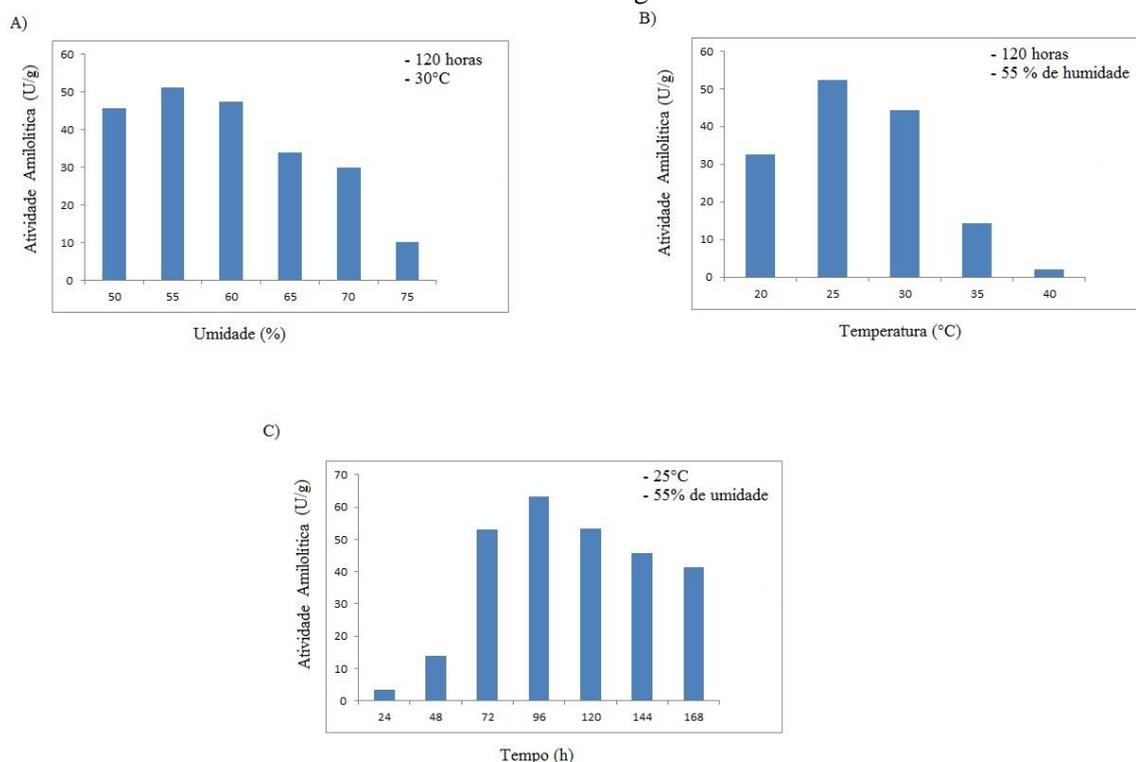
O substrato que apresentou maior potencial para produção de amilase pelo microrganismo foi o farelo de trigo, com uma atividade enzimática de 35,57 U/g. Segundo Pandey (1992) a maioria dos fungos quando submetidos a FES apresenta uma maior produção com farelo de trigo devido suas propriedades nutricionais e sua textura. Castro et. al (2013) descrevem que quatro linhagens fúngicas isoladas do cerrado produziram maior quantidade de enzima em farelo de trigo, quando comparado com a produção em sabugo de milho. Kunamneni et al. (2005) obtiveram uma atividade enzimática de 534 U/g quando utilizaram farelo de trigo, na produção de amilase por FES, a partir do fungo *Thermomyces lanuginosus*, após um período de 120h de fermentação, com 90% de umidade inicial a 50°C.

Outros parâmetros de cultivo também foram avaliados para otimização da produção de amilase pelo *Gongronella* sp., como: umidade, temperatura e o tempo de cultivo (figura 5).

A umidade ótima para produção de amilase pelo fungo em farelo de trigo foi a 55% apresentando cerca de 51,26 U/g (figura 6A), após 120 horas de cultivo a 30°C. O nível de umidade do substrato é um dos fatores que mais influenciam o cultivo microbiano em estado sólido, podendo variar de acordo com a natureza do substrato,

tipo de produto final e necessidade do microrganismo. Um nível de umidade muito alto resulta na diminuição da porosidade, aumento no risco de contaminação e redução das trocas gasosas. Reduzidos níveis de umidade levam a um menor grau de crescimento em relação ao ótimo e baixo grau de substrato realmente utilizado (LONSANE et al., 1985).

Figura 5. Produção de amilase pelo cultivo em estado sólido do fungo *Gongronella* sp. em farelo de trigo.



Legenda: (A) umidade inicial, (B) temperatura de cultivo, (C) tempo de cultivo (Próprio autor).

Diferentes temperaturas foram avaliadas para o cultivo do microrganismo em farelo de trigo contendo 55% de umidade por 120 horas. A temperatura ótima de cultivo para produção de amilase foi 25°C com 52,54 U/g (figura 2B), isso pode ser explicado por se tratar de um microrganismo mesófilo. Sato e Sudo (1999) relatam que a temperatura afeta tanto o crescimento quanto a produção das enzimas, sendo necessário eficiência na remoção de calor. Bianchi et al. (2001) complementam que devido as atividades metabólicas dos microrganismos e dependendo da altura da camada de substrato, uma grande quantidade de calor pode ser produzida durante o processo fermentativo em estado sólido. Como a temperatura afeta diretamente a germinação dos esporos, o crescimento dos microrganismos e a formação de produto, o calor produzido deverá ser imediatamente dissipado para que o aumento da temperatura não prejudique o processo fermentativo e o produto de interesse (SANTANA, 2012).

Para determinação do tempo ótimo de cultivo, amostras foram retiradas a cada 24 horas perfazendo um total de 168 horas. A maior produção da enzima foi obtida com 96 horas de cultivo, cerca de 63,25 U/g, utilizando os demais parâmetros obtidos como ótimos nos ensaios anteriores (figuras. 2C). O tempo de cultivo obtido (96 h) foi próximo ou menor que o descrito para produção de amilases por outras linhagens fúngicas. Kunamneni et al. (2005) relatam maior produção de amilase após 120 horas de cultivo em estado sólido do fungo *Thermomyces lanuginosus* em farelo de trigo. Ellaiah et al. (2002) descrevem uma maior produção de amilase pelo fungo *Aspergillus* sp. A3 também em 120 horas de cultivo em estado sólido.

A tabela 3 representa a síntese das condições ótimas de cultivo obtidas no presente trabalho, visando a produção de amilase pelo fungo *Gongronella* sp. em resíduos agroindustriais por cultivo em estado sólido.

Tabela 3 - Condições ótimas de todos os parâmetros avaliados e atividade enzimática final da otimização.

| Parâmetros | Substrato | Umidade | Temperatura | Tempo de Cultivo | Atividade Enzimática |
|-----------------------|------------------|----------------|--------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Condição Ótima | Farelo de Trigo | 55% | 25°C | 96h | 63,25 U/g |

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitem inferir que o fungo filamentoso *Gongronella* sp. apresenta potencial para produção de amilases em meios de cultivo com reduzido valor comercial (resíduos agroindustriais) e com tempo de produção relativamente baixo. Estas características são muito apreciáveis para redução do custo final destas enzimas, favorecendo sua aplicação em processos industriais. Outro aspecto importante que deve ser ressaltado é o reduzido número de trabalhos utilizando fungos pertencentes a este gênero para produção de amilases, o que incentiva a continuidade do trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANTES, G. M. Uma Perspectiva Computacional Sobre Catálise Enzimática. Química Nova, São Paulo, v. 31, n. 2, 2008.

ARAÚJO, L. F. et al. Bioconversão do mandacaru sem espinhos (*Cereus jamacaru*) em alimento alternativo para Ruminantes. Tecnologia & Ciência Agropecuária, João Pessoa, v. 3, n. 1, p. 53-57, 2009.

BARATTO, C. M.; SALAMONI, S. P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C. B.; LOCATELLI, G. O. Seleção de Microrganismos Produtores de Enzimas Hidrolíticas Isolados da Região do Meio Oeste de Santa Catarina, Brasil. Evidência, Joaçaba, v. 11, n. 2, p. 15-28, 2011.

BAUMER J. D.; MAS DIEGO S. M.; PACHECO S. M. V.; MORGADO A. F. M., & FURIGO A. F. JR. Comparative study of mycelial growth and production of cinnabarin by different strains of *Pycnoporus sanguineus*. Biologia e Farmácia, [S.I.], v. 2, n. 2, p. 1-3, 2008.

BIANCHI, V. L. D., MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: Schmidell, Wi., Lima, V.A., Aquarone, E., Borzani, W. Biotecnologia Industrial, [S.I.], v. 3, p. 247-276, 2001.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, p. 506, 2008.

CARVALHO, R. V.; CORRÊA, T. L. R.; SILVA, J. C. M.; VIANA, A. P.; MARTINS, M. L. L. 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, Campinas, v. 28, n. 2, 2008.

CASTRO, M. C. ; BRASILIANO, R. A. P. ; SENNA, S. N. ; ALVES-PRADO, H. F. . Produção de amilase por fungos isolados em áreas de cerrado - MS. In: VII Encontro de Ciências da Vida. Ilha Solteira, SP, VII Encontro de Ciências da Vida, 2013.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. Ciência Rural, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 945-954, 2009.

ELLAIAH, P; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. Process Biochem, [S.I.], v. 38, p. 615-620, 2002.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. Química Nova, São Paulo, v. 30, n. 1, 2007.

KIELING, D. D. Apostila: Enzimas - Aspectos Gerais. Santa Catarina: UFSC, Desenvolvimento de material didático ou instrucional, p. 1-13, 2002.

KUNAMNENI, A.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Journal of Bioscience and Bioengineering, [S.I.], v. 100, n. 2, p. 168-171, 2005.

LAIDLER, K. J. Introduction to the Chemistry of Enzymes. McGraw-Hill Book Company Inc., Nova Iorque, 1954, 208p.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial, São Paulo: Blucher, v. 3, 2001.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering Aspects of Solid State Fermentation. Enzyme Microbiology Technology, [S.I.], v. 7, p. 258-265, 1985.

MARIOTTO, J. R. Cinética Enzimática. Trabalho apresentado como requisito parcial para aprovação na Disciplina Estágio de Docência, Universidade Federal de Santa Catarina, [S.I.], 2006.

MONTEIRO, V. N.; ULHOA, C. J. Biochemical Characterization of a β - 1,3 Glucanase from *Trichoderma koningii* Induced by cell Wall of *Rhizoctonia solani*. Current Microbiology, [S.I.], v. 52, p. 92-96, 2006.

MORAES, C. S.; JUNIOR, F. O. R. O.; MASSON, G.; REBELLO, K. M.; SANTOS, L. O.; BASTOS, N. F. P.; FARIA, R. C. R. Série em Biologia Celular e Molecular: Métodos experimentais no estudo de proteínas. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro: IOC, 2013.

MOURA, W. S.; ASCHERI, D. P. R. Extração e caracterização do amido do *Hedychium coronarium* e elaboração de filmes biodegradáveis. 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) – Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, GO, 2008.

PANDEY, A. Production of starch saccharifying enzyme in solid culture. Starch-Stärke, [S.I.], v. 44, n. 2, p. 75-77, 1992.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa Para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. Comunicado Técnico on line, ISSN 1679-6535, Fortaleza, CE, 2005.

ROCHA, T. S.; DEMIATE, I. M.; FRANCO, C. M. L. Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 28, n. 3, p. 620-628, 2008.

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.

SANTANA, R. S. M. Produção de enzimas amilolíticas através da fermentação em estado sólido. 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2012.

SATO, K.; SUDO, S. Small-scale solid-state fermentations. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, [S.I.], p. 60-79, 1999.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. Ciência Tecnologia Alimentos, Campinas, v. 23, n. 3, 2003.

SILVA, T. M.; POLIZELI, M. L. T. M. Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus*. 2009. 216 f. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2009.

SPIER, M. R. Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas α -Amilase e Amiloglucosidase por Fermentação no Estado Sólido. 2005. 178 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.