

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**IMOBILIZAÇÃO DE AMILASE DE
Neurospora crassa (mutante *exo-1*) E PRODUÇÃO
DE DERIVADOS ATIVOS ESTABILIZADOS.**

OLGA LUISA TAVANO

Tese de Doutorado
2006



OLGA LUISA TAVANO

Imobilização de amilase de *Neurospora crassa* (mutante exo-1) e produção de derivados ativos estabilizados.

**Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia**

Orientador: Prof. Dr. Rubens Monti

**Araraquara
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

T23 li Tavano, Olga Luisa
Imobilização de amilase de *Neurospora crassa* (mutante *exo-1*) e
produção de derivados ativos estabilizados / Olga Luisa Tavano. –
Araraquara : [s.n], 2006
101 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Rubens Monti

1. Biotecnologia. 2. Enzimas. 3. Amilase - Imobilização. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

*Dedico este trabalho ao meu país e seu povo,
cujo trabalho permitiu meus estudos da pré-escola ao doutorado.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rubens Monti pela orientação, paciência, amizade e o sempre presente incentivo.

Ao Dr. José Manuel Guisán, Dr. Benevides C. C. Pessela e Dr. Roberto Fernández-Lafuente, do Instituto de Catálisis e Petroleoquímica/ CSIC de Madrid, pela orientação e carinho durante meu estágio neste Instituto e valiosas contribuições a este trabalho.

À Profa. Dra. Raquel Giordano, pelas considerações e contribuições para início deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jonas Contiero e Profa. Dra Edwil Gattas pelas sugestões e críticas em meu Exame de Qualificação.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, por me receber por mais estes quatro anos.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelas bolsas: de Doutorado e de Estágio de Doutorando no Exterior (Sanduíche).

À Célia, Patrícia, Sandra, Vilma e Izolina, pela paciência e auxílios, através da seção de Pós-graduação.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, Antonio, Daniela, Ana Claudia e Paulo, por anos de convivência em um ótimo ambiente de trabalho e amizade.

Ao meu companheiro Sinézio, por todo carinho, amor e dedicação.

À minha família, sempre amiga e compreensiva por tantas ausências...

Aos meus queridos amigos da Espanha, Pilar, Sara, Juanma, Zaida, Valéria, César, Fernando, Tamara, Gloria, Miguel, Palomo, Mari Carmem, Benevides & família, pelos momentos dentre os mais agradáveis de minha vida.

“De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estava começando,
a certeza de que era preciso continuar
e a certeza de que seria interrompido antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo,
Fazer da queda, um passo de dança,
do medo, uma escada,
do sonho, uma ponte,
da procura, um encontro”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

IMOBILIZAÇÃO DE AMILASE DE *Neurospora crassa* (MUTANTE EXO-1) E PRODUÇÃO DE DERIVADOS ATIVOS ESTABILIZADOS.

Neste trabalho estudou-se a possibilidade de imobilização de uma amilase produzida por cepa de *Neurospora crassa* (mutante *exo-1*), e produção de derivados ativos e estabilizados. Foram testados diferentes suportes sólidos, incluindo-se diferentes suportes de agarose e suportes epóxidos preparados com Eupergit e Sepabeads. Além da agarose 10BCL foi utilizada a agarose 4BCL para que se verificasse possíveis dificuldades difusionais do substrato desta enzima, o amido. O acompanhamento das cinéticas de imobilização com a maltose como alternativa ao amido, também colaborou em evidenciar a dificuldade de difusão do amido através de ambos os suportes glioxil-agarose. O derivado obtido com agarose 10BCL, assim como aquele produzido com uso de suporte Eupergit foram os derivados mais estáveis, capazes de manter 100% de suas atividades após 12 horas de incubação à temperatura de 60°C, quando na forma solúvel a enzima conservou apenas 12% de sua atividade inicial. Quando incubados a 70°C destacou-se o derivado de glioxil-agarose (10BCL) como mais estável, mantendo cerca de 30% de sua atividade inicial após 4 horas de incubação. Quando testada a utilização de uma agarose comercial alternativa, sem percentual de crosslink conhecido, de menor custo, sua aplicação mostrou-se promissora e os derivados produzidos além de ativos se apresentam estáveis frente à temperatura. Em conjunto, as informações contidas no presente estudo indicam que a amilase de *Neurospora crassa* apresenta-se promissora em comparação às amilases de mercado aqui estudadas, tanto em sua utilização na forma solúvel quanto no que se relaciona a produção de derivados estáveis.

Palavras-chaves: amilases, enzimas, imobilização de enzimas

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF ONE AMYLASE FROM *Neurospora crassa* (MUTANT EXO-1) AND PRODUCTION OF ESTABILIZED DERIVATES.

In this work were studied the immobilization of amylase from *Neurospora crassa* (Mutant Exo-1). This amylase showed easily production, purification and high capacity of immobilization on agarose and epoxy supports. It was used crosslinked agarose with two polymer concentration: 4 and 10%. The 4BCL agarose presents bigger porous diameter than 10 BCL agarose, so, in this case, possible diffusion problems of the starch across the supports could be reduced. Also, in this study, we have tested two epoxy supports for this amylase immobilization, using Eupergit and Sephabeads supports. The activities of the obtained derivatives were measured using two substrates – maltose and starch. Both glyoxyl agarose support prepared with 4BCL and 10BCL agarose present diffusion problems when the starch was used as substrate to measure the immobilization course. The 10BCL glyoxyl derivative presented the highest thermal stability when comparing the others derivatives. Among the epoxy derivatives the Eupergit one were better than the derivatives obtained using Sepabeads as support. In a confrontation between the two best derivatives, that is, the glyoxyl 10 BCL and Eupergit derivatives, both of them were stable at 60° incubation, maintaining 100% of activities for 12 hours, while the soluble amylase preserved about 12% of initial activity. These two amylase derivatives only showed differences at 70°C incubation, when the glyoxyl 10BCL amylase derivative was more thermally stable, preserving about 30% of the initial activity after 4 hours.

Keywords: Amylases, enzymes, enzymes immobilizations.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1. AMILASES.....	27
2.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	29
2.2.1. Tipos de Imobilização.....	30
2.2.2. Géis de agarose.....	31
2.2.3. Suportes Epóxidos.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. MATERIAL.....	37
3.2. MÉTODOS.....	37
3.2.1. Obtenção de α -amilase de <i>Neurospora crassa</i>	37
3.2.2. Determinação da atividade enzimática.....	38
3.2.2.1. Determinação de açúcar redutor	38
3.2.2.2. Utilização de kit multienzimático.....	38
3.2.3. Determinação de proteínas.....	39
3.2.4. Preparo dos Suportes de Agarose.....	39
3.2.4.1. Suporte de Glioxil-Agarose.....	39
3.2.4.2. Suporte MANAE-Agarose.....	40
3.2.4.3. Preparo de suporte glutaraldeído-agarose.....	40
3.2.4.4. Suporte CNBr- Sepharose 4B.....	40
3.2.4.5. Suporte Sepabeads	41

3.2.4.6. Suporte Eupergit.....	41
3.2.5. Determinação do grau de ativação da agarose.....	41
3.2.6. Preparo de derivados enzimáticos.....	41
3.2.6.1. Derivados de Glioxil-agarose (10 BCL e 4 BCL).....	41
3.2.6.2. Derivados MANAE-agarose.....	42
3.2.6.3. Derivados MANAE-Glutaraldeído.....	42
3.2.6.4. Derivados CNBr.....	43
3.2.6.5. Derivados Sepabeads.....	43
3.2.6.6. Derivados Eupergit.....	43
3.2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	44
3.2.8. Ensaio cinéticos.....	44
3.2.8.1. Determinação de Km e Vmax.....	44
3.2.8.2. Determinação de pH ótimo.....	44
3.2.8.3. Determinação da temperatura ótima.....	45
3.2.8.4. Determinação da estabilidade enzimática.....	45
3.2.9. Ensaio de reuso dos derivados.....	45
3.2.10.HPLC.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1. Características gerais das enzimas solúveis.....	48
4.2. Ensaio de imobilização.....	54
5. CONCLUSÕES.....	94
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema geral de hidrólise do amido por amilases.....	28
Figura 2.2. Métodos de imobilização de enzimas.....	30
Figura 2.3. Estrutura do gel de agarose.....	31
Figura 2.4. Ativação do suporte de agarose com grupos glioxil e processo de imobilização.....	32
Figura 2.5. Imobilização de enzimas em suportes de glioxil-agarose e MANAE-agarose.....	33
Figura 2.6. Esquema de imobilização de proteínas em suporte epóxido.....	35
Figura 4.1. SDS–PAGE das amilases comercial e de <i>Neurosora crassa</i>	49
Figura 4.2. Efeito do pH na atividade da α -amilase (<i>Aspergillus oryzae</i>).....	51
Figura 4.3. Efeito do pH na atividade da amilase de <i>Neurospora crassa</i>	52
Figura 4.4. Efeito do pH na atividade da glucoamilase (<i>Aspergillus niger</i>).....	52
Figura 4.5. Efeito da temperatura na atividade das amilases de <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Neurospora crassa</i> e <i>Aspergillus niger</i>	53
Figura 4.6. Atividade residual das amilases de <i>Neurospora crassa</i> , de <i>Aspergillus niger</i> e <i>Aspergillus oryzae</i> , após 3 horas de incubação nos diferentes pHs, à temperatura ambiente.....	54
Figura 4.7. Estabilidade da α -amilase de <i>Aspergillus oryzae</i> solúvel e derivados, após incubação 60°C pH 7,0.....	58
Figura 4.8. Representação do efeito da presença de uma superfície hidrofóbica na estabilidade de uma enzima imobilizada.....	61
Figura 4.9. Cinética de imobilização da amilase de <i>Neurospora crassa</i> sobre glioxil agarosa – 4BCL. Imobilização: temperatura ambiente, em tampão bicarbonato 5 mM pH=10.2, e atividade determinada com Amido 1%.....	64

Figura 4.10. Cinética de imobilização da amilase de <i>Neurospora crassa</i> sobre glioxil agarose – 4BCL. Imobilização: temperatura ambiente, em tampão bicarbonato 5 mM pH =10.2, e atividade determinada com Maltose 1%.....	64
Figura 4.11. Cinética de imobilização da amilase de <i>Neurospora crassa</i> sobre glioxil agarose – 10BCL. Imobilização: temperatura ambiente, em tampão bicarbonato 5 mM pH=10.2, e atividade determinada com Amido 1%.....	65
Figura 4.12. Cinética de imobilização da amilase de <i>Neurospora crassa</i> sobre glioxil agarose – 10BCL. Imobilização: temperatura ambiente, em tampão bicarbonato 5 mM pH 10.2, e atividade determinada com Maltose 1%.....	65
Figura 4.13. Estabilidade da amilase solúvel de <i>Neurospora crassa</i> e derivados glioxil-agarose após incubação 60°C pH 5,0. Atividade determinada com Amido 1% (A) e Maltose 1% (B).....	67
Figura 4.14. Estabilidade da amilase solúvel de <i>Neurospora crassa</i> e derivados amino-agarose e amino-agarose + glutaraldeído, após incubação a 60°C pH 5,0. Atividade determinada com Amido 1%.....	68
Figura 4.15. Estabilidade da amilase de <i>Neurospora crassa</i> após incubação a 60°C, em pH 5,0. Atividade determinada com Amido 1% (A) e Maltose 1% (B)	70
Figura 4.16. Estabilidade da amilase de <i>Neurospora crassa</i> após incubação a 70°C pH 5,0. Atividade determinada com Amido 1% (A) e Maltose 1% (B).....	72
Figura 4.17. Estabilidade térmica da glucoamilase de <i>Aspergillus niger</i> e seus derivados submetidos à incubação à 60°C, em tampão acetato de sódio 5 mM pH 5,0 e acompanhada com substrato amido.....	74
Figura 4.18.. Estabilidade da glucoamilase de <i>Aspergillus niger</i> e seus derivados submetidos a incubação à 70°C, em tampão acetato de sódio 5 mM pH 5,0, acompanhada com substrato amido.....	75
Figura 4.20. Atividades de hidrólise do amido, dos derivados de amilase NC e	

glucoamilase, em ciclo de três utilizações.....	76
Figura 4.21.. Percentuais de atividade da α -amilase de <i>Neurospora crassa</i> solúvel e seu derivado glioxil-agarose 10BCL em diferentes condições de pH do meio de reação.....	81
Figura 4.22. Atividade da amilase solúvel de <i>Neurospora crassa</i> e seu derivado glioxil-agarose 10BCL, frente à temperatura de meio de reação, determinadas com amido como substrato.....	82
Figura 4.23. Atividade residual da amilase de <i>Neurospora crassa</i> solúvel e seu derivado glioxil-agarose, após 30 minutos de incubação, 60°C, em diferentes valores de pH.....	83
Figura 4.24. Formação de produtos de hidrólise do amido pelas amilases de <i>Neurospora crassa</i> solúvel (A) seu derivado glioxil-agarose 10BCL (B) e amilase solúvel de <i>Aspergillus orizae</i> (C), determinada por HPLC.....	84
Figura 4.25. Efeito do pH na atividade do derivado de glioxil-agarose de amilase de <i>Neurospora crassa</i>	88
Figura 4.26. Efeito da temperatura na atividade da amilase solúvel de <i>Neurospora crassa</i> e derivado glioxil-agarose.....	89
Figura 4.27. Estabilidade dos derivados glioxil-agarose da amilase de <i>Neurospora crassa</i> após incubação a 60°C e pH 5,0.....	90
Figura 4.28. Atividade residual da amilase de <i>Neurospora crassa</i> solúvel e seu derivado glioxil-agarose, após 30 minutos de incubação, 60°C, em diferentes valores de pH.....	91
Figura 4.29. Atividades de hidrólise do amido, dos derivados de amilase de <i>Neurospora crassa</i> , em ciclo de três utilizações.....	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1. Informações gerais referentes à obtenção da amilase de <i>Neurospora crassa</i>	50
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Imobilização da α -amilase (<i>Aspergillus oryzae</i>) sobre diferentes suportes.....	56
Tabela 4.2. Imobilização da amilase de <i>Neurospora crassa</i> , sobre diferentes suportes.....	59
Tabela 4.3. Imobilização da glucoamilase comercial (<i>Aspergillus niger</i>), sobre diferentes suportes.....	73
Tabela 4.4. Características de derivados glioxil-agarose 10BCL e Eupergit (epóxido) das amilases de <i>Neurospora crassa</i> e <i>Aspergillus niger</i>	76
Tabela 4.5. Parâmetros cinéticos (Km e Vmax) para as amilases de <i>Neurospora crassa</i> e <i>Aspergillus niger</i> , nas formas solúveis e seus respectivos derivados.....	79
Tabela 4.6. Eficiências catalítica das amilases de <i>Neurospora crassa</i> e de <i>Aspergillus niger</i> frente aos diferentes substratos.....	80
Tabela 4.7. Imobilização das amilases de <i>Neurospora crassa</i> e <i>Aspergillus niger</i> em suporte glioxil – agarose.....	86
Tabela 4.8. Valores de km e Vmax para os derivados glioxil-agarose	88

1. INTRODUÇÃO

A grande especificidade de ação, condições simples para a catálise de reações e diversidade de processos passíveis de serem realizados, conferem, entre outras, vantagens para a utilização de enzimas em relação a catalisadores químicos. A possibilidade de obtenção de fontes microbianas é outra importante característica das enzimas, levando a uma grande disponibilidade, comparativamente á outras fontes, como tecidos animais (BERSET, 1985; PSZCZOLA, 2001).

A aplicação das enzimas nas indústrias, principalmente alimentícias, vem aumentando à medida que avanços tecnológicos propiciam o surgimento de novas enzimas, novas aplicações para enzimas já conhecidas, ou ainda o aumento da eficiência de inúmeras enzimas utilizadas (PSZCZOLA, 2001; GERHARTZ, 1990).

A imobilização de enzimas é um dos processos capazes de aumentar a eficiência de diversas enzimas, pois a instabilidade e impossibilidade de reutilização de uma enzima são obstáculos na sua utilização, obstáculos esses que são parcial ou totalmente superados através da imobilização enzimática (KATCHALSKI-KATZIR, 1993), sendo uma enzima imobilizada definida como “enzima fisicamente confinada ou localizada em certa região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, que pode ser utilizada repetida e continuamente” (GERHARTZ, 1990; BICKERSTAFF, 1997).

A imobilização por ligação multipontual é um processo capaz de aumentar ainda mais a estabilidade da enzima imobilizada e vem ganhando destaque em

pesquisas recentes (MATEO, ABIAN, FERNANDEZ-LAFUENTE & GUIBAN, 2000; FERNANDEZ-LAFUENTE, COWAN & WOOD, 1995).

Dentre as enzimas empregadas na indústria alimentícia, que são economicamente destacadas por sua grande utilização, estão as amilases, enzimas capazes de hidrolisar o amido gerando diversidade de produtos de utilização industrial (GERHARTZ, 1990; VAN DER MAAREL et al, 2002).

Estudos, como os apresentados por TANYOLAC, YURUKSOY & OZDURAL (1998), BRYJAK (2003), CARPIO et al (2000) e TORRES et al (2004), demonstram que as amilases podem ser estabilizadas pelo processo de imobilização. Mais estudos envolvendo imobilização multipontual destas enzimas se mostram necessários, uma vez que a padronização de condições de produção de derivados enzimáticos envolvendo este método, levando a grande estabilidade e reaproveitamento enzimático, seria de grande interesse aplicado às indústrias alimentícias.

Torna-se importante assim, a ampliação dos conhecimentos existentes sobre obtenção de derivados amilolíticos, com alta estabilidade. Considerando-se ainda as necessidades de preservação do meio ambiente, toda catálise enzimática bem sucedida é prioridade em relação à catálise ácida, que libera produtos de refugo, causando sérios danos ao ambiente. Derivados enzimáticos poderiam ser utilizados em catálise de processos onde há interesses na obtenção de produtos isentos de toxicidade e outras impurezas. Portanto, propõe-se neste trabalho estudar a obtenção de derivados amilolíticos estabilizados, com possibilidade de reutilização. Para tal, apresentam-se como objetivos específicos: o estudo das características de imobilização da amilase de *Neurospora crassa* em

diferentes suportes sólidos, comparando-se posteriormente as estabilidades térmicas da enzima em sua forma solúvel e seus derivados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. AMILASES

Um dos componentes de reserva energética presentes em maior quantidade nos vegetais é o amido. Polímero de glicose, composto de duas frações macromoleculares, sendo a amilose, sua fração representada por um polímero linear de unidades de glicose unidas entre si por ligações do tipo α -1,4. A amilopectina é a fração ramificada, constituída por cadeia de glicose com ligações α -1,4 e pontos de ramificações formadas por ligações α -1,6. O tamanho dos grânulos de amido e a proporção entre amilose e amilopectina contidas nos grânulos podem variar de acordo com a espécie vegetal e variedade botânica (LEONEL & CABELLO, 2001).

O uso comercial e tecnológico do amido é extremamente variável, sendo grande parte da produção mundial destinada à indústria alimentícia. Uma de suas aplicações inclui passo de hidrólise do amido para produção de xarope de glicose. Esta hidrólise pode ser realizada por reação química, através de hidrólise ácida, ou por reação enzimática (SURMELY et al, 2001).

Uma variedade de enzimas é capaz de hidrolisar o amido ou outros polímeros de glicose. De maneira geral podemos classificá-las em endoamilases ou exoamilases, de acordo com sua maneira de atuação sobre a molécula de amido (PANDEY et al, 2000; VAN DER MAAREL et al, 2002; GUZMÁN-MALDONADO & PAREDES-LOPEZ, 1995).

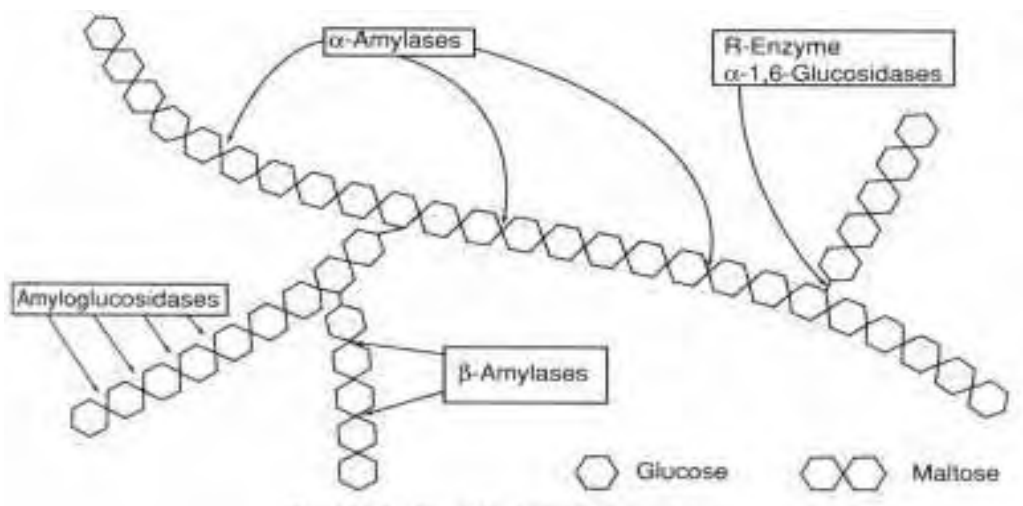


Figura 2.1. Esquema geral de hidrólise do amido por amilases. Fonte: VAN DER MAAREL et al, (2002)

As endoamilases, como as α -amilases, são capazes de romper ligações glicosídicas α -1,4, posicionadas nas partes internas das cadeias de amilose ou amilopectina. Seus produtos de reação são oligossacárides de diferentes tamanhos e dextrinas limites, que apresentam a porção ramificada da cadeia de amilopectina. Já as exoamilases podem romper ligações α -1,4, como no caso das β -amilases, ou α -1,4 e α -1,6, como ocorre com a glucoamilase, sempre iniciando suas ações a partir das extremidades das cadeias de amilose ou amilopectina. Após ação de exoamilases o produto gerado é constituído unicamente por glicose, quando se trabalha com a amiloglucosidase ou glucoamilase, ou maltose e dextrinas limites quando a hidrólise é realizada com β -amilase (PANDEY et al, 2000; VAN DER MAAREL et al, 2002; GUZMÁN-MALDONADO & PAREDES-

LOPEZ, 1995; REILLY & COUTINHO, 1997; NIELSEN, BORCHERT & VRIEND, 2001).

As amilases, destacando-se as de origem microbiana, apresentam potencialmente inúmeras aplicações em processos industriais incluindo as áreas de alimentação, indústrias têxteis e de papel (BERSET, 1985; PSZCZOLA, 2001; PANDEY et al, 2000; VAN DER MAAREL et al, 2002; REDDY, ANNAPOORNA & RAO, 2003; GUZMÁN-MALDONADO & PAREDES-LOPEZ, 1995; REILLY & COUTINHO, 1997; NIELSEN, BORCHERT & VRIEND, 2001; CORDEIRO, MARTINS & LUCIANO, 2002).

De acordo com SPINELLI et al (1996) o mutante *exo-1* de *Neurospora crassa* é conhecido pela capacidade de hiperprodução e hipersecreção de diversas exoenzimas, entre elas a amilase, quando estimulado pela presença de amido no meio de cultivo. Esta amilase caracteriza-se por apresentar estrutura monomérica, de peso molecular aproximado de 82Kda e presença de 5.1% de açúcares em sua molécula. Uma das características interessantes desta amilase é sua alta estabilidade térmica.

2.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A imobilização de enzimas é um processo em que se confina ou localiza a enzima em uma região definida do espaço, gerando uma forma insolúvel que retém atividade catalítica. Um dos objetivos centrais do processo de imobilização é a reutilização da enzima, prolongando seu tempo de uso (BICKERTAFF, 1997; ARROYO, 1998; KATCHALSKI-KATZIR, 1993).

2.2.1. Tipos de imobilização

Os métodos empregados na imobilização de enzimas envolvem processos de retenção física ou união química ao suporte. Um resumo destes principais métodos pode ser visto na Figura 2.2. Neste último caso, a ligação entre a enzima e o suporte pode se dar por adsorção ou ligação covalente, de acordo com suporte e condições de imobilização escolhidos.

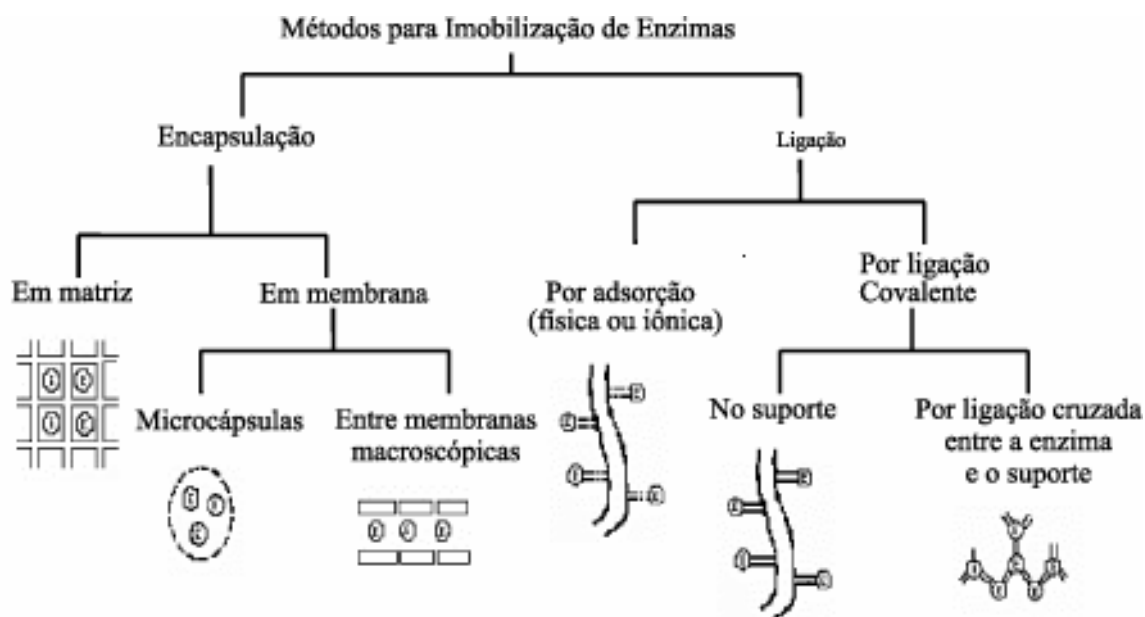


Figura 2.2. Métodos de imobilização de enzimas.

A imobilização de enzimas através de ligações covalentes entre a enzima e suporte é uma das mais interessantes do ponto de vista de aplicação industrial do derivado produzido, quando não se deseja recuperar a enzima ou suporte posteriormente, já que além da manipulação mais simples do derivado este apresenta maior resistência e estabilidade em relação a enzima livre (BICKERTAFF, 1997; ARROYO, 1998; GUIÓSÁN et al, 1997).

A união covalente entre enzima e suporte requer grupos ativos no suporte disponíveis para reagirem com grupos presentes nos aminoácidos das proteínas em questão. Os principais aminoácidos envolvidos nestes processos geralmente são a lisina, cisteína, tirosina e histidina, além desses a metionina, triptofano, arginina, ácido aspártico e glutâmico, esses em menor expressão (BICKERTAFF, 1997; ARROYO, 1998; GUIÁN et al, 1997).

No caso da imobilização por uniões covalentes a ligação entre enzima e suporte pode se dar por um ponto apenas, ligação unipontual, ou por mais pontos, ligação multipontual. A imobilização multipontual apresenta diversas vantagens sobre a unipontual, destacando-se a maior estabilização da enzima (GUIÁN et al, 1997).

2.3.2. Géis de agarose

A agarose é uma fração extraída do agar, um polímero natural extraído de algas vermelhas. Suas fibras são constituídas de unidades de agarobiose (Figura 2.3.), açúcar cujas hidroxilas serão transformadas através de reações químicas em grupos ativos onde se ligarão as enzimas a serem imobilizadas.

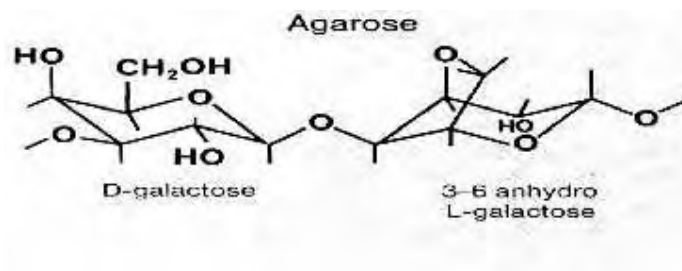


Figura 2.3. Estrutura do gel de agarose

(Figura disponível em: <http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~binder/thesis/node41.html>)

O uso da agarose como suporte para imobilização oferece, entre outras, a vantagem de ser resistente a degradação microbiana, ser mecanicamente resistente, apresentar transparência óptica, ser atóxico e de fácil manuseio. Dentre os suportes preparados a partir do gel de agarose estão: o glioxil-agarose e o monoaminoetil- N- aminoetil (MANAE) – agarose (GUISÁN et al., 1997), ambos utilizados neste trabalho. Estes suportes são produzidos a partir da transformação dos grupamentos hidroxilas da agarose em grupos gliceril- e logo sendo levados a glioxil- ou MANAE (vide Figuras 2.4. e 2.5.)

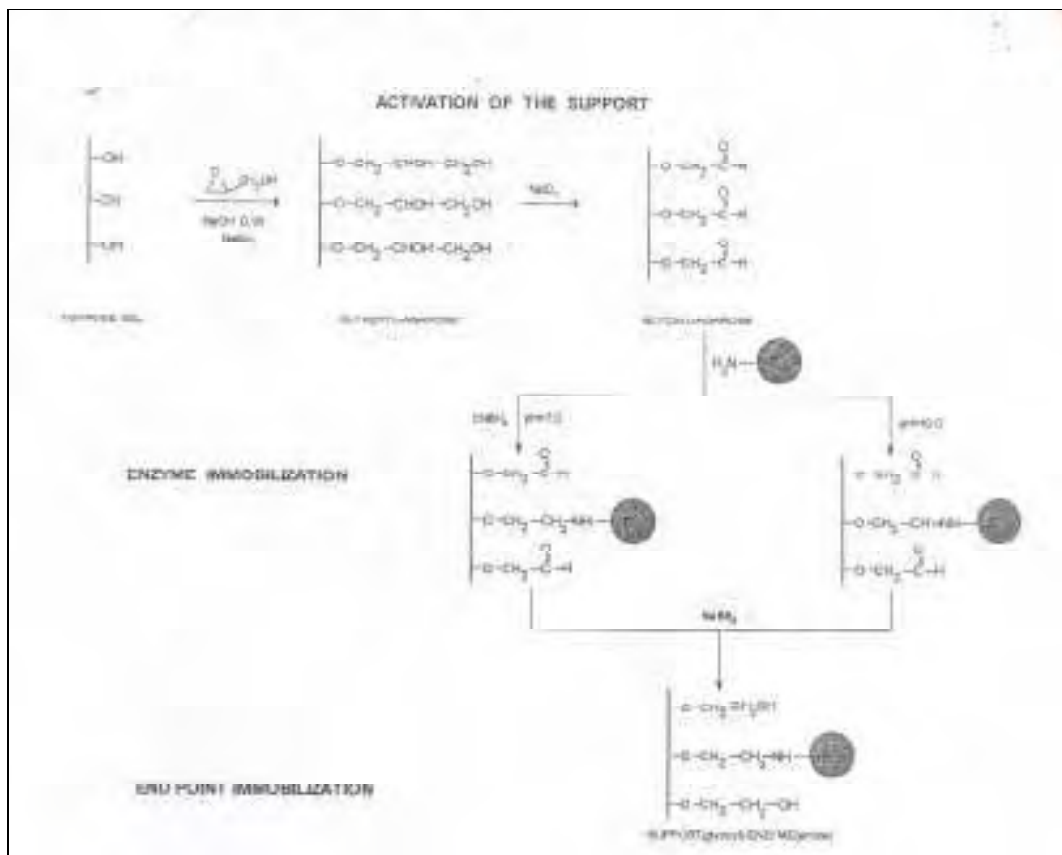


Figura 2.4. Ativação do suporte de agarose com grupos glioxil e processo de imobilização. Fonte: GUISÁN et al., In BICKERSTAFF, 1997, Cap.31.

O suporte glioxil orienta a imobilização da enzima através de sua área de superfície que contenha maior densidade de grupamentos amino, incluindo-se o amino-terminal da molécula e os grupamentos ϵ -amino das cadeias laterais das lisinas. Em condições amenas de pH durante o processo de imobilização, serão estabelecidas preferencialmente as ligações com os grupos amino-terminal, enquanto que condições de altos valores de pH (pH 10,0 – 10,2) possibilitam que os grupamentos amino das lisinas estejam reativos e se estabeleça ligações entre estes resíduos de aminoácidos e o suporte (GUISÁN et al., 1997).

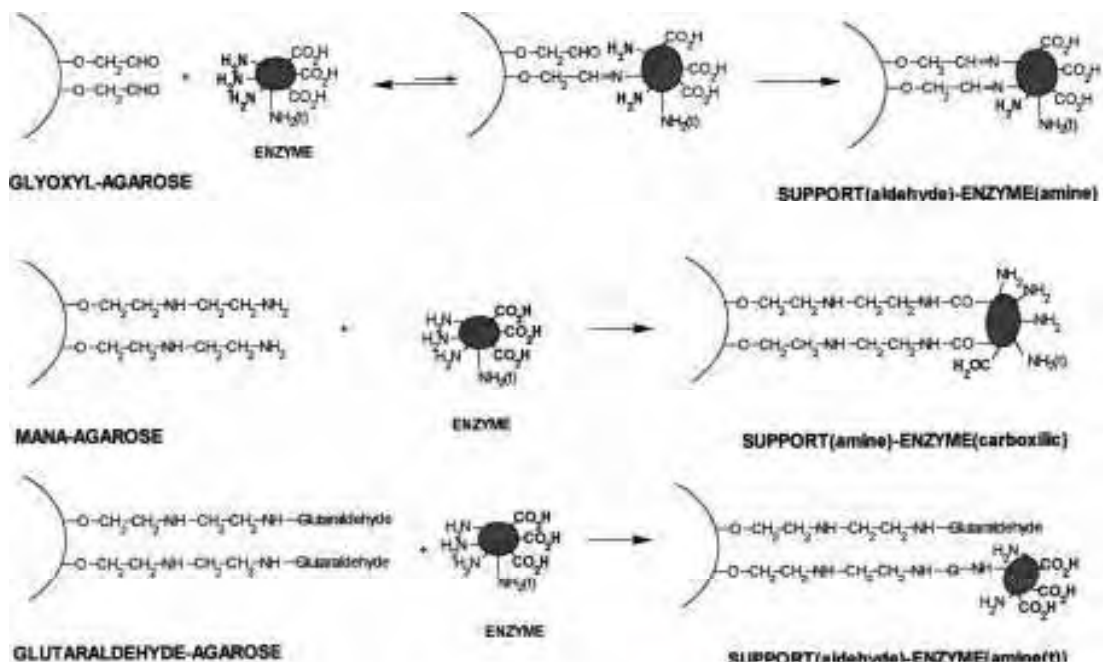


Figura 2.5. Imobilização de enzimas em suportes de glioxil-agarose e MANAE-agarose. Fonte: GUISÁN et al., In BICKERSTAFF, 1997, Cap.30.

Para o suporte MANAE-agarose a reação é justamente oposta ao descrito para o suporte glioxil, uma vez que neste caso o suporte apresenta grupos amino que deverão interagir com os grupamentos carboxil das moléculas enzimáticas. Neste suporte os grupamentos amino foram desenvolvidos de forma a serem reativos em condições mais amenas de pH que aquelas descritas para o suporte glioxil, podendo-se aqui trabalhar em meio contendo pH próximo a 7,0 e orientando a imobilização da enzima através de sua superfície de maior densidade de grupamentos carboxil (GUISÁN et al., 1997).

2.3.3. Suportes Epóxidos

São resinas sintéticas epóxi-acrílicas, com a grande facilidade de já apresentarem em sua estrutura os grupamentos epóxidos, capazes de interagir com a proteína, não exigindo nenhum procedimento de ativação prévio (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000). São matrizes consideradas quase ideais (MATEO et al, 2000, 2002 E 2003) e podem interagir com diversos grupamentos da enzima: amino, tiol, hidroxila, fenólicos, etc. Seus mecanismos de imobilização podem ocorrer em duas etapas incluindo um primeiro passo de adsorção física podendo evoluir para um segundo passo de produção de ligações covalentes (Figura 2.6.). Os grupos remanescentes no suporte devem ser bloqueados ao final do processo para impedir que interações posteriores entre enzima e suporte, indesejáveis, possam ocorrer (GRAZU, et al, 2003; MATEO, 2000, 2003).

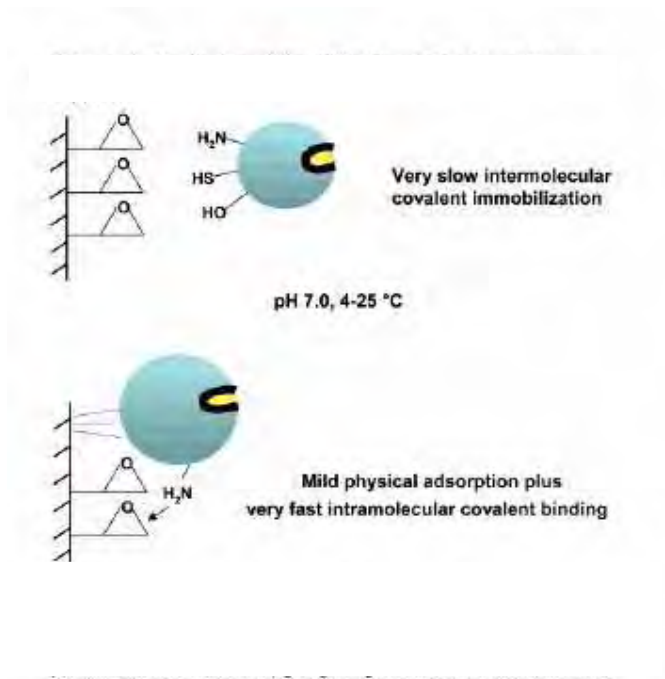


Figura 2.6. Esquema de imobilização de proteínas em suporte epóxico.

Fonte: MATEO, et al., 2003.

Entre estes suportes epóxicos a resina Sepabeads[®] é um adsorvente sintético capaz de se manter estável em meios ácidos, alcalinos e em solventes orgânicos, que pode ser regenerada após utilização no processo de imobilização da enzima pela adsorção da proteína (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000; MATEO, 2002).

O Eupergit[®] C é uma resina porosa produzida pela copolimerização da N,N- metileno-bis-metacrilamida, glicidil metacrilato, alil-glicidil éter e metacrilamida. O Eupergit[®] C 250L tem a mesma estrutura do Eupergit[®] C, apenas apresentando poros maiores. A matriz deste suporte apresenta boa resistência mecânica e a contaminação microbiológica, e por apresentar alta densidade de grupos ativos em sua superfície, é capaz de imobilizar cargas altas de proteínas (KATCHALSKI-KATZIR & KRAEMER, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Neste estudo foram utilizadas amilases de *Neurospora crassa* (mutante exo-1); α -amilase comercial (EC 3.2.1.1. de *Aspergillus oryzae*, Sigma-Aldrich) e glucoamilase comercial (EC 3.2.1.3. de *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Obtenção de α -amilase de *Neurospora crassa*

A cepa mutante exo-1 de *Neurospora crassa* (gentilmente cedida pelo Prof. Dr. João Atilio Jorge, do Laboratório de Microbiologia da FCFRP-USP) foi primeiramente cultivada em meio vogel sólido (meio agar inclinado) contendo glicose 2,0%, pH 6,0, a 30°C, para formação dos esporos. Após o crescimento, os esporos foram suspensos em água destilada e 1,0 ml desta suspensão (contendo em média 10^7 células/ml) transferido para erlenmeyers contendo 50 ml de meio vogel líquido, adicionado de 1,0 % de amido, com pH ajustado para 6,0. O crescimento foi mantido a 30°C, sob agitação orbital a 140 rpm, sendo interrompido após 14 horas por filtração a vácuo. A massa micelial foi descartada e o filtrado submetido à precipitação com acetona, até volume final de solvente equivalente a 60 %. O precipitado, contendo as amilases de produção extracelular, foi separado por centrifugação (9000 RPM/ 15 minutos) e mantido a temperatura ambiente até completa evaporação do solvente e então armazenado sob refrigeração.

3.2.2. Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi realizada após incubação a 50°C para glucoamilases e 40°C para α -amilase, em solução tampão (tampão acetato de sódio 100mM, pH = 5,0) contendo 1% (m/v) de substrato. Os seguintes substratos foram utilizados: Amido (Starch Potato Soluble, Sigma-Aldrich), Maltose (Maltose Monohidrat, MERCK), Maltodextrina (Dextrin 15 from Maize Starch, Fluka), Dextrano (Dextran from *Leuconostoc* ssp, Mr~6000, Fluka). A determinação do produto gerado pela hidrólise dos substratos, por tempo de reação, foi realizada por:

3.2.2.1. Determinação de açúcar redutor

Através da liberação de terminal de açúcar redutor gerado pela hidrólise dos polímeros de glicose componentes do amido, utilizando-se o método de MILLER (1959) com uso do reagente ácido 3-5'dinitrosalícílico (DNS) e leituras de densidade óptica em 540 nm. Uma curva de referência de glicose foi utilizada.

3.2.2.2. Utilização de kit multienzimático

Em alguns casos foi utilizado kit multienzimático de glicose oxidase e peroxidase – (GLUCOSE MONOLIQUID – ENZYMATIC COLORIMETRIC DETERMINATION GL 303 BEM SRL-Italy) para determinação específica dos resíduos de glicose liberados pela ação das enzimas e derivados sobre os substratos amido e maltose. Uma curva de referência de glicose foi utilizada.

3.2.3. Determinação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com método desenvolvido por BRADFORD (1976). E em algumas ocasiões pelo método de LOWRY (1951) modificado por HARTREE (1972), utilizando-se a soroalbumina bovina, como padrão.

3.2.4. Preparo dos Suportes de Agarose

Foram utilizadas agaroses de 4BCL e 10 BCL (Beads Crosslinked), generosamente doadas por Hispanagar S.A. (Burgos, Espanha), além de uma agarose comercial adquirida sem grau de crosslink definido, da Acrós Organics (New Jersey, USA).

3.2.4.1. Suporte de Glioxil-Agarose

Para preparo do suporte de glioxil-agarose, cada agarose foi ativada utilizando-se água deionizada e NaOH 1,7 M, em banho de gelo, evitando-se o aquecimento. A seguir foi acrescentado NaBH₄ (borohidreto de sódio) e, sob agitação suave, glicidol (2,3-epoxi-propanol) até concentração final de 2M. A agitação foi mantida por 18 horas e então o gel foi filtrado e lavado abundantemente com água deionizada, sob vácuo. A agarose ativada foi oxidada com periodato de sódio (NaIO₄) 100 mM, sob agitação suave, por 90 minutos, quando ocorre ruptura do grupo gliceril da agarose formando grupos glioxil. Transcorrido esse tempo o gel foi filtrado à vácuo, lavando-se abundantemente com água deionizada. Esta reação de oxidação com periodato é estequiométrica,

podendo-se, portanto, controlar a reação para obtenção do grau de ativação desejado (GUISÁN, 1997).

3.2.4.2. Suporte MANAE (monoaminoetil-N-aminoetil)-agarose

O suporte glioxil-agarose anteriormente descrito sofreu reação com etilendiamina (EDA) 2M em pH 10, por 2 horas, sob agitação suave. Após tal período foi adicionado NaBH₄, permanecendo por mais 2 horas em agitação suave. Ao final do período os suportes foram lavados abundantemente com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,0, seguido de tampão borato de sódio 100 mM, pH 9,0, e finalmente com água deionizada. Nestas condições, a conversão de grupos glioxil em grupos amino atinge 100% conforme descrito por FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al.(1999).

3.2.4.3. Preparo de suporte glutaraldeído-agarose

O suporte de amino-agarose (item 4.2.5.3.) sofreu reação com glutaraldeído, onde a união de glutaraldeído aos grupos amino deve ser total. A um volume de gel amino-agarose foi adicionado tampão fosfato de sódio 200 mM em pH 7,0 e a esta suspensão adicionado lentamente glutaraldeído a 25% (v/v), ajustando-se o pH para 7,0. Após 14 horas com agitação suave, o gel foi filtrado e lavado abundantemente com água deionizada, sob vácuo. Este tipo de suporte deve ser utilizado no dia de preparo.

3.2.4.4. Suporte CNBr- Sepharose 4B

O suporte (CNBr-actived Sepharose 4B, Amersham Biosciences) foi ativado mantendo-se por 20 minutos sob agitação, a temperatura ambiente, com

água destilada cujo pH foi ajustado com HCl para 2,5. Transcorrido este tempo o suporte foi lavado com água destilada á vácuo e lavado com tampão fosfato de sódio 5,0 mM pH 7,0.

3.2.4.5. Suporte Sepabeads

Foi utilizado suporte epóxico, Sepabeads® comercialmente adquirido (Sepabeads® FP – EC 3, Residion S.R.L. – Mitsubishi Chemical Corporation).

3.2.4.6. Suporte Eupergit

O suporte epóxico Eupergit® C 250L foi comercialmente adquirido (Rhom Pharma - Darmstadt, Germany).

3.2.5. Determinação do grau de ativação da agarose

A densidade superficial de grupos reativos em gel de agarose ativada foi determinada por quantificação colorimétrica do excesso de periodato de sódio. Solução de periodato de sódio de 100 mM foi adicionada de forma a conter periodato em excesso, a massa conhecida de agarose ativada, como descrito em 3.2.4.1., e após tempo estabelecido de reação os suportes foram filtrados e a quantidade de periodato residual determinada, com uso de solução de 1:1 de KI 10%: solução saturada de bicarbonato de sódio, e leituras em 423nm.

3.2.6. Preparo de derivados enzimáticos

3.2.6.1. Derivados de Glioxil-agarose (10 BCL e 4 BCL)

Foram utilizados 100 ml de solução de enzima em tampão carbonato de sódio 5 mM pH 10,2 reunidos a 10 g do suporte. A suspensão foi mantida a temperatura ambiente sob agitação constante. Em intervalos regulares de tempo foram retiradas alíquotas da suspensão e do sobrenadante (filtrado da suspensão), juntamente com alíquota de parte reservada da solução enzimática (utilizada como controle), para acompanhamento das atividades enzimáticas. Após processo de imobilização foi acrescentado boroidreto de sódio (1mg/ml de suspensão) para redução do derivado e inativação dos grupos ativos remanescentes.

3.2.6.2. Derivados MANAE-agarose.

Uma alíquota de 20 ml de solução de enzima diluída em tampão fosfato 5 mM pH 7,0 foi reunida a 10 g do suporte de amino-agarose recém-preparado, e a suspensão mantida sob agitação constante a temperatura ambiente. Em intervalos regulares de tempo foram retiradas alíquotas da suspensão e do sobrenadante (filtrado da suspensão), juntamente com alíquota de parte reservada da solução enzimática (utilizada como controle), para acompanhamento das atividades enzimáticas.

3.2.6.3. Derivados MANAE-Glutaraldeído

Para produção deste derivado foi realizada uma continuação do processo como anteriormente descrito reservando-se 2,5 g do derivado amino-agarose recém preparado ao qual foi acrescentado 5,0 ml de tampão fosfato 5mM pH 7,0 acrescido de glutaraldeído suficiente para uma concentração final de 0,5% em

volume de suspensão. Após 2 horas de agitação a temperatura ambiente o derivado foi lavado sob vácuo abundantemente com água destilada.

3.2.6.4. Derivados CNBr- Sepharose 4B

Foram utilizados 100 ml de solução de enzima em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 reunidos a 10 g do suporte. A suspensão foi mantida a temperatura ambiente sob agitação constante. Em intervalos regulares de tempo foram retiradas alíquotas da suspensão e do sobrenadante (filtrado da suspensão), juntamente com alíquota de parte reservada da solução enzimática (utilizada como controle), para acompanhamento das atividades enzimáticas. Transcorrido o tempo de imobilização o derivado sofreu processo de bloqueio com solução de glicina 3M, pH 8,5 (10 g de derivado para 40 ml solução de glicina) sob agitação por 2 horas a temperatura ambiente.

3.2.6.5. Derivados Sepabeads

Foram utilizados 100 ml de solução de enzima em tampão fosfato de sódio 1,0M pH 7,0 reunidos a 10 g do suporte. A suspensão foi mantida a temperatura ambiente sob agitação constante. Em intervalos regulares de tempo foram retiradas alíquotas da suspensão e do sobrenadante (filtrado da suspensão), juntamente com alíquota de parte reservada da solução enzimática (utilizada como controle). Transcorrido o tempo de imobilização o derivado sofreu processo de bloqueio dos possíveis grupos ativos remanescentes com uso de solução de glicina 3M, pH 8,5 (10 g de derivado para 40 ml solução de glicina) sob agitação por 24 horas, a temperatura ambiente.

3.2.6.6. Derivados Eupergit

Foram utilizados 100 ml de solução de enzima em tampão fosfato de potássio 1.0 M pH 7,0 reunidos a 10 g do suporte. A suspensão foi mantida a temperatura ambiente sob agitação constante. Em intervalos regulares de tempo foram retiradas alíquotas da suspensão e do sobrenadante (filtrado da suspensão), juntamente com alíquota de parte reservada da solução enzimática (utilizada como controle). Transcorrido o tempo de imobilização o derivado foi incubado em pH 10,2 por 24 h. Posteriormente sofreu processo de bloqueio de possíveis grupos ativos remanescentes com uso de solução de glicina 3M, pH 8,5 (10 g de derivado para 40 ml solução de glicina) sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente.

3.2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A eletroforese em condições desnaturantes foi realizada em gel de poliacrilamida-SDS, de acordo como método de LAEMMLI (1970), usando-se acrilamida a 6,5 %. As bandas protéicas serão visualizadas com corante Brilliant Blue G-Colloidal Concentrate.

3.2.8. Ensaio cinéticos

3.2.8.1. Determinação de Km e Vmax

As enzimas solúveis e derivados foram ensaiados em concentrações crescentes de substrato (em tampão acetato de sódio 100mM, pH=5,0) para cálculos de Km e V_{máx}, estimados após elaboração de gráficos de Lineweaver-Burk.

3.2.8.2. Determinação de pH ótimo

A determinação do pH ótimo das amilases solúveis e seus respectivos derivados foram realizadas utilizando-se diferentes tampões, de forma a se verificar a atividade das enzimas em faixa de valores de pH entre 3,0 a 10,0. Os tampões utilizados foram: tampão McIlvaine (tampão citrato/fosfato - faixa de pH entre 3,0 – 8,0), tampão acetato (faixa de pH entre 4,0 – 5,5), tampão Sørensen (tampão fosfato – faixa de pH entre 6,0 – 8,0), e tampão glicina/NaOH (faixa de pH entre 9,0 – 10,0).

3.2.8.3. Determinação da temperatura ótima

As enzimas solúveis e seus respectivos derivados foram ensaiados em seus tampões correspondentes aos seus pHs ótimos, em diferentes temperaturas de meio.

3.2.8.4. Determinação da estabilidade enzimática

Foram verificadas as estabilidades das enzimas solúveis e seus respectivos derivados após incubação à temperatura de 60°C ou 70°C, e faixa de pH entre 3,0 e 10,0), por unidade de tempo.

3.2.8.5. Ensaios de inibição enzimática

Os seguintes metais foram utilizados para verificar suas possíveis inibição da atividade enzimática: Cobre, Zinco, Ferro, Manganês, Prata, Lítio e Magnésio, na forma de sulfato, em concentrações de 5, 10, 20 e 40 mM.

3.2.9. Ensaios de reuso dos derivados

A possibilidade de reutilização dos derivados foi ensaiada, realizando-se ciclos de hidrólise do amido, incubando-se uma alíquota do derivado com solução tampão contendo o substrato. Ao final de um ciclo de tempo fixo o grau de hidrólise do amido foi determinado como descrito em 3.2.2. para determinação da atividade do derivado. A reação foi interrompida por filtração da suspensão e o derivado recuperado utilizado para novo ciclo de reação. As mesmas condições iniciais (proporção massa de derivado: volume de solução de substrato) foram mantidas nos ensaios subseqüentes. A atividade determinada no primeiro ciclo foi considerada 100% de atividade, para efeito de atividade residual nos demais ciclos.

3.2.10. HPLC

Os produtos de hidrólise do amido, gerados pelas amilases solúveis e seus derivados, foram avaliados por HPLC (Spectra System, P4000), equipado com detector Evaporative Light Scattering Detector (SEDEX Model 75) utilizando-se coluna SUPELCOSIL Ca (SUPELCO-Sigma-Aldrich Co), termostaticada a 80°C e fase móvel de água MiliQ com fluxo de 0,5 ml/min.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho aborda a utilização de uma amilase produzida por uma cepa mutante de *Neurospora crassa* em processos de imobilização e produção de derivados, que além de ativos se apresentassem mais estáveis que sua forma solúvel. Considerou-se também a possibilidade de aplicação comercial futura, na medida em que os ensaios desenvolvidos foram realizados de forma a buscar a mínima agregação de custos aos processos, desde a obtenção da enzima.

4.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ENZIMAS SOLÚVEIS

Como já descrito em 3.2.1., a enzima foi obtida diretamente do filtrado do crescimento da cultura de *Neurospora crassa*. Nesta solução do filtrado a enzima já se encontra praticamente isolada, como verificado pelo resultado obtido com a SDS-PAGE (Figura 4.1.), destacando-se uma única banda fortemente revelada, quando o extrato bruto, correspondente ao filtrado direto da cultura, foi aplicado. Embora esta condição de relativa pureza da enzima seja favorável para seu estudo, sua concentração real em solução se apresentava muito baixa (0,505 mg de proteínas/ml de solução, vide Quadro 4.1.), dificultando o preparo das condições para os processos de imobilização, como soluções com concentração de proteína suficiente para uma relação proteína:suporte adequada. Neste sentido, foram testados métodos simples para concentração das proteínas, como a precipitação com uso de solvente orgânico, como a acetona. No Quadro 4.1. também podem ser verificados os valores das atividades dos precipitados obtidos com acetona em concentrações finais de 55, 60, 65 e 70% do solvente em

solução. Na Figura 4.1. é possível observar os perfis eletroforéticos das respectivas amostras dos precipitados.

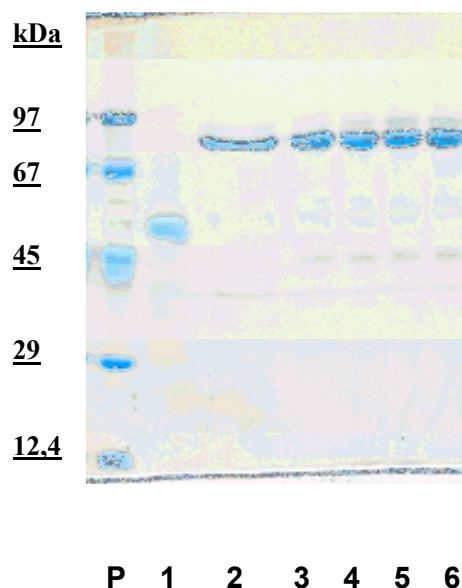


Figura 4.1. SDS-PAGE da α -amilase comercial e de *Neurospora crassa*.
Legenda: P = padrões de peso molecular; 1 = α -amilase comercial; 2=extrato bruto de cultura de *Neurospora crassa*; 3, 4, 5 e 6 = amilase de *Neurospora crassa* purificada por precipitação com 55%, 60%, 65% e 70% de acetona, respectivamente.

Embora todos os precipitados mantenham o mesmo perfil verificado para o extrato bruto, frente à revelação da SDS-PAGE, é possível observar, conforme os resultados apresentados no Quadro 4.1., que a precipitação com acetona ocasionou um ganho na atividade específica de todas as amostras, sendo que à concentração de 60% o precipitado obtido apresentou maior atividade específica, e foi esse então o procedimento adotado para obtenção de uma amostra concentrada.

Ainda com relação ao observado na Figura 4.1., é possível estimar que o peso molecular da amilase de *Neurospora crassa* apresenta-se próximo a 85KDa, o que esta de acordo com os resultados apresentados por SPINELLI et al. (1996)

que encontraram valores de aproximadamente 82KDa para a mesma enzima. Os mesmos autores apresentam dados que sugerem ser esta amilase uma proteína monomolecular e glicosilada, com cerca de 5,1% de carboidratos em sua estrutura.

Quadro 4.1. Informações gerais referentes à obtenção da amilase de *Neurospora crassa*.

Extrato bruto*	0,505 mg proteínas/ml de filtrado
	12,21 μ Mols glicose/minuto/mg proteína
Precipitados do extrato bruto	
55% de acetona =	16,28 μ Mols glicose/minuto/mg proteína
60% de acetona =	18,77 μ Mols glicose/minuto/mg proteína
65% de acetona =	17,70 μ Mols glicose/minuto/mg proteína
70% de acetona =	14,59 μ Mols glicose/minuto/mg proteína

* Filtrado da cultura.

Para efeito de comparação e melhor arrazoado sobre o potencial de utilização desta amilase de *Neurospora crassa*, outras duas amilases comercialmente obtidas foram incluídas neste estudo: uma α -amilase de *Aspergillus oryzae* e uma glucoamilase de *Aspergillus niger*. Esta última foi obtida comercialmente em solução, e foi submetida à diálise contra água destilada/4°C antes de sua utilização.

Na seqüência são apresentados resultados obtidos com as enzimas em suas formas solúveis. Nas Figuras 4.2, 4.3 e 4.4 é possível verificar a diferença entre os comportamentos das enzimas em função dos diferentes pHs de meio de

reação. Além das diferenças entre as amilases, uma mesma enzima mostrou-se diferentemente influenciada de acordo com o tipo de tampão utilizado para um mesmo valor de pH. Na Figura 4.2. verifica-se que a α -amilase comercial (*Aspergillus oryzae*) apresentou pH ótimo = 5,0 quando ensaiada com tampão citrato; já a de *Neurospora crassa* (Figura 4.3.) apesar de apresentar o mesmo valor de pH ótimo (5,0) apresentou um melhor desempenho quando em tampão acetato, assim como a glucoamilase de *Aspergillus niger* (Figura 4.4.).

É interessante observar que a amilase de *Neurospora crassa* manteve sua atividade em condições extremas de pH (vide Figura 4.3.) apresentando atividade em pHs ácidos (cerca de 15% de atividade em pH 3,0) bem como pHs alcalinos, mantendo, ainda que baixa, sua atividade em pH 10,0 (cerca de 5% da atividade), onde as outras enzimas já haviam perdido sua capacidade catalítica (Figuras 4.2 e 4.4). Além disso, esta amilase não parece sofrer tanta influencia do tipo de tampão empregado como observado em relação às outras enzimas.

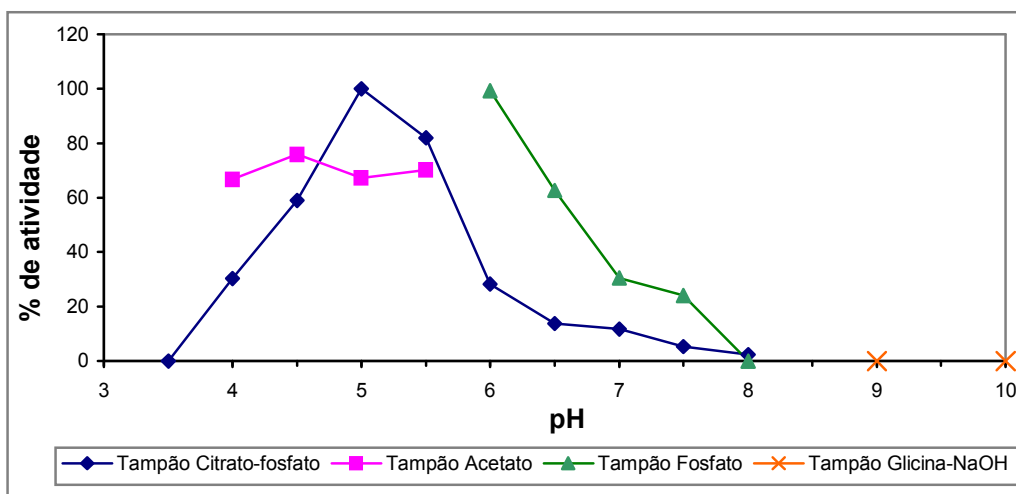


Figura 4.2. Efeito do pH na atividade da α -amilase (*Aspergillus oryzae*).

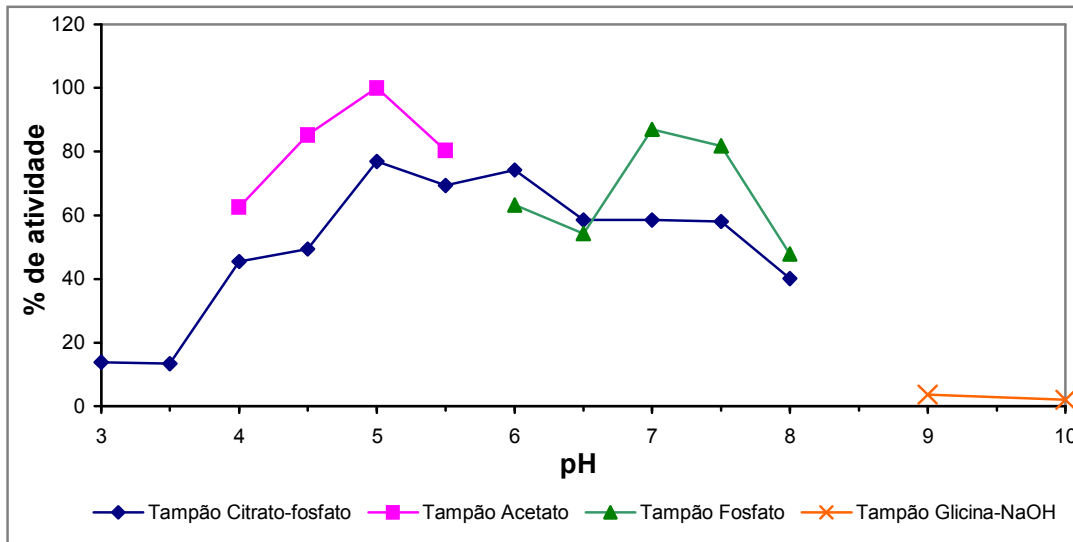


Figura 4.3. Efeito do pH na atividade da amilase de *Neurospora crassa*.

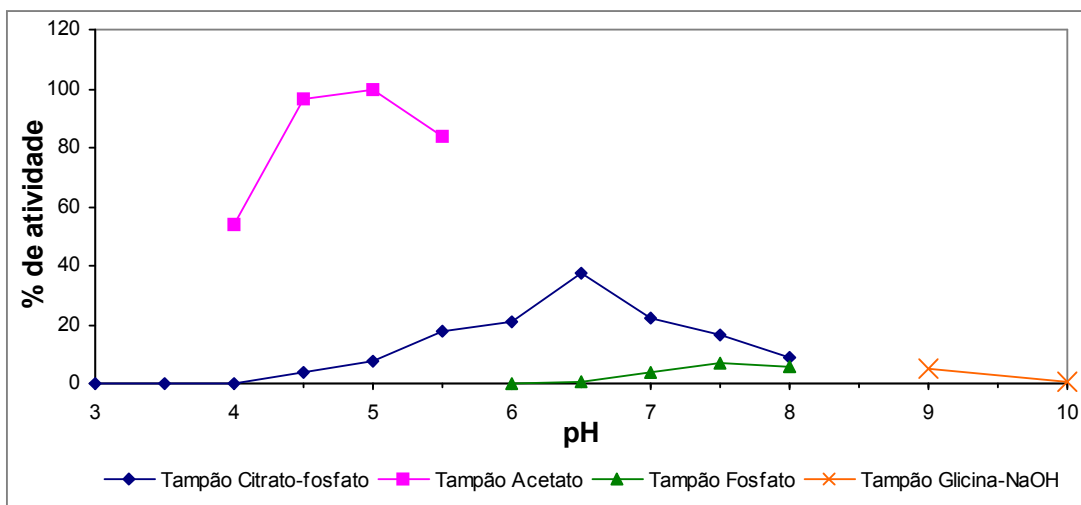


Figura 4.4. Efeito do pH na atividade da glucoamilase (*Aspergillus niger*).

Na Figura 4.5. é possível acompanhar a influência da temperatura do meio de reação no comportamento de hidrólise do amido pelas amilases em estudo.

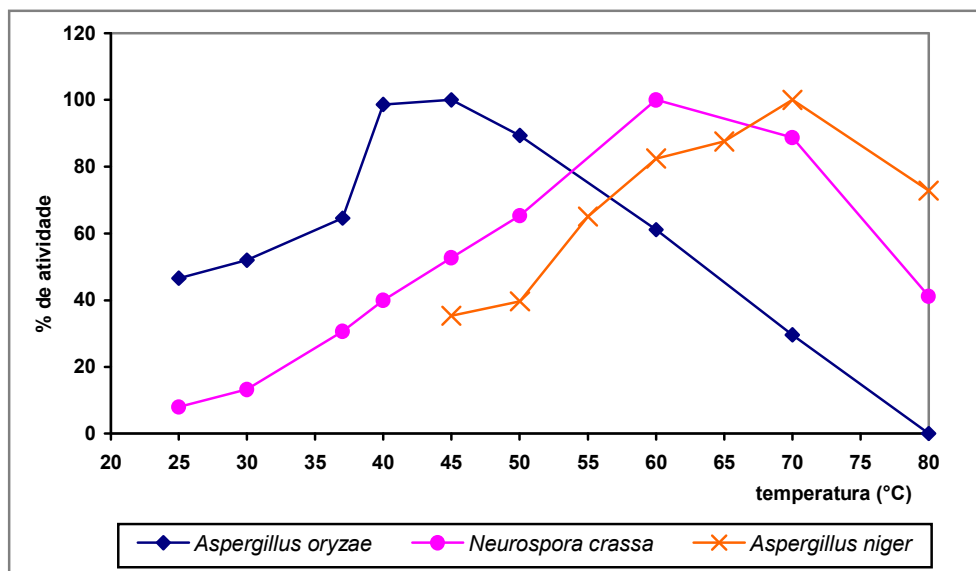


Figura 4.5. Efeito da temperatura na atividade das amilases de *Aspergillus oryzae*, *Neurospora crassa* e *Aspergillus niger*.

Quando observadas as curvas de temperaturas ótimas de atividade (Figura 4.5.) pode-se verificar um comportamento da amilase de *Neurospora crassa* mais próximo ao apresentado pela glucoamilase de *Aspergillus niger*, verificando-se temperatura ótima de hidrólise do amido em valores mais altos para estas duas enzimas, enquanto que a α -amilase já apresenta temperatura ótima próxima a 40-45°C, com redução em sua atividade em temperaturas acima de 50°C.

A amilase de *Neurospora crassa* apresenta características de glucoamilase (SPINELLI et al, 1996), sendo assim, como algumas glucoamilases, poderia apresentar capacidade de romper ligações α -1,6. Para averiguarmos tal característica foi testada a capacidade de hidrólise de moléculas de um dextrano cujas ligações entre os resíduos de glicose são do tipo α -1,6. Neste caso a enzima não demonstrou qualquer capacidade para romper as ligações deste substrato.

Ainda com relação à amilase de *Neurospora crassa* foi verificada a possibilidade de inibição de sua atividade pela presença de metais no meio. Foram testadas inibições por zinco, cobre, ferro, manganês, magnésio, lítio e prata, mas nenhuma inibição foi verificada.

4.2. ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO

Para dar seguimento aos ensaios de imobilização, em princípio foram testados os comportamentos das enzimas solúveis frente à incubação em diferentes pHs, à temperatura ambiente (vide Figura 4.6.). Tal procedimento forneceu parâmetros para que se elaborassem os protocolos de imobilização, conhecendo-se previamente a estabilidade de cada enzima frente aos tampões a serem utilizados nos diferentes processos de produção dos derivados.

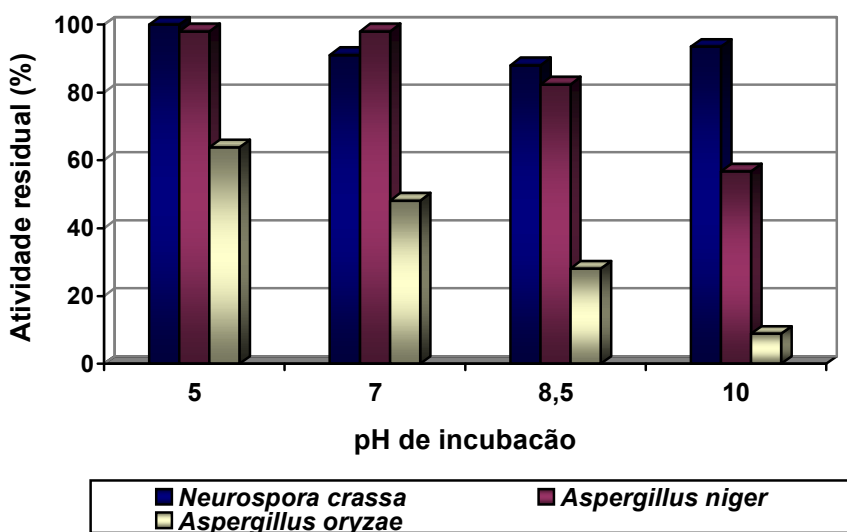


Figura 4.6. Atividade residual das amilases de *Neurospora crassa*, de *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, após 3 horas de incubação nos diferentes pHs, à temperatura ambiente.

De acordo com o observado na Figura 4.6 pode-se perceber uma alta estabilidade da amilase de *Neurospora crassa* nas condições estudadas, apresentando-se 100% estável à incubação em pH 5,0 por 3 horas em temperatura ambiente, e cerca de apenas 10% de perda de atividade quando incubada nos demais pHs.

A amilase de *Aspergillus niger* foi estável nos pHs 5,0 e 7,0, mantendo cerca de 98% de atividade ao final das 3 horas de incubação (vide Tabela 4.6.) e cerca de 80% quando incubada a pH 8,5. Em pH 10,0 cerca de 50% de sua atividade foi perdida.

Já a α -amilase de *Aspergillus oryzae* mostrou-se pouco estável, em especial nos meios alcalinos, onde se observa na Figura 4.6. uma perda de mais de 90% de sua atividade quando esta foi incubada a pH 10,0, por 3 horas. Esta baixa estabilidade da α -amilase refletiu negativamente em suas possibilidades de imobilização, uma vez não se apresentava capaz de suportar processos longos de incubação em soluções de altos valores de pH, como necessário para imobilizações em glioxil-agarose, já que para a imobilização de uma enzima neste suporte, de modo a se estabelecer múltiplas interações, além de seu grupamento amino terminal, é também necessário que os grupamentos ϵ -amino dos resíduos de lisina estabeleçam ligações com o suporte (GUISÁN et al., 1997). Para tanto os ϵ -amino das lisinas devem estar não somente expostos na superfície da molécula, como também reativos, o que ocorre quando se trabalha em altos valores de pH, tendo em vista os altos valores de pK destes resíduos de aminoácidos (cerca de 10,5). Devido a estas circunstâncias, para que se obtenha uma imobilização multipontual bem sucedida em suportes cuja reação envolve

tais grupos das enzimas, as reações de ligação se passam em altos valores de pH, neste caso trabalhando-se em pH 10,0 – 10,2.

Deste modo, a imobilização da α -amilase comercial sobre suporte glioxil não foi bem sucedida, como pode ser observado pelos dados apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Imobilização da α -amilase (*Aspergillus oryzae*) sobre diferentes suportes.

Suporte	pH de imobilização	Tempo de imobilização	% Atividade do controle ⁵	% de Atividade imobilizada ⁶	Atividade intrínseca do derivado ⁷
Glioxil- agarose (4 BCL)	pH = 10,2 ¹	2 horas	12,5 %	31,4 %	0 %
CNBr- Agarose	pH = 7,0 ²	2 horas	84,0 %	14,0 %	35,7 %
MANAE - agarose	pH = 7,0 ²	4 horas	46,8 %	53,7 %	78,4 %
MANAE- agarose + glutaraldeído	pH = 7,0 ²	4 horas + 2 horas	46,8 %	53,7 %	36,5 %
Sepabeads (epóxido)	pH = 7,0 ³	24 horas	85,0 %	15,0 %	100 %
Eupergit (epóxido)	pH = 7,0 ⁴	24 horas	85,0 %	0 %	0 %

¹tampão bicarbonato de sódio pH 10,2, 5mM.

²tampão fosfato de sódio pH 7,0, 5mM.

³tampão fosfato de sódio pH 7,0, 1,0M, seguido de incubação a pH 10,2 e bloqueio com solução de glicina 3M em pH 8,5.

⁴tampão fosfato de potássio pH 7,0, 1,0M, seguido de incubação a pH 10,2 e bloqueio com solução de glicina 3M em pH 8,5.

⁵Atividade da solução controle ao final do tempo de imobilização.

⁶Diferença entre a atividade quantificada na solução controle (100%) e aquela encontrada no sobrenadante após decorrida a imobilização (**atividade esperada no derivado**)

⁷Atividade recuperada - Percentual da atividade real encontrada no derivado em relação à esperada.

Observa-se através dos dados da Tabela 4.1. que a enzima perdeu grande parte de sua atividade (87,5%) durante o período em que foi mantida a pH 10, procedimento necessário para que pudesse ser imobilizada, chegando-se a um derivado glioxil-agarose que ao final do processo de imobilização não apresentava atividade enzimática. O mesmo ocorreu após a tentativa de imobilização em suporte Eupergit (epóxido), com perda de sua atividade ao final do processo quando se executa a etapa de estabilização incubando-se o derivado a pH 10.

Os derivados passíveis de produção com esta α -amilase foram aqueles cujos processos incluíam condições amenas de reação, como suportes MANAE-agarose, MANAE-agarose + glutaraldeído e CNBr. Embora sua produção tenha sido possível, tais derivados não apresentaram vantagem quanto a estabilidade em comparação à enzima em sua forma solúvel, como observa-se na Figura 4.7., sendo que nenhum de seus derivados foi capaz de se manter ativo após os primeiros 60 minutos de incubação a 60°C. Embora a produção, ainda que com baixa atividade, do derivado desta α -amilase por imobilização em suporte Sepabeads tenha sido possível, como representado na Tabela 4.1., tal derivado mostrou-se altamente instável, perdendo a totalidade de sua atividade hidrolítica durante a simples armazenagem a 4°C.

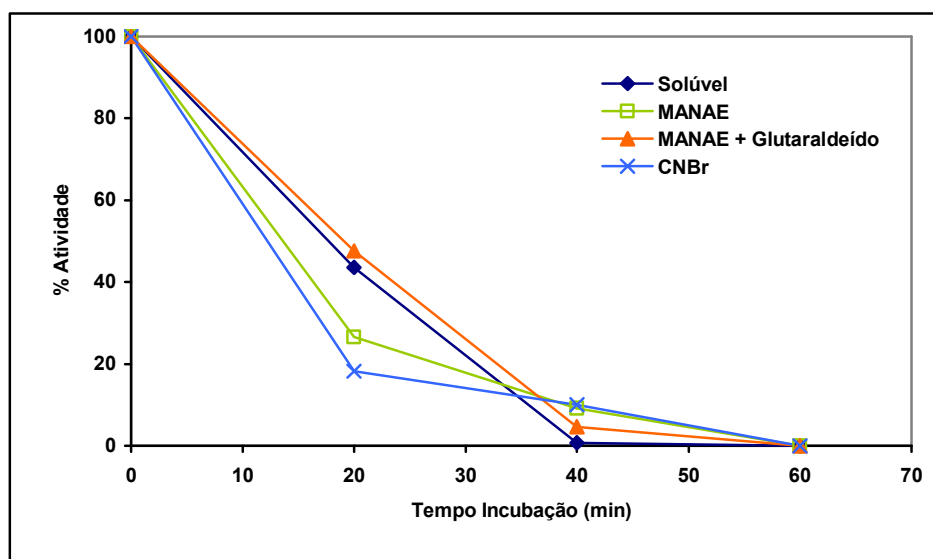


Figura 4.7. Estabilidade da α -amilase solúvel de *Aspergillus oryzae* e derivados, após incubação 60°C em pH 7,0. Atividade determinada com Amido 1%.

Diferentemente da α -amilase de *Aspergillus oryzae* a amilase de *Neurospora crassa* permitiu a imobilização pelos diferentes processos. A relação de suportes testados, e os resultados dos diferentes processos de imobilização, estão expressos nos dados reunidos na Tabela 4.2. É possível observar que a enzima foi capaz de se ligar a todos os suportes testados, embora com eficiências variáveis entre os diferentes processos, pois partindo-se de uma relação de 2mg proteínas/ grama de suporte chegou-se a diferentes percentuais de enzima ligada ao final do processo para cada suporte (vide tabela 4.2.).

Tabela 4.2. Imobilização da amilase de *Neurospora crassa*, sobre diferentes suportes.

Suporte	pH de imobilização	Tempo de imobilização	% Atividade do controle ⁵	% de Atividade imobilizada ⁶	Atividade intrínseca do derivado ⁷
Glioxil-agarose (4 BCL)	pH = 10,2 ¹	24 horas	100 %	34,2 %	100 %
Glioxil-agarose (10 BCL)	pH = 10,2 ¹	24 horas	100 %	63,2 %	51,44 %
CNBr- Agarose	pH= 7,0 ²	2 horas	100 %	51,7 %	20,8 %
MANAE - agarose	pH = 7,0 ²	4 horas	100 %	80,9 %	57,22 %
MANAE-agarose + glutaraldeído	pH = 7,0 ²	4 horas + 2 horas	100 %	80,9 %	57,89 %
Sepabeads (epóxido)	pH = 7,0 ³	24 horas	100 %	42,4 %	0 %
Eupergit (epóxido)	pH = 7,0 ⁴	24 horas	100 %	100 %	98,0 %

¹tampão bicarbonato de sódio pH 10,2, 5mM.

²tampão fosfato de sódio pH 7,0, 5mM.

³tampão fosfato de sódio pH 7,0, 1,0M, seguido de incubação a pH 10,2 e bloqueio com solução de glicina 3M em pH 8,5.

⁴tampão fosfato de potássio pH 7,0, 1,0M, seguido de incubação a pH 10,2 e bloqueio com solução de glicina 3M em pH 8,5.

⁵Atividade da solução controle ao final do tempo de imobilização.

⁶Diferença entre a atividade quantificada na solução controle (100%) e aquela encontrada no sobrenadante após decorrida a imobilização (atividade esperada no derivado)

⁷Atividade recuperada - Percentual da atividade real encontrada no derivado em relação à esperada.

Além dos diferentes rendimentos de imobilização observados (Tabela 4.2.) também houve variação entre os percentuais de recuperação da atividade entre os derivados, isto é, os percentuais das atividades intrínsecas encontradas para os derivados em comparação àquelas esperadas foi variável para cada tipo de suporte. Como atividade esperada para o derivado entende-se aquela desaparecida do meio de imobilização durante o processo (vide *Material e Métodos*). Neste ponto destaca-se o derivado Sepabeads, que, embora neste caso tenha alcançado-se 42,4% de imobilização, ao final do processo nenhuma atividade foi verificada neste derivado. Diferentemente do observado em relação a imobilização realizada em suporte Eupergit, outro suporte epóxido utilizado, em que não só se alcançou 100% de imobilização como também 98% de recuperação da atividade no derivado. Apesar destes dois serem igualmente suportes epóxidos, de acordo com estudo realizado por MATEO et al. (2002) o suporte epóxido preparado com Sepabeads apresenta-se mais hidrofóbico do que o Eupergit. Esta superfície hidrofóbica apresentada pelo suporte pode promover efeitos negativos na enzima, que poderiam explicar a ocorrência da perda de atividade do derivado, como observado ao final do processo para Sepabeads (Tabela 4.2.), já que regiões hidrofóbicas da molécula enzimática, normalmente voltadas para o interior das cadeias, poderiam se reorganizar pela aproximação com as regiões hidrofóbicas do suporte, causando alterações conformacionais na molécula enzimática que levariam ao prejuízo de sua capacidade catalítica. Um esquema de tal hipótese pode ser observado na Figura 4.8., apresentada por MATEO et al (2002).

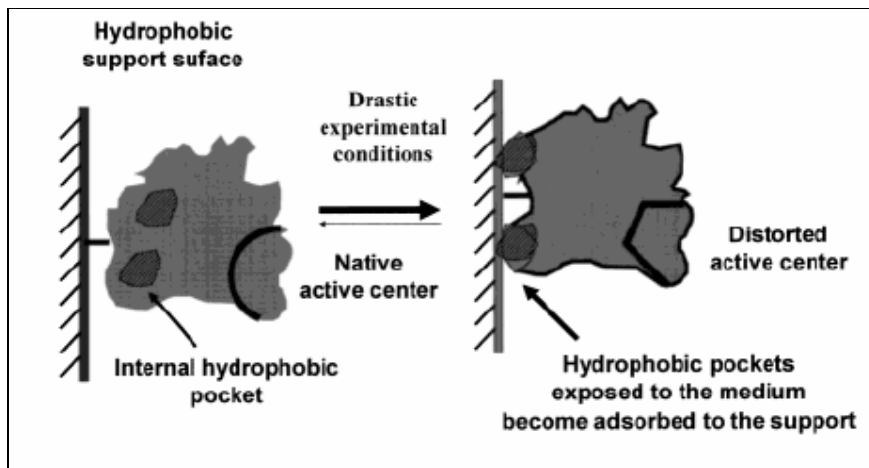


Figura 4.8. Representação do efeito da presença de uma superfície hidrofóbica na estabilidade de uma enzima imobilizada, de acordo com Mateo et al (2002).

Os dois suportes glioxil-agarose, embora muito parecidos no que diz respeito ao tipo de sítios ativos presentes, matriz, etc., apresentam certas diferenças que podem colaborar na compreensão dos dados de imobilização expressos na tabela 4.2. Matrizes com maior percentual de agarose apresentam malhas com menor porosidade e maior superfície (MATEO et al, 2005 e 2006), desta forma, a carga de enzima capaz de ser imobilizada em uma matriz com 10% de agarose, cuja densidade de grupos ativos quando ativada ao máximo alcança cerca de 220 μMols de grupos glioxil/ml de suporte, é significativamente maior que em uma agarose com 4%, cuja ativação máxima atinge cerca de 40 μMols de grupos glioxil/ml de suporte. Assim sendo, podemos considerar coerentes os percentuais de imobilização da amilase de *Neurospora crassa* verificados para estes dois suportes (Tabela 4.2.) onde observa-se um maior percentual de enzima sendo incorporado ao suporte agarose 10BCL do que ao 4BCL. Também as características destes suportes poderiam explicar as

diferenças de recuperações das atividades entre estes dois suportes glioxil-agarose, pois apresentando uma maior densidade de grupos ativos/ml o suporte de agarose 10BCL não só é capaz de imobilizar maior carga de proteínas como também estabelecer maior número de ligações entre seus grupos ativos e a superfície da enzima, o que pode levar a uma maior estabilização da enzima, como se verificará mais a diante, mas com o contraponto de provocar uma certa redução na atividade catalítica desta enzima com a maior interação com o suporte. Isso demonstra a necessidade de um equilíbrio entre a busca da estabilidade da enzima e a manutenção de sua atividade catalítica, ou seja, um meio termo entre a maior rigidificação da molécula e a perda de sua mobilidade de ação e/ou alteração conformacional capaz de promover a perda da atividade enzimática. A constatação do aumento da estabilidade com o uso da agarose de maior concentração pode ser feita observando-se os dados que serão apresentados mais adiante (Figura 4.13.).

Outro aspecto importante envolvendo a imobilização destas amilases diz respeito ao tipo de substrato, macromolecular, como o amido, sobre o qual agem estas enzimas. Sendo o amido um polímero de glicose de alto peso molecular, e, principalmente, por ser composto de frações como a amilopectina que apresenta estrutura ramificada e espacialmente desfavorável à sua difusão através da malha dos diferentes suportes, deve ser considerada a possibilidade de ocorrência de problemas difusionais deste substrato através da “malha” do gel de agarose, o que poderia dificultar a ação de alguns derivados em estudos. Para verificarmos tal fenômeno foi feito o acompanhamento dos comportamentos observados durante o processo de produção dos derivados com as agaroses de diferentes concentrações. A atividade da amilase de *Neurospora crassa* foi acompanhada

durante sua imobilização sobre os suportes de glioxil-agarose, utilizando-se tanto agarose a 10% como 4%, sendo que nesta última (com menor concentração de agarose, e maior porosidade) esperava-se a redução da dificuldade difusional do substrato amido em comparação a outra agarose. Também a cinética de imobilização foi acompanhada utilizando-se a maltose como substrato, uma vez que este substrato não apresentaria tais problemas difusionais, considerando-se sua estrutura e tamanho reduzido. Nas Figuras 4.9. a 4.12. estão representadas as cinéticas das imobilizações nos dois suportes glioxil-agarose citados.

Nesses dois casos, tanto no processo de imobilização em agarose 4BCL como 10BCL (Figuras 4.9. e 4.11.) igualmente observou-se indicativos de dificuldade de difusão do amido quando comparadas as curvas (Atividade X Tempo de imobilização) da solução controle com as curvas referentes à suspensão do meio de imobilização. Em ambos os casos a atividade verificada para a suspensão (contendo solução tampão com enzima ainda livre, suporte e derivados) vai decaindo à medida que a enzima vai se imobilizando ao suporte. O que sugere que à medida que a enzima vai sendo transferida da solução para o gel, reagindo com o suporte, sua atividade relativa vai sofrendo redução. Isto pode indicar tanto o efeito de uma alteração na própria molécula enzimática, conforme vão sendo estabelecidas ligações com o suporte, quanto o efeito da dificuldade crescente de acesso do substrato à enzima, à medida que esta penetra no gel. Esta segunda hipótese apóia-se no fato de que o efeito não foi observado quando a cinética de imobilização nestes suportes foi acompanhada utilizando-se maltose como substrato (de acordo com as curvas apresentadas nas Figuras 4.10 e 4.12.), sendo mantidas as atividades das suspensões assim como para os respectivos controles.

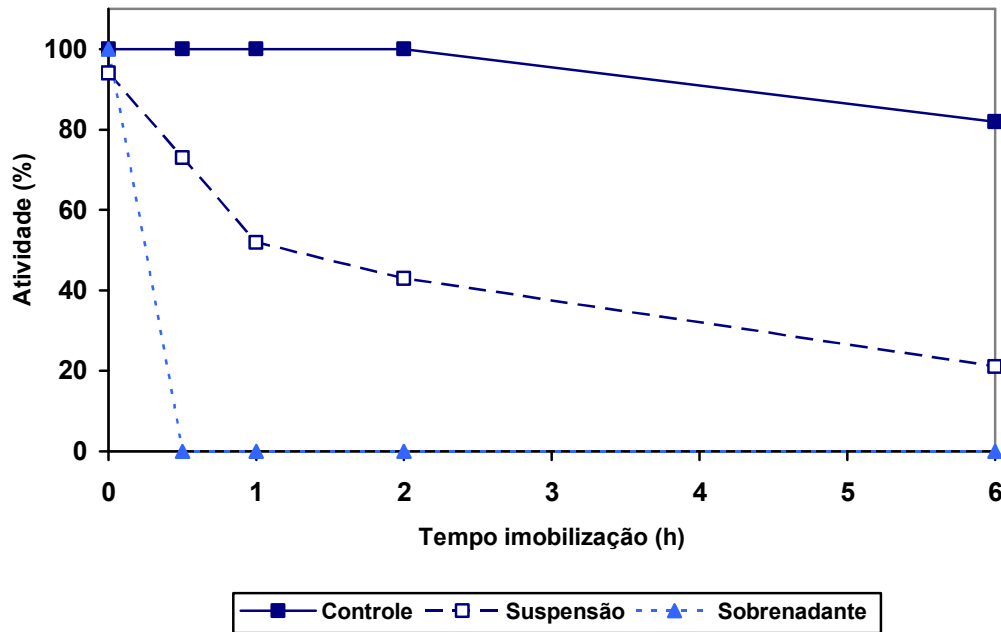


Figura 4.9. Cinética de imobilização da amilase de *Neurospora crassa* sobre glioxil agarosa – 4BCL. Imobilização: temperatura ambiente, em tampão bicarbonato 5 mM pH=10,2, e atividade determinada com Amido 1%.

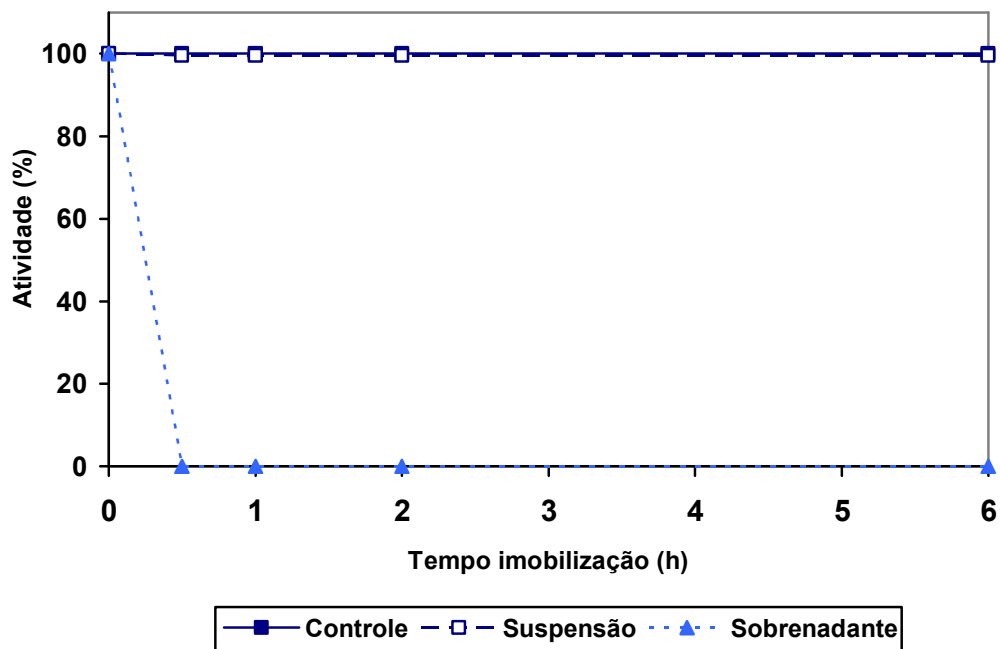


Figura 4.10. Cinética de imobilização da amilase de *Neurospora crassa* sobre glioxil agarose – 4BCL. Imobilização: temperatura ambiente, em tampão bicarbonato 5 mM pH=10,2, e atividade determinada com Maltose 1%.

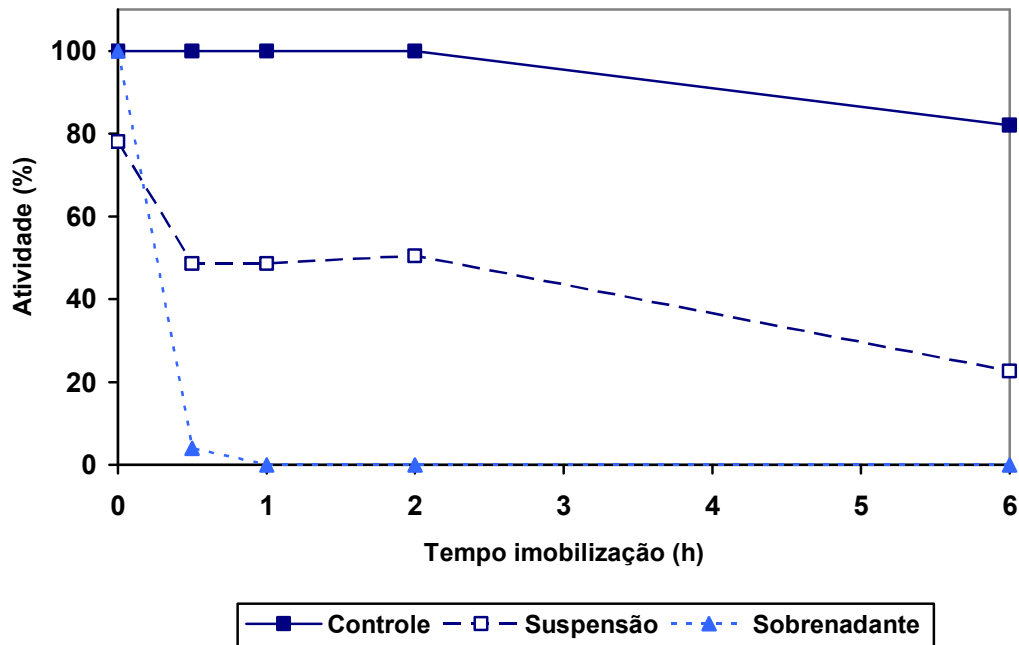


Figura 4.11. Cinética de imobilização da amilase de *Neurospora crassa* sobre glioxil agarose – 10BCL. Imobilização: temperatura ambiente, em tampão bicarbonato 5 mM pH=10,2, e atividade determinada com Amido 1%.

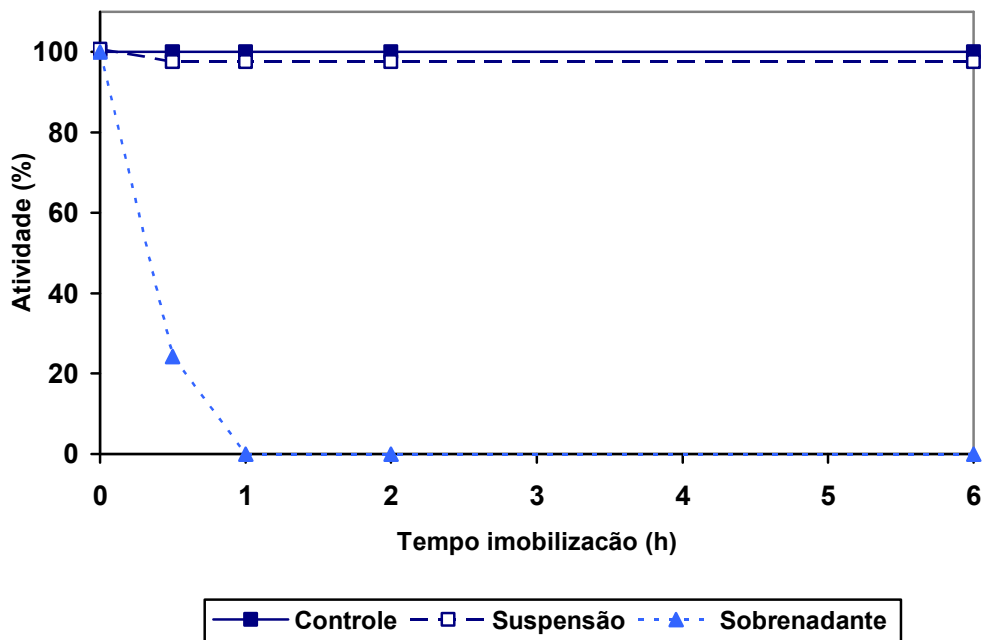


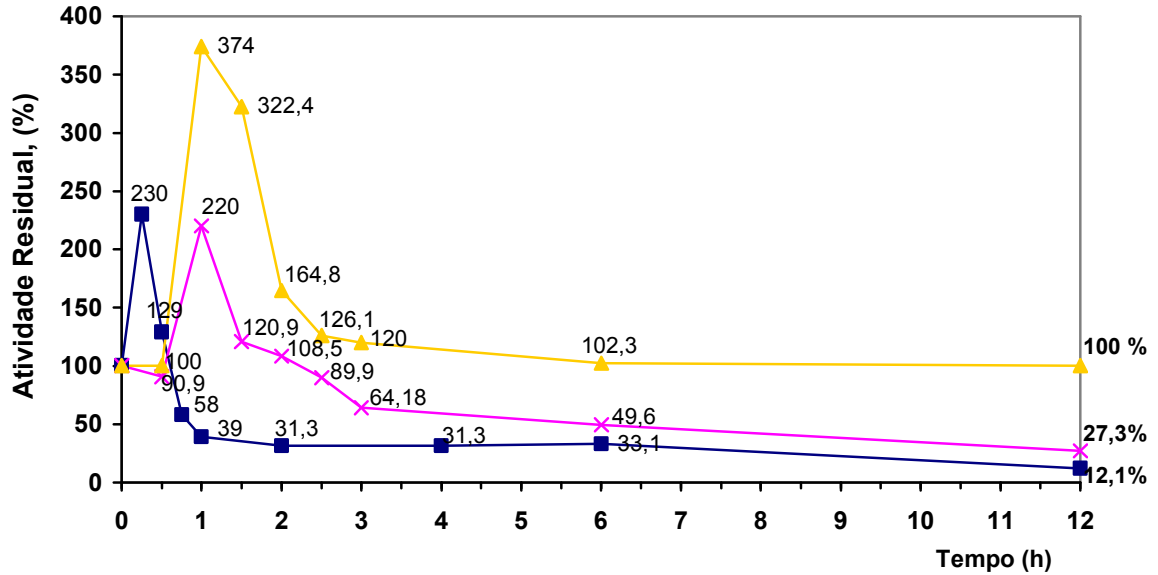
Figura 4.12. Cinética de imobilização da amilase de *Neurospora crassa* sobre glioxil agarose – 10BCL. Imobilização: temperatura ambiente, em tampão bicarbonato 5 mM pH 10,2, e atividade determinada com Maltose 1%.

Independentemente da dificuldade de difusão dos substratos, o processo de imobilização da amilase de *Neurospora crassa* parece estabelecer alterações na enzima que modificam sua relação com seus substratos amido e maltose. De acordo com os gráficos de inativação térmica apresentados na Figura 4.13. tanto para o derivado glioxil-agarose 4BCL como 10 BCL, a capacidade de hidrólise foi efetivamente melhor mantida com relação ao amido (Figura 4.13. A) do que com relação à maltose (Figura 4.13. B).

No transcorrer do tempo de incubação o derivado produzido com a agarose 10 BCL manteve sua atividade máxima frente ao amido (Figura 4.13. A) até o final do período das 12 horas de incubação.

Em função destas diferenças de comportamento observadas para a amilase de *Neurospora crassa* em relação ao amido e maltose uma hipótese levantada para explicar tal comportamento seria a existência de sítios catalíticos distintos para cada substrato na molécula desta enzima. Numa tentativa de se evidenciar tal característica, foram ensaiadas as atividades enzimáticas utilizando-se estes dois substratos em conjunto, para comparação com suas atividades em separado. Uma somatória de capacidade hidrolítica, verificada por um aumento da atividade catalítica quando utilizados os substratos em conjunto, poderia indicara a presença de sítios catalíticos distintos na molécula. Tal informação, contudo, não se confirmou, pois não foi observado aumento da atividade quando ensaiados os substratos em conjunto. Esta constatação também foi apresentada em estudo realizado por SPINELLI et al (1996).

(A)



(B)

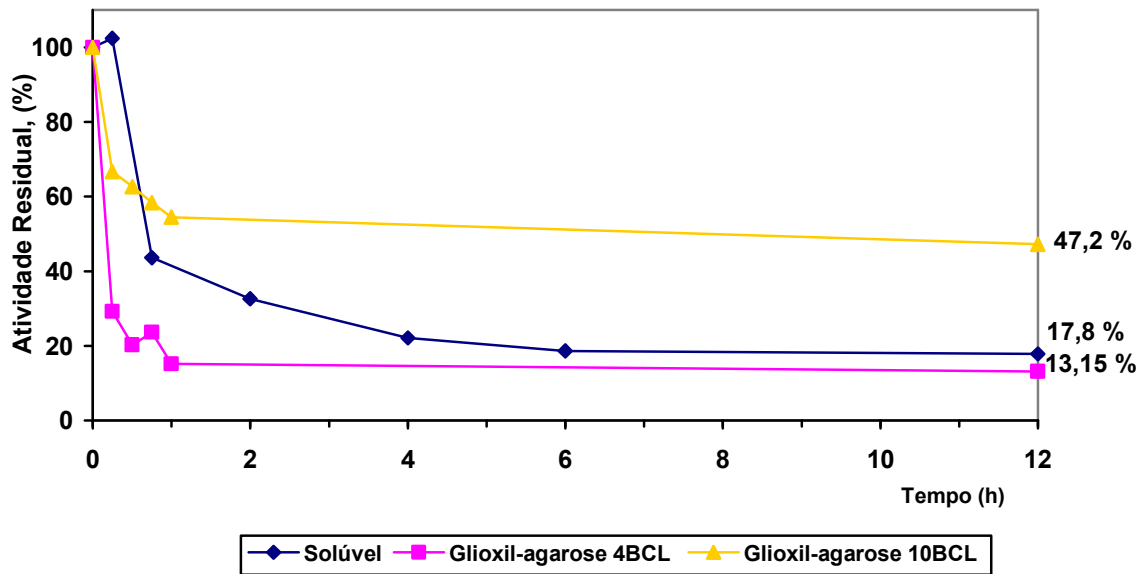


Figura 4.13. Estabilidade da amilase solúvel de *Neurospora crassa* e derivados glioxil-agarose após incubação a 60°C, pH 5,0. Atividade determinada com Amido 1% (A) e Maltose 1% (B) .

Outro fato curioso com relação às diferentes respostas frente aos diferentes substratos foi o acompanhamento de um estado de hiperativação inicial, tanto quando ensaiada a enzima solúvel quanto seus derivados glioxil-agarose, ao ser utilizado o amido como substrato (Figura 4.13. A). O mesmo não foi observado com relação a maltose (Figura 4.13. B). O fato desta amilase estar imobilizada multipontualmente, e, portanto, em um estado sujeito a menor flexibilidade, poderia colaborar com a explicação para o deslocamento da curva observada de surgimento desta hiperativação para a direita do gráfico, no sentido de levar maior tempo para ocorrer (Figura 4.13. A).

Este fato, observado para ambos os derivados glioxil-agarose, não foi observado para os derivados MANAE-agarose, como indica a Figura 4.14.

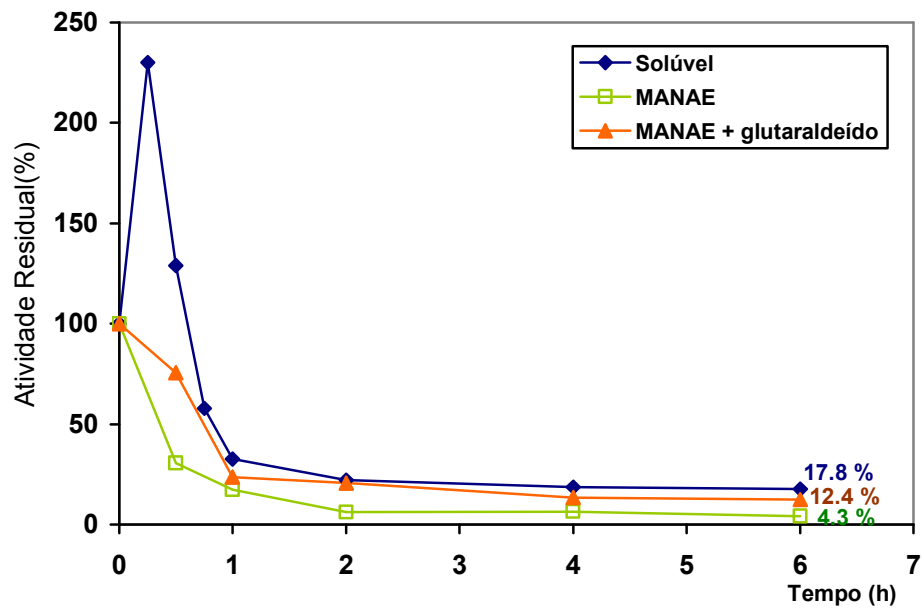


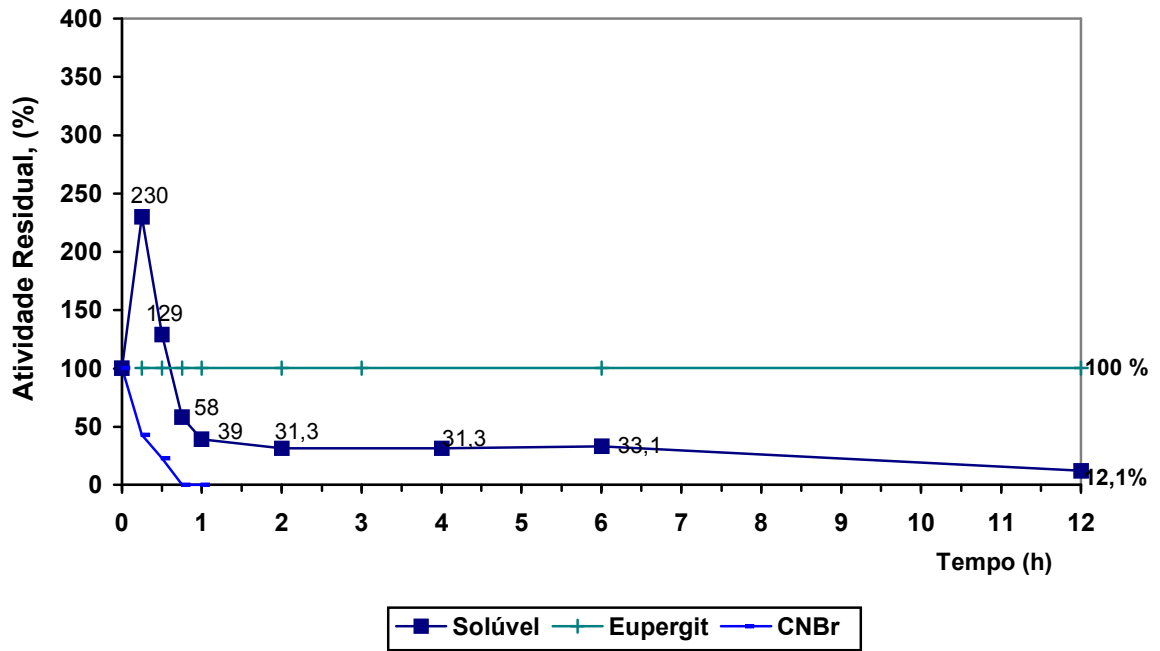
Figura 4.14. Estabilidade da amilase solúvel de *Neurospora crassa* e derivados amino-agarose e amino-agarose + glutaraldeído, após incubação a 60°C pH 5,0. Atividades determinadas com Amido 1%

Como citado antes, na figura 4.14. encontram-se as curvas de inativação térmica dos derivados da amilase de *Neurospora crassa* produzidos com suporte de MANAE-agarose. Para o derivado produzido com suporte MANAE-agarose e posteriormente tratado com glutaraldeído pode-se verificar uma maior estabilidade em relação ao mesmo derivado sem tal tratamento, como esperado, uma vez que a molécula de glutaraldeído, adicionada ao derivado, comporta-se como um “grampo” acoplado à molécula, provocando um aumento de sua estabilidade, como de fato observado. Contudo, tais derivados não se apresentaram mais estáveis em relação à enzima solúvel, e, portanto, foram abandonados.

Outros testes foram realizados com utilização de CNBr-Agarose e suportes epóxidos como Sepabeads e Eupergit. Com o uso do suporte CNBr-Agarose pretendeu-se formular um “controle” da enzima, para comparação com os derivados, mais próximo do ideal do que sua própria forma solúvel. Com este derivado, unipontual, teríamos uma forma da enzima com as menores alterações possíveis de sua conformação nativa provocadas pelo processo de imobilização ao mesmo tempo que, diferentemente da enzima solúvel, este controle reproduziria melhor as condições a serem testadas com os derivados durante os ensaios de atividade, como possíveis dificuldades de manterem-se em suspensão entre outras. Contudo, além da baixa capacidade de imobilização neste suporte demonstrada por esta amilase, tal derivado mostrou-se ainda menos estável em relação à enzima solúvel (Figura 4.15.) inclusive não sendo possível detectar qualquer atividade frente à maltose, o que tornou inviável sua utilização.

Quanto ao suporte Eupergit sua utilização para a imobilização desta enzima apresentou-se muito promissora, como indica a Figura 4.15.

(A)



(B)

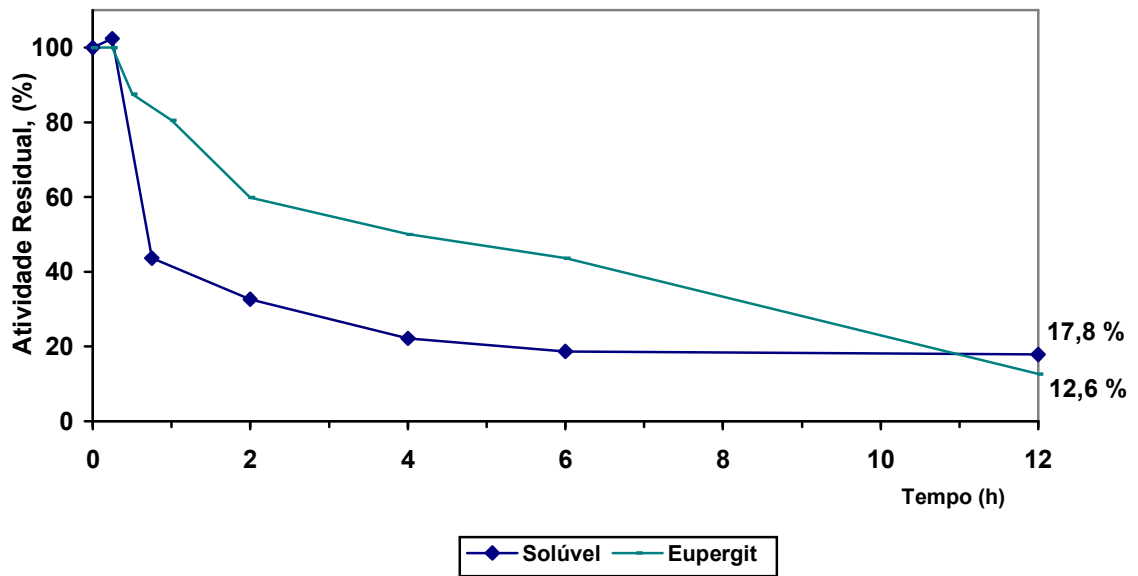


Figura 4.15. Estabilidade da amilase de *Neurospora crassa* e seu derivado Eupergit após incubação a 60°C, pH 5,0. Atividade determinada com Amido 1% (A) e Maltose 1% (B) .

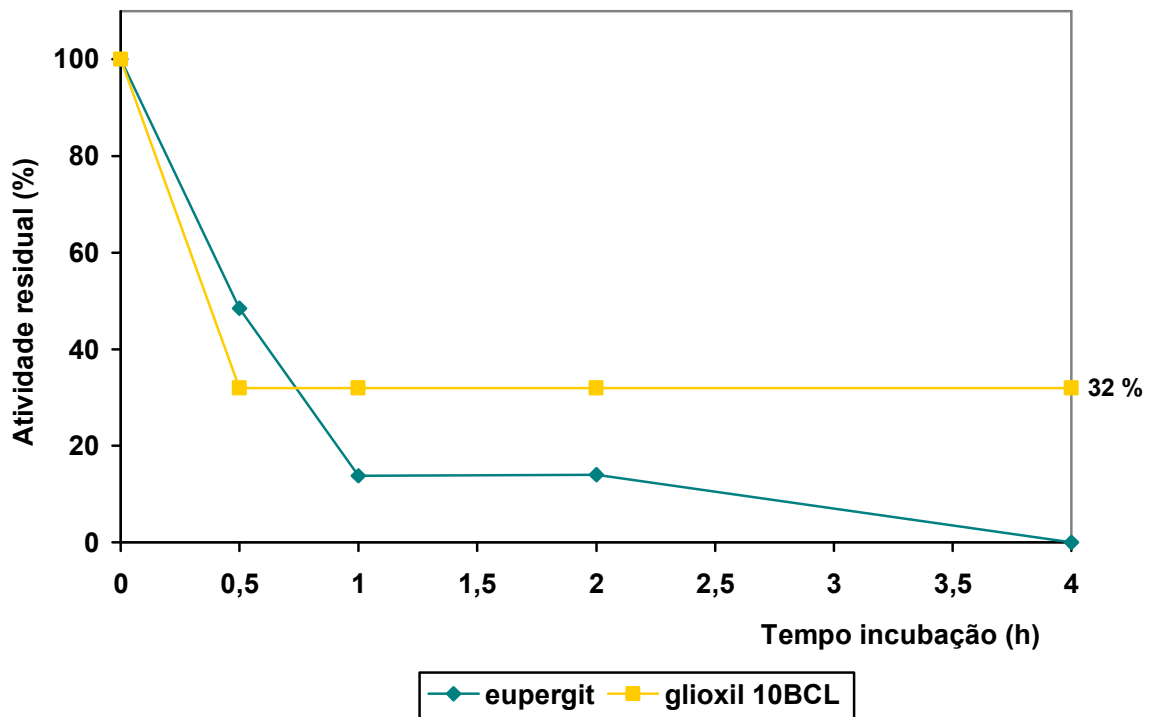
Os derivados Eupergit mantiveram sua capacidade máxima de hidrólise em relação ao amido durante todo período testado de incubação a 60°C (Figura 4.15., A), o mesmo não ocorrendo com relação a maltose, como já observado anteriormente para os derivados glioxil-agarose (Figura 4.15., B).

Os derivados Eupergit e glioxil-agarose 10BCL de amilase de *Neurospora crassa*, ambos multipontuais, foram os que apresentaram maior estabilidade térmica quando estudados a 60°C. Na tentativa de diferenciá-los tais derivados foram comparados incubando-os então a 70°C, assim como a enzima na sua forma solúvel (vide Figuras 4.16., A e B).

A enzima solúvel, que não se encontra representada nas Figuras (4.16. A e B), teve sua atividade perdida logo no princípio do ensaio, sofrendo agregação e precipitação visível com sua incubação à 70°C. Tal fenômeno não ocorre com os derivados, já que, com o processo de imobilização as moléculas protéicas são impedidas de se agregarem, não sofrendo tal efeito provocado pelo calor ocorrido com a forma livre da enzima.

Embora apresentando uma acentuada queda na atividade, frente ao substrato amido, nos primeiros 30 minutos de incubação o derivado glioxil-agarose destacou-se em relação ao derivado Eupergit, estabilizando-se em um percentual de atividade de cerca de 32%, quando em 4 horas de incubação o derivado Eupergit já havia perdido totalmente sua atividade, frente aos dois substratos. Também quando utilizado o substrato maltose a atividade do derivado glioxil-agarose foi mantida em cerca de 30% de sua atividade inicial (Figura 4.16, B).

(A)



(B)

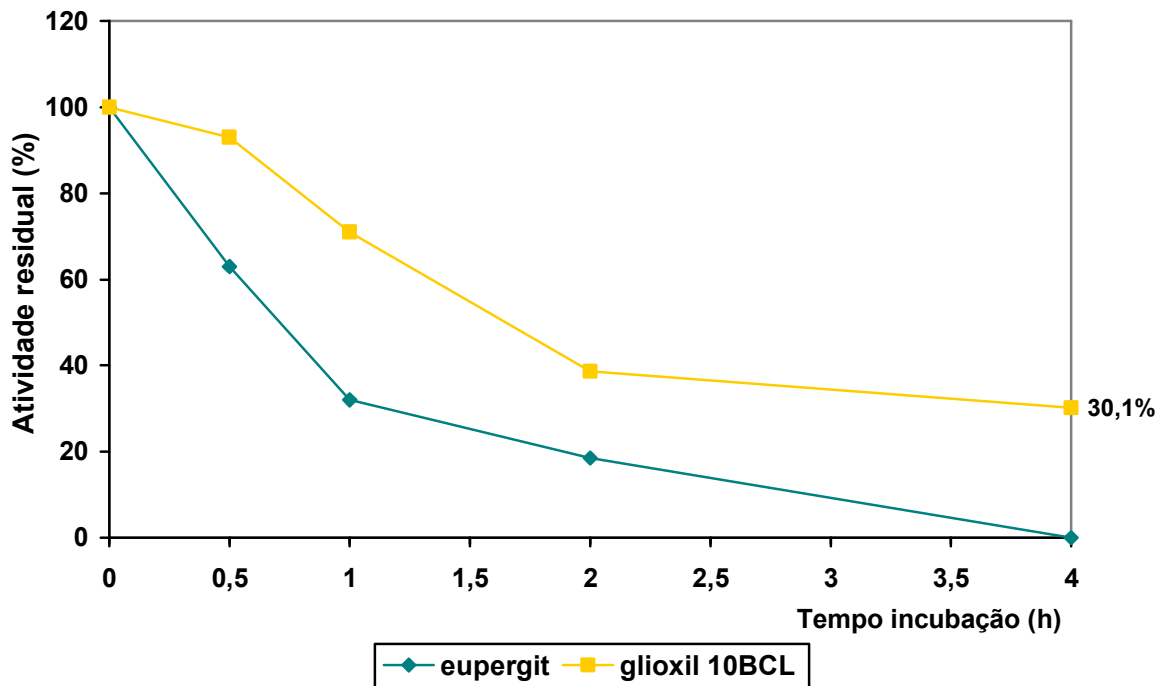


Figura 4.16. Estabilidade da amilase de *Neurospora crassa* e seu derivado Eupergit após incubação a 70°C, pH 5,0. Atividade determinada com Amido 1% (A) e Maltose 1% (B).

Em função dos dados até aqui apresentados conclui-se que o derivado glioxil-agarose 10BCL de amilase de *Neurospora crassa* apresenta-se o mais estável entre derivados estudados, seguido pelo derivado Eupergit. Como já comentado anteriormente, para uma melhor avaliação dos resultados para os derivados obtidos, buscou-se trabalhar paralelamente com os mesmos tipos de derivados sendo preparados com amilases comerciais, agora prioritariamente os derivados glioxil-agarose 10 BCL e Eupergit. Sendo assim foram preparados estes mesmos derivados com uma enzima de referência, no caso a glucoamilase de *Aspergillus niger*, comercialmente obtida. Na Tabela 4.3. foram reunidos os dados sobre as imobilizações realizadas com a glucoamilase de *Aspergillus niger* sobre os diferentes suportes.

Tabela 4.3. Imobilização da glucoamilase comercial (*Aspergillus niger*), sobre diferentes suportes.

Suporte	pH de imobilização	Tempo de imobilização	% Atividade do controle ⁴	% de Atividade imobilizada ⁵	Atividade intrínseca do derivado ⁶
Glioxil-agarose (4 BCL)	pH = 10,2 ¹	24 horas	100%	49,1%	72,8%
Glioxil-agarose (10 BCL)	pH = 10,2 ¹	24 horas	100%	24,6%	28,2%
Sepabeads (epóxido)	pH = 7,0 ²	24 horas	97,2%	21,0%	0%
Eupergit (epóxido)	pH = 7,0 ³	24 horas	100%	79,1%	6,2%

¹tampão bicarbonato de sódio pH 10,2, 5mM.

²tampão fosfato de sódio pH 7,0, 1,0M, seguido de incubação a pH 10,2 e bloqueio com solução de glicina 3M em pH 8,5.

³tampão fosfato de potássio pH 7,0, 1,0M, seguido de incubação a pH 10,2 e bloqueio com solução de glicina 3M em pH 8,5.

⁴Atividade da solução controle ao final do tempo de imobilização.

⁵Diferença entre a atividade quantificada na solução controle (100%) e aquela encontrada no sobrenadante após decorrida a imobilização (atividade esperada no derivado)

⁶Atividade recuperada - Percentual da atividade real encontrada no derivado em relação à esperada.

Diferentemente da α -amilase, a glucoamilase comercial permitiu a produção de derivados Eupergit e glioxil-agarose com alta atividade ao final do processo de imobilização. Mas, também neste caso, como já havia sido observado para a amilase de *Neurospora crassa*, a imobilização em suporte Sepabeads não produziu um derivado ativo, não detectando-se qualquer atividade neste derivado ao final do processo (Tabela 4.3.).

Quando os derivados glioxil-agarose 10BCL e Eupergit, da glucoamilase de *Aspergillus niger*, foram submetidos à incubação a 60°C, observou-se que nas primeiras 2 horas de incubação estes derivados apresentaram-se estáveis, sendo que a partir deste momento os dois derivados apresentaram uma queda acentuada em sua atividade e uma menor estabilidade quando comparados à forma solúvel, como aparece na Figura 4.17.

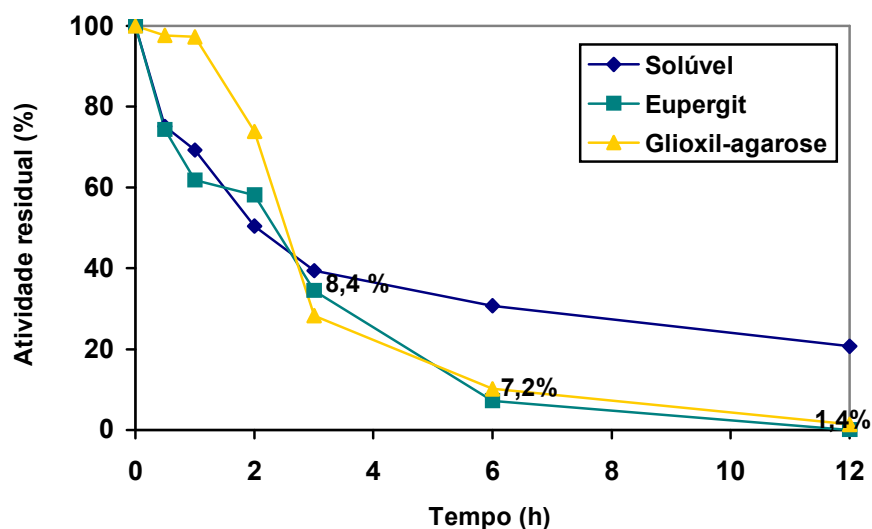


Figura 4.17. Estabilidade térmica da glucoamilase de *Aspergillus niger* e seus derivados submetidos à incubação à 60°C, em tampão acetato de sódio 5 mM pH 5,0 e acompanhada com substrato amido.

Quando a incubação destes derivados foi realizada à 70°C , tanto derivados como enzima solúvel apresentaram acentuada perda de atividade logo nos primeiros 15 minutos de incubação, com perdas totais das atividades a partir de 2 horas de incubação (Figura 4.18.). Embora o derivado Eupergit tenha se mostrado levemente mais estável em relação às outras formas, sua atividade inicial foi drasticamente reduzida logo no início do período de incubação.

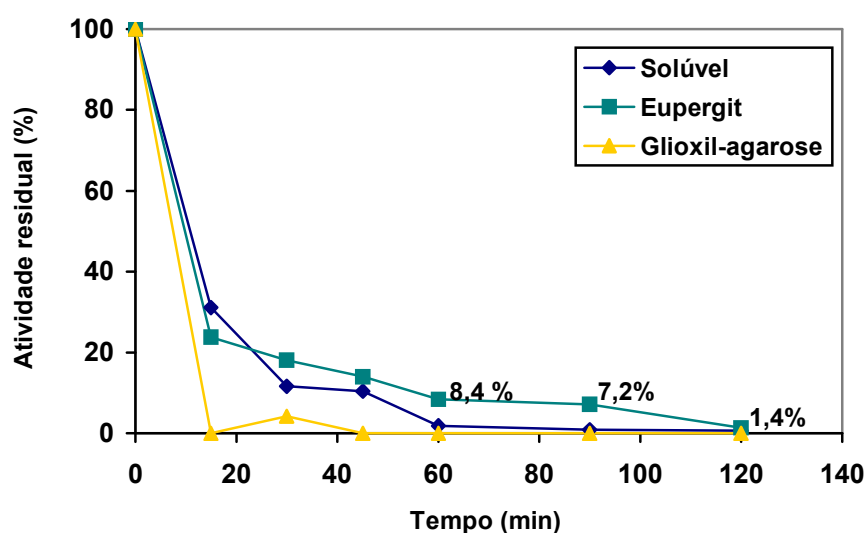


Figura 4.18. Estabilidade da glucoamilase de *Aspergillus niger* e seus derivados submetidos a incubação à 70°C, em tampão acetato de sódio 5 mM pH 5,0, acompanhada com substrato amido.

Embora não apresentando-se altamente vantajosos no aspecto de suas estabilidades térmicas, em relação à forma solúvel, estes derivados glioxil-agarose 10BCL e Eupergit da glucoamilase de *Aspergillus niger* apresentaram outras características interessantes, dentre elas podemos destacar suas atividades específicas, possibilidades de reuso, entre outras, que serão apresentadas a seguir.

Na tabela 4.4. foram reunidas algumas informações sobre os derivados glioxil-agarose 10BCL e Eupergit das amilases de *Neurospora crassa* e *Aspergillus niger*, como suas quantidades de proteínas ligadas e atividades específicas em comparação às respectivas formas solúveis.

Tabela 4.4. Características de derivados glioxil-agarose 10BCL e Eupergit (epóxido) das amilases de *Neurospora crassa* e *Aspergillus niger*.

Enzima	Proteína imobilizada	Atividade específica
<i>Amilase de Neurospora crassa</i>		
Solúvel	-	18,77 μ Mols de glicose/min/mg prot
Derivado-Glioxil	1,61 mg prot./g derivado	6,37 μ Mols de glicose/min/mg prot
Derivado-Eupergit	3,87 mg prot./g derivado	2,19 μ Mols de glicose/min/mg prot
<i>Glucoamilase de Aspergillus niger</i>		
Solúvel	-	53,58 μ Mols de glicose/min/mg prot.
Derivado-Glioxil	3,36 mg prot./g derivado	16,03 μ Mols de glicose/min/mg prot
Derivado-Eupergit	6,93 mg prot./g derivado	9,40 μ Mols de glicose/min/mg prot.

Conforme apresentado na Tabela 4.4. as atividades específicas encontradas para os derivados foram mais baixas que àquelas de suas correspondentes formas solúveis para todos os casos. Sendo que para ambas as enzimas o derivados Eupergit apresentaram atividades específicas mais baixas

que os derivados glioxil-agarose 10BCL, que apresentaram cerca de 30% da atividade equivalente a suas formas solúveis.

Uma das vantagens da utilização de enzimas imobilizadas é a possibilidade de reuso do derivado. Neste sentido os derivados glioxil-agarose 10BCL e Eupergit das amilases de *Neurospora crassa* e *Aspergillus niger*, foram testados quanto a suas possibilidades de reutilização em ciclos de três utilizações para hidrólise de amido. Os resultados estão representados na Figura 4.20.

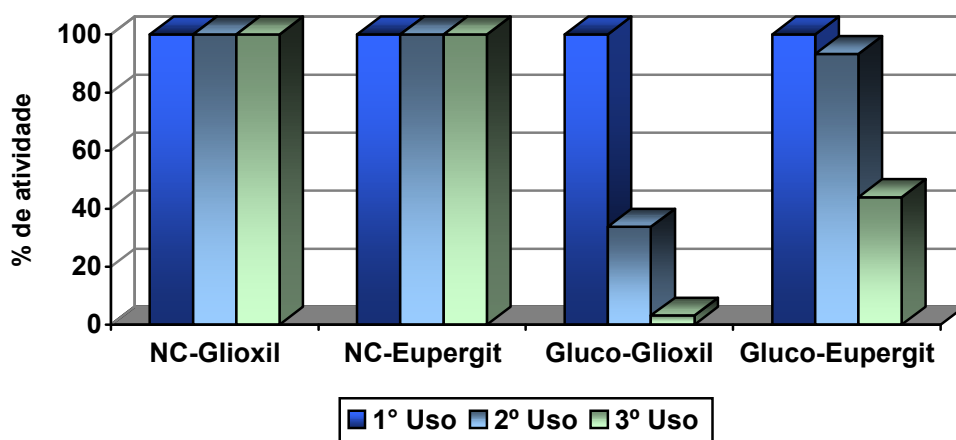


Figura 4.20. Atividades de hidrólise do amido, dos derivados glioxil-agarose 10BCL e Eupergit (epóxido) de amilase de *Neurospora crassa* (NC) e *Aspergillus niger* (Gluco), em ciclos de três utilizações.

Observando a Figura 4.20. verifica-se claramente que os derivados da amilase de *Neurospora crassa* se destacam em comparação aos derivados da glucoamilase comercial no que se refere a possibilidade de reuso, mostrando-se capazes de passarem por processo de reutilização em três ciclos, mantendo inalteradas suas capacidades de atuar sobre o amido, enquanto os derivados de glucoamilase apresentaram redução na sua capacidade hidrolítica a cada ciclo de

utilização, principalmente o de glicoxil-agarose, cuja utilização já não seria possível em um quarto ciclo de hidrólise do amido.

Na tabela 4.5. encontram-se reunidos os valores de K_m e V_{max} para as amilases de *Neurospora crassa* e *Aspergillus niger*, para suas formas solúveis e respectivos derivados. Tais resultados demonstram que os processos de imobilização utilizados ocasionaram alterações em seus parâmetros cinéticos.

De maneira geral as enzimas tiveram suas afinidades pelos substratos macromoleculares diminuídas após a imobilização, de acordo com os aumentos observados para os valores de K_m aparente (Tabela 4.5.). Já para o substrato maltose tal fenômeno não foi verificado.

Este aumento dos valores de K_m em relação aos substratos de alto peso molecular pode indicar a ocorrência de certos fenômenos associados ao processo de imobilização destas amilases, pois tanto poderiam estar refletindo alterações sofridas pela estrutura das moléculas protéicas, com conseqüências sobre sua capacidade de hidrólise, como também ser reflexo da dificuldade encontrada por estes substratos de alcançarem o sítio ativo da enzima, demonstrando a dificuldade das moléculas de maltodextrina e do amido de se difundirem através da trama do gel, prejudicando uma avaliação efetiva de alteração da afinidade pelo substrato desta nova forma em que se encontra a molécula da enzima.

Tabela 4.5. Parâmetros cinéticos (Km e Vmax) para as amilases de *Neurospora crassa* e *Aspergillus niger*, nas formas solúveis e seus respectivos derivados.

Enzima	KM E VMAX PARA DIFERENTES SUBSTRATOS*					
	Maltose		Amido		Maltodextrina	
	Km	Vmax	Km	Vmax	Km	Vmax
Amilase de <i>Neurospora crassa</i>						
Solúvel	20,87	25,51	0,29	2,94	2,83	31,45
Derivado glioxil- agarose 10BCL	2,57	9,43	11,06	0,156	9,51	52,63
Derivado Eupergit (epóxido)	8,58	5,44	37,36	20,66	6,12	1,76
Glucoamilase <i>Aspergillus niger</i>						
Solúvel	1,14	19,96	2,17	10,05	1,78	6,11
Derivado glioxil- agarose 10 BCL	1,41	4,05	71,41	15,80	5,85	3,32
Derivado Eupergit (epóxido)	1,86	2,41	14,27	9,74	5,84	8,26

*Valores de Km expressos em mg/ml e de Vmax em $\mu\text{Mols}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteínas.

Estes dados podem ser extrapolados para uma representação da eficiência catalítica das enzimas e seus derivados, como expressado na Tabela 4.6., de onde se conclui que de uma forma geral os processos de imobilização levaram a prejuízos nas eficiências catalíticas das enzimas estudadas.

Tabela 4.6. Eficiências catalítica das amilases de *Neurospora crassa* e de *Aspergillus niger* frente aos diferentes substratos.

Enzima	EFICIÊNCIA CATALÍTICA (V _{MAX} /KM) PARA CADA SUBSTRATO		
	Maltose	Amido	Maltodextrina
<i>Amilase de Neurospora crassa</i>			
Solúvel	1,22	10,14	11,11
Derivado glioxil- agarose 10 BCL	3,67	0,01	5,53
Derivado Eupergit (epóxido)	0,63	0,55	0,29
<i>Glucoamilase Aspergillus niger</i>			
Solúvel	17,51	4,63	3,43
Derivado glioxil- agarose 10 BCL	2,87	0,22	0,57
Derivado Eupergit (epóxido)	1,30	0,68	1,41

Considerando-se o derivado glioxil-agarose 10BCL da amilase *Neurospora crassa* o derivado mais positivamente destacado, foram realizados outros ensaios com este derivado, em comparação à forma solúvel da enzima, buscando-se

verificar diferenças entre eles, como alterações no pH ou temperatura ótimos de hidrólise.

Na Figura 4.21. estão reunidos os dados sobre pH ótimo de hidrólise do amido para o derivado glioxil-agarose e forma solúvel da amilase, onde verifica-se que, salvas algumas pequenas diferenças entre as respostas aos diferentes pHs, o pH ótimo de atividade foi alcançado em pH 5.0 para derivado assim como para a enzima solúvel.

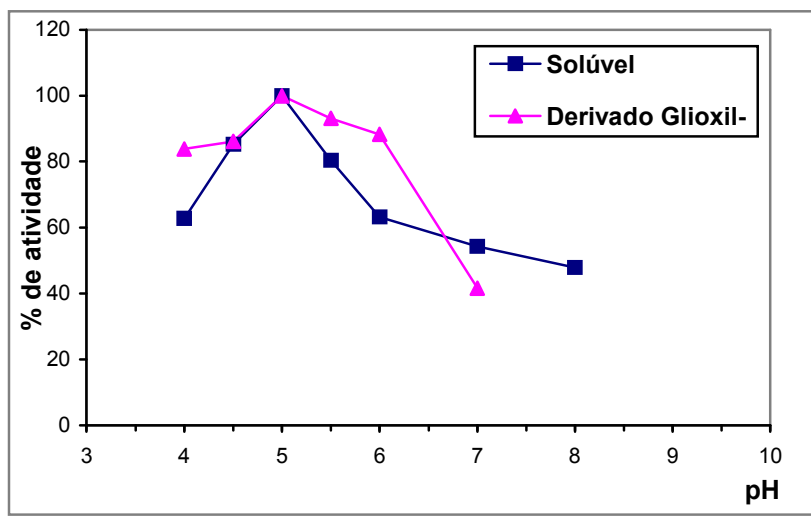


Figura 4.21. Percentuais de atividade da amilase de *Neurospora crassa* solúvel e seu derivado glioxil-agarose 10BCL em função do pH do meio de reação. Substrato amido.

Foi também traçada uma curva de temperatura ótima de atividade para este derivado. Neste ponto a enzima imobilizada apresentou uma pequena alteração de temperatura ótima, para valor mais elevado (Figura 4.22.).

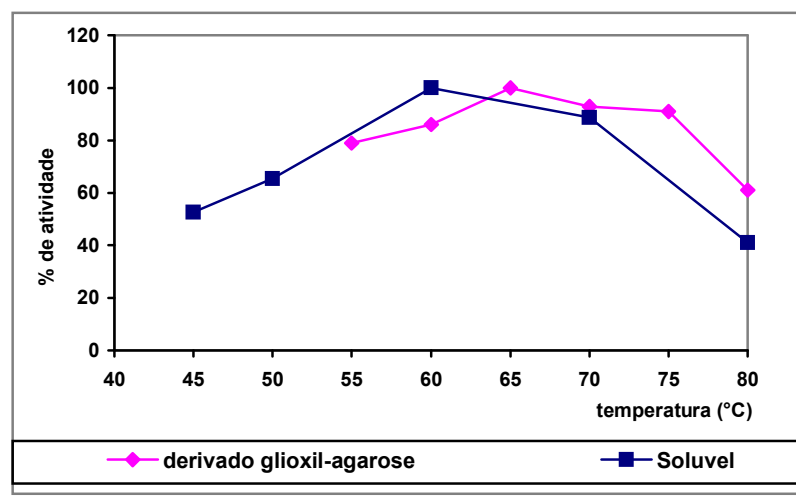


Figura 4.22. Atividade da amilase solúvel de *Neurospora crassa* e seu derivado glioxil-agarose 10BCL, frente à temperatura de meio de reação, determinadas com amido como substrato.

Na Figura 4.23. estão representados os dados de estabilidade do derivado glioxil-agarose 10BCL e da forma solúvel da amilase *Neurospora crassa*, após incubação de 30 minutos a 60°C, em diferentes valores de pH do meio. Com a observação do gráfico (Figura 4.23) verifica-se que, embora as duas formas da enzima apresentem boa estabilidade em todos os meios testados, há uma tendência da forma solúvel da enzima destacar-se sobre o derivado nos meios ácidos, invertendo-se esta relação nos meios alcalinos e neutros.

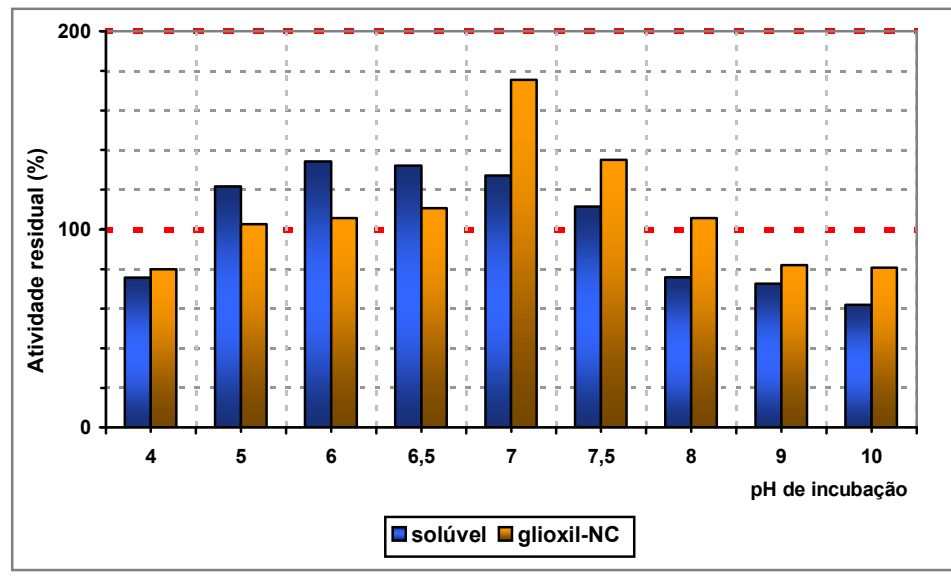


Figura 4.23. Atividade residual da amilase de *Neurospora crassa* solúvel e seu derivado glioxil-agarose, após 30 minutos de incubação, 60°C, em diferentes valores de pH. Valores percentuais em relação à atividade da enzima não incubada (100%).

Cabe aqui comentar que talvez a escolha de um período de trinta minutos de incubação para as amostras não tenha sido o mais adequado, se nos reportarmos aos dados anteriormente apresentados (Figura 4.13. - A) que indicam o surgimento de um estado de hiperatividade, estimulado pela temperatura em trinta minutos de incubação, e que poderia em parte influenciar estes resultados.

Na figura 4.24. (A e B) estão representadas curvas de formação de produto gerados pela hidrólise do amido pela amilase de *Neurospora crassa* solúvel seu derivado glioxil-agarose acompanhados por determinação em HPLC, que colaboram em confirmar sua característica de glucoamilase, pois, como esperado, houve liberação de apenas resíduos de glicoseo, não sendo detectados quaisquer outros picos referentes a outros sacarídeos, como ocorre no caso da utilização da α -amilase (Figura 4.24.C) onde ocorre a liberação e detecção de outros produtos

além da glicose, como a maltose, em função de sua característica de endoamilase.

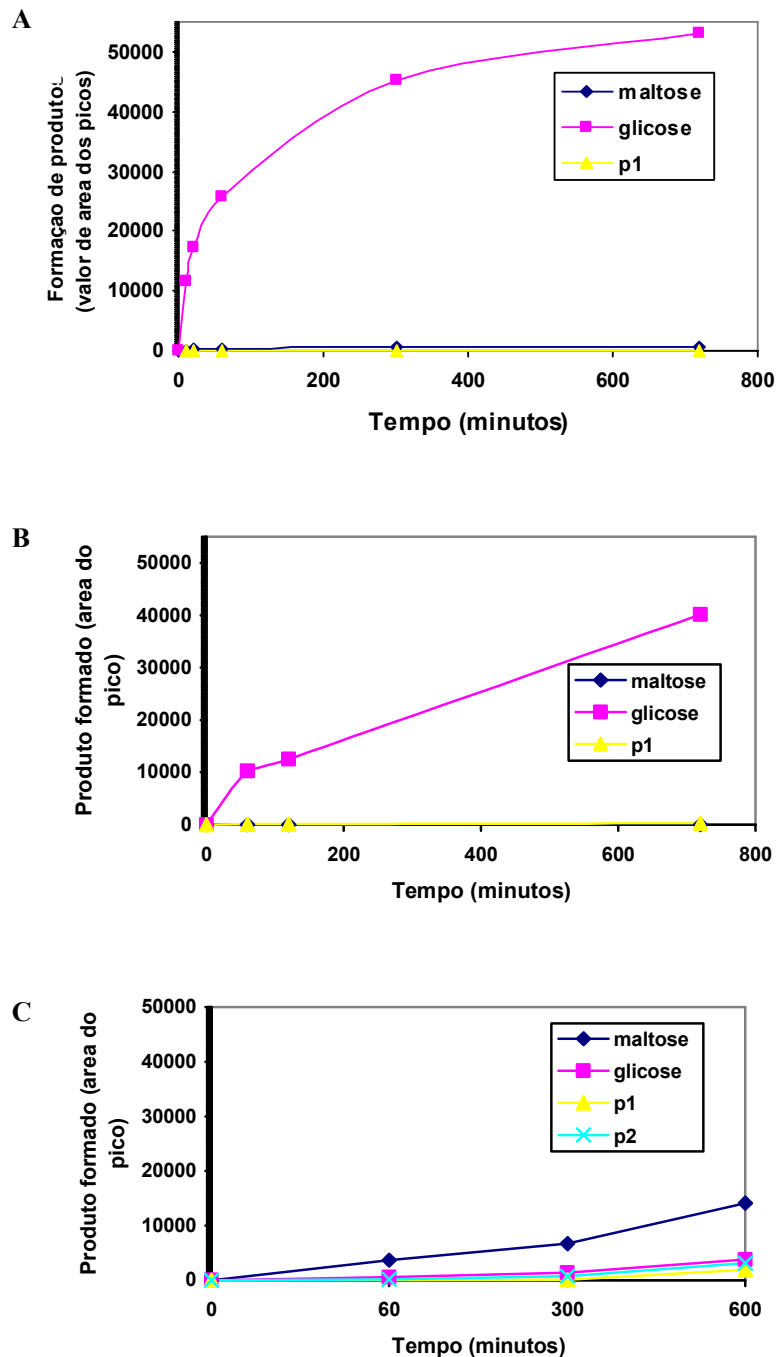


Figura 4.24. Formação de produtos de hidrólise do amido pelas amilases de *Neurospora crassa* solúvel (A) seu derivado glioxil-agarose 10BCL (B) e amilase solúvel de *Aspergillus orizae* (C), determinada por HPLC. Valores de formação dos produtos expressos como área dos picos (P1 = provável monossacáride de PM menor que glicose; P2 = oligossacárides de peso molecular maior que maltose)

4.2.1. Testes relativos às imobilizações utilizando-se a agarose sem concentração pré-definida.

Uma outra agarose, cuja forma de comercialização não especifica suas características de percentual de crosslink, foi também testada quanto a sua possibilidade de utilização e performance em comparação àquelas utilizadas e com grau de crosslink pré-definido. A utilização de tal agarose é de interesse por seu custo reduzido em relação às outras agaroses testadas.

No processo de preparo dos suportes de agarose após etapa de ativação esta é oxidada com periodato de sódio (vide Material e Métodos, item 3.2.4.1.), quando ocorre ruptura do grupo gliceril da agarose formando grupos glioxil. Sendo esta reação de oxidação com periodato uma reação estequiométrica, pode-se controlar tal reação, controlando-se o número de mols de periodato de sódio acrescentados para produção do suporte glioxil, chegando-se a um grau de grupos reativos no suporte de acordo com o desejado. Através da metodologia adotada, a concentração de periodato de sódio utilizada é calculada para que se chegue um grau de ativação final da agarose equivalente a 100 μ Mols de grupos reativos por mililitro de agarose (GUISÁN, 1997).

Sendo assim, buscou-se determinar a totalidade de grupos ativos disponíveis neste gel de agarose quando ativado. Para tanto foi utilizada solução contendo excesso de periodato de sódio (NaIO_4) para que todos os possíveis grupos reativos pudessem ser quantificados. O controle do processo foi realizado pela quantificação daquele periodato de sódio excedente que não reagiu, calculando-se então a diferença para a quantidade total de início. Desta forma, os resultados indicaram que o grau máximo de ativação desta agarose foi de 175,61

μ Mols de grupos reativos/ml de agarose ou 245,85 μ Mols de grupos reativos/g de agarose. O que a aproximaria mais de características da agarose 10BCL do que da agarose 4BCL, podendo inclusive ser preparada de forma a ser utilizada com grau de ativação equivalente a 100 μ Mols de grupos reativos por mililitro de agarose.

Na Tabela 4.7. foram reunidos dados referentes aos testes de imobilização das amilases de *Neurospora crassa* e *Aspergillus niger* em suporte glioxil preparado com esta agarose.

Tabela 4.7. Imobilização das amilases de *Neurospora crassa* e *Aspergillus niger* em suporte glioxil – agarose.

Carga de proteína inicial/ grama de suporte	Proteína imobilizada/ grama de gel	Atividade específica
<i>Amilase de Neurospora crassa</i>		
2,64 mg (100%)	430,4 μ g (16,3%)	1,98 μ Mols glic./min/ mg prot
503,5 μ g (100%)	224,6 μ g (44,6%)	5,17 μ Mols glic./min/ mg prot
122,9 μ g (100%)	64,2 μ g (52,2%)	4,27 μ Mols glic./min/ mg prot
59,29 μ g (100%)	37,2 μ g (62,8%)	5,81 μ Mols glic./min/ mg prot
<i>Glucoamilase de Aspergillus niger</i>		
4,34 mg (100%)	1,58 mg (36,4%)	0,113 μ Mols glic./min/mg prot
1,16 mg (100%)	146,4 μ g (12,6%)	0,354 μ Mols glic./min/ mg prot

Verifica-se que para cargas iniciais muito altas havia prejuízo nas capacidades catalíticas das duas amilases em relação ao substrato amido. No caso da amilase de *Neurospora crassa* optou-se em utilizar para os demais ensaios o derivado obtido com cerca de 224 µg de proteínas por grama de gel, por apresentar uma melhor atividade específica em comparação ao derivado contendo maior carga de proteínas, e por sua quantidade real de proteínas ligadas proporcionar uma maior atividade/ grama de suporte em relação aos de menor carga de enzima. Para a amilase de *Aspergillus niger* não foi possível testar cargas iniciais de proteínas mais baixas já que os derivados obtidos passavam a apresentar atividades extremamente baixas e de difícil detecção.

Observando-se os valores expressos na Tabela 4.8. verifica-se uma certa vantagem do derivado glioxil-agarose produzido com esta agarose em relação ao glioxil produzido com a agarose 10BCL para a amilase de *Neurospora crassa*, pois neste caso os valores de Km e Vmax (6,8 e 1,34, respectivamente) apresentaram-se melhores em relação aos valores anteriormente obtidos e apresentados na Tabela 4.5. (11,06 e 0,16, para Km e Vmax, respectivamente). Considerando-se o resultado calculado para a eficiência catalítica o ganho foi também mais expressivo, passando de 0,01 (vide Tabela 4.6.) para 0,20 (vide Tabela 4.8.). O mesmo não se pode afirmar para a glucoamilase de *Aspergillus niger*.

Tabela 4.8. Valores de Km e Vmax para os derivados glioxil-agarose.

Derivado glioxil	Km	Vmax	Vmax/Km
<i>Neurospora crassa</i>	6,80	1,34	0,20
<i>Aspergillus niger</i>	10,74	0,26	0,02

*Valores de Km expressos em mg amido/ml e de velocidade em μ Mols de glicose/minuto/mg de proteínas.

O pH ótimo para hidrólise do amido, deste derivado glioxil-agarose da amilase de *Neurospora crassa*, foi determinado e o resultado pode ser observado na Figura 4.25., onde verifica-se uma semelhança destes com aqueles da forma solúvel desta amilase (Figura 4.3.) sendo o pH 5,0, em tampão acetato de sódio, a melhor condição de hidrólise.

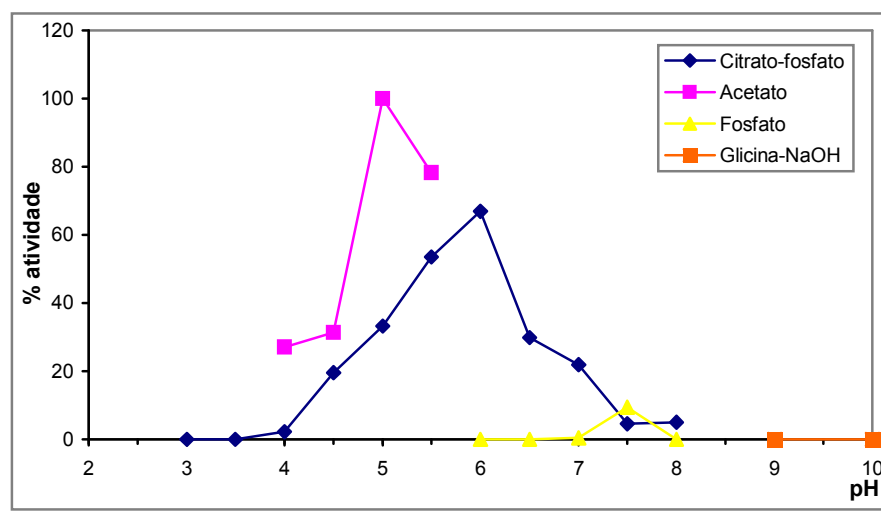


Figura 4.25. Efeito do pH na atividade do derivado de glioxil-agarose de amilase de *Neurospora crassa*.

Com relação à influência da temperatura do meio verifica-se que este derivado assemelha-se à forma solúvel com relação à temperatura ótima, que se manteve 60°C, como apresentado na Figura 4.26.

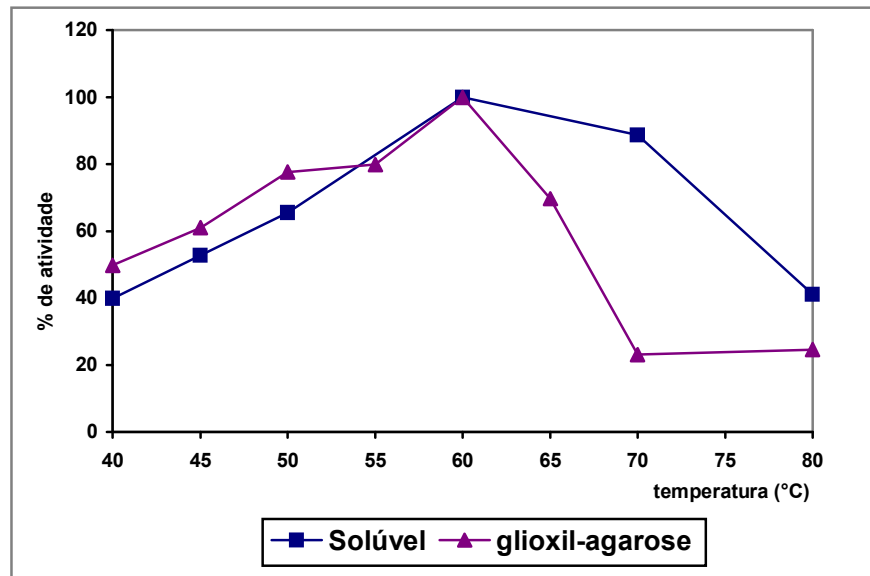


Figura 4.26. Efeito da temperatura na atividade da amilase solúvel de *Neurospora crassa* e derivado glioxil-agarose.

Um dado curioso é a observação novamente do surgimento de um estado de hiperativação com relação a esta amilase quando este derivado glioxil-agarose é submetido a incubação a 60°C (vide Figura 4.27.) embora desta vez sendo detectado logo nos primeiros trinta minutos de incubação. Diferentemente do apresentado pelo derivado glioxil-agarose 10BCL (Figura 4.13.) este não foi capaz de manter sua atividade total frente à incubação, apresentando uma redução em cerca de 50% de sua atividade após 4 horas. Quando o mesmo derivado foi incubado a 70°C, assim como já verificado para o derivado 10BCL, não se detectou um estado de hiperativação inicial.

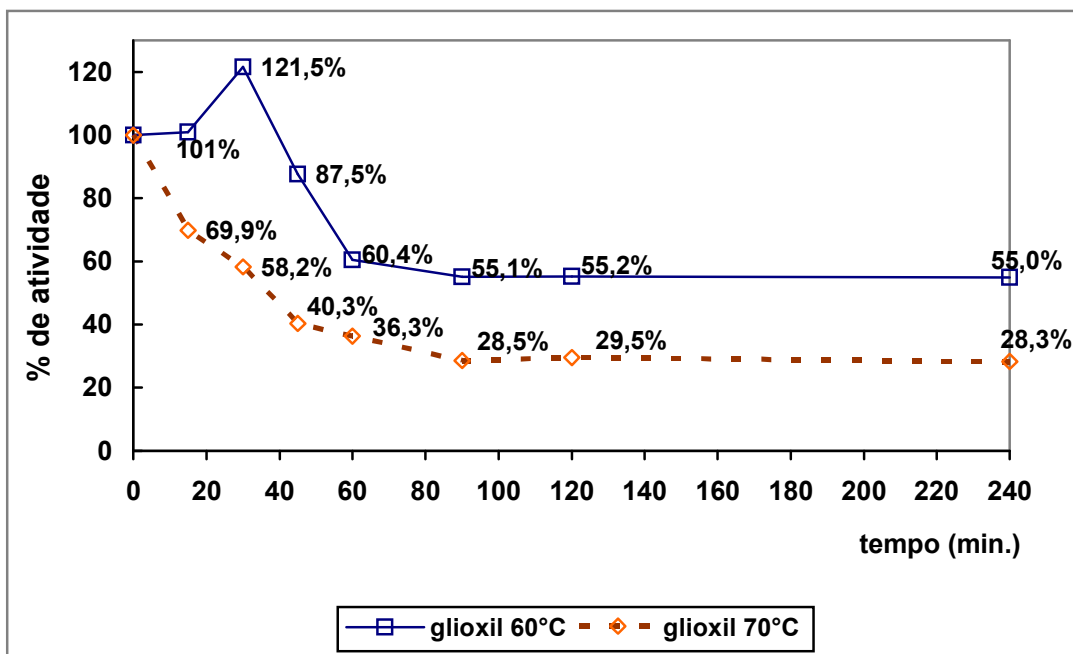


Figura 4.27 Estabilidade dos derivados glioxil-agarose da amilase de *Neurospora crassa* após incubação a 60°C e pH 5,0. Atividade determinada com Amido 1%.

Quando incubado em diferentes pHs por 30 minutos a 60°C, novamente verificamos uma tendência do derivado glioxil-agarose de se destacar em relação à enzima solúvel em meios mais alcalinos, como se observa na Figura 4.28.

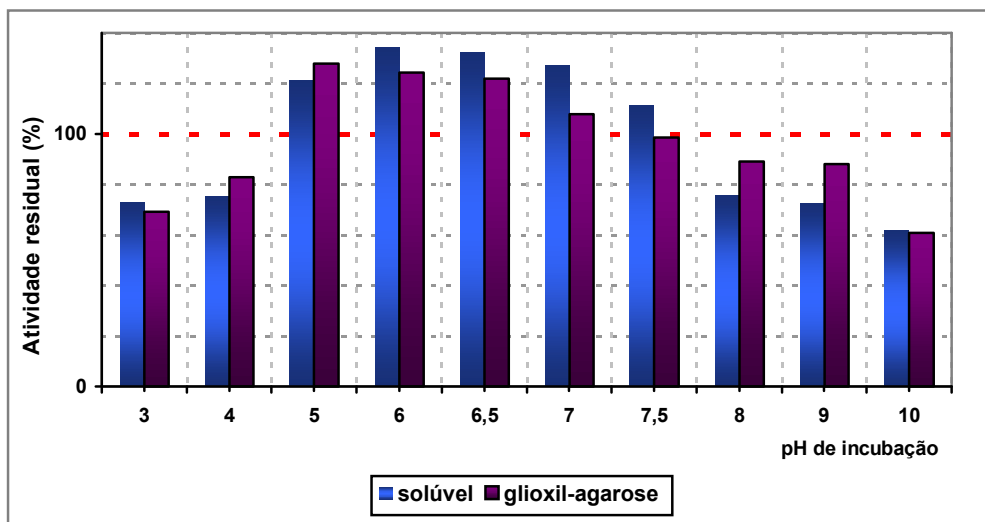


Figura 4.28. Atividade residual da amilase de *Neurospora crassa* solúvel e seu derivado gloxil-agarose, após 30 minutos de incubação, 60°C, em diferentes valores de pH. Valores percentuais em relação à atividade da enzima não incubada (100%).

Este derivado gloxil-agarose também foi ensaiado quanto sua possibilidade de reutilização na hidrólise do amido, como observa-se na Figura 4.29.

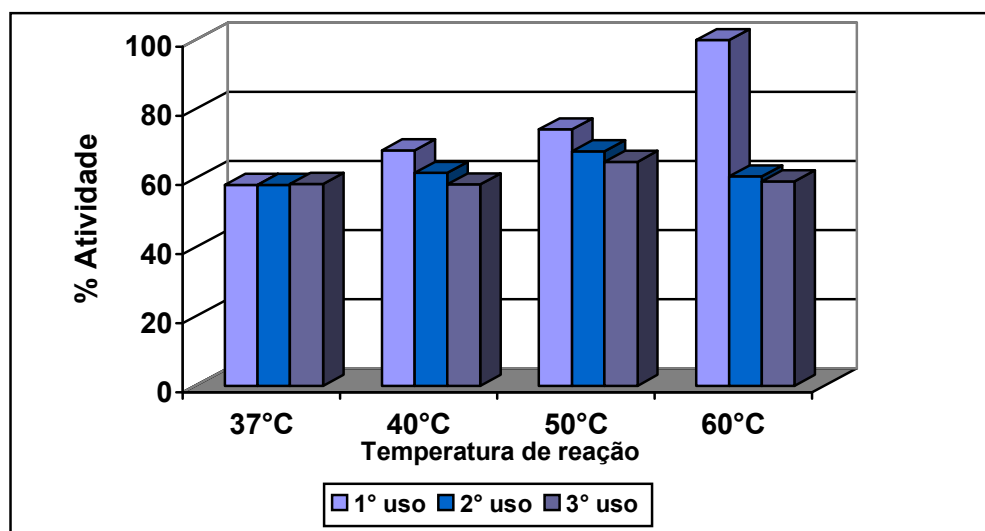


Figura 4.29. Percentuais de atividade do derivado gloxil-agarose de amilase de *Neurospora crassa*, em ciclo de três utilizações. Atividade sobre substrato amido.

Este derivado glioxil-agarose manteve-se ativo durante os três ciclo de utilização testados, para hidrólise do amido (Figura 4.29.). Neste ensaio quatro temperaturas de reação, 37°C, 40°C, 50°C e 60°C foram testadas e, de acordo com os resultados, verifica-se a a manutenção da atividade do derivado, embora com algumas alterações em sua eficiência a cada ciclo.

5. CONCLUSÕES

A amilase de *Neurospora crassa* em sua forma solúvel apresentou características interessantes quanto à estabilidade à temperatura e pH, quando comparada às amilases comerciais abordadas, possibilitando diferentes ensaios de imobilização e produção de maior variedade de derivados, uma vez que foi possível sua imobilização em todos os suportes aqui testados, a saber: suporte glioxil agarose (4BCL, 10BCL, e agarose sem crosslink definido), MANAE-agarose, MANAE-agarose com adição de glutaraldeído, BrCN-agarose, Eupergit (epóxido) e Sepabeads (epóxido).

Os derivados de amilase de *Neurospora crassa* preparados com suporte glioxil-agarose 10BCL, seguido pelo derivado preparado com suporte Eupergit foram os mais destacados quanto à estabilidade térmica. Apresentaram-se inclusive mais estáveis em relação aos derivados das amilases comerciais abordadas.

Além da estabilidade à temperatura destacada tais derivados foram capazes de passar por ciclos de reuso, sem apresentarem perdas significativas em suas capacidades catalíticas.

Embora existam indicativos de que ocorram problemas de difusão do substrato amido com relação à estrutura dos suportes, estes problemas não chegam a desqualificar os derivados impedindo-os de atuar sobre o amido.

A agarose comercial testada, sem grau de crosslink pré-definido, apresentou desempenho favorável à produção dos derivados, assemelhando-se

ao desempenho observado para a agarose 10BCL e mostrando-se uma alternativa mais econômica à produção destes derivados.

Em conjunto, as informações adquiridas pelo presente estudo indicam que a amilase de *Neurospora crassa* apresenta-se como promissora em relação às amilases de mercado aqui estudadas, tanto em sua forma solúvel quanto no que se relaciona a produção de derivados ativos e estabilizados.

6. REFERÊNCIAS

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, v. 39, n. 2, p. 23-39, 1998.

BICKERSTAFF, G. E. (Ed.). *Immobilization of enzymes and cells*. New Jersey: Humana, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRYJAK, J. Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilization on acrylic carriers. *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, p. 347-355, 2003.

CARPIO, C. et al. Bone-bound enzymes for food industry application. *Food Chemistry*, v. 68, p. 403-409, 2000.

CHANG, M. Y.; JUANG, R. S. Activities, stabilities and reaction kinetic of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 75-82, 2005.

CHERNUKHINI, V.; KLENOVA, E. M. A method of immobilization on the solid support of complex and simple enzymes retaining their activity. *Analytical Biochemistry*, v. 208, p. 178-181, 2000.

CORDEIRO, C. A.; MARTINS, M. L. L.; LUCIANO, A. B. Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, p. 57-61, 2002.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 7, p. 181-189, 1999.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; COWAN, D. A.; WOOD, A. N. Hyperstabilization of a thermophilic esterase by multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 366-372, 1995.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. *Enzymes and Microbial Technology*, v. 17, p. 517-523, 1995.

GRAZU, V. et al. Novel bifunctional epoxy/thiol-reactive support to immobilize thiol containing proteins by the epoxy chemistry. *Biomacromolecules*, v. 4, p. 1495-1501, 2003.

GUISÁN, J. M. et al. Immobilization of enzymes on glyoxyl-agarose: strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment. *Methods in Biotechnology-Immobilization of Enzymes and Cells*, p. 289-298, 1997.

GUZMÁN-MALDONADO, H.; PAREDES-LÓPEZ, O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v. 35, n. 5, p. 373-403, 1995.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, v. 48, p. 422-427, 1972.

JANECEK, S.; SVENSSON, B.; MACGREGOR, E. A. Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of the α -amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. *European Journal Biochemistry*, v. 270, p. 635-645, 2003.

KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes – learning from past successes and failures. *Tibtechnology*, v. 11, p. 471-478, 1993.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 10, p. 157-176, 2000.

KEATING, L.; CATHERINE, K.; FOGARTY, W. Mechanism of action and the substrate-dependent pH maximum shift of the α -amylase of *Bacillus coagulans*. *Carbohydrate Research*, v. 309, p. 311-318, 1998.

LADERMAN, K. A. et al. The purification and characterization of an extremely thermostable α -amylase from the hyperthermophilic *Archaeobacterium Pyrococcus furiosus*. *Journal Biological Chemistry*, v. 268, n. 32, p. 24394-24401, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T₄. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEONEL, M.; CABELLO, C. Hidrólise enzimática do farelo de mandioca: glicose e álcool. In: FRANCO, C. et al. *Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca*. Campinas: Fundação Cargill, 2001. v. 4, 224 p.

LIM, L. H.; MACDONALD, D. G.; GORDON, A. H. Hydrolysis of starch particles using immobilized barley α -amylase. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 53-62, 2003.

LOPEZ-GALLEGO, F. et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *Journal of Biotechnology*, n. 116, p. 1-10, 2005.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MALDONADO-GUZMÁN, H.; LÓPEZ-PAREDES, O. Amylolitic enzymes and products derived from starch: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 35, n. 5, p. 373-403, 1995.

MATEO, C. et al. Epoxy sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnology Progress*, v. 18, p. 639-634, 2002.

MATEO, C. et al. Epoxy-Amino Groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules*, v. 4, p. 772-777, 2003.

MATEO, C. et al. Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of Physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules*, v. 1, p. 739-745, 2000.

MATEO, C. et al. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 509-515, 2000.

-
- MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 2, p. 274-280, 2006.
- MATEO, C. et al. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 456-462, 2005.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- NIELSEN, J. E.; BORCHERT, T. V.; VRIEND, G. The determinants of α -amylase pH-activity profiles. *Protein Engineering*, v. 14, n. 7, p. 505-512, 2001.
- PANDEY, A. et al. Advances in microbial amylases. Review. *Biotechnology Applied Biochemistry*, v. 31, p. 135–152, 2000.
- PANDYA, P. H. et al. Studies on the activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous sílicas. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 77, p. 67-77, 2005.
- PESSELA, B. C. C. et al. One-step purification, covalent immobilization and additional stabilization of a thermophilic poly-his-tagged β -galactosidase from *thermos* sp. strain T2 by using novel heterofunctional chelate-epoxy sephabeads. *Biomacromolecules*, v. 4, p. 107-113, 2003.
- PSZCZOLA, D. E. From soybean to spaghetti: the broadening use of enzymes. *Food Technology*, v. 55, p. 54-64, 2001.
- REDDY, N. S.; ANNAPOORNA, N.; RAO, K. R. S. An overview of the microbial α -amylase family. *African Journal of Biotechnology*, v. 2, p. 645-648, 2003.
- REILLY, P. J.; COUTINHO, P. M. Glucoamylase structural, functional and evolutionary relationships. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, v. 29, p. 334-347, 1997.
- SPINELLI, L. B. B. et al. Biochemical characterization of glucoamylase from the hyperproducer exo-1 mutant strain of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 138, p. 173-177, 1996.

SUMERLY, E. et al. Hidrólise do amido. In: FRANCO, C. et al. Cultura de tuberosas amiláceas Latino Americanas. Campinas: Fundação Cargill, 2001. v. 2, 224 p.

TANYOLAC, D.; YURUKSOY, B. I.; OZDURAL, A. H. Immobilization of a thermostable α -amylase, Termamyl, onto nitrocellulose membrane by Cibacron Blue F3GA dye binding. *Biochemistry Engeneering Journal*, v. 2, p. 179-186, 1998.

TORRES, R. et al. Reversible immobilization of glucoamylase by ionic adsorption on Sepabeads coated with polyethyleneimine. *Biotechnology Progress*, v. 20, p. 1297-1300, 2004.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Analytical Clinical Biochemistry*, v. 6, p. 24-27, 1969.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C. et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal Biotechnology*, v. 94, p. 137-155, 2002.