

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Imobilização de amilase comercial em pó de
sabugo de milho visando à hidrólise de amido**

Isabela da Costa Luchiari

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Alimentos e
Nutrição para obtenção do título de
Mestre em Alimentos e Nutrição.

Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin
Coorientador: Prof. Dr. Rubens Monti

Araraquara

2019

Imobilização de amilase comercial em pó de sabugo de milho visando à hidrólise de amido

Isabela da Costa Luchiari

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Alimentos e
Nutrição para obtenção do título de
Mestre em Alimentos e Nutrição.

Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Masarin
Coorientador: Prof. Dr. Rubens Monti

Araraquara

2019

L936i

Luchiari, Isabela da Costa.

Imobilização de amilase comercial em pó de sabugo de milho visando à hidrólise de amido / Isabela da Costa Luchiari. –

Araraquara: [S.n.], 2019.

87 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração em Ciências dos Alimentos.

Orientador: Fernando Masarin.

Coorientador: Rubens Monti.

1. Glucoamilase. 2. α -amilase. 3. Pó de sabugo de milho. 4. Imobilização de enzimas. 5. Hidrólise enzimática de amido. I. Masarin, Fernando, orient. II. Monti, Rubens, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

CAPES: 33004030055P6

Esta ficha não pode ser modificada

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter posto anjos durante toda minha caminhada. Em cada etapa e em cada dificuldade fui auxiliada por amigos e professores.

Agradeço à minha família por estar ao meu lado a cada conquista, pela participação concreta e efetiva nesta realização, que é nossa!

Ao Prof. Dr. Fernando Masarin pela oportunidade.

À Profa. Dra. Ariela Veloso de Paula que contribuiu imensamente não só para a concretização deste trabalho, mas também para meu crescimento profissional.

Aos membros da Banca Examinadora da defesa e da qualificação pela disponibilidade de tempo e atenção para a finalização deste trabalho.

À Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de ciências Farmacêuticas (FCF) por disponibilizar recursos e instalações para a realização dos experimentos.

Aos técnicos e colegas do Laboratório pelo auxílio e companheirismo durante toda minha jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Introdução: A utilização de enzimas em tecnologia de alimentos é considerada um processo ambientalmente adequado, além de fornecer um bioproduto com qualidade superior. As amilases são enzimas que hidrolisam o amido, formando oligossacarídeos e glicose. A hidrólise enzimática do amido tem a vantagem de não formar compostos indesejados, empregar temperaturas mais amenas e não causar problemas de corrosão em equipamentos. Uma das principais aplicações da hidrólise enzimática de amido é na produção de xarope de glicose. No entanto, para aplicações industriais, é possível empregar enzimas imobilizadas, uma vez que a técnica de imobilização promove maior estabilização à enzima com relação aos efeitos da temperatura, além de permitir sua reutilização. Diferentes tipos de suportes podem ser utilizados para imobilização de enzimas, dentre eles, o pó de sabugo de milho, um resíduo agroindustrial. **Objetivo:** Avaliar a imobilização de amilases comerciais em pó de sabugo de milho ativado e averiguar o efeito da aplicação do derivado em resposta à processos de hidrólise de amido. **Resultados:** A glucoamilase e a α -amilase, ambas em suas formas livres, apresentaram temperaturas de máxima atividade de 40°C e 50°C, respectivamente. O valor de pH ótimo da glucoamilase e da α -amilase foi de 5. A enzima glucoamilase apresentou maior estabilidade à temperatura quando comparado a enzima α -amilase, na forma livre e por este motivo foi realizada apenas a imobilização covalente unipontual da enzima glucoamilase em pó de sabugo de milho. A imobilização da referida enzima foi avaliada em diferentes pHs (5 e 7). No entanto, a análise dos resultados evidenciou que não houve diferença no perfil de rendimento de imobilização. O pH 5 foi selecionado para continuidade dos estudos, e a enzima glucoamilase foi imobilizada em pó de sabugo de milho, apresentando um rendimento de imobilização de 95%. A enzima glucoamilase na sua forma imobilizada foi caracterizada em relação aos valores ótimos culminado em pH=5 e temperatura de 60°C. Com relação à estabilidade térmica, a enzima imobilizada apresentou boa estabilidade nas temperaturas de 30°C e 40°C, semelhantemente aos resultados obtidos para a forma livre. O biocatalisador imobilizado foi aplicado em reações de hidrólise do amido, operado em modo batelada. Em 8h de reação (50°C e pH5), foram obtidos valores de conversões de amido em glicose de 46% e 55%, empregando-se a glucoamilase em suas formas livre e imobilizada, respectivamente. O perfil de conversão de amido em glicose em função do tempo, foi semelhante, independentemente se a enzima estava livre ou imobilizada. **Conclusão:** A glucoamilase comercial imobilizada em pó de sabugo de milho apresentou potencial para hidrolisar o amido em glicose, podendo ser aplicada em processos industriais.

Palavras-chave: Glucoamilase; α -amilase; Pó de sabugo de milho; Imobilização de enzimas; Hidrólise enzimática de amido.

Abstract

Introduction: The use of enzymes in food technology is considered an environmentally appropriate process, in addition to providing a bioproduct with superior quality. Amylases are enzymes that hydrolyze starch, forming oligosaccharides and glucose. Enzymatic hydrolysis of starch has the advantage of not forming unwanted compounds, employing milder temperatures and not causing corrosion problems in equipment. One of the main applications of enzymatic hydrolysis of starch is in the production of glucose syrup. However, for industrial applications, it is possible to employ immobilized enzymes, since the immobilization technique promotes greater stabilization of the enzyme with respect to the effects of temperature, in addition to allowing its reuse. Different types of supports can be used to immobilize enzymes, among them, corn cob powder, an agro-industrial residue. **Objective:** To evaluate the immobilization of commercial amylases in activated corn cob powder and to investigate the effect of applying the derivative in response to starch hydrolysis processes. **Results:** Glucoamylase and α -amylase, both in their free forms, showed maximum activity temperatures of 40 °C and 50 °C, respectively. The optimal pH value of glucoamylase and α -amylase was 5. The enzyme glucoamylase showed greater temperature stability when compared to the enzyme α -amylase, in the free form and for this reason, only one-point covalent immobilization of the enzyme glucoamylase was performed. corncob powder. The immobilization of this enzyme was evaluated at different pHs (5 and 7). However, the analysis of the results showed that there was no difference in the immobilization income profile. PH 5 was selected to continue the studies, and the enzyme glucoamylase was immobilized in corncob powder, with an immobilization yield of 95%. The enzyme glucoamylase in its immobilized form was characterized in relation to the optimum values culminating at pH = 5 and temperature of 60°C. Regarding thermal stability, the immobilized enzyme showed good stability at temperatures of 30°C and 40°C, similarly to the results obtained for the free form. The immobilized biocatalyst was applied in starch hydrolysis reactions, operated in batch mode. In 8h of reaction (50°C and pH5), values of starch to glucose conversions of 46% and 55% were obtained, using glucoamylase in its free and immobilized forms, respectively. The conversion profile of starch to glucose as a function of time was similar, regardless of whether the enzyme was free or immobilized. **Conclusion:** Commercial glucoamylase immobilized in corncob powder showed the potential to hydrolyze starch into glucose and can be applied in industrial processes.

Keywords: Glucoamylase; α -amylase; Corn cob powder; Enzyme immobilization; Enzymatic hydrolysis of starch.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVO	12
2.1	Objetivo geral	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	Hidrólise enzimática	13
3.2	Composição e estrutura química do amido	15
3.3	Fontes mais comuns de amido para a indústria	18
3.4	Enzimas de interesse comercial para hidrólise de amido	20
3.5	Imobilização de enzimas	21
3.6	Suportes para imobilização de enzimas	25
3.6.1	Procedimentos de ativação do derivado lignocelulósico para imobilização de enzimas por ligação covalente do tipo unipontual	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	Determinação da atividade enzimática nos preparados enzimáticos comerciais	31
4.2	Caracterização das enzimas na forma livre e imobilizada	33
4.2.1	Temperatura de máxima atividade	33
4.2.2	pH de máxima atividade	33
4.2.3	Estabilidade térmica	34
4.2.4	Estabilidade ao pH	34
4.3	Determinação de proteínas totais nos preparados enzimáticos comerciais	35
4.3.1	Análise por SDS-PAGE de enzimas glucoamilase comercial	35
4.4	Pré-tratamento térmico e alcalino do pó de sabugo de milho	36
4.5	Funcionalização do suporte de pó de sabugo de milho com glutaraldeído	36
4.6	Imobilização unipontual de glucoamilase	37
4.7	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)	39
4.8	Avaliação da hidrólise enzimática do amido	39
4.9	Quantificação e elaboração de curva analítica para determinação de malto-oligossacarídeos (MOS) por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Efeito da temperatura e do pH nas atividades amilolíticas das enzimas glucoamilase e α -amilase em suas formas livres	41
5.2	Avaliação da estabilidade térmica e ao pH das enzimas α -amilase e glucoamilase em suas formas livres	46
5.2.1	Avaliação de imobilização de glucoamilase em pó de sabugo de milho	51
5.2.2	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR) do derivado enzimático	56
5.3	Efeito da temperatura e do pH na atividade amilolítica da enzima glucoamilase imobilizada em pó de sabugo de milho	57

5.4	Avaliação da estabilidade térmica da enzima glucoamilase imobilizada em pó de sabugo de milho	60
6	AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AMIDO POR GLUCOAMILASES.....	65
6.1	Avaliação da separação dos malto-oligossacarídeos (MOS) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	65
7	CONCLUSÃO	69
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	69
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
10	APÊNDICES.....	81

1 INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos, as enzimas são utilizadas de modo empírico em suas aplicações, seja no âmbito alimentício ou para fins curativos. A princípio, acreditava-se que as enzimas atuassem exclusivamente *in vivo*, no entanto, com os avanços tecnológicos e científicos iniciados em meados do século XX as enzimas ganharam uma nova importância: a aplicação em produtos e processos industriais (1).

O processo industrial de hidrólise de amido inicialmente aplicava a técnica conhecida como hidrólise ácida, que apesar de ser considerado um processo mais rápido, apresenta algumas desvantagens, dentre elas, pode-se citar a baixa eficiência, corrosão de equipamentos, condições de processo mais severas (principalmente temperatura e pressão), além de não ser considerado um processo mais ecológico, já que há geração de produtos de degradação. Entretanto, nos tempos atuais a indústria vem aplicando a técnica de hidrólise de amido através de catalisadores biológicos (enzimas, especificamente amilases), que apresentam uma maior eficiência, as condições de processo são mais brandas e não há formação de subprodutos indesejáveis e corrosão de equipamentos (1).

Na década de 1830, cientistas franceses isolaram do malte da cevada por meio de um complexo enzimático capaz de hidrolisar o amido, e tempos depois, em 1890, nos Estados Unidos, o bioquímico Jokichi Takamine iniciou a produção comercial de uma amilase de origem fúngica, que posteriormente foi patenteado em diversos países. Tal descoberta proporcionou grandes mudanças em diversos setores industriais, podendo-se definir como principais aplicações à produção de xarope de glicose, que além de ser amplamente utilizado como adoçante também pode servir de substrato para fermentação e ser convertido em etanol ou ácidos orgânicos, ou ainda ser formulada como glicose cristalina (2). Na década de 1950,

George W. Beadle e Edward L. Tatum comprovaram a hipótese de que um gene tem a capacidade de codificar a síntese de uma única enzima por meio de ensaios com o fungo *Neurospora crassa*. As principais amilases utilizadas para fins industriais, principalmente na produção de hidrolisados de amidos, são provenientes dos seguintes microrganismos: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Aspergillus oryzae* (3).

Contudo, o emprego de biocatalisadores na indústria é limitado devido ao alto custo. Assim, surge a necessidade de se imobilizar as enzimas, sendo que uma enzima imobilizada pode ser definida como uma enzima fisicamente confinada ou localizada em uma determinada região do espaço com retenção de suas atividades catalíticas e que podem ser reutilizadas (4). Esta técnica foi consolidada em 1972, data da primeira imobilização de uma enzima destinada a aplicações comerciais. Em 1982 houve à intensificação de estudos de produção de enzimas associados a organismos geneticamente modificados (5). As enzimas imobilizadas em suportes apresentam algumas vantagens: o biocatalisador pode ser reutilizado por diversas vezes; maior facilidade no processo de recuperação do biocatalisador, já que o derivado é insolúvel ao meio reacional; aplicação em biorreatores contínuos; além da vantagem de proporcionar maior estabilidade, mantendo com maior facilidade suas características bioquímicas e as condições externas, como pH e temperatura (4,6).

Entretanto, deve-se levar em consideração alguns fatores importantes como a avaliação da viabilidade econômica do emprego de enzimas, que pode estar diretamente relacionado com o baixo consumo de material e energia, além de evitar a geração de possíveis resíduos industriais e de emissões de poluentes. Essas características revelam um elevado potencial com relação a empregabilidade de

processos biocatalíticos em escala comercial. Estudos mostram que o mercado global de enzimas vem crescendo, por exemplo, em 2010 que ultrapassou US\$ 3,3 bilhões, sendo o maior volume direcionado às enzimas do tipo hidrolases. Neste mesmo ano, constatou-se que o emprego de biocatalisadores predominantemente para fins farmacêuticos e de pesquisa proporcionou um movimento anual de aproximadamente US\$ 2,4 bilhões (7).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a imobilização de enzima amilase comercial em pó de sabugo de milho ativado e averiguar o efeito da aplicação do derivado em resposta à processos de hidrólise de amido.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar enzimas amilolíticas comerciais quanto aos valores ideais de pH e temperatura, além da estabilidade térmica e ao pH;
- Selecionar a amilase comercial com maior potencial de imobilização com base na caracterização realizada anteriormente e imobilizá-la em pó de sabugo de milho previamente ativado;
- Caracterizar a enzima comercial imobilizada anteriormente, quanto aos valores ideais de pH e temperatura, além da estabilidade térmica e ao pH;
- Avaliar o potencial de hidrólise de amido com a enzima livre e imobilizada anteriormente.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Hidrólise enzimática

Em geral, as enzimas são proteínas com atividade biológica capazes de catalisar reações bioquímicas. As enzimas tem a característica de manter sua atividade original de forma significativa em vários ciclos sucessivos de reuso dependendo da enzima utilizada e das condições do meio, o que as tornam especialmente interessantes para a tecnologia e segurança de alimentos devido a possível reprodutibilidade de processos metabólicos considerados sustentáveis e que irão contribuir para a obtenção de alimentos de melhor qualidade, apesar de exigir uma série de condições distintas e muito específicas de atuação e ter um custo de processo mais elevado, devido ao alto valor agregado da enzima e o tempo de hidrólise, que é mais elevado quando comparado com a hidrólise ácida (8).

Desta forma, a implementação da biotecnologia industrial oferece vantagens significativas (por ser considerado um recurso renovável), quando comparado com tecnologias tradicionais que utilizam produtos químicos (petróleo, gás natural, dentre outros) (9).

A hidrólise enzimática do amido se inicia com a etapa de liquefação onde ocorre sua completa gelatinização, essencial para facilitar a ação da enzima sob a molécula de amido. Posteriormente é realizada a determinação do grau de dextrinização para evitar o efeito de retrogradação (10), que pode ocorrer quando a massa de amido é resfriada é a precipitação e/ou formação de um gel levando a reassociação das moléculas de amido (11).

Nesta etapa do processo é de extrema importância monitorar algumas variáveis como a temperatura, o pH, a concentração de cálcio e a porcentagem de

matéria seca, além do acompanhamento do grau de hidrólise, que está diretamente relacionado com a composição dos produtos resultantes na etapa de sacarificação. O acompanhamento da hidrólise do amido pode ser realizado através do método do teste do amido, que mede o equivalente em dextrose do hidrolisado resultante. Este hidrolisado, em contato com iodo apresenta uma cor azul, sendo que a intensidade da coloração obtida está relacionada diretamente com o teor de dextrose formada. Após a etapa liquefação do amido, é realizada a sacarificação, onde os oligossacarídeos oriundos da etapa de liquefação são hidrolisados gerando um xarope com um alto teor de açúcares de baixo peso molecular. O processo de sacarificação tem influência na composição do xarope produzido que está diretamente relacionada com o grau de hidrólise. Assim, como na etapa de hidrólise, o controle do processo de sacarificação deve ser realizado pelo monitoramento de fatores como temperatura, pH, porcentagem de matéria seca e grau de conversão em produto (12), além da morfologia do amido, granulometria, porosidade e teor de amilose. Quando um grânulo pequeno tem uma maior área por volume de sólido sua hidrólise ocorre mais rapidamente do que em um grânulo de maior tamanho e com uma área específica menor (13).

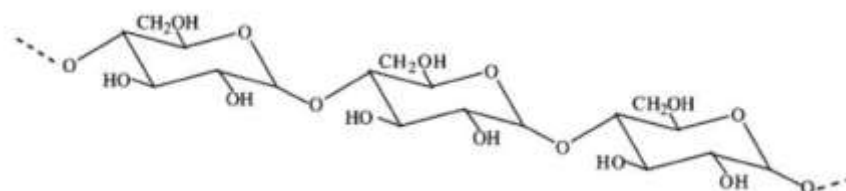
A hidrólise ácida tem a vantagem de ser um processo mais rápido e de menor custo, pois a eficiência da hidrólise enzimática de amido para formação de glicose é considerada inferior quando comparado ao emprego da hidrólise ácida, no entanto, há alguns problemas inerentes ao processo ácido que também devem ser levados em consideração na avaliação do custo-benefício. Por exemplo: o emprego da hidrólise ácida, acarreta a formação de produtos de degradação a partir do substrato e sérios problemas de corrosão em equipamentos, além de haver a necessidade de uma etapa de neutralização pós-hidrólise (1).

3.2 Composição e estrutura química do amido

O amido destaca-se diante dos demais carboidratos pelo fato de ser considerado reserva alimentar dos vegetais e por ser constituinte da maior parte dos carboidratos digestíveis da dieta humana (8).

Os diferentes tipos de amido são encontrados na natureza na forma de grânulos, que são formados por dois polímeros principais, conhecidos como amilose e amilopectina. A amilose tem uma cadeia linear composta de unidades D-glicopiranosil conectadas por ligação do tipo α -1-4, sendo que pode conter nessas moléculas algumas ligações do tipo α -1-6 (Figura 1). Todavia, a maioria desses pontos de ramificação são separados por posições bastante espaçadas, fazendo com que as propriedades da amilose sejam determinadas pelas características da cadeia linear (13,14).

Figura 1. Ilustração da estrutura química da amilose.

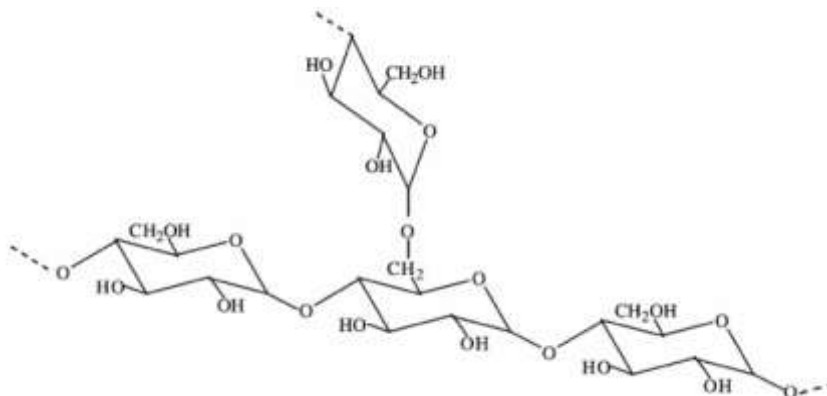


Adaptado de Muralikrishna e Nirmala (MURALIKRISHNA; NIRMALA, 2005) (15).

Já a amilopectina se caracteriza por ser uma molécula de alto peso molecular e elevado grau de ramificação, sendo que este polímero constitui aproximadamente 75 % da composição dos amidos comuns (

Figura 2) (11).

Figura 2. Ilustração da estrutura química da amilopectina.



Adaptado de Muralikrishna e Nirmala (MURALIKRISHNA; NIRMALA, 2005) (15).

Os grânulos de amido quando aquecidos e hidratados com água sofrem um processo denominado de gelatinização. Este fenômeno faz com que o amido inche e perca sua conformação nativa, resultando na perda de compostos solúveis de amilose e amilopectina da estrutura. O grau de gelatinização depende de algumas variáveis, como a temperatura, a relação amido/água (massa/volume), do tipo de grânulo e o grau de heterogeneidade da morfologia dos grânulos, sendo que essas propriedades são específicas de cada fonte de amido (16). O aquecimento contínuo dos grânulos em excesso de água resultará no inchaço dos grânulos e na perda de compostos solúveis natural de compostos solúveis presentes até ocorrer a ruptura total da estrutura granular. O aquecimento de uma suspensão de amido resulta na obtenção de uma “pasta de amido”, onde ocorrerá a penetração de água entre as cadeias, gerando um rompimento das ligações químicas e criando assim camadas de hidratação em torno das moléculas (11).

O amido tem uma grande importância tecnológica. Em processos alimentícios, o amido pode conferir textura aos alimentos, sendo utilizado também como espessante, estabilizante e geleificante. Entretanto, o amido possui baixa resistência a processamentos como cisalhamento, resistência à temperatura e efeito

de sinérese. Essas características limitam uma maior empregabilidade industrial. Por este motivo, foram desenvolvidos métodos capazes de alterar propriedades funcionais e físico-químicas do amido. Os amidos modificados podem ser uma alternativa econômica com relação a outros hidrocolóides que conferem menor qualidade e disponibilidade (17).

Os amidos modificados podem ser obtidos por processos físicos, químicos e enzimáticos. A modificação física ocorre pelo inchaço do amido “nativo” por meio de aquecimento em solução de água e álcool. A água e a elevada temperatura promovem a gelatinização dos grânulos, já o álcool inibe o inchaço dos grânulos de amido fazendo com que ocorra alterações nas regiões cristalinas. Este processo de modificação física do amido torna possível a dissolução do amido em água fria (18).

A modificação química ocorre por meio da utilização de álcalis, que são compostos alcalinos empregados como catalisadores, álcoois e um agente modificador. Os grupos hidroxila reativos do amido são ativados pelo alcalino e substituídos pelo grupo funcional do agente modificador presente, alterando as propriedades desse amido. Por exemplo, no setor de panificação os amidos modificados são empregados como espessantes para recheios e coberturas de tortas e bolos; em sopas desidratadas, o amido modificado é utilizado para melhorar a textura do produto final e também são usados como espessantes em caldos e sopas instantâneas; em condimentos e temperos o amido modificado está presente em ketchup, o molho shoyo, molho de tomate, caldo de carne desidratado, entre outros, para que tenham melhor estabilidade no processamento a quente e se obtenha melhor textura no produto final; em sorvetes, os amidos modificados são usados como estabilizantes e espessantes, com excelentes resultados em baixas temperaturas (19).

O processo de hidrólise enzimática empregado promove a conversão do amido em glicose. No entanto, apesar de proporcionar melhores condições ambientais, há um grande desafio, já que são necessárias várias etapas para que ocorra a hidrólise do amido bruto, que consiste na difusão e adsorção da enzima na superfície do grânulo de amido, para posteriormente ocorrer à catálise (20).

3.3 Fontes mais comuns de amido para a indústria

O amido de batata tem grande destaque por resultar em géis de cor clara e sabor neutro. Essa clareza adquirida pelos géis está relacionada com a grande quantidade de ésteres de fosfato presente na cadeia de amilopectina. Outra característica a ser considerada é o comportamento reológico do amido, que está diretamente relacionado com o tamanho e grau de pureza dos grânulos, comprimento das cadeias de amilose e amilopectina e capacidade de troca de cátions (21).

O bagaço de mandioca (considerado uma fécula) é considerado um subproduto sólido que normalmente é descartado nos rios ou em ambientes inadequados, resultando no aumento da carga orgânica. Este subproduto é obtido do processo de trituração e lavagem com água corrente, esse material apresenta cerca de 47% de amido e 43% de fibras, sendo que o amido remanescente que não foi removido pelo processo de lavagem bem como as fibras constitui a maior parte do bagaço (22). O milho é composto pelo endosperma, gérmen, pericarpo e a ponta seca do grão. No endosperma, encontram-se os carotenoides, enquanto no gérmen, concentra-se quase que a totalidade de lipídios. O pericarpo é constituído de hemicelulose (67%) e celulose (23%), bem como a ponta seca do grão, que é considerada a menor estrutura do grão (2,0%) responsável pela junção do grão ao

sabugo. O grão de milho tem uma massa individual que varia de 250 a 300 mg e sua base seca é constituída por cerca de 72% de amido, 9,5% de proteína, 9% de fibra e 4% de óleo. Esse produto é considerado, nos países desenvolvidos, de grande importância industrial, sendo utilizado como matéria prima para a fabricação de filmes comestíveis destinados ao revestimento de frutas, verduras e grãos, a fim de estender a vida de prateleira desses produtos (23).

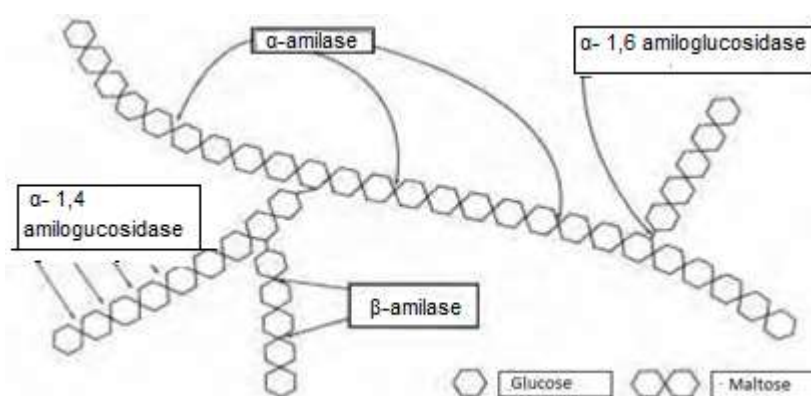
O amido necessita ser hidrolisado para a produção de moléculas menores e com menor viscosidade do que o amido nativo. Posteriormente, este amido poderá ser empregado, por exemplo, na produção de balas e gomas que tem como característica a produção de géis firmes (24).

O principal constituinte desses alimentos é o xarope de glicose, que também é utilizado na produção de xarope de frutose, que é empregado não só na indústria de bals e gomas, mas também na indústria de panificação e no setor de cervejarias (25). Sua obtenção pode ocorrer por via química ou enzimática. O processo químico requer a adição de ácidos inorgânicos, além de temperaturas e pressões consideráveis. Entretanto, o processo de hidrólise enzimática do amido ocorre pela aplicação de enzimas amiláceas, que podem ser provenientes de animais, vegetais ou microrganismos. O processo enzimático requer a adição de amilases, sendo que a hidrólise do amido ocorre a temperaturas mais amenas e devido (25) a especificidade da enzima, é possível obter produtos com propriedades químicas mais definidas (26).

3.4 Enzimas de interesse comercial para hidrólise de amido

O amido pode ser hidrolisado tanto por via química quanto por via enzimática (27), sendo que uma grande parte das enzimas amiláceas tem a propriedade de hidrolisar não só o amido, mas também outros polímeros de glicose (Figura 3). Essas amilases podem ser classificadas como endoamilases, capazes de hidrolisar aleatoriamente no interior da molécula do amido (sendo a principal pertencente ao grupo das α -amilases) ou exoamilases, que hidrolisam o amido em posições específicas (sendo as principais pertencentes ao grupo das β -amilases e das glucoamilases, também conhecidas como amiloglucosidades) (28).

Figura 3. Ilustração da hidrólise do amido por enzimas amiláceas.



Adaptado de Van Der Maarel (VAN DER MAAREL et al., 2002) (29).

A α -amilase é uma endoamilase capaz de romper as ligações glicosídicas do tipo α -1,4 aleatoriamente resultando na produção de oligossacarídeos e dextrinas (28–30). Em contrapartida, a β -amilase caracteriza-se por ser uma exoamilase que tem a capacidade de hidrolisar as extremidades não redutoras do amido, gerando maltose (30,31). Já as glucoamilases são enzimas capazes de romper ligações do tipo α -1,4 do amido atuando na extremidade não redutora e mais lentamente nas ligações do tipo α -1,6 resultando na liberação de glicose (32,33), a qual pode

hidrolisar o amido completamente e produzir 100% de glicose, dependendo das condições da hidrólise (34).

A atuação das amilases ocorre primeiramente na superfície dos grânulos de amido por meio de fissuras e imperfeições e se estende lateralmente formando cavidades que as conduzem até o centro do grânulo, promovendo uma erosão nos grânulos o que proporciona sua dissolução (35). O grau da dissolução dos grânulos está relacionado com diversos fatores morfológicos e estruturais do amido como a cristalinidade, o tamanho dos grânulos, a superfície de contato, a relação amilose/amilopectina, a porosidade e o grau de integridade (11).

3.5 Imobilização de enzimas

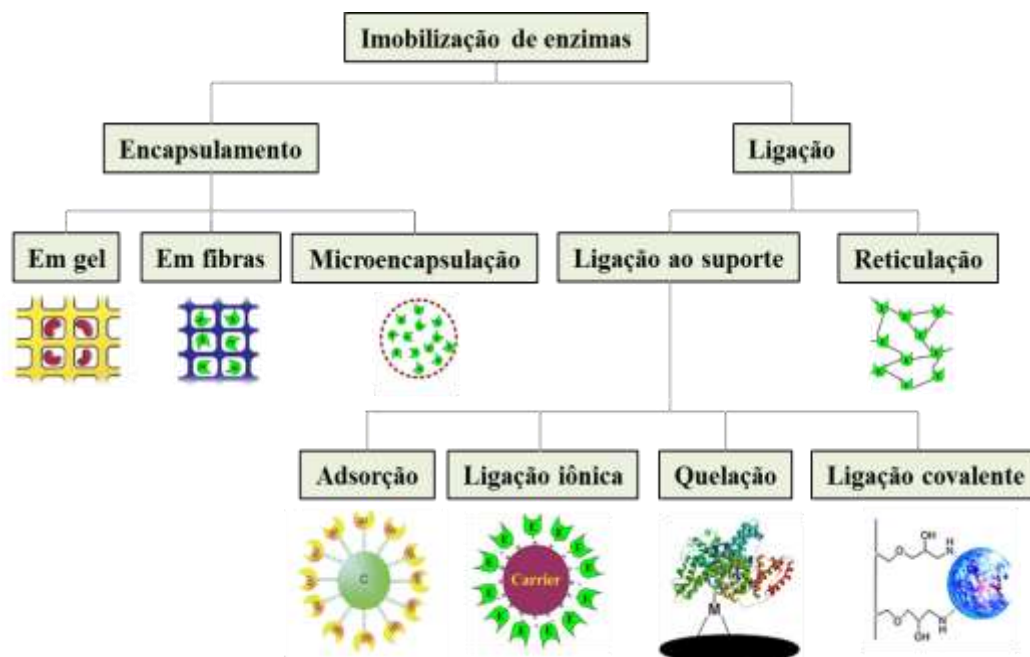
A técnica de imobilização enzimática é muito empregada pelo fato de ser considerada uma técnica capaz de melhorar a eficiência de várias enzimas, já que obstáculos como a instabilidade e a possibilidade de reuso das enzimas podem ser resolvidos por meio da imobilização enzimática (4).

Entretanto, desde a metade do século XX a imobilização de enzimas vem sendo estudada progressivamente pelo fato de posteriormente poder ser destinada a várias aplicações industriais, podendo resultar em alguns benefícios como a reutilização biocatalítica que acarretará diretamente na diminuição do custo de produção e controle de processo para purificação de enzimas, considerando suas funções (5).

Um ponto importante a se considerar é a etapa de seleção do suporte para imobilização, já que as interações que irão se estabelecer entre o suporte e a enzima influenciará diretamente na eficácia do catalisador, bem como à sua estabilidade térmica e química (36). Por este motivo, deve-se considerar fatores

como a estrutura do suporte utilizado, o método de imobilização empregado e as condições de processo para obter um bom rendimento e uma boa eficiência de imobilização (37). Com relação à seleção do suporte para imobilização, há alguns requisitos pré-definidos para que o suporte seja considerado adequado, como elevada área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais definidas, além da capacidade de regeneração, custo, morfologia, composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano e alta densidade de grupos reativos presentes em sua superfície (38). Entretanto, deve-se salientar que não existe um método ou suporte de imobilização único aplicável a todas as enzimas, já que cada enzima possui diferentes características físico-químicas e cada substrato terá diferentes propriedades particulares. Além disso, todos os métodos apresentam vantagens e limitações (39). Os diferentes métodos de imobilização enzimática são agrupados da seguinte forma: adsorção física, adsorção por afinidade, ligação covalente, aprisionamento, encapsulamento e reticulação (Figura 4).

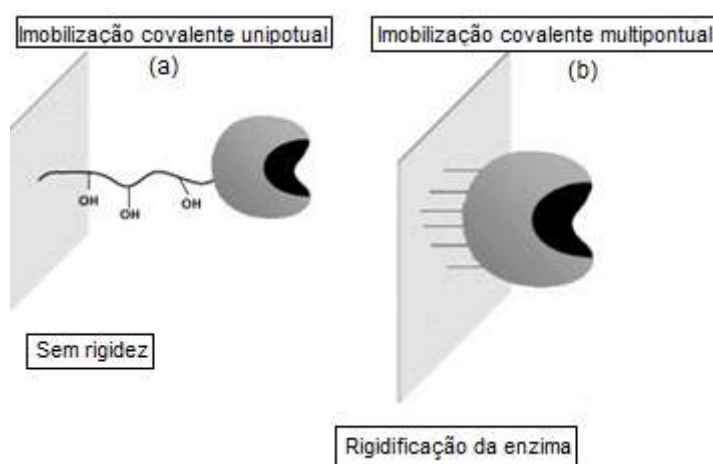
Figura 4. Principais métodos de imobilização de enzimas adaptado de Bon (40).



Em quaisquer os métodos o catalisador é acoplado à superfície de um sólido por meio de interações químicas ou físicas que ocorre entre o suporte e a enzima, sendo que é possível potencializar a eficiência de imobilização utilizando suportes sintéticos ou por meio de alterações químicas feitas na enzima. Para isto, podem-se empregar dois métodos principais na imobilização de enzimas. A imobilização multipontual que pode ocorrer por meio da ativação com glioxil, que tem se mostrado bastante eficaz dentre os possíveis agentes funcionais que podem ser utilizados; e a unipontual, que utiliza reagentes bifuncionais ou multifuncionais como o glutaraldeído como agente bifuncional que irão possibilitar a formação de ligações covalentes (37). Na presente revisão serão abordados com maior profundidade o método de imobilização por ligação covalente, que foi selecionada pelo fato de possibilitar que a enzima fique retida fortemente ao suporte, evitando assim a sua dessorção.

A ligação multipontual baseia-se na formação de duas ou mais ligações covalentes entre uma enzima e os grupos ativos presentes no suporte. Todavia, a ligação do tipo unipontual ocorre quando há uma única ligação covalente entre a enzima e o suporte (Figura 5) (40).

Figura 5. Ilustração da imobilização covalente unipontual e multipontual. (a) Imobilização do tipo unipontual e (b) Imobilização do tipo multipontual.



Adaptado de Mateo (MATEO et al., 2007)(41).

A ligação tipo multipontual pode beneficiar a atividade, a seletividade e o aumento da estabilidade da enzima devido à rigidificação da molécula protéica, apesar de poder causar alguns efeitos funcionais como a inativação da enzima (42). Inicialmente é realizada a modificação da superfície do suporte por meio de reações químicas que irão promover a ativação de grupos funcionais presentes e assim promover intermediários reativos, sendo que os resíduos mais empregados na imobilização de proteínas multipontual são amino-terminal, resíduos de lisina e grupos carboxílicos (43).

A adesão da enzima ao suporte ocorre por ligação covalente ocorre pela interação entre os resíduos de aminoácidos, que constituem a enzima, considerados não essenciais para sua atividade catalítica e os grupos reativos existentes na

superfície do suporte (44). A ligação covalente é considerada uma interação forte e por este motivo a estrutura da enzima se torna mais rígida podendo impedir a interferência de agentes desnaturantes, ou seja, há o aumento da estabilidade térmica e operacional da enzima (45). Em contrapartida, pode haver uma alteração no sítio ativo da enzima que resultará em uma perda considerável da sua atividade catalítica, além de sua aplicação se restringir devido ao custo elevado de algumas matérias-primas, a complexidade de alguns processos de imobilização e a perda da atividade catalítica considerável (37).

3.6 Suportes para imobilização de enzimas

Quanto à classificação dos suportes, pode-se considerar o tipo de material, que pode ser orgânico ou inorgânico, além da sua morfologia, que pode ser considerado um material com alto ou baixo grau de porosidade, ou apresentar característica de formação de géis (46). Os materiais macroporosos têm a vantagem de possuir uma área de contato interna amplamente disponível para imobilização da enzima, mas é importante considerar o diâmetro desses poros, já que eles devem ter espaço suficiente para acomodar as enzimas. O tamanho do substrato também é de grande importância, já que está relacionado diretamente com o efeito difusional que pode ocorrer. Os suportes microporosos são capazes de acomodar as enzimas apenas na superfície externa culminando no contato do catalisador com as moléculas do substrato, mas concomitantemente acarreta a diminuição da área de contato entre o suporte e a enzima (47).

Um dos tipos de suporte que tem maior destaque são os polímeros orgânicos, que se caracterizam por ter uma elevada adaptabilidade a diferentes métodos de imobilização. Essa característica é dada pela facilidade da implementação de grupos

funcionais reativos no suporte sólido (37). Dentre os polímeros orgânicos encontram-se os polímeros que podem ser classificados como naturais ou sintéticos. Os polímeros sintéticos exibem maior versatilidade devido as possíveis formas e estruturas químicas que quando combinadas podem formar um suporte de acordo com as características desejadas. Entretanto, os polímeros naturais como os lignocelulósicos tem um custo menor por se tratar de subprodutos agroindustriais, que são biodegradáveis, evitando assim danos ambientais após sua utilização (47).

Um exemplo de subproduto lignocelulósico que pode ser usado para imobilização enzimática é o sabugo de milho. Esse subproduto gerado no setor agroindustrial compreende a estrutura central da espiga na qual os grãos estão aderidos. A literatura reporta que cada 100 kg de espiga de milho aproximadamente 18 kg corresponde ao sabugo (48). O sabugo é constituído de palha fina, palha grossa, anel lenhoso e medula, sendo que após sua moagem obtém-se o pó de sabugo de milho (49). As características de resistência à abrasão e resistência de alteração de temperatura e pH da superfície granular apresentadas pelo sabugo faz com que sua empregabilidade como suportes inertes tenha boas condições em aplicações industriais (50). De modo geral, as fibras dos subprodutos descritos anteriormente (celulose, hemicelulose e lignina) têm em sua estrutura grupos hidroxilas reativos acessíveis, o que possibilita a interação com outros grupos funcionais (51). Entretanto, esses subprodutos contêm em sua composição a lignina e hemicelulose, além da celulose. Desta forma, para disponibilizar os grupos hidroxilas presentes na celulose é necessária uma etapa de pré-tratamento químico no subproduto, que irá promover a dissolução parcial da hemicelulose e lignina culminando na maior disponibilidade dos grupos hidroxila da celulose (52). O sabugo de milho é empregado na produção de ração animal, na produção de feno e

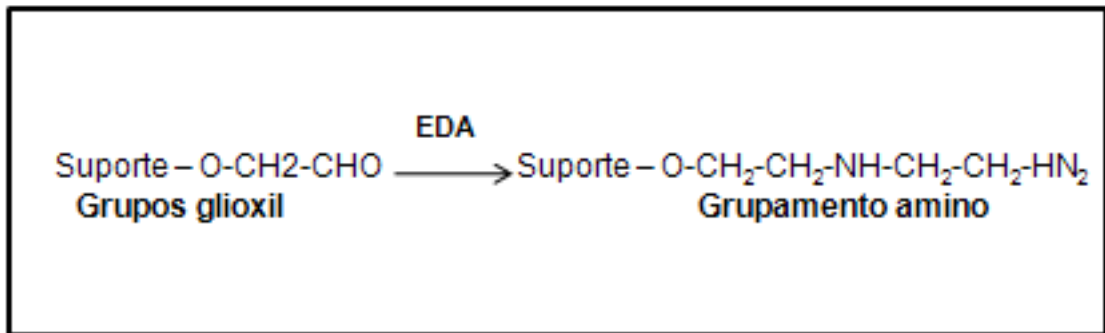
fertilizantes orgânicos, assim como suporte e adjunto para materiais como plásticos, colas adesivas e materiais que contém borracha em sua constituição, como pneus. O sabugo também é usado como abrasivo e polidor em produtos de limpeza, produção de furfural e fabricação de tijolos e cerâmicas. Já no setor alimentício, o sabugo de milho é utilizado para enriquecer ração animal, serve como aditivos em óleos vegetais e pode ser empregado em diversos processos, como por exemplo, na fabricação de sorvete (53).

3.6.1 Procedimentos de ativação do derivado lignocelulósico para imobilização de enzimas por ligação covalente do tipo unipontual

Há alguns antecedentes a imobilização enzimática que são necessários para disponibilização das hidroxilas (OH) da molécula de celulose que se encontra encapsulada pelas moléculas de lignina e hemicelulose. A primeira etapa é o tratamento térmico, responsável pela remoção parcial da fração de lignina e da expansão das fibras do material. Este material expandido posteriormente é submetido a um pré-tratamento em meio alcalino (NaOH) com temperaturas amenas (25°C) que é capaz de promover a remoção parcial da lignina e hemicelulose culminando no aumento do conteúdo de celulose e na disponibilização das hidroxilas alcólicas (OH) de sua estrutura (54).

Após as etapas de pré-tratamento do material lignocelulósico e exposição das hidroxilas alcólicas (OH) da molécula de celulose, necessita-se realizar a inclusão do glicidol por meio de uma reação de esterificação às hidroxilas alcólicas (OH) da molécula de celulose. Esta etapa é realizada em meio alcalino (NaOH), com adição de borohidreto de sódio, um agente redutor que permite a formação de uma nova ligação química (tipo éter), originando grupamento do tipo gliceril (54). Portanto,

Figura 8. Etapa de oxidação do grupo glioxil para formação do suporte amino.



(50)

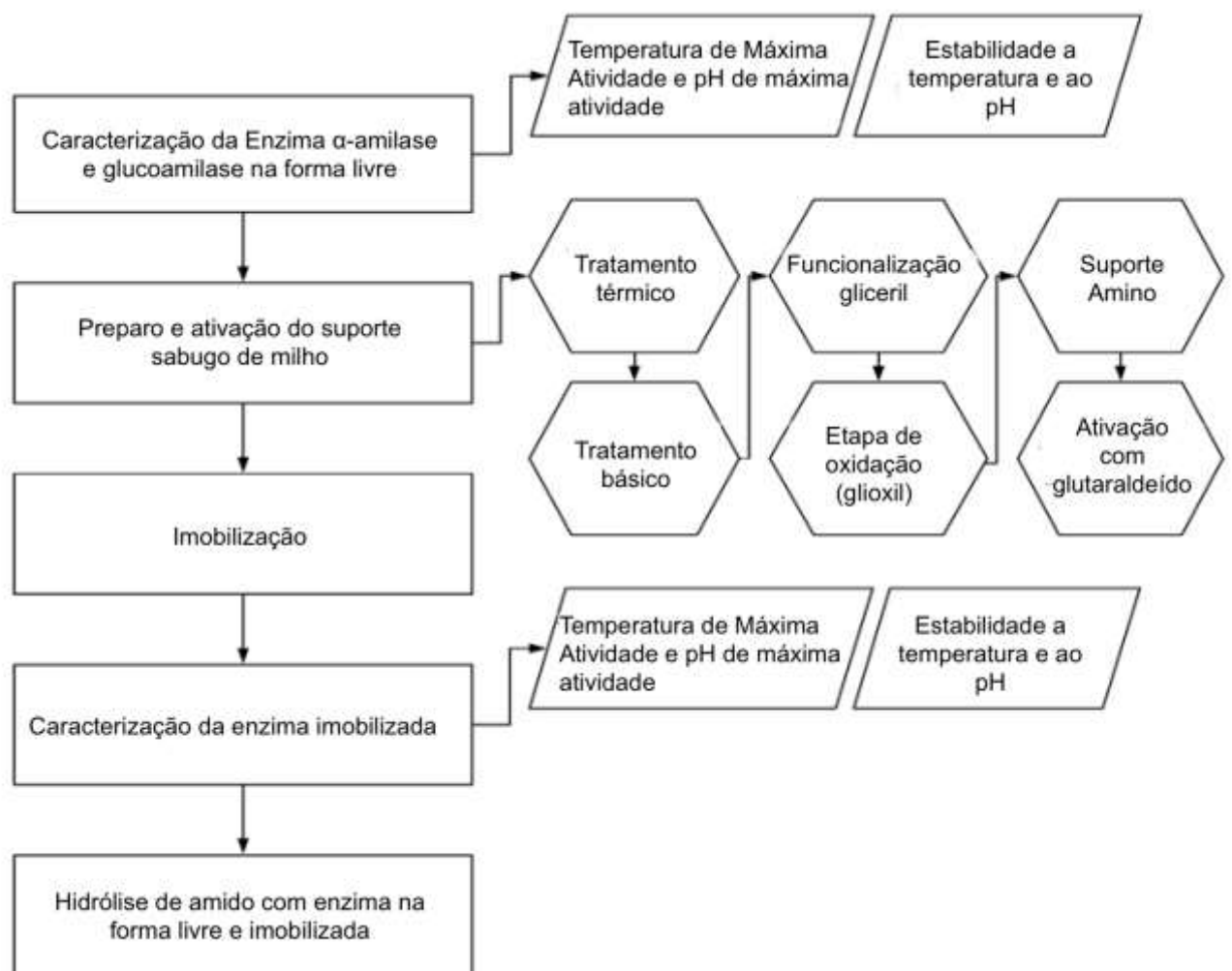
A última etapa de funcionalização do suporte envolve a interação do grupamento amina com glutaraldeído resultando no suporte ativado. Essa reação entre o grupamento amina e o grupamento aldeído leva o pH com extrema importância porque é nesses pHs estabelecidos que os grupos de fato vão estar reativos o suficiente para que ocorra a interação entre o suporte e a enzima (glioxil-pH 10 e gluta-pH7) sendo que esses grupos devem estar desprotonados. Então, em pH 10 normalmente emprega-se uma enzima que é alcalina e vai ter vários resíduos de lisina na sua estrutura que tem grupamentos amino na cadeia lateral e esses grupamentos amino só vão estar desprotonados se estiver em pH10, para então se ligar ao grupamento aldeído do suporte (55).

Finalmente, na etapa de imobilização, o grupo amino terminal da enzima deverá se ligar ao grupo amina do suporte ativado, resultando na enzima imobilizada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A fim de facilitar a compreensão das etapas experimentais desenvolvidas no presente trabalho, a Figura 9 apresenta um fluxograma que resume a sequência dos ensaios realizados.

Figura 9. Fluxograma referente às diversas etapas dos processos usados para a execução do trabalho.



4.1 Determinação da atividade enzimática nos preparados enzimáticos comerciais

A atividade enzimática de amilases foi realizada de acordo com a metodologia de Almeida et al. (2017) (56). O substrato utilizado para medir a atividade enzimática foi o amido de batata solúvel (Sigma, lote: SLBG4612V). Assim, 0,9 mL de uma suspensão de amido 1% (%massa/volume) em tampão acetato de sódio 100 mM a pH=5 foram adicionados em tubos de ensaio. Na sequência 0,1 mL de preparado enzimático, onde 0,2mL foi diluído em 1L de água destilada (enzima na sua forma livre) (glucoamilase de *Aspergillus niger*-Sigma e α -amilase de *Aspergillus oryzae* - Sigma) ou 0,001 g (dados em base seca) de derivado contendo glucoamilase imobilizada acrescida de 0,1 mL de água destilada, que equivale o preparado enzimático na forma livre. Em seguida os tubos foram mantidos a 40°C (α -amilase na sua forma livre), 50°C (glucoamilase na sua forma livre) e 60°C (glucoamilase na sua forma imobilizada) por 30 min, após o tempo de incubação, a reação foi interrompida com a adição de 1,5 mL de ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (57), que foi submetido a uma temperatura de 100°C, em seguida, foi acrescido 15 mL de água destilada e agitados manualmente para posterior realização da leitura em espectrofotômetro em 540 nm. Também foi preparado um controle para verificar se havia açúcar redutores no preparo enzimático, o qual foi adicionado: 0,9 mL de suspensão de amido 1% (%massa/volume), 1,5 mL de DNS e posteriormente 0,1 mL de extrato enzimático. As etapas posteriores foram idênticas às etapas empregadas anteriormente.

O controle foi descontado nos cálculos da atividade enzimática. Para o branco foi adicionada água no lugar do preparo enzimático. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Uma curva analítica foi elaborada por meio do preparo de soluções de glicose com concentrações previamente conhecidas Apêndice I. O método foi padronizado por uma curva de padrão de glicose (3, 5, 7, 9, 12 e 15 mg.mL⁻¹). Após reação de oxirredução com DNS foi adicionado 15 mL de água destilada para posterior leitura em espectrofotômetro (540 nm). A unidade de atividade (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima que libera um µmol de produto por minuto, nas condições de ensaio. A atividade específica foi expressa em U.mg⁻¹ proteína total. Foi realizado um experimento para definição da diluição das enzimas α-amilase e glucoamilase (Apêndice II).

Por meio da curva analítica da glicose pode-se obter a concentração de glicose que foi obtido em mg e posteriormente transformado em micromol por mL de enzima (micromol.mL⁻¹) através da Equação 1:

$$y = 0,441x - 0,0314 \quad (1)$$

x= concentração de glicose (mg.mL⁻¹)
y= unidade de absorvância

A partir da concentração obtida foi possível calcular a atividade enzimática através da Equação 2:

$$UI = \frac{D \times C \times Vt}{T \times Ve} \quad (2)$$

D: fator de diluição
C: concentração de açúcares redutores determinada a partir do método DNS (micromol/mL)
Vt: volume total da reação (mL)
T: tempo de reação (minutos)
Ve: volume da solução enzimática (mL)

A atividade específica foi expressa em U.mg⁻¹ de proteína total segundo a Equação 3:

$$AE = \frac{Ae}{p} \quad (3)$$

AE= atividade específica (U.mg^{-1})
Ae= atividade enzimática (U.mg^{-1})
P= proteína total (U.mg^{-1})

4.2 Caracterização das enzimas na forma livre e imobilizada

4.2.1 Temperatura de máxima atividade

Para a realização do estudo de temperatura de máxima atividade, 0,1 mL de solução enzimática previamente diluída em água destilada ($\text{pH}=6$), no caso das enzimas α -amilase e glucoamilase na forma livre e 0,001 g de derivado mantido em tampão McIlvaine $\text{pH}=5$ para a enzima glucoamilase na sua forma imobilizada foram adicionados a tubos de ensaio e mantidos em banho-maria por 30 min nas temperaturas de 30-80°C com intervalo de 10°C. Para a determinação das temperaturas máximas de atividade das amilases a atividade enzimática da enzima livre e imobilizada foi realizada conforme descrito no item 4.1.

4.2.2 pH de máxima atividade

Para a realização do estudo de pH de máxima atividade, 0,1 mL de solução enzimática diluída nos diferentes pHs (3-8) no caso das enzimas α -amilase e glucoamilase na forma livre e 0,001g de derivado mantido em tampão McIlvaine $\text{pH}=5$ para a enzima glucoamilase na sua forma imobilizada foram adicionados a tubos de ensaio e mantidos em banho-maria por 30 min nas temperaturas definidas como máxima de atividade para ambas as enzimas (α -amilase livre 40°C e glucoamilase livre 50°C e glucoamilase imobilizada 60°C). Para a determinação dos pHs ideais das amilases, a atividade enzimática da enzima livre e imobilizada foi realizada conforme descrito no item 4.1.

4.2.3 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica das enzimas α -amilase e glucoamilase foram determinadas dosando-se a atividade residual das enzimas após 2, 4, 6, 8 e 10h de incubação em diferentes temperaturas. As enzimas nas suas formas livres foram previamente diluídas em água destilada (pH=6); α -amilase 0,05 mg.mL⁻¹; glucoamilase: água: preparado enzimático, 0,2mL foi diluído em 1L de água destilada e 2,5 mL foram incubadas em banho-maria em diferentes temperaturas (30-80°C, com intervalos de 10°C). Para o caso da glucoamilase na sua forma imobilizada foi pesado 0,001 g derivado (dados em base seca) e adicionado 0,2 mL de água destilada. Após a incubação alíquotas de 0,1 ml das enzimas em suas formas livres foram amostradas para dosagem da atividade enzimática conforme descrito no item 4.1, em pH e temperatura máximas de atividade de cada enzima avaliada. No caso da enzima imobilizada o derivado foi recuperado e transferido para realização da atividade enzimática conforme descrito no item 4.1, em pH e temperatura máximos de atividade do derivado.

4.2.4 Estabilidade ao pH

A estabilidade ao pH das enzimas α -amilase e glucoamilase foram determinadas dosando-se a atividade residual das enzimas após 2, 4, 6, 8 e 10h de incubação em diferentes pHs. As enzimas nas suas formas livres foram previamente diluídas em tampão Mclvaine em diferentes pHs (3-8) e 2,5 mL da solução resultante foram incubadas em banho-maria na sua temperatura de máxima atividade (α -amilase a 40°C e glucoamilase a 50°C). α -amilase 0,05 mg.mL⁻¹; glucoamilase 1:5000 enzima:água. Após a incubação alíquotas de 0,1 ml das enzimas em suas formas livres foram amostradas para dosagem da atividade enzimática conforme

descrito no item 4.1, em pH e temperatura máximos de atividade de cada enzima avaliada. No caso da enzima imobilizada o derivado foi recuperado e transferido para realização da atividade enzimática conforme descrito no item 4.1, em pH e temperatura máximos de atividade do derivado.

4.3 Determinação de proteínas totais nos preparados enzimáticos comerciais

Para a determinação do teor de proteínas nos extratos enzimáticos em estudo foi utilizada a metodologia pré-estabelecida (58). No momento da dosagem do teor de proteína, alíquotas de 0,1 mL de preparo enzimático previamente diluído em água destilada foram adicionados em 1 mL do reagente de Bradford. A mistura foi homogeneizada em vortex, em seguida, foi mantida em repouso durante 15 min para posterior realização da leitura em espectrofotômetro (595 nm). Para a determinação quantitativa de proteínas foi construída uma curva analítica utilizando albumina de soro bovina (SBA) como padrão de proteína nas concentrações de 0,05 a 0,5 mg.mL⁻¹ (Apêndice III). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.1 Análise por SDS-PAGE de enzimas glucoamilase comercial

Para analisar o perfil de proteína do extrato enzimático bruto foi realizado um SDS-PAGE da enzima glucoamilase comercial com base no método Laemmli (1970), utilizando BLUEye Sigma (12 marcadores) como padrão de massa molecular que varia de 11 KDa a 245 KDa. As condições estabelecidas de corrida foram de 80 V e 20 mA.

4.4 Pré-tratamento térmico e alcalino do pó de sabugo de milho

O pré-tratamento foi realizado segundo Bassan et al. (59) (com modificações). Inicialmente, foi realizado um pré-tratamento do suporte pó de sabugo de milho com etanol 70% (%volume/volume). A proporção de massa de suporte e etanol 70% utilizada foi de 1:10 (massa/volume) (dados em base seca), respectivamente. Esta mistura foi mantida em reator (Regmed, 1,5 L) a 120°C por 20 min, com agitação de 4 rpm. Após este tempo, o reator foi resfriado e aberto, sendo adicionada água destilada na mesma proporção 1:10 (massa/volume), então o material foi mantido em contato com a água + etanol por 24h a 25°C. Após as 24h a suspensão foi filtrada em um sistema de filtração à vácuo e a fração sólida foi recuperada. Para cada 1 g de suporte (dados em base úmida) previamente pré-tratado termicamente, foi adicionado a 10 mL de solução NaOH (2 M), sendo a suspensão mantida por 24h a 25°C em shaker a 145 rpm. Após este tempo, a suspensão foi filtrada em um sistema á vácuo, o sólido foi recuperado e lavado com água destilada até atingir pH=7. Em seguida, o suporte foi seco em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 40°C por 24h.

4.5 Funcionalização do suporte de pó de sabugo de milho com glutaraldeído

A funcionalização do suporte pó de sabugo de milho foi realizada de acordo com (59) (com modificações). Inicialmente foram adicionados em um béquer 1 g de suporte (massa úmida) de pó de sabugo de milho previamente pré-tratado (item 4.3), 0,068 g de borohidreto de sódio, 5,8 mL de água destilada e 9,52 mL de NaOH (1,7M), que foram mantidos em shaker a 25°C (145rpm) por 5min. Em seguida, foram adicionados 1,7 mL de glicidol, gota a gota em banho de gelo com agitação manual. Após 17h de agitação em shaker 145rpm a uma temperatura de 25°C o

suporte foi filtrado á vácuo e lavado com 800 mL de água destilada, para ser submetido à oxidação com periodato de sódio (NaIO_4).

Na biomassa obtida após a filtração foram adicionados 8 mL de periodato de sódio (100 mM) e 32 mL de água destilada. A suspensão foi mantida em shaker por 2h a 145 rpm a uma temperatura de 25°C. Posteriormente, esta suspensão foi lavada com água destilada e filtrada á vácuo.

Na etapa de aminação, para cada 1 g de suporte pó de sabugo de milho (base seca) previamente ativado com grupos glioxil foram adicionados 22,84 mL de etilenodiamina (EDA, pH=10, 2 M). A mistura foi mantida em shaker a 145rpm por 2h a temperatura de 25°C. Posteriormente, foram adicionados 5,7 mg de borohidreto de sódio (NaBH_4), sendo o sistema mantido nas mesmas condições por 17h. O sistema permaneceu aberto, pois há liberação de gás. Em seguida, o suporte foi filtrado á vácuo, lavado com 120 mL tampão acetato de sódio (0,1M e pH=4) e 500 mL de água destilada.

Finalmente, o suporte sólido foi funcionalizado com glutaraldeído. Para cada 1 g de suporte, foram utilizados 11,2 mL de glutaraldeído 2,5% (v/v) em tampão fosfato pH=7 e pH=5 (0,2M). A suspensão foi mantida sob agitação em shaker, 145rpm por 17h, a temperatura de 25°C para em seguida, ser filtrado á vácuo e lavado 100 mL de tampão fosfato de sódio (25 mM e pH=7) e 275 mL de água destilada. A etapa de imobilização foi obrigatoriamente realizada no mesmo dia que foi realizada a etapa de funcionalização do suporte com glutaraldeído.

4.6 Imobilização unipontual de glucoamilase

1 g de suporte (dados em base seca) de pó de sabugo de milho previamente ativado com glutaraldeído (item 4.4), foram adicionados a 20 mL de solução

enzimática (10572,4 U) em tampão fosfato, pH=5 (100 mM). A diluição da enzima foi realizada da seguinte maneira: 1 mL de enzima em 25 mL de tampão fosfato, pH=5 (100 mM) e pH=7, onde 20 mL foram mantidos em contato com o suporte pó de sabugo de milho. A mistura foi mantida por 24h em shaker a 145 rpm a temperatura de 25°C. O processo de imobilização foi monitorado retirando-se alíquotas do sobrenadante nos tempos de 1,0h, 1,5h, 2,0h e 24h dos quais foram determinadas a atividade enzimática e teor total de proteínas totais (itens 4.1 e 4.2, respectivamente) (59).

Com o intuito de determinar o sucesso da imobilização da glucoamilase, foram calculados os seguintes parâmetros: rendimento de imobilização, eficiência de imobilização e atividade recuperada. Os cálculos foram realizados conforme as Equações 3, 4 e 5, respectivamente (60).

$$RI = \left(\frac{U_0 - U_f}{U_0} \right) * 100\% \quad (3)$$

RI: Rendimento de imobilização (%)

U₀: Atividade enzimática total da enzima livre (U)

U_f: Atividade enzimática total do sobrenadante final após a imobilização (U)

$$EFI = \left(\frac{U_{EI}}{U_0 - U_f} \right) * 100\% \quad (4)$$

EFI: Eficiência de imobilização (%)

U_{EI}: Atividade enzimática total do derivado (U)

U₀: Atividade enzimática total da enzima livre (U)

U_f: Atividade enzimática total do sobrenadante final após a imobilização (U)

$$AR = \left(\frac{U_{EI}}{U_0} \right) * 100\% \quad (5)$$

AR: Atividade recuperada (%)

U_{EI} : Atividade enzimática total do derivado (U)

U_0 : Atividade enzimática total da enzima livre (U)

4.7 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Os espectros foram registrados na região compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1} , com 4 cm^{-1} de resolução, 64 varreduras por ensaio, em modo ATR (Refletância Total Atenuada) em um Espectrofotômetro FTIR - Platinum/ BRUKER; equipado com um cristal ATR em ZnSe de alta capacidade para análise de sólidos, pastas e líquidos. As amostras (pó de sabugo de milho tratado com NaOH, pó de sabugo de milho tratado com glutaraldeído, enzima livre, derivado pH5 e derivado pH7) foram secas em estufa a 60°C por 48h. Foi utilizada uma alíquota de cada amostra para a realização dos experimentos. Os gráficos foram elaborados no programa OriginPro 8.

4.8 Avaliação da hidrólise enzimática do amido

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados em uma suspensão de amido de batata (Sigma S2004) 10% (mass/volume) em tampão McIlvaine pH=5 que inicialmente foi pré-tratado. A etapa de pré-tratamento compreendeu a hidrólise-liquefação do amido que foi realizada em Erlenmeyer de 150 mL com o auxílio de um agitador magnético (360 rpm) a uma temperatura de 90°C por 1h e posteriormente, resfriado a 60°C em banho de gelo (61). Em seguida, 30 mL do amido pré-tratado foi transferido para Erlenmeyers de 125 mL, onde foi realizado o ensaio de hidrólise enzimática. A carga enzimática de glucoamilase comercial na sua

forma livre utilizada foi 400U por grama de amido (dados em base seca). Assim, 0,11 mL de preparado enzimático bruto (1200 U) enzima em sua forma livre ou 1,74 g de derivado (dados em base seca) (1200 U) foram adicionados em 30 mL de amido 10% (massa/volume) (61). Os frascos foram fechados com rolha de borracha. A reação foi mantida em shaker (AMEREX SK-737R) a temperatura constante de 50°C que foi a temperatura de máxima atividade para a enzima livre, a 150rpm por até 8h de incubação. Os frascos foram amostrados nos tempos de 2h, 4h, 6h e 8h. As alíquotas retiradas foram rapidamente aquecidas em banho maria a 90°C por 5 min para inativação da enzima. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9 Quantificação e elaboração de curva analítica para determinação de malto-oligossacarídeos (MOS) por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os malto-oligossacarídeos MOS foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, SHIMADZU modelo NEXERA XR). As seguintes condições cromatográficas foram avaliadas: coluna BIO-RAD Aminex HPX-42A (300 x 7,8 mm); temperatura: 80°C; eluente: água ultrapura com fluxo de 0.6 mL.min⁻¹; volume de amostra: 20 µL; detector: índice de refração a 60°C (SHIMADZU, modelo RID-20A). A separação cromatográfica e a elaboração das curvas analíticas dos diferentes MOS foram realizadas com os seguintes padrões, de grau analítico, secos sob pentóxido de fósforo e vácuo: glicose (M₁), maltose (M₂), maltotriose (M₃), maltotetraose (M₄), maltopentaose (M₅), maltohexaose (M₆), maltoheptaose (M₇) e maltooctaose (M₈). Sendo M₁ e M₂ da Sigma e M₃-M₈ da Megazyme-Irlanda.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

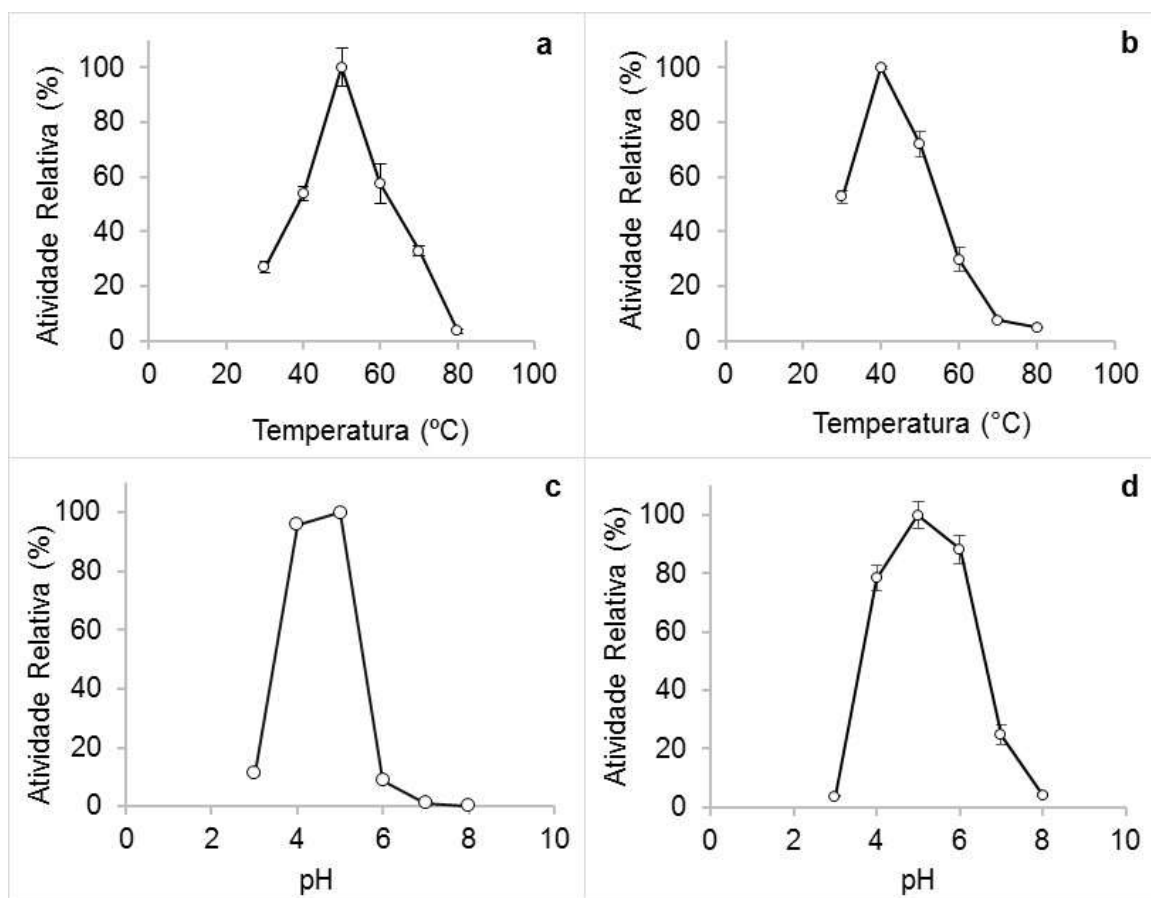
Inicialmente as atividades enzimáticas da glucoamilase e α -amilase, ambas em suas formas livres, foram avaliadas em relação aos seus respectivos valores determinados de temperatura e pH. As estabilidades de ambas as enzimas também foram avaliadas para diferentes valores de temperatura e pH.

5.1 Efeito da temperatura e do pH nas atividades amilolíticas das enzimas glucoamilase e α -amilase em suas formas livres

As atividades enzimáticas das enzimas glucoamilase e α -amilase em suas formas livres foram avaliadas em resposta aos efeitos de diferentes temperaturas e pHs, conforme apresentado na Figura 10abcd. Através da presente avaliação foi possível determinar as temperaturas e pHs de máxima atividade das enzimas em estudo.

A Figura 10 apresenta o perfil de atividade enzimática relativa em função da temperatura e pH para as enzimas glucoamilase e α -amilase em suas formas livres, respectivamente.

Figura 10. Atividade enzimática relativa de amilases na sua forma livre em função da temperatura e pH. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle (tempo zero).



(a) Atividade enzimática de glucoamilase comercial em função da temperatura. Atividade considerada 100%; $12812,8 \pm 897,9 \text{ U.mL}^{-1}$. (b) Atividade enzimática de α -amilase comercial em função da temperatura. Atividade considerada 100%; $6,1 \pm 0,0 \text{ U.mL}^{-1}$. (c) Atividade enzimática de glucoamilase comercial em função do pH. Atividade considerada 100%; $13096,7 \pm 115,5 \text{ U.mL}^{-1}$. (d) Atividade enzimática de α -amilase comercial em função do pH. Atividade considerada 100%; $2,1 \pm 0,1 \text{ U.mL}^{-1}$. Os desvios padrões das amostras que foram realizadas em triplicata que não são visíveis nos respectivos gráficos indicam que o marcador é maior que o próprio desvio. O valor da atividade considerada 100% da enzima glucoamilase comercial em função da temperatura ($6,1 \pm 0,0 \text{ U.mL}^{-1}$) era para ser maior com relação ao valor da atividade considerada 100% da atividade enzimática de α -amilase comercial em função do pH ($2,1 \pm 0,1 \text{ U.mL}^{-1}$). Isso pode estar relacionado com a ver estabilidade. Mesmo ela estando atuando no seu valor máximo de temperatura e pH ela não é estável nessas condições.

A Figura 10a apresenta um aumento gradual da atividade relativa da enzima glucoamilase em sua forma livre entre as temperaturas de 30-50°C, atingindo um máximo em 50°C (atividade considerada 100%; $12812,8 \text{ U.mL}^{-1}$). Todavia, a partir da temperatura de 50°C houve uma diminuição gradual da atividade relativa, sendo que

na temperatura de 80°C a atividade enzimática relativa apresentou um valor de apenas 3,6%. Desta forma, foi definida a temperatura de 50°C como máxima para a atividade enzimática da enzima glucoamilase em sua forma livre.

Resultados similares aos apresentados no presente estudo para temperatura de máxima atividade da enzima glucoamilase de *Aspergillus niger* foram reportados por Riaz et al. (2012) (62). Os resultados mostraram a temperatura de 60°C como máxima para a atividade da enzima glucoamilase de *Aspergillus niger*. A atividade enzimática foi dosada utilizando amido 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM (pH5) a uma temperatura de 40°C por 40min, e a glicose obtida da reação foi dosada por um kit de glicose (Fluitest[®] GLU, fabricado na Alemanha).

Esse valor foi superior ao reportado por Xian e Feng (2018) (63) que apresentaram a temperatura de 45°C como máxima para a atividade de glucoamilase de *Aspergillus tritici* WZ99. A dosagem da atividade enzimática foi realizada adicionando 0,35 mL de solução de amido de milho 1% preparado em tampão cítrico-Na₂HPO₄ 0,1 M (pH=4). A reação ocorreu a 30°C por 3 min e a glicose obtida foi dosada pelo método de glicose oxidase.

Almeida et al. (2017) (64) reportaram valores ligeiramente mais elevados de temperatura máxima de atividade para glucoamilases de *Aspergillus brasiliensis* e *Rhizopus oryzae*. Os autores reportaram temperaturas máximas de 70°C e 60°C para as atividades de glucoamilases oriundas dos respectivos fungos. Além disso, Bagheri et al. (2014) (65) também reportaram uma temperatura máxima de 70°C para a atividade de glucoamilase de *Aspergillus niger*.

A Figura 10b apresenta um aumento gradual de atividade relativa da enzima α -amilase, porém entre as temperaturas de 30-40°C, atingindo um máximo de atividade em 40°C (atividade considerada 100%; 6,1 U.mL⁻¹). Entretanto, a partir

desta temperatura houve uma diminuição gradual da atividade relativa, sendo que na temperatura de 70°C a atividade enzimática relativa apresentou um valor de apenas 7,4%. Assim, foi definida a temperatura de 40°C como máxima para a atividade enzimática da enzima α -amilase em sua forma livre.

Resultados similares aos reportados no presente estudo para temperatura máxima de atividade da enzima α -amilase purificada de *Aspergillus oryzae* IFO-30103 foram reportados na literatura por Dey e Banerjee. (2015). Os autores mostraram uma temperatura de 50°C como máxima para a atividade da enzima α -amilase purificada de *Aspergillus oryzae* IFO-30103. Outro estudo reportou o efeito da temperatura em α -amilase de *Bacillus methylotrophicus* P11-2, a qual revelou a temperatura de 70°C como máxima para a atividade enzimática (67).

A Figura 10c apresenta um aumento gradual da atividade relativa da enzima glucoamilase entre os pHs 3-5, atingindo um máximo de atividade relativa em pH 5 (atividade considerada 100%; 13096,7 U.mL⁻¹). Todavia, a partir do pH 5 houve uma diminuição gradual da atividade, sendo que no pH 7 a atividade relativa remanescente foi de apenas 6,1%. Entretanto, valores de atividade semelhantes foram obtidos entre pHs 4-5, mostrando uma atividade relativa de 95,9% e 100%, respectivamente. O teste de Tukey foi aplicado aos dados experimentais entre pHs 4-5, revelando que não houve uma diferença significativa entre os valores de atividade relativa da enzima glucoamilase. Por este motivo, foi definido o pH 5 como condição padrão para as dosagens de atividade enzimática da enzima glucoamilase em sua forma livre.

Valores similares de pHs de máxima atividade de glucoamilases de *Aspergillus brasiliensis* e *Rhizopus oryzae* foram reportados recentemente na literatura. Neste trabalho os autores descrevem o pH 4 como sendo ideal na

atividade enzimática para ambas as enzimas estudadas (56). Outros trabalhos recentes também reportaram o pH 5 como ideal para glucoamilase oriunda de *Aspergillus niger* (63,68). Desta forma, os resultados de pH ideal da enzima glucoamilase avaliada no presente trabalho foram similares aos valores reportados na literatura para outras glucoamilases.

A Figura 10d apresenta um aumento gradual da atividade relativa da enzima α -amilase entre os pHs 3-5, atingindo um máximo de atividade em pH 5 (atividade considerada 100%; 2,1 U.mL⁻¹). Todavia, a partir do pH 5 houve uma diminuição gradual da atividade relativa, sendo que no pH 8 a atividade enzimática apresentou um valor relativo de apenas 4,2%. Resultados semelhantes foram reportados por Dey e Banerjee (2015). Os autores estudaram uma α -amilase purificada de *Aspergillus oryzae* IFO-30103. Os resultados revelaram que a atividade enzimática desta enzima tem um pH ideal de 5,5.

A Tabela 1 apresenta as concentrações de proteínas totais e as atividades enzimáticas de glucoamilase e α -amilase em suas formas livres em seus respectivos valores ideais de temperatura e pH, previamente determinados. A atividade da enzima α -amilase apresentou condições ótimas em 50°C e pH 5, enquanto que a α -amilase, 40°C e pH 5. Nestas condições, ao utilizar amido solúvel de batata como substrato, a enzima glucoamilase apresentou menor atividade específica (100,0 U.mg⁻¹) quando comparado a enzima α -amilase, que apresentou uma atividade específica de 326,0 U.mg⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração de proteínas (mg.mL^{-1}), atividade enzimática (U.mL^{-1}) e atividade específica (U.mg^{-1}) de glucoamilases e α -amilases comerciais.

Preparados Enzimáticos	Teor de Proteína (mg.mL^{-1})	Atividade enzimática (U.mL^{-1})	Atividade específica (U.mg^{-1})
Glucoamilase	$131,5 \pm 2,7$	$13096,7 \pm 115,5$	$100,0 \pm 0,7$
α -amilase	$0,006 \pm 0,0$	$2,1 \pm 0,1$	$326,0 \pm 18,7$

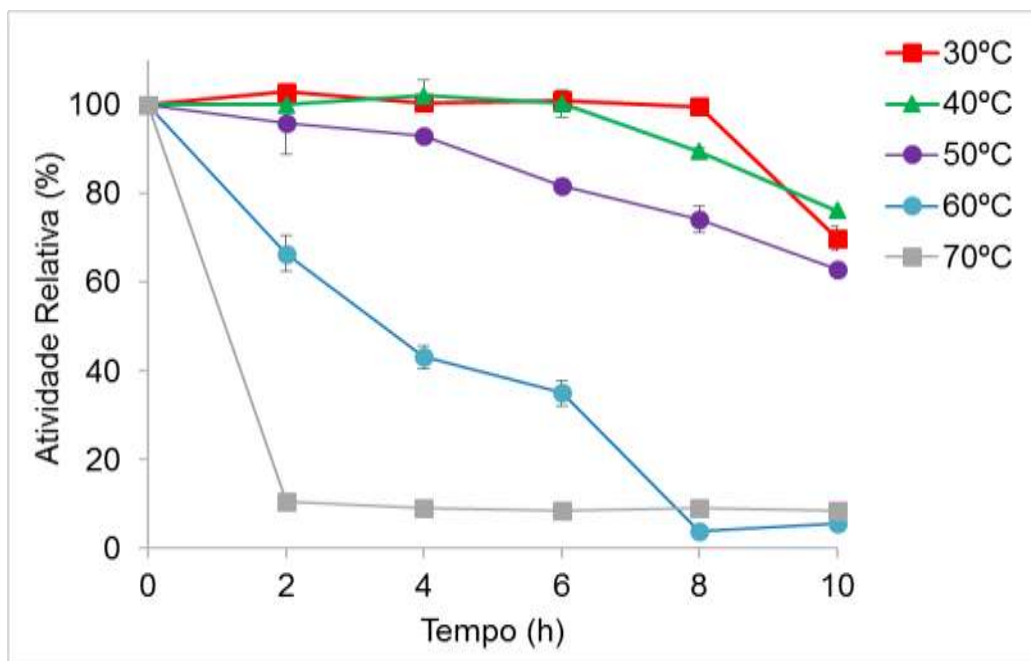
Xian e Feng (2018) (63) reportaram a atividade específica de $30,1 \text{ U.mg}^{-1}$ para glucoamilase oriunda de *Aspergillus Tritici* WZ 99, sendo o presente valor inferior a atividade específica de glucoamilase comercial avaliada no presente estudo ($100,0 \text{ U.mg}^{-1}$). Pavezzi (2006) (69) e Riaz et al. (2012) (62) reportaram atividades específicas de glucoamilases não comercial produzida por *Aspergillus awamori* e *Aspergillus niger* de $4,5 \text{ U.mg}^{-1}$ e $8,5 \text{ U.mg}^{-1}$, respectivamente. Esses valores também foram inferiores ao valor de glucoamilase comercial avaliada no presente estudo ($100,0 \text{ U.mg}^{-1}$).

Paul et al. (2017) (70) e Singh et al. (2016) (71) reportaram atividades específicas de α -amilase oriundas de *Bacillus sp* MB6 e *Bacillus sp* B-10 de $246,7 \text{ U.mg}^{-1}$ e $20,6 \text{ U.mg}^{-1}$, respectivamente. Esses valores foram inferiores à atividade específica de α -amilase comercial avaliada no presente estudo ($326,0 \text{ U.mg}^{-1}$).

5.2 Avaliação da estabilidade térmica e ao pH das enzimas α -amilase e glucoamilase em suas formas livres

Os resultados obtidos dos ensaios de estabilidade térmica da enzima glucoamilase comercial em sua forma livre podem ser visualizados na Figura 11.

Figura 11. Perfil de atividade relativa da enzima glucoamilase comercial em diferentes temperaturas em função do tempo. O pH de incubação foi mantido em 6. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle, que é a dosagem da atividade enzimática sem incubação (tempo zero). Atividade considerada 100%; $12812,8 \pm 897,9 \text{ U.mL}^{-1}$.



A glucoamilase comercial apresentou boa resistência à desnaturação térmica quando incubada por até 8h em temperaturas constantes de 30°C, 40°C e 50°C. Desta forma, foi constatado que a atividade relativa da enzima glucoamilase em 8h de incubação a 40°C foi de 89,5%. Além disso, a atividade relativa da enzima glucoamilase em 8h de incubação a 50°C foi de aproximadamente 75%.

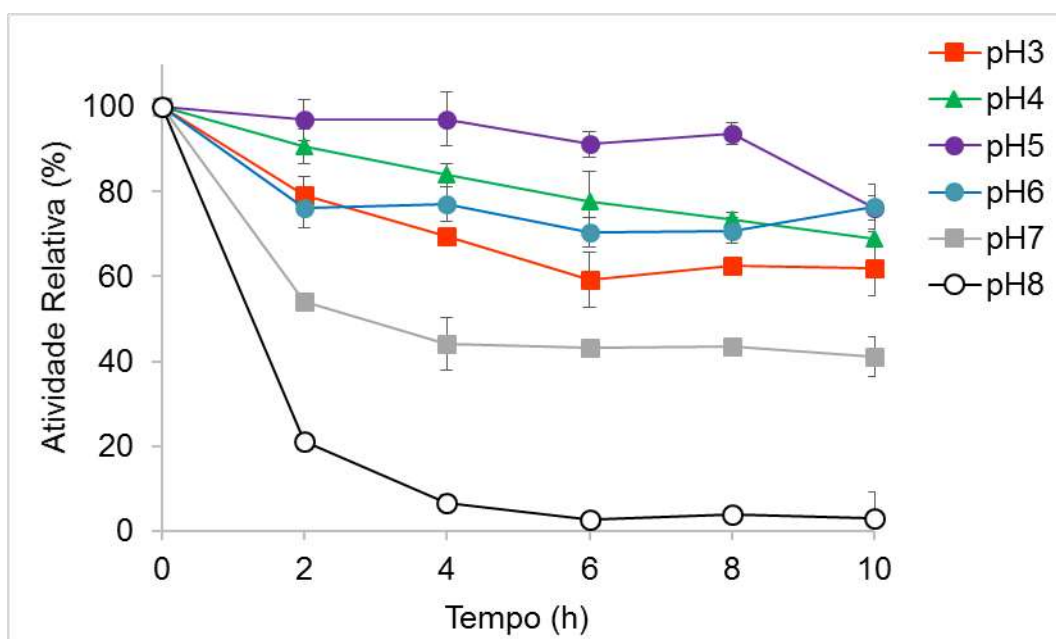
Um estudo reportado por Almeida et al. (2017) (64) mostrou que a glucoamilase oriunda de *Aspergillus brasiliensis* permaneceu estável por até 2h de incubação a 50°C. Desta forma, os resultados de estabilidade térmica da enzima glucoamilase comercial do presente estudo foram semelhantes a outras glucoamilases oriundas de fungos filamentosos reportadas na literatura.

De forma geral, os resultados apresentados na Figura 11 mostram que a glucoamilase comercial do presente estudo apresentou elevada resistência térmica,

se mantendo estável em temperaturas de até 30°C, por aproximadamente 8h de incubação. Todavia, em temperaturas superiores a 60°C houve perda expressiva de atividade após 2h de incubação. A boa resistência térmica da enzima glucoamilase comercial em temperaturas de 40°C e 50°C indica que há potencial para sua aplicação em processos industriais (72).

Os resultados obtidos dos ensaios de estabilidade em pH da enzima glucoamilase comercial podem ser visualizados na Figura 12.

Figura 12. Perfil de atividade relativa da enzima glucoamilase comercial em diferentes pHs em função do tempo. A temperatura de incubação foi mantida em 50°C. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle (tempo zero). O valor de atividade considerado 100% foi de $8219,5 \pm 610,0 \text{ U.mL}^{-1}$.



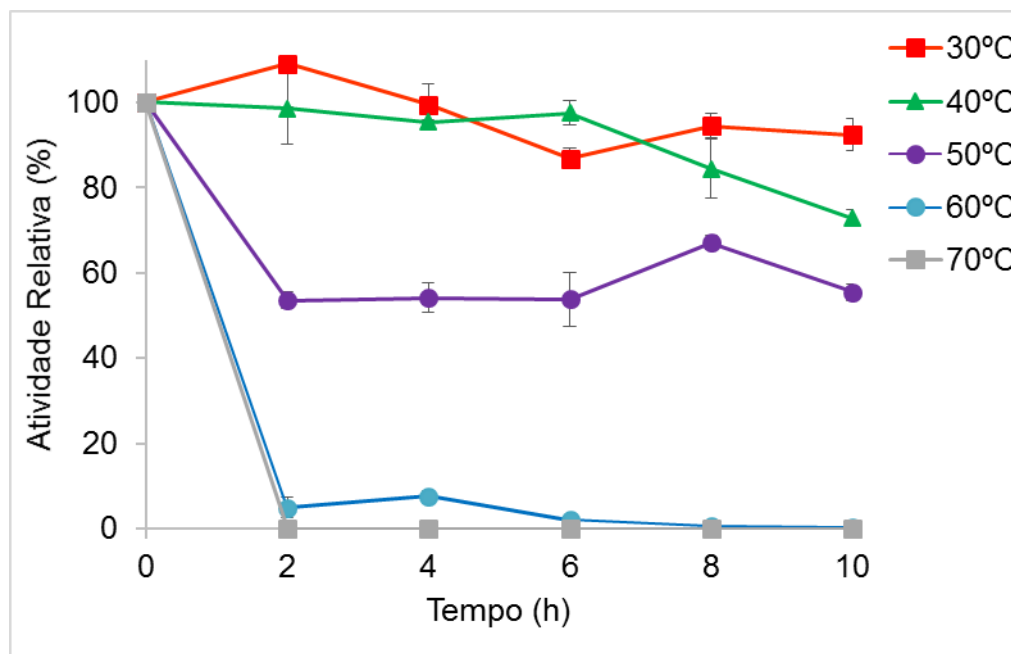
Os resultados indicam que a enzima glucoamilase não apresentou boa resistência quando incubada em pHs 3, 7 e 8, culminando em perda apreciável de atividade com 2h de incubação. Entretanto, a atividade da enzima glucoamilase foi relativamente estável após 8h de incubação em pH 5, sendo que sua atividade

residual foi de aproximadamente 93,6%. Em pH 6, a glucoamilase foi estável após 10h de incubação, sendo que a atividade residual foi de aproximadamente 80%. A boa estabilidade da enzima glucoamilase comercial em pH 5 indica que há potencial para a aplicação em processos industriais, pois devido a essa característica é possível a reutilização da enzima (72).

Almeida *et al.* (2017) (64) estudaram glucoamilase oriundas de *Aspergillus brasiliensis* e *Rhizopus oryzae*, os resultados obtidos demonstraram boa estabilidade em pHs 3-8 após 24h de incubação, sendo que nestas condições os valores de atividade relativa residual foram superiores a 85%. O presente trabalho corrobora com este resultado quando avaliado em pHs 4, 5 e 6 (Figura 12). Entretanto, em pH 3 a glucoamilase comercial apresentou uma perda gradual de sua atividade, apresentando uma atividade residual de 62% após 10h de incubação. Além disso, em pH 7 e 8, após 10h de incubação, as atividades relativas residuais foram de 41% e 3%, respectivamente (Figura 12).

Os resultados obtidos dos ensaios de estabilidade térmica da enzima α -amilase comercial são apresentados na Figura 13.

Figura 13. Perfil de atividade relativa da enzima α -amilase comercial em diferentes temperaturas em função do tempo. O pH de incubação foi mantido em 6. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle (tempo zero). Atividade considerada 100%; $2,2 \pm 0,3 \text{ U.mL}^{-1}$.



A α -amilase comercial apresentou boa resistência à estabilidade térmica quando incubada por até 8h em temperaturas constantes de 30°C e 40°C. Além disso, a atividade da enzima α -amilase foi relativamente estável após 10h de incubação na temperatura de 50°C, sendo que sua atividade residual foi de aproximadamente 55%. Desta forma, a enzima α -amilase apresentou uma estabilidade térmica, na temperatura de 50°C, inferior à enzima glucoamilase comercial (Figuras 13 e 11).

Xie et al. (2014) (67) reportaram a estabilidade térmica de α -amilase de *Bacillus methylotrophicus* P11-2, cuja atividade permaneceu estável em temperaturas inferiores a 50°C. Todavia, a enzima foi inativada quando incubada por 1h a temperaturas superiores a 70°C. Fincan et al. (2014) (74) também reportaram a estabilidade térmica de α -amilase de *Anoxybacillus flavithermus*, a qual apresentou boa estabilidade térmica nas temperaturas de 40°C e 45°C. Desta forma, os

resultados de estabilidade térmica da enzima α -amilase comercial do presente estudo foram semelhantes a outras α -amilase oriundas de fungos filamentosos reportadas na literatura.

Os resultados de estabilidade ao pH mostraram que a enzima α -amilase não apresentou estabilidade na faixa de pHs avaliados (3-8) (dados não apresentados). Em contrapartida, Dey e Banerjee (2015) (66) reportaram que α -amilases oriundas de *A. oryzae* IFO-30103 permaneceram estáveis em pHs 5-7. Entretanto, um estudo realizado por Xie et al. (2014) (67) que avaliaram α -amilases de *B. methylotrophicus* P11-2 mostraram que estas enzimas foram estáveis em pHs 6-9.

Os ensaios de caracterização enzimática realizados para as enzimas supracitadas indicaram que a enzima glucoamilase apresentou maior potencial para ser imobilizada em pó de sabugo de milho, via ligação química do tipo covalente, pois a enzima apresentou maior estabilidade à variação de temperatura e pH (Figuras 11 e 12) quando comparado a enzima α -amilase (Figuras 13). Desta forma, a enzima glucoamilase foi selecionada para estudos de imobilização em pó de sabugo de milho. A estabilidade e atividade enzimática da enzima e do derivado foram avaliadas em resposta a temperatura e pH. Foi considerado também o fato da enzima glucoamilase ter a capacidade de produzir 100% de glicose, o que é de extrema importância no caso de produção de xarope de glicose, muito empregado na indústria alimentícia.

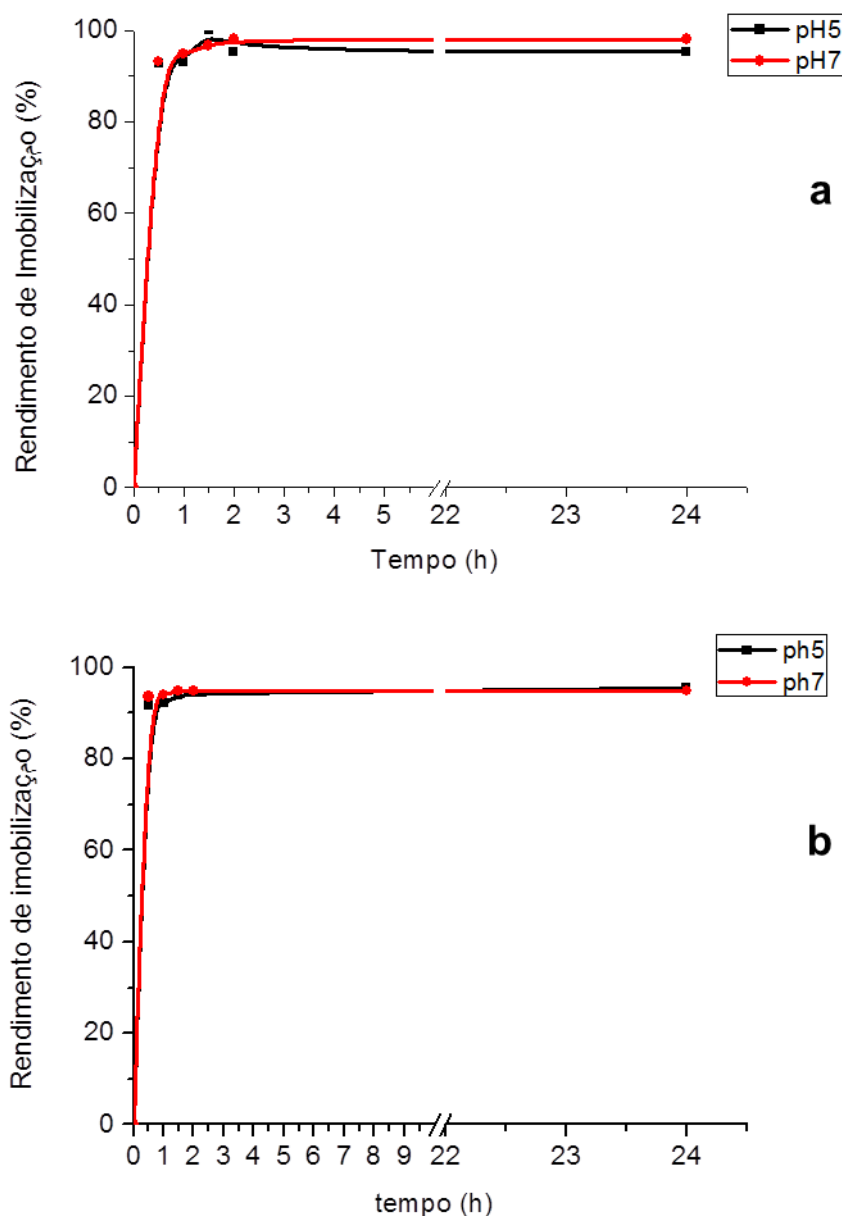
5.2.1 Avaliação de imobilização de glucoamilase em pó de sabugo de milho

A fim de melhor compreender o processo de imobilização da glucoamilase em pó de sabugo de milho, é fundamental a realização de testes prévios de triagem do pH empregado no processo de imobilização, bem como a avaliação da eficiência e

rendimento do processo de imobilização. Desta forma, ensaios de imobilização foram realizados em pHs 5 e 7.

A Figura 14ab mostra o perfil de rendimento de imobilização da enzima glucoamilase nos diferentes pHs em função do tempo. Os valores de rendimento de imobilização foram calculados com base no teor de proteína (Figura 14a) e atividade enzimática (Figura 14b).

Figura 14. Perfil de rendimento de imobilização da enzima glucoamilase comercial em pHs 5 e 7. (a) Rendimento de imobilização por proteína (%), (b) Rendimento de imobilização por atividade (%). Não houve perda de atividade do controle.



De acordo com a metodologia de Bassan et al. (com modificações) (59), o pH de imobilização deveria ser 7, a fim de garantir que o processo ocorra de forma unipontual. No entanto, os ensaios de estabilidade ao pH revelaram que a glucoamilase foi mais estável em pH=5. A análise dos resultados evidencia que não houve diferença no perfil da curva de rendimento de imobilização avaliando-se os diferentes pHs.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos dos principais parâmetros quantitativos do processo de imobilização da enzima glucoamilase comercial imobilizada em pó de sabugo de milho nos diferentes pHs. Os rendimentos de imobilização da enzima glucoamilase, monitorados por concentração de proteínas, após 24h, foram de 94,6% (pH=5) e 98,1% (pH=7). Quando calculado com base na atividade enzimática da enzima glucoamilase, os resultados obtidos foram 95,4% e 94,9%. Portanto, independentemente do pH empregado no processo, o perfil de rendimento de imobilização ao longo do tempo foi semelhante.

Tabela 2. Rendimento de imobilização (%), eficiência de imobilização (%) e atividade recuperada (%) de glucoamilase comercial imobilizada em pó de sabugo de milho em diferentes pHs após 24h de imobilização.

pH	Tempo zero (U.g ⁻¹)	Atividade enzimática (U.g ⁻¹)	Rendimento por proteína (%)	Rendimento por atividade (%)	Eficiência (%)	Atividade recuperada (%)
5	446,11	546,8 ± 6,4	94,6 ± 1,2	95,4 ± 0,3	8,1 ± 1,1	7,8 ± 1,1
7	446,39	846,1	98,1	94,9	10,2	9,7

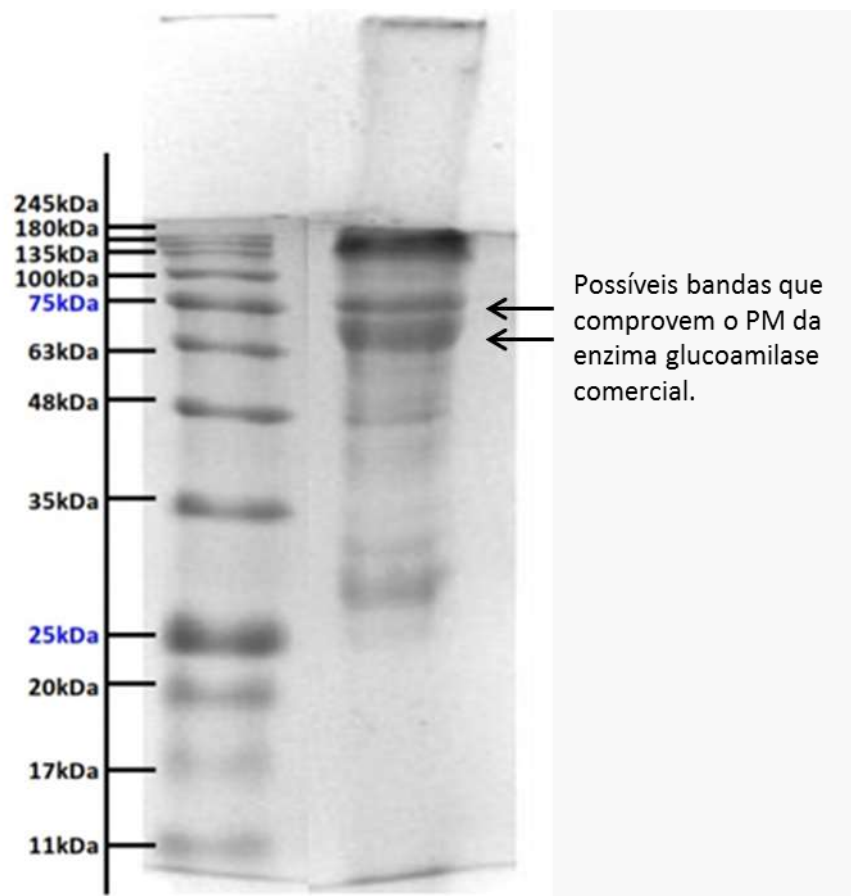
Carregamento: (1 mL de enzima:grama de sabugo, base seca).

A eficiência de imobilização e atividade recuperada da glucoamilase imobilizada em pH 5 foram 8,1% e 7,8%, respectivamente. Todavia, em pH 7, obteve-se um valor de 10,2% para eficiência de imobilização e 9,7% para atividade recuperada. Estes resultados (pHs 5 e 7) podem ser explicados considerando-se

que, além da enzima glucoamilase, pode ter ocorrido a imobilização de outras proteínas, uma vez que a enzima comercial não é purificada (50).

Isso pode ser comprovado pela análise de eletroforese realizada para o biocatalisador. A Figura 15 apresenta o perfil de purificação parcial da enzima glucoamilase comercial.

Figura 15. Análise por SDS-PAGE. Perfil de purificação parcial da enzima glucoamilase comercial: (1) Padrão massa molecular, (2) Preparado enzimático bruto de glucoamilase comercial.



Na Figura 15 podem ser visualizadas as massas moleculares na faixa de 11 a 245 KDa, de acordo com o padrão de massa molecular empregada (Figura 15- raia 1). A Figura 15 raia 2, referente ao preparado enzimático bruto, revela que a massa molecular da enzima glucoamilase comercial encontra-se na faixa de 63 a 75 KDa,

ou seja, não foi observada uma banda única para a proteína, assegurando um peso molecular exato. Isso confirma o baixo grau de pureza da enzima comercial. A literatura reporta valores de massa molecular similares aos obtidos no presente trabalho. Parashar e Satyanarayana (2017) (75) também determinaram a massa molecular da glucoamilase de *Aspergillus niger*. Aalbaek et al. (2002) (76) estudaram a enzima glucoamilase proveniente de *A. niger* e concluíram que a enzima geralmente existe em múltiplas formas celulares. Neste estudo, os autores relatam que três formas de glucoamilase têm sido encontradas com massas moleculares diferentes, a glucoamilase I (GA I) com 91 kDa, a glucoamilase II (GA II) com 73 kDa e a glucoamilase III (GA III) com 59 kDa. Um estudo que avalia glucoamilase de *Aspergillus tritici* WZ99 purifica obteve uma massa molecular de 50 KDa. Outro estudo que avaliou glucoamilase de *Aspergillus tritici* WZ99 purifica obteve uma massa molecular de 50 KDa (63).

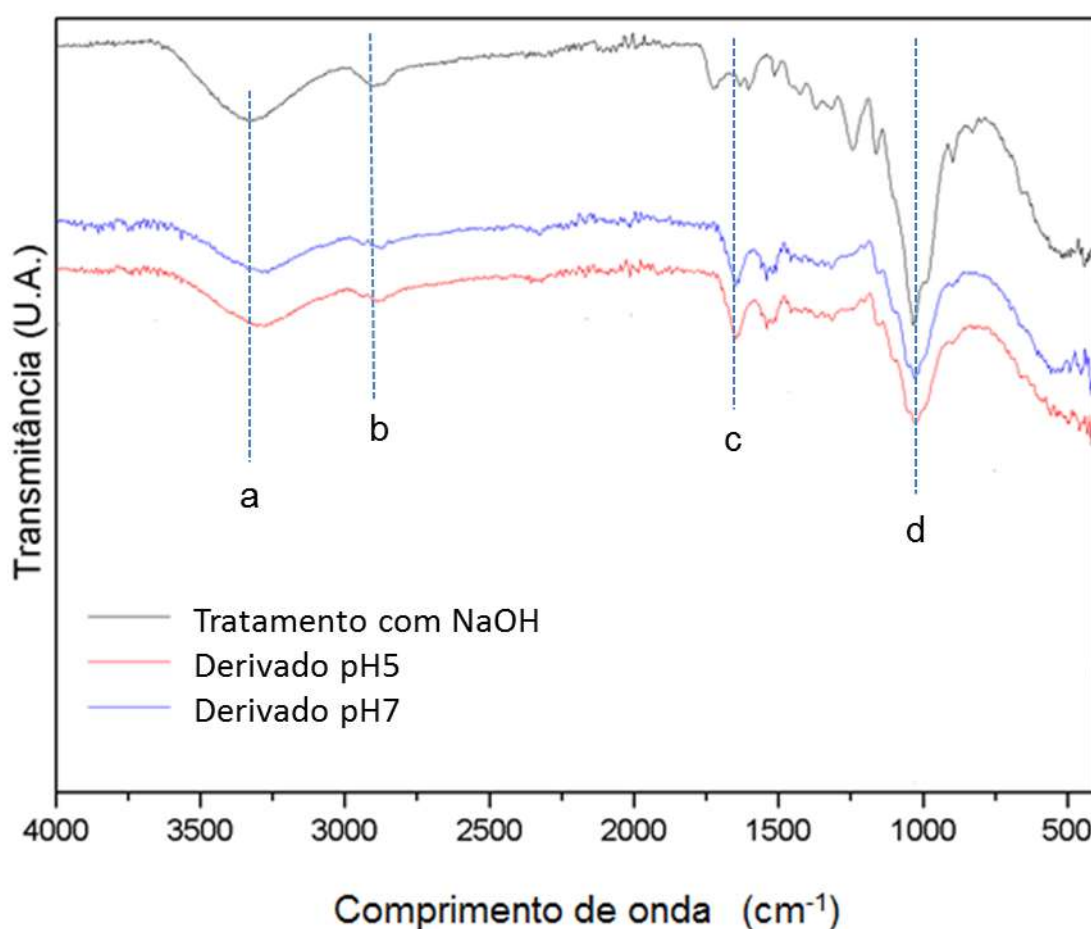
Ensaio de imobilização e de atividade da enzima invertase comercial imobilizadas em pó de sabugo de milho ativado com glutaraldeído foram reportados por Santos (2010) (50). Neste trabalho, os autores empregaram pH=7 e o rendimento de imobilização e a eficiência catalítica da enzima em estudo foram de 73,1% e 4,7%, respectivamente. Esses resultados corroboram aos apresentados no presente trabalho (imobilização de glucoamilase comercial em pó de sabugo de milho ativado com glutaraldeído) (Tabela 2).

Com relação aos valores de atividade (Tabela 2), uma diferença de aproximadamente 35% foi obtida empregando-se pH=7 no processo de imobilização. Considerando-se a maior estabilidade da enzima em pH=5 (Figura 12), este foi selecionado para continuidade dos ensaios experimentais.

5.2.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier em modo de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR) do derivado enzimático

A Figura 16 apresenta os espectros de FTIR-ATR de amostras de pó de sabugo de milho em diferentes condições.

Figura 16. Espectroscopia em infravermelho (FTIR-ATR) do suporte pó de sabugo de milho após o processo de funcionalização dos derivados enzimáticos.



Com base na análise da Figura 16, foi possível identificar as bandas características em cada uma das amostras. A Tabela 3 apresenta as bandas de absorção na região do infravermelho médio (FTIR-ATR) e os respectivos comprimentos de onda.

Tabela 3. Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho médio (FTIR-ATR) para as diferentes amostras.

Comprimento de onda (cm⁻¹)	Identificação das bandas de absorção	Letras que identificam as bandas na Figura 16
3330	Estiramento O-H	a
2896	Estiramento simétrico e assimétrico C-H(CH ₂ e CH ₃) da celulose	b
1640	Grupamento NH ₃ dos sais de amina primário	c
1022	Deformação no plano C-H da celulose	d

Roldan et al. (2017) (77) estudaram a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar e verificaram a existência de bandas de absorção de grupamentos químicos característicos deste material, semelhantes ao sabugo de milho. A banda de maior intensidade, formada em 1022 cm⁻¹ (Tabela 3-letra d) é proveniente da deformação da ligação do tipo C-H da molécula de celulose.

Com relação ao espectro do derivado imobilizado em pH=5 e pH=7 (Figura 16) pode ser observada uma banda característica em 1640 cm⁻¹, referente aos grupamentos NH₃ de aminas primárias (Tabela 3-letra c), confirmando a presença destas ligações no derivado imobilizado (78). Além disso, a banda em 3330 cm⁻¹ (estiramento C-OH, Tabela 3-letra a) observada no espectro do pó de sabugo de milho tratado com NaOH foi mais intensa quando comparada aos espectros dos derivados imobilizados (pH=5 e pH=7), indicando a ocorrência da ligação covalente enzima-suporte.

5.3 Efeito da temperatura e do pH na atividade amilolítica da enzima glucoamilase imobilizada em pó de sabugo de milho

O processo de imobilização enzimática pode acarretar em alterações sobre a estabilidade da enzima e outros fatores como propriedades cinéticas e

deslocamento dos valores de pH e temperatura. Essas alterações podem ocorrer devido a efeitos conformacionais na estrutura terciária do sítio ativo da enzima, efeitos estereoquímicos que dificultam a acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima, efeitos de transferência de massa e macroambientais proveniente do método de imobilização (79).

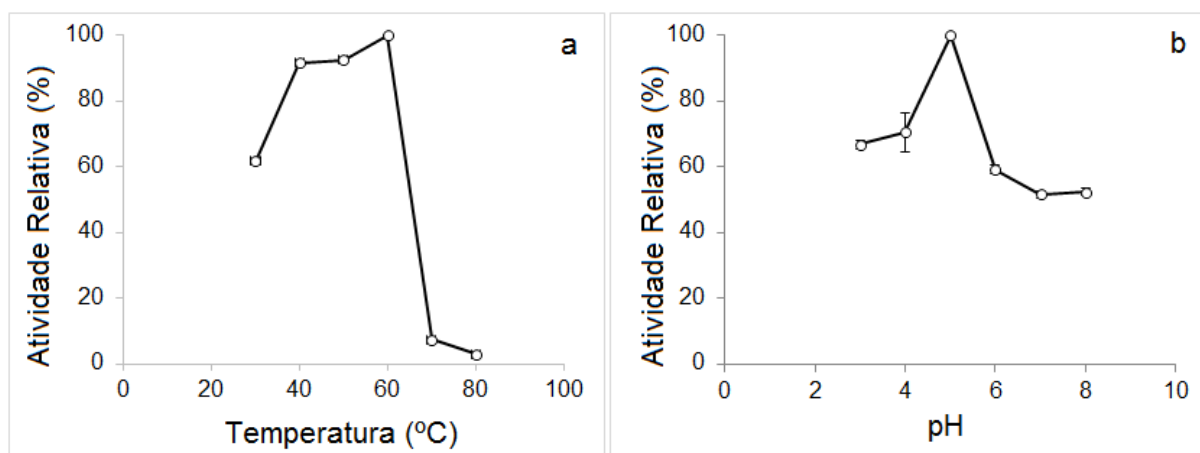
O efeito da temperatura e do pH sobre a enzima glucoamilase comercial foram avaliados de maneira análoga ao realizado para a enzima livre. Os resultados obtidos com o ensaio de atividade para determinação da temperatura e pH de máxima atividade da glucoamilase comercial imobilizada em pó de sabugo de milho estão apresentados na Figura 17ab. A glucoamilase comercial forneceu maior atividade à temperatura de 60°C (atividade considerada 100%; 229,9 U.mL⁻¹) (Figura 17a). Comparando os resultados da enzima imobilizada com a enzima livre (Figura 10a), foi possível observar que a temperatura de máxima atividade da enzima foi aumentada de 50°C para 60°C. Além disso, o perfil de atividade relativa em função da temperatura apresentou-se com uma maior amplitude. Entretanto, na temperatura de 70°C houve perda apreciável da atividade, indicando que a imobilização da enzima culminou em uma menor atividade em resposta ao aumento da temperatura.

Santos (2010) (50) reportaram uma temperatura de máxima atividade de 55°C para a enzima invertase comercial oriunda de *Saccharomyces cerevisiae*, ambas na sua forma livre e imobilizada em pó de sabugo de milho ativado com glutaraldeído.

Outros trabalhos realizados utilizando a enzima glucoamilase imobilizada em outros suportes também foram avaliados. Syed et al. (2016) (80) reportaram a imobilização da enzima glucoamilase oriunda de *Neurospora Sitophila* em nanopartícula de prata revestida de fitoquímicos que são flavonoides e outros compostos fenólicos. Esse estudo mostrou que o resultado obtido de temperatura de

máxima atividade foi de 45°C. Valores distintos foram obtidos pelo presente estudo que descreveu uma glucoamilase comercial com uma temperatura de máxima atividade de 60°C.

Figura 17. Perfil da atividade enzimática relativa de glucoamilase comercial imobilizada em pó de sabugo de milho em função da temperatura e pH. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle (tempo zero).



(a) Atividade enzimática de glucoamilase comercial em função da temperatura. Atividade considerada 100%; $229,9 \pm 2,5 \text{ U.mL}^{-1}$. (b) Atividade enzimática de glucoamilase comercial em função do pH. Atividade considerada 100%; $229,9 \pm 2,5 \text{ U.g}^{-1}$. Os desvios padrões que não são visíveis indicam que o marcador é maior que o próprio desvio.

A Figura 17b apresenta o perfil da atividade relativa da enzima glucoamilase comercial em resposta a variação de pH, após ser imobilizada em pó de sabugo de milho. Em sua forma livre, a enzima glucoamilase apresentou um pH de máxima atividade entre 4 e 5, entretanto, a enzima imobilizada culminou em um pH de máxima atividade de exatamente 5.

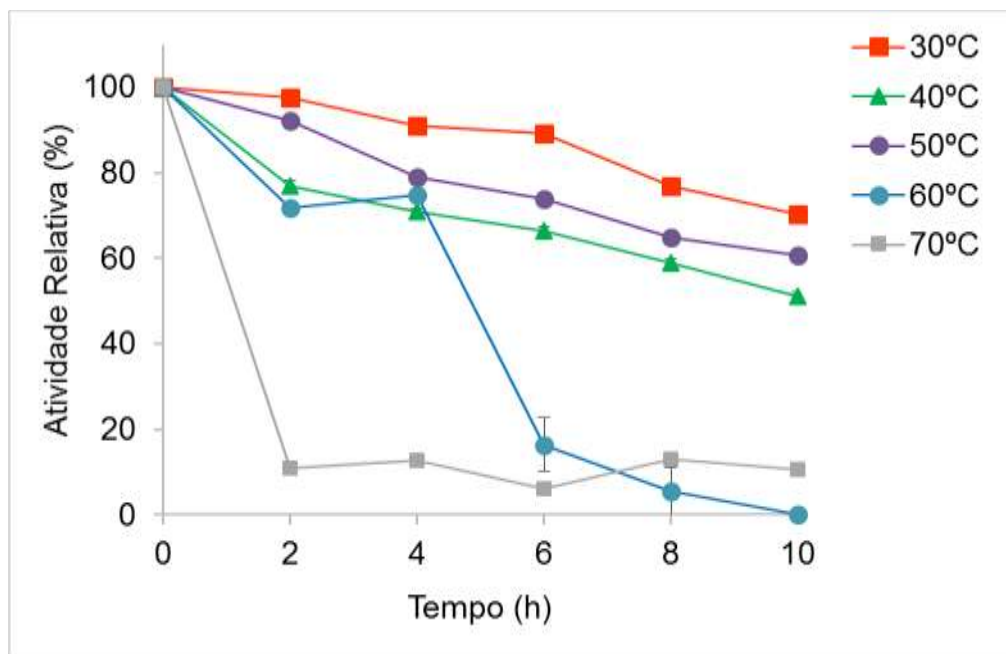
Hassan et al. (2009) (81) reportaram a imobilização covalente de glucoamilase em superfície quimicamente ativa de carragena do tipo *Kappa*. Neste estudo foi constatado que o pH de máxima atividade para a atividade do catalisador livre e imobilizado não foram alterados (pH 5), apesar de os valores de pH para a enzima imobilizada apresentarem uma maior amplitude em relação à enzima livre.

Comportamento semelhante foi observado por SYED et al. (2016) (80), que avaliou glucoamilase de *Neurospora sitophila* imobilizada covalentemente em nanopartícula de prata revestida de fitoquímicos que são flavonoides e outros compostos fenólicos. Todavia, um estudo realizado por Ida (2000) (82), a qual imobilizou glucoamilase de *Aspergillus niger* em superfície de membrana cerâmica apresentou alteração no valor de pH de máxima atividade da enzima livre (pH 4) e imobilizada (pH 3-5). Os autores observaram uma maior amplitude na faixa de pH da enzima imobilizada com relação a enzima livre, corroborando com os resultados do presente estudo.

5.4 Avaliação da estabilidade térmica da enzima glucoamilase imobilizada em pó de sabugo de milho

O processo de imobilização pode conferir maior estabilidade à enzima, entretanto, a princípio não foi o que ocorreu no presente estudo. Os resultados obtidos da análise de estabilidade térmica da glucoamilase previamente imobilizada são apresentados na Figura 18.

Figura 18. Efeito da estabilidade térmica na atividade da enzima glucoamilase imobilizada em água (pH=6). Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle (tempo zero). Atividade considerada 100%; $229,9 \pm 2,5 \text{ U.g}^{-1}$.



A glucoamilase imobilizada apresentou boa resistência à temperatura quando incubada por 2, 4, 6, 8, e 10h a temperaturas constantes de 30-50°C. Todavia, o perfil de atividade relativa da enzima glucoamilase imobilizada ao longo do tempo de incubação, nas temperaturas de 40-50°C, mostrou uma taxa de perda de atividade relativamente maior quando comparado à glucoamilase em sua forma livre (Figura 11).

Ao comparar a atividade residual da glucoamilase na sua forma livre e imobilizada, após 6h de incubação, foi averiguado uma atividade relativa residual de 82% e 74% (temperatura de 50°C) e de 35% e 16% (temperatura de 60°C), (Figuras 11 e 18, respectivamente). Além disso, quando incubada a 40°C por 2h, a enzima na sua forma livre manteve uma atividade relativa residual de (96%) (Figura 11). No entanto, quando imobilizada e avaliada nessas mesmas condições sua

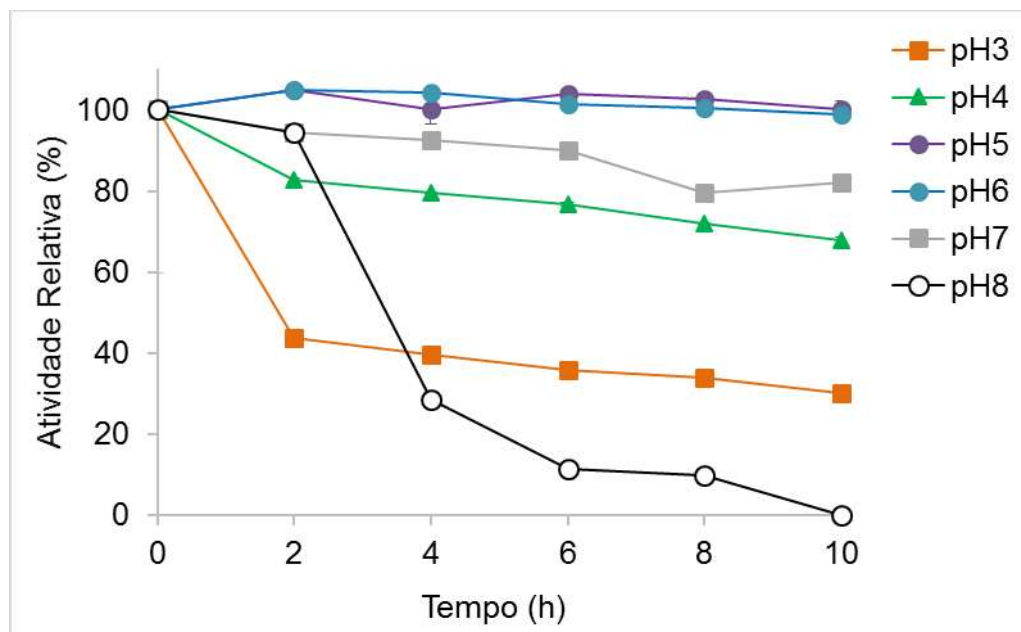
atividade relativa residual foi de 77%, ou seja, uma perda de 28% superior para a enzima imobilizada quando comparado à enzima na sua forma livre.

Esses resultados indicam que durante o processo de imobilização, podem ocorrer alterações na estrutura e no sítio ativo da enzima resultando na inativação da enzima ou acarretar melhora dos valores de atividade e/ou de sua estabilidade (53).

George et al. (2013) (83) reportaram a estabilidade térmica da enzima glucoamilase imobilizada em sílica mesoporosa funcionalizada com decano. A estabilidade da enzima foi afetada de forma positiva na sua forma imobilizada quando comparada em sua forma livre. A glucoamilase livre incubada por 30 min a 60°C apresentou-se praticamente inativa, enquanto a glucoamilase na sua forma imobilizada apresentou uma atividade relativa residual maior que 80%, nas mesmas condições de avaliação da enzima livre, indicando o aprimoramento da estabilidade da enzima imobilizada quanto a variação de temperatura (10°C a 60°C).

A Figura 19 apresenta os resultados obtidos dos ensaios de estabilidade em pH da enzima glucoamilase previamente imobilizada.

Figura 19. Efeito da estabilidade ao pH na atividade da enzima glucoamilase imobilizada em pó de sabugo de milho. O pH de incubação foi mantido em 6. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle (tempo zero). O valor de atividade considerado 100% foi de 185,16 U.mL⁻¹.



De maneira geral a enzima imobilizada apresentou melhor desempenho quando comparada a enzima em sua forma livre em pHs de 4-7, a 50°C. A enzima glucoamilase imobilizada manteve-se estável (atividade relativa de 100%) em pHs 5 e 6 durante todo o período de incubação (10h). Todavia, a enzima glucoamialase em sua forma livre apresentou uma atividade relativa de aproximadamente 76% em 10h de incubação, indicando que a enzima imobilizada foi mais estável nesses pHs quando comparado com sua forma livre (Figuras 19 e 12, respectivamente).

A enzima glucoamilase imobilizada foi estável nos pHs de 6 a 50°C (Figura 19), porém a mesma apresentou perda de atividade relativa apreciável no ensaio de estabilidade em temperatura, como discutido anteriormente (Figura 18). Essa diferença não deveria ter ocorrido, pois os ambos ensaios foram realizados a temperatura de 50°C em pH=6. Uma possível interpretação desta diferença pode ser atribuída ao método utilizado na estabilidade térmica e pH, pois nos ensaios de

estabilidade térmica a enzima imobilizada foi incubada com água pH=6, enquanto nos ensaios de estabilidade em pH a enzima imobilizada foi incubada com tampão Mclvaine pH=6. Assim, é indicativo que o tampão Mclvaine tornou a enzima imobilizada mais estável quando comparado a água pH=6, isso deve ter ocorrido em virtude de o pH da água não ter permanecido constante, ao contrário do pH do tampão Mclvaine. Desta forma, podemos admitir que os ensaios de estabilidade térmica deveriam ter sido realizados com tampão Mclvaine pH=5-6 e não com água pH=6.

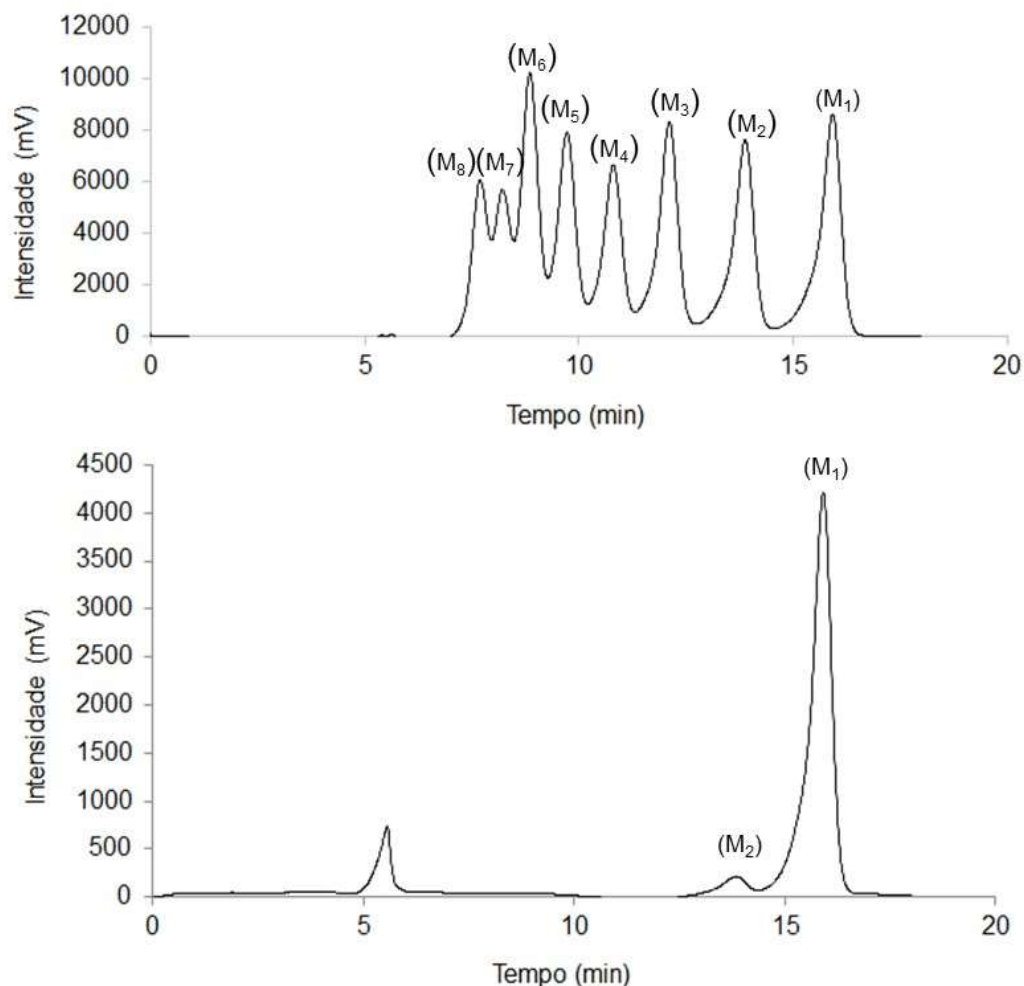
Os ensaios de estabilidade realizados em pH=7 apresentaram uma melhora significativa da estabilidade da enzima glucoamilase imobilizada em relação a sua forma livre, pois em 10h de incubação a glucoamilase imobilizada apresentou uma atividade relativa de 82%, enquanto a glucoamilase em sua forma livre mostrou uma atividade relativa de apenas 41%. Todavia, os ensaios realizados em pH=8 as glucoamilases livres e imobilizadas não foram estáveis após 4h de incubação (Figuras 12 e 19, respectivamente).

6 AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AMIDO POR GLUCOAMILASES

6.1 Avaliação da separação dos malto-oligossacarídeos (MOS) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Figura 20 apresenta o cromatograma típico dos padrões analíticos e do hidrolisado enzimático. A Figura 20a apresenta os seguintes padrões analíticos de malto-oligossacarídeos (MOS), com os seus respectivos tempos de retenção: maltooctaose (7,6 min), maltoheptaose (8,8 min), maltohexaose (8,2 min), maltopentaose (8,7 min), maltotetraose (10,8 min), maltotriose (12,1 min), maltose (13,9 min) e glicose (15,9 min). O cromatograma apresentou uma resolução razoável considerando a dificuldade de separação desses compostos. As curvas analíticas estão apresentadas no Apêndice III (Figuras IV.1 a IV.8), sendo que todas as curvas apresentaram um R^2 próximos de 1 o que indica que as mesmas se ajustaram em um modelo matemático do tipo linear.

Figura 20. (a) Cromatograma típico dos seguintes padrões analíticos: (1) Glicose (M_1), (2) Maltose (M_2), (3) Maltotriose (M_3), (4) Maltotetraose (M_4), (5) Maltopentaose (M_5), (6) Maltohexaose (M_6), (7) Maltoheptaose (M_7) e (8) Maltooctaose (M_8). (b) Cromatograma típico de hidrolisado enzimático obtido pós-hidrólise de amido 10% (massa/volume) com glucoamilase comercial (Sigma) em sua forma imobilizada em 8h de reação de hidrólise (2) Maltose (M_2) e (1) Glicose (M_1).



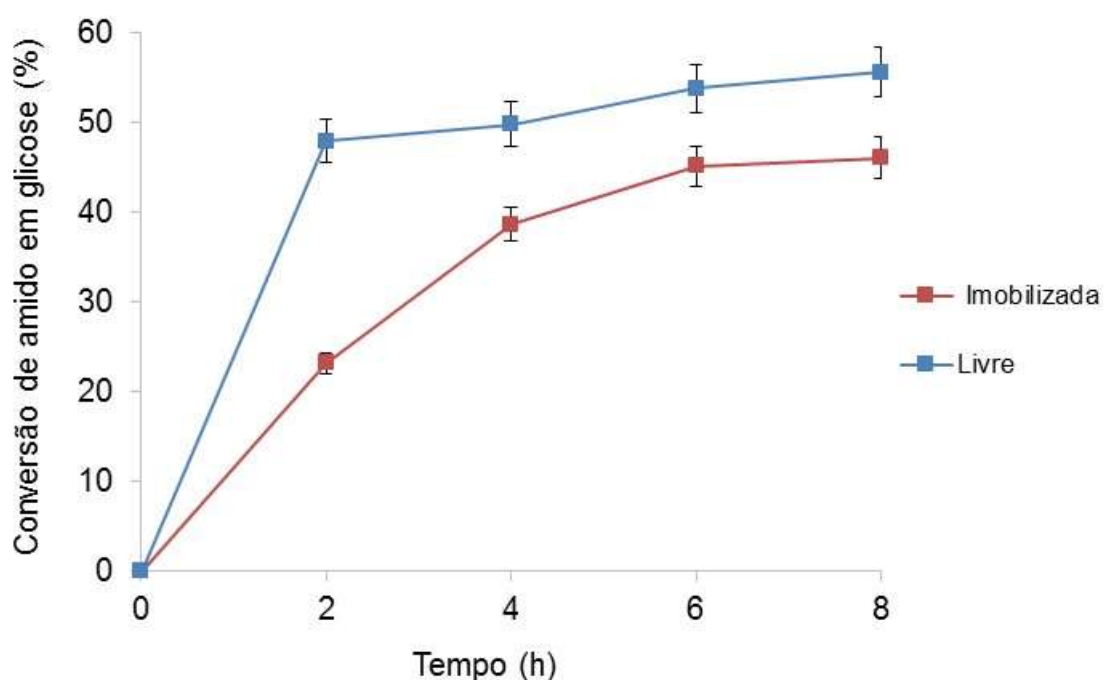
A Figura 20b demonstra o perfil do cromatograma dos MOS obtidos através da hidrólise enzimática de amido utilizando a enzima glucoamilase em sua forma imobilizada após 8h de reação.

A partir dos tempos de retenção dos padrões analíticos fornecidos pela Figura 20a pode-se confirmar a presença de maltose (13,9 min) e glicose (15,9 min). Os outros compostos não foram detectados na presente hidrólise. Além dos picos dos padrões analíticos, um pico não identificado (5,3 min) também foi identificado e

provavelmente seja oriundo do preparado enzimático. A formação de apenas glicose e maltose corrobora com o mecanismo de ação da enzima glucoamilase, ou seja, uma endoenzima que cliva as extremidades redutoras da molécula de amido formando apenas glicose (34).

Os principais açúcares formados na hidrólise enzimática da molécula de amido foram quantificados e os dados foram reportados no formato de conversão de amido em glicose em função do tempo (Figura 21).

Figura 21. Conversão de amido em glicose (%) em função do tempo, na reação de hidrólise catalisada por glucoamilase nas formas livre e imobilizada.



As conversões de amido em glicose em 8h de reação da enzima glucoamilase em suas formas livre e imobilizada foram de 46% e 55%, respectivamente. Também houve a formação de maltose, porém os valores foram desprezíveis. O perfil de conversão de amido em glicose em função do tempo, ambas glucoamilases em suas formas livre e imobilizada, foram semelhantes. Entretanto, foi possível averiguar que

a velocidade de conversão de amido em glicose da enzima em sua forma livre foi relativamente superior. Em 2h de reação, a conversão de amido em glicose, catalisada por enzima livre, foi de aproximadamente 45%, enquanto a conversão de amido em glicose, catalisada por enzima imobilizada, foi de aproximadamente 20%. No entanto, ao final de 8h de reação a conversão de ambas glucoamilases, livre e imobilizada, foram de aproximadamente 55% e 46%, respectivamente. A dificuldade de transferência de massa do substrato em encontrar o sítio ativo da enzima previamente imobilizada pode ser atribuída a menor velocidade de conversão de amido em glicose quando comparado à enzima em sua forma livre. Em contrapartida, a glucoamilase imobilizada pode ser recuperada e reutilizada em novos ciclos de hidrólise de amido, enquanto a enzima livre não pode ser recuperada.

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram parcialmente com os resultados reportados por Scipioni (2011) (61). Os autores avaliaram a influência do tempo da hidrólise de amido de batata por glucoamilase proveniente de *Aspergillus niger* na sua forma livre (Starmax GA400). Nesse estudo o autor obteve um rendimento de 61,9% com um tempo de hidrólise de 26h empregando um teor de amido de 7% (massa/volume). Torres et al. (2012) (84) também reportaram a hidrólise de amido de gengibre 10% (massa/volume) por glucoamilase e mostrou um rendimento entre 55,4-75,6%.

De forma geral a enzima glucoamilase comercial previamente imobilizada em sagugo de milho tem potencial para hidrolisar amido em glicose (sendo a catálise tecnicamente viável).

7 CONCLUSÃO

- A enzima glucoamilase na sua forma livre foi estável em temperaturas relativamente elevadas (50°C). Além disso, a glucoamilase na sua forma livre também apresentou boa estabilidade em pH=5. Entretanto, a enzima α -amilase na sua forma livre foi menos estável em temperaturas relativamente elevadas (50°C) e pH=5, quando comparado a enzima glucoamilase;
- A enzima glucoamilase comercial foi imobilizada em pó de sabugo de milho por ligação do tipo unipontual com sucesso, fornecendo valores médios de rendimento de imobilização de 95%;
- A enzima glucoamilase comercial previamente imobilizada foi estável em temperaturas relativamente elevadas (50°C), além de apresentar uma estabilidade superior à enzima livre em pH=5 a 50°C, o que denota um bom desempenho para futuras aplicações em escala industrial;
- A enzima glucoamilase comercial previamente imobilizada apresentou potencial para hidrolisar a molécula de amido em glicose, fornecendo uma conversão de amido em glicose de 46% em 8h de reação.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudos de hidrólise de amido com glucoamilase comercial imobilizada em pó de sabugo de milho ainda necessitam ser mais aprofundada para permitir encontrar as melhores condições de hidrólise e comprovar o potencial de reuso do derivado enzimático, além de desenvolver estudos em biorreatores do tipo leito fixo operados de forma continua.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sumerly R, Alvarez H, Cereda MP, Vilpoux O. Tecnologias, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas. Cargill F, editor. Fundação Cargill. 2003;3:337–448.
2. Roy I, Gupta MN. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads. *Enzyme Microb Technol.* 2004;34(1):26–32.
3. Costa JA V. Estudo da produção de amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. Departamento de engenharia de alimentos. [Arquivo de dissertações e teses]: Universidade Estadual de Campinas; 1996.
4. Katchalski-Katzir E. Immobilized enzymes-learning from past successes and failures. *Trends Biotechnol.* 1993;11:471–478.
5. Cao L. Immobilised enzymes: science or art? Current opinion in chemical biology. 2005;9(2):217–226.
6. Aguiar RO de, Mondardo RM, Agnes EJ, Castro HF de, Pereira EB. Avaliação e comparação da eficiência de imobilização de lipase pancreática em quitosana para produção de ácidos graxos em frascos agitados. *Acta Sci Technol.* 2010;32(1):15–19.
7. Bilal M, Iqbal HMN. Sustainable bioconversion of food waste into high-value products by immobilized enzymes to meet bio-economy challenges and opportunities – A review. *Food Res Int.* 2019;123:226–240.
8. Bae CJ, Lee JW, Bae HS, Shim SB, Jee SW, Lee SH, et al. Detection of allergenic compounds using an IL-4/luciferase/CNS-1 transgenic mice model.

- Toxicol Sci. 2011;120(2):349–359.
9. Gavrilescu M, Chisti Y. Biotechnology-A sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv.* 2005;23:471–499.
 10. Leonel M, Cereda MP. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. *Ciência e Tecnol Aliment.* 2002;22(1):65–69.
 11. Damodaran S, Parkin KL, Fennema OR. *Química de Alimentos de Fennema*. 4^a Ed. Artmed, editor. 2010.
 12. Pinto MP. Otimização dos processos de produção dos xaropes de glicose e dextrose monohidratada. Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa; 2009.
 13. Lin L, Zhang L, Cai X, Liu Q, Zhang C, Wei C. Relação entre a hidrólise enzimática e os componentes do amido de arroz. 2018;84:406–413.
 14. Tao K, Li C, Yu W, G GR, Li E. Como a estrutura fina molecular da amilose do amido de arroz afeta propriedades funcionais. Elsevier. 2019;24–31.
 15. Muralikrishna G, Nirmala M. Cereal alfa-amylases: an overreview. *Carbohydr Polim.* 2005;60:10.
 16. Griebel S, Webb MM, Campanella OH, Craig BA, Weil CF, Tuinstra MR. The alkali spreading phenotype in *Sorghum bicolor* and its relationship to starch gelatinization. *J Cereal Sci.* 2019;86:41–47.
 17. Yu B, Ren F, Zhao H, Cui B, Liu P. Effects of native starch and modified starches on the textural, rheological and microstructural characteristics of soybean protein gel. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2019;2–27.
 18. Włodarczyk-Stasiak M, Mazurek A, Jamroz J, Pikus S, Kowalski R. Physicochemical properties and structure of hydrothermally modified starches.

- Food Hydrocoll. 2019;95:88–97.
19. Oladele AK, Duodu KG, Emmambux NM. Pasting, flow, thermal and molecular properties of maize starch modified with crude phenolic extracts from grape pomace and sorghum bran under alkaline conditions. Food Chem. 2019;297:124879.
 20. Almeida RLJ, Pereira TS, Freire VA, Santiago ÂM, Oliveira HML, Conrado LS, et al. Influence of enzymatic hydrolysis on the properties of red rice starch. Int J Biol Macromol. 2019;1210–1219.
 21. Martínez P, Peña F, Bello-Pérez LA, Núñez-Santiago C, Yee-Madeira H, Velezmoro C. Physicochemical, functional and morphological characterization of starches isolated from three native potatoes of the Andean region. Food Chem. 2019;2:1–8.
 22. Raupp DS, Moreira SS, Banzatto DA, Sgarbieri VC. Composição e propriedades fisiológico - nutritivas de uma farinha rica em fibra insolúvel obtida do resíduo fibroso de fecularia de mandioca. Ciência e Tecnol Aliment. 1999;19(2):205–210.
 23. Unidos E, Brasil N. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. Embrapa milho e sorgo. 2006;1–6.
 24. Henrique CM, Cereda MP, Sarmento SBS. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. Ciência e Tecnol Aliment. 2008;28(1):231–240.
 25. Swift RJ, Karandikar A, Griffen AM, Punt PJ, van den Hondel CA, Robson GD, et al. The Effect of organic nitrogen sources on recombinant glucoamylase production by *Aspergillus niger* in chemostat culture. Fungal Genet Biol. 2000;31(2):125–133.

26. Severo MG, Moraes K de, Ruiz WA. Modificação enzimática da farinha de arroz visando a produção de amido resistente. *Quim Nova*. 2010;33(2):345–350.
27. Passos M. Valorização tecnológica do hidrolisado fosfórico de amido de mandioca: produção de biomassa e astaxantina utilizando a levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Processos Tecnológicos*. [Arquivo de Tese]: Universidade Federal do Paraná; 2002.
28. Fernandes LP. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina Phaseolina*. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2007;4(1):43–51.
29. Van Der Maarel MJEC, Van Der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J Biotechnol*. 2002;94(2):137–155.
30. Bano S, Ul Qader SA, Aman A, Syed MN, Azhar A. Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(1):255–251.
31. Olsen HS. Enzymes in Food Processing. In: Inc AP, editor. *Biotechnology Set*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 1975. p. 663–736.
32. Fierobe HP, Stoffer BB, Frandsen TP, Svensson B. Mutational modulation of substrate bond-type specificity and thermostability of glucoamylase from *Aspergillus awamori* by replacement with short homologue active site sequences and thiol/disulfide engineering. *Biochemistry*. 1996;35(26):8696–8704.
33. Stroparo EC, Beitel SM, Resende JTB, Kinob A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Semin Ciências Agrárias*. 2012;33(6):2267–2278.

34. Lemos C, Fuchs E, Gomes E, Silva R. Glucoamilase: estrutura e termoestabilização. *Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. 2003;31:86–94.
35. Li J., Vasanthan T, Hoover R, Rossnagel B. Starch from hull-less barley: V. In-vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidase. *Food Chem*. 2004;84(4):621–632.
36. Bernal C, Escobar S, Wilson L, Illanes A, Mesa M. Carbonaceous-siliceous composite materials as immobilization support for lippase from *Alcaligenes* sp.: application to the synthesis of antioxidants. *Carbon N Y*. 2014;74:96–103.
37. Cabral JMS, Aires-Barros MR, Gama M. *Engenharia Enzimática*. Lidel, editor. Lisboa; 2003.
38. Talbert JN, Goddard JM. Enzymes on material surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;93:8–19.
39. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol*. 2004;35(2–3):126–139.
40. Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML. *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Interciência, editor. Vol. 6. 2008. 23 p.
41. Mateo C, Palomo JM, Fernández-Lorente G, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol*. 2007;40(6):1451–1463.
42. Grazú V, Lopez-Gallego F, Montes T, Abian O, González R, Hermoso JA, et al. Promotion of multipoint covalent immobilization thorough different regions of genetically modified penicilin G acylase from *E. coli*. *Process Biochem*. 2010;45(3):390–398.

43. Souza LT de A, Veríssimo LAA, João BCP, Santoro MM, Resende RR, Mendes AA. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: Blucher, editor. *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol 4*. Editora Blucher; 2017. p. 529–568.
44. Alfaya AAS, Kubota LT. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Quim Nova*. 2002;25(5):835–841.
45. Miletic N, Vukovic Z, Nastasovic A, Loos K. Macroporous poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins -versatile immobilization supports for biocatalysts. *J Mol Catal B Enzym*. 2009;56(4):5.
46. Mendes AA, Oliveira PCD, Castro HFD, Giordano RLC. Aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzimas de interesse industrial. *Quim Nova*. 2011;34(5):831–840.
47. Dalla-Vecchia R, Nascimento MDG, Soldi V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*. 2004;27(4):623–630.
48. Tsai W., Chang C., Wang S., Chang C., Chien S., Sun H. Preparation of activated carbons from corn cob catalyzed by potassium salts and subsequent gasification with CO₂. *Bioresour Technol*. 2001;78(2):203–208.
49. Ziglio BR, Mazile JR, Bezerra V, Branco IG, Bastos R, Rigo M. Elaboração de pães com adição de farinha de sabugo de milho. *Revista Ciências Exatas e Naturais*. 2007;9:116–128.
50. Santos AF. Imobilização de invertase comercial e de *Saccharomyces cerevisiae* em sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar. [Araraquara, SP]: Universidade Estadual Paulista UNESP; 2010.
51. Tita SPS, Paiva JMF de, Frollini E. Resistência ao Impacto e Outras Propriedades de Compósitos Lignocelulósicos: Matrizes Termofixas Fenólicas

- Reforçadas com Fibras de Bagaço de Cana-de-açúcar. *Polímeros*. 2002;12(4):228–239.
52. Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*. 2002;83(1):1–11.
53. Costa CZ, Albuquerque MCC, Brum MC, Castro AM. Degradação microbiológica e enzimática de polímeros: uma revisão. Vol. 38, *Quimica Nova*. 2015. p. 259–267.
54. Cruz CZP. Imobilização de alcalase em pó de sabugo de milho: Hidrólise das proteínas do soro de queijo bovino e obtenção de peptídeos bioativos. Universidade Júlio de Mesquita Filho - UNESP; 2017.
55. Mateo C, Abian O, Bernedo M, Cuenca E, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, et al. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme Microb Technol*. 2005;37(4):456–462.
56. Almeida PZ de, Pereira MG, Carvalho CC de, Heinen PR, Ziotti LS, Messias JM, et al. Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. *Biota Neotrop*. 2017;17(3):2–9.
57. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*. 1959;31(3):1–3.
58. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1–2):248–254.
59. Bassan JC, de Souza Bezerra TM, Peixoto G, da Cruz CZP, Galán JPM, Vaz ABDS, et al. Immobilization of Trypsin in Lignocellulosic Waste Material to Produce Peptides with Bioactive Potential from Whey Protein. *Tese Doutorado Univ Estadual Julho Mesquita Filho*. 2016;9(5).

60. Sheldon RA, van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev.* 2013;42(15):6223–6235.
61. Scipioni GC. Otimização do Processo de sacarificação do Amido de batata (*Solanum Tuberosum* L .) utilizando enzimas amilolíticas. Universidade Federal de Santa Maria-UFSM; 2011.
62. Riaz M, Rashid MH, Sawyer L, Akhtar S, Javed MR, Nadeem H, et al. Physiochemical properties and kinetics of glucoamylase produced from deoxy-d-glucose resistant mutant of *Aspergillus niger* for soluble starch hydrolysis. *Food Chem.* 2012;130(1):24–30.
63. Xian L, Feng JX. Purification and biochemical characterization of a novel mesophilic glucoamylase from *Aspergillus tritici* WZ99. *Int J Biol Macromol.* 2018;107(3):1122–1130.
64. Almeida PZ de, Pereira MG, Carvalho CC de, Heinen PR, Ziotti LS, Messias JM, et al. Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. *Biota Neotrop.* 2017;17(3):2–9.
65. Bagheri A, Khodarahmi R, Mostafaie A. Purification and biochemical characterisation of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*: Relation to starch processing. *Food Chem.* 2014;161:270–278.
66. Bhanja Dey T, Banerjee R. Purification, biochemical characterization and application of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2015;4(1):83–90.
67. Xie F, Quan S, Liu D, Ma H, Li F, Zhou F, et al. Purification and characterization of a novel α -amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. *Process Biochem.* 2014;49(1):47–53.
68. Bagheri A, Khodarahmi R, Mostafaie A. Purification and biochemical

- characterisation of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*: Relation to starch processing. *Food Chem.* 2014;161:270–278.
69. Pavezzi FC. Produção e caracterização de glucoamilases termoestáveis de *Aspergillus awamori* obtidas por PCR mutagênico e expressas em *Saccharomyces cerevisiae* Produção e caracterização de glucoamilases termoestáveis de *Aspergillus awamori* obtidas por PCR mutagênico e. Dissertação de Mestrado. UNESP - Univ Estadual Paulista; 2006.
 70. Paul JS, Lall BM, Ladhay SK, Tiwari KL. Otimização de parâmetros e estudo cinético da enzima α -amilase de *Bacillus* sp. MB6 isolado de resíduos vegetais. 2017. p. 123–129.
 71. Kumar Singh S, Khan A, Nath Singh R, Bahuguna A, Chauhan P, Kumar Sharma V, et al. Production, purification and characterization of thermostable α -amylase from soil isolate *Bacillus* sp. strain B-10. *J BioSci Biotechnol.* 2016;5(1):37–43.
 72. Zhong N, Chen W, Liu L, Chen H. Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase onto the organic functionalized SBA-15: Their enzymatic properties and glycerolysis efficiencies for diacylglycerols production. *Food Chem.* 2019;271:739–746.
 73. Fincan S., Enez B, Özdemir S, Matpan Bekler F. Purification and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. *Carbohydr Polym.* 2014;102:144–150.
 74. Agüloğlu Fincan S, Enez B, Özdemir S, Matpan Bekler F. Purification and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. *Carbohydr Polym.* 2014;102(1):144–150.
 75. Parashar D, Satyanarayana T. Engineering a chimeric acid-stable α -amylase-

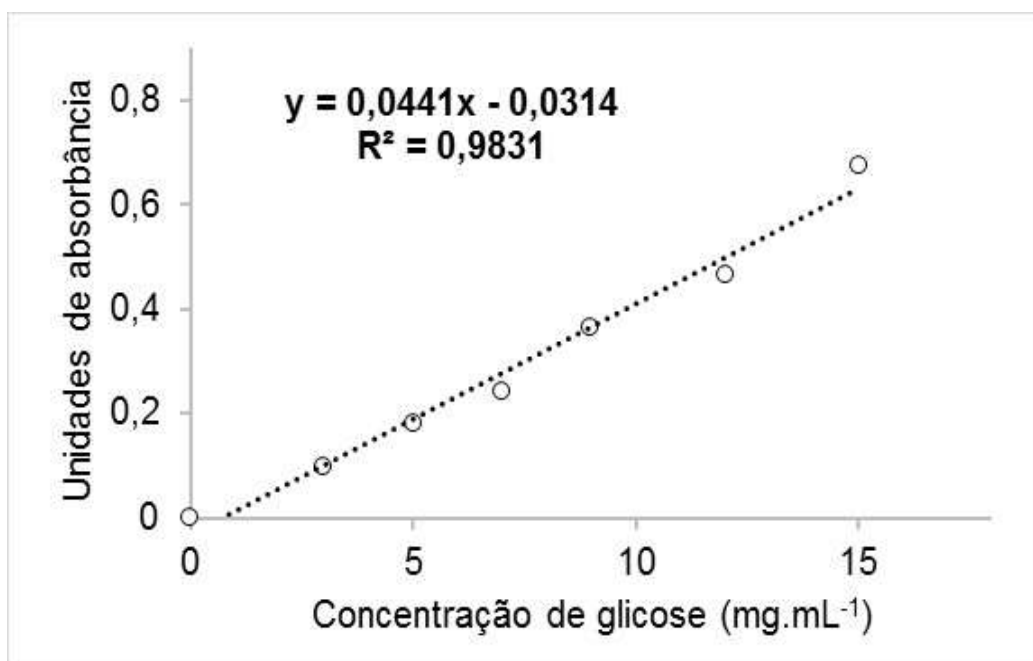
- glucoamylase (Amy-Glu) for one step starch saccharification. *Int J Biol Macromol*. 2017;99:274–281.
76. Aalbaek T, Reeslev M, Jensen B, Eriksen SH. Acid protease and formation of multiple forms of glucoamylase in batch and continuous cultures of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb Technol*. 2002;30(3):410–415.
 77. Roldán IUM, Mitsuhara AT, Munhoz Desajacomo JP, de Oliveira LE, Gelli VC, Monti R, et al. Chemical, structural, and ultrastructural analysis of waste from the carrageenan and sugar-bioethanol processes for future bioenergy generation. *Biomass and Bioenergy*. 2017;107:233–243.
 78. Silverstain R, Webster F, Kiemle D. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7º. LTC, editor. Rio de Janeiro; 2006. 1-490 p.
 79. Cardoso CL, Moraes MC de, Cass QB. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Quim Nova*. 2009;32(1):175–187.
 80. Syed F, Ali K, Javaid M, Gul M, Khan Z, Imran M, et al. *Journal of Photochemistry & Photobiology , B : Biology Preparation and characterization of a green nano-support for the covalent immobilization of glucoamylase from Neurospora sitophila*. *JPB*. 2016;162:309–317.
 81. Hassan ME, Yang Q, Xiao Z. Covalent immobilization of glucoamylase enzyme onto chemically activated surface of κ -carrageenan. *Bull Natl Res Cent*. 2019;43(1):2–11.
 82. Ida J ichi, Matsuyama T, Yamamoto H. Immobilization of glucoamylase on ceramic membrane surfaces modified with a new method of treatment utilizing SPCP-CVD. *Biochem Eng J*. 2000;5(3):179–184.
 83. George R, Gopinath S, Sugunan S. Improved Stabilities of Immobilized

Glucoamylase on Functionalized Mesoporous Silica Synthesized using Decane as Swelling Agent. 2013;8(1):70–76.

84. Torres LM, Leonel M, Mischan MM. Concentração de enzimas amilolíticas na hidrólise do amido de gengibre. Ciência Rural. 2012;42(7):1327–1332.

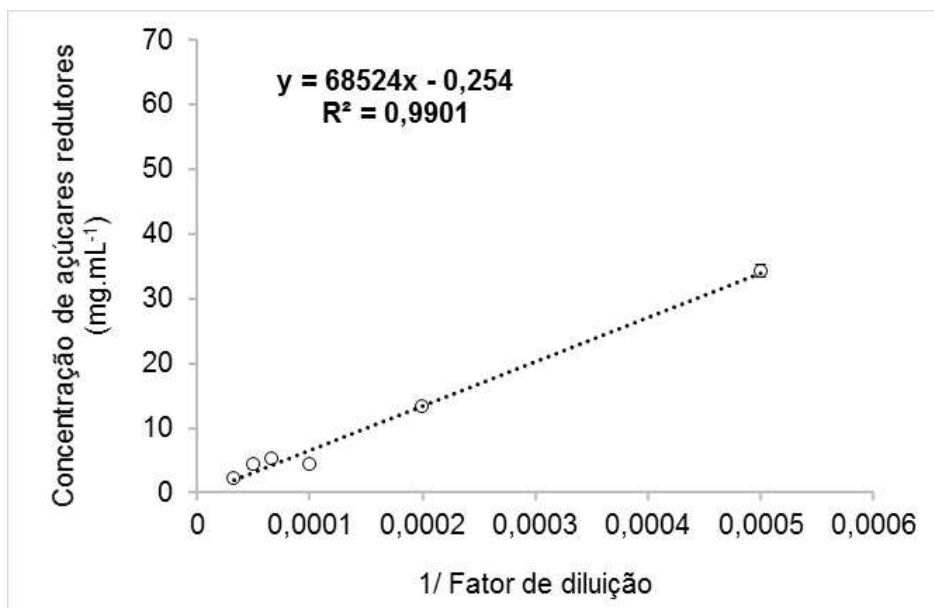
10 APÊNDICES

Apêndice 1. Curva analítica de glicose em função de unidades de absorbância. Reação química realizada em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5, obtida pela reação de oxirredução com DNS.

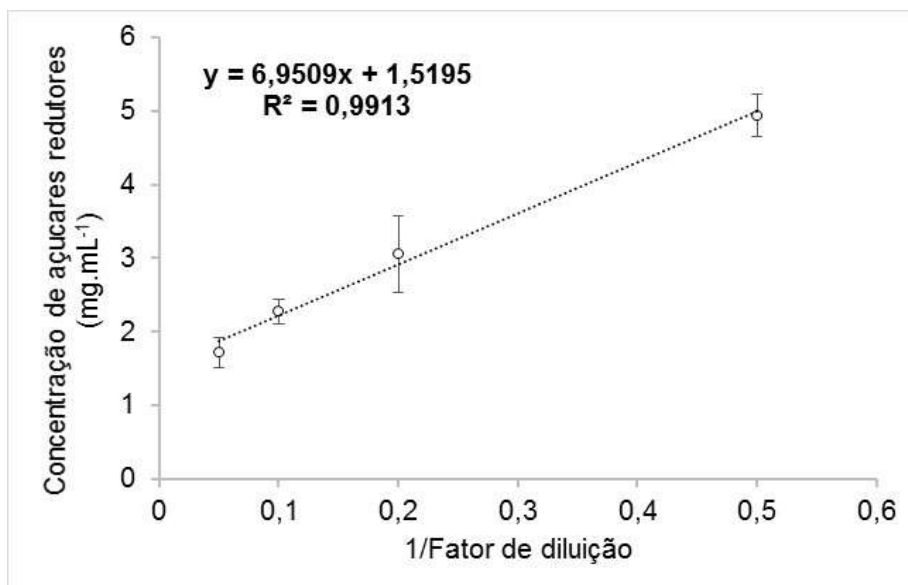


Apêndice 2. Relação da concentração de açúcar redutor em função do inverso do fator de diluição das enzimas avaliadas, glucoamilase e α -amilase, respectivamente.

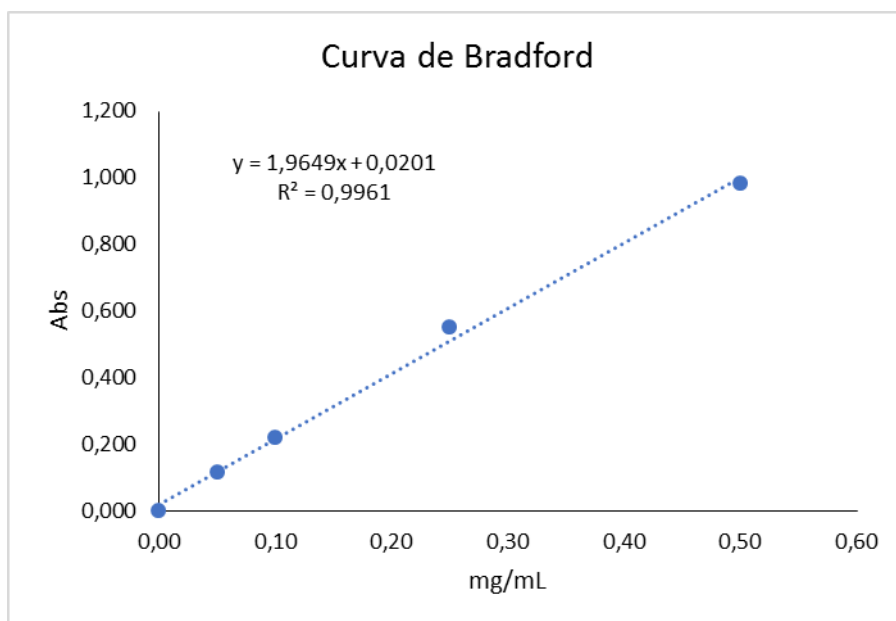
Apêndice II.1. Concentração de açúcares redutores em função do inverso do fator de diluição. Catálise amilolítica com glucoamilase realizada em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5, obtida pela reação de oxirredução com DNS (A reação ocorreu a 50°C por 30 min).



Apêndice II.2 – Concentração de açúcares redutores em função do inverso do fator de diluição. Catálise amilolítica com α -amilase comercial realizada em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5, obtida pela reação de oxirredução com DNS. (A reação ocorreu a 50°C por 30 min).



Apêndice 3. Curva analítica para determinação de proteína.



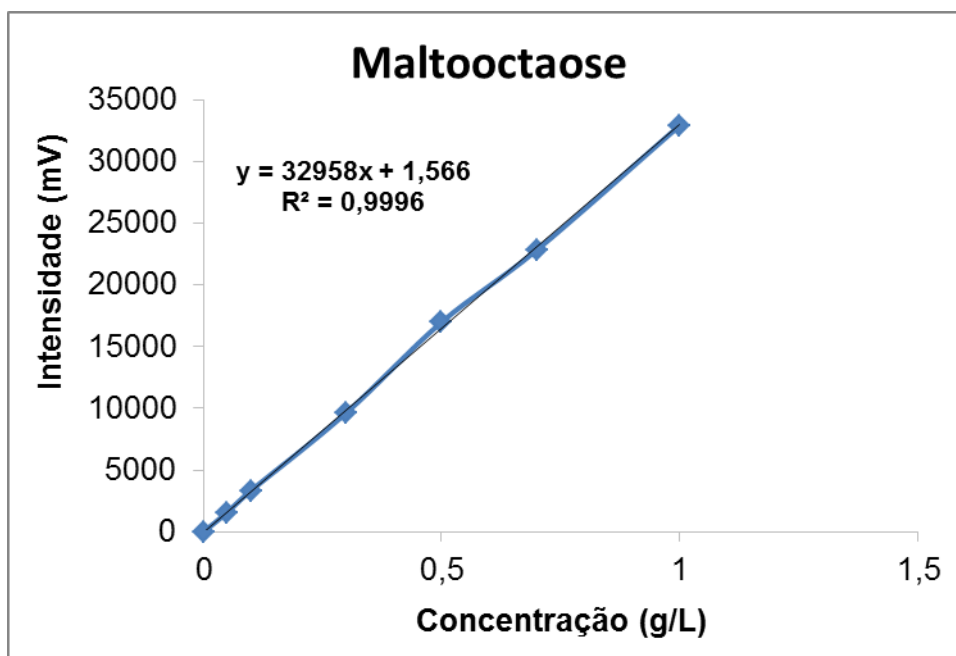
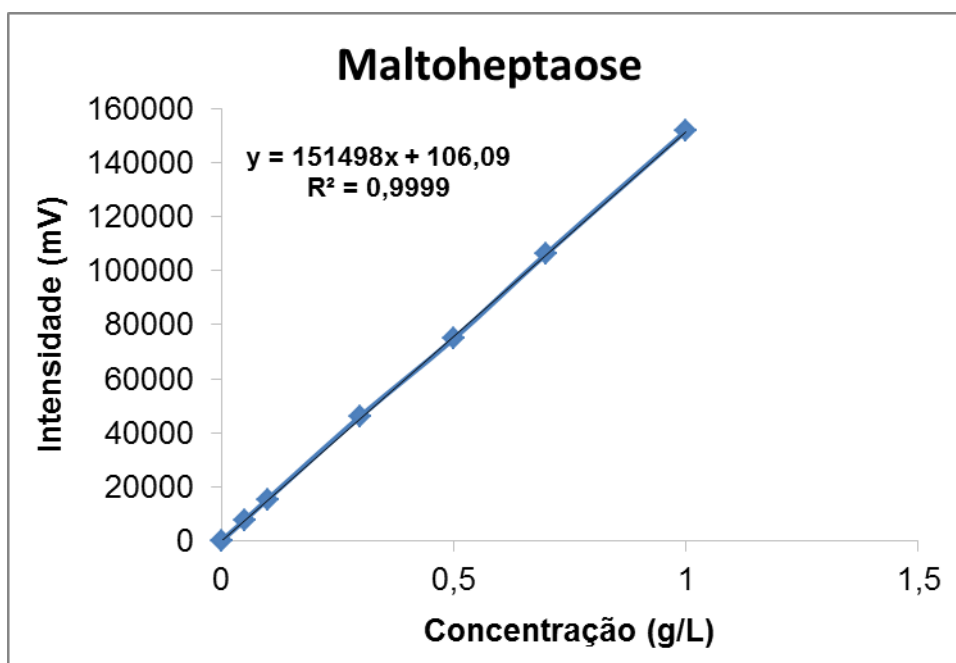
Apêndice 4. Curva analítica para determinação de açucares.**Figura IV.1:** Curva analítica para determinação de maltooctose**Figura IV.2:** Curva analítica para determinação de heptose

Figura IV.3: Curva analítica para determinação de hexose

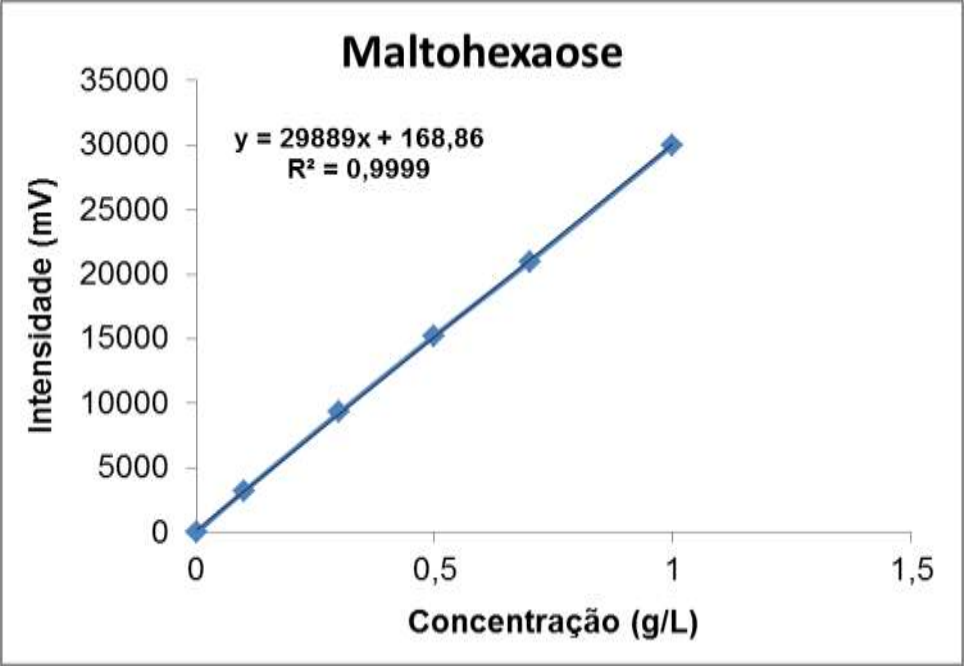


Figura IV.4: Curva analítica para determinação de maltopentose

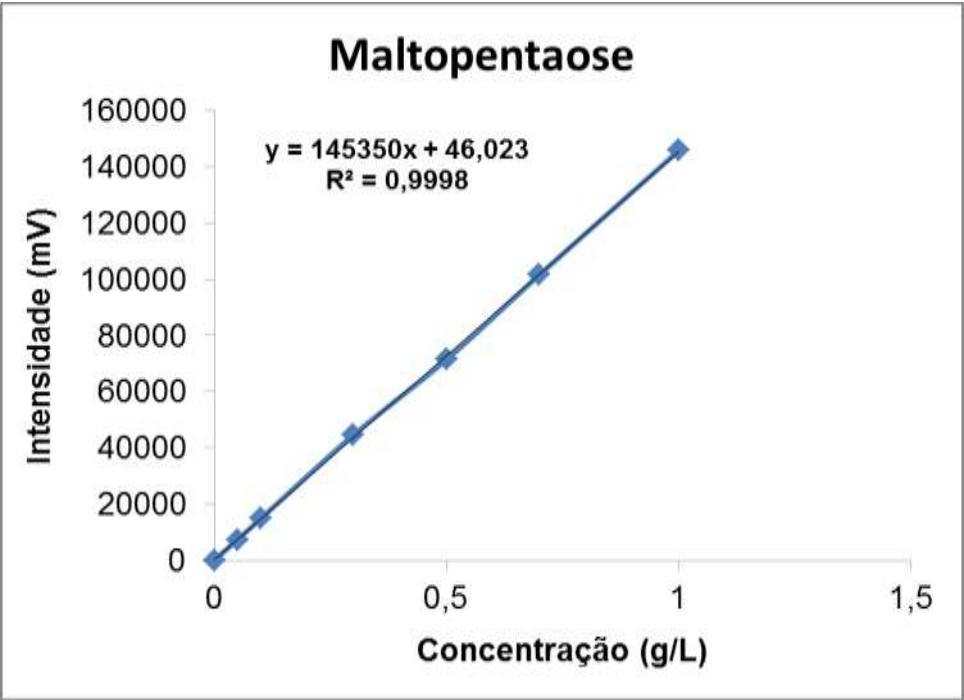


Figura IV.5: Curva analítica para determinação de maltotetrose

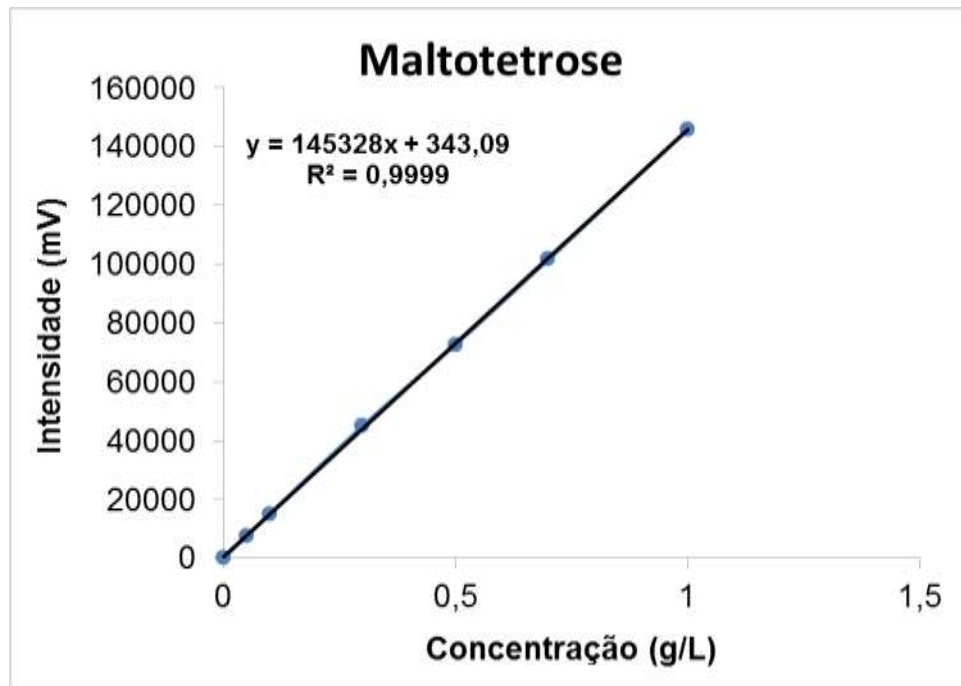


Figura IV.6: Curva analítica para determinação de maltotriose

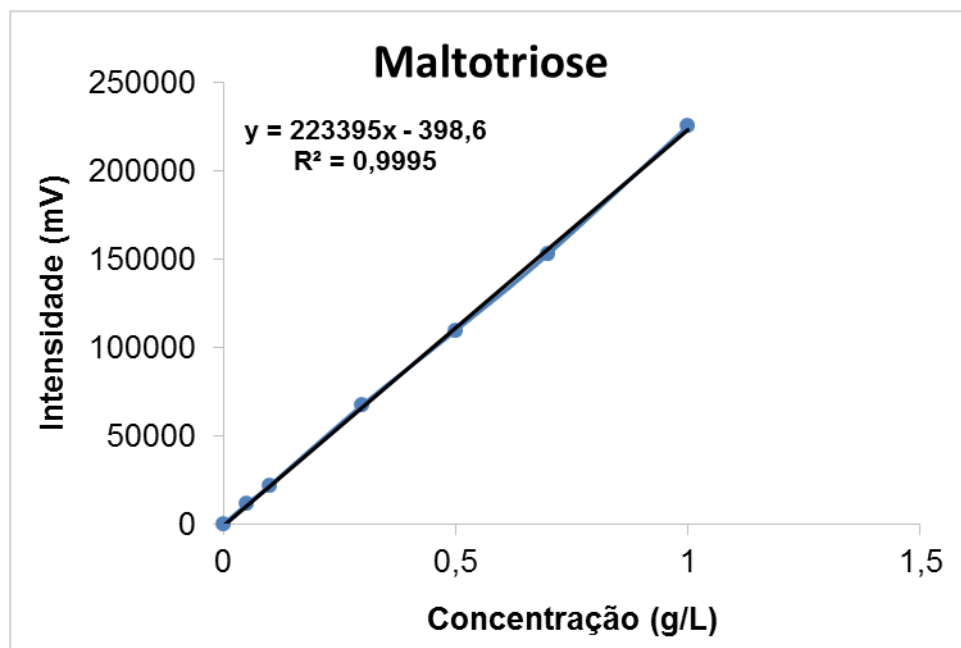


Figura IV.7: Curva analítica para determinação de maltose

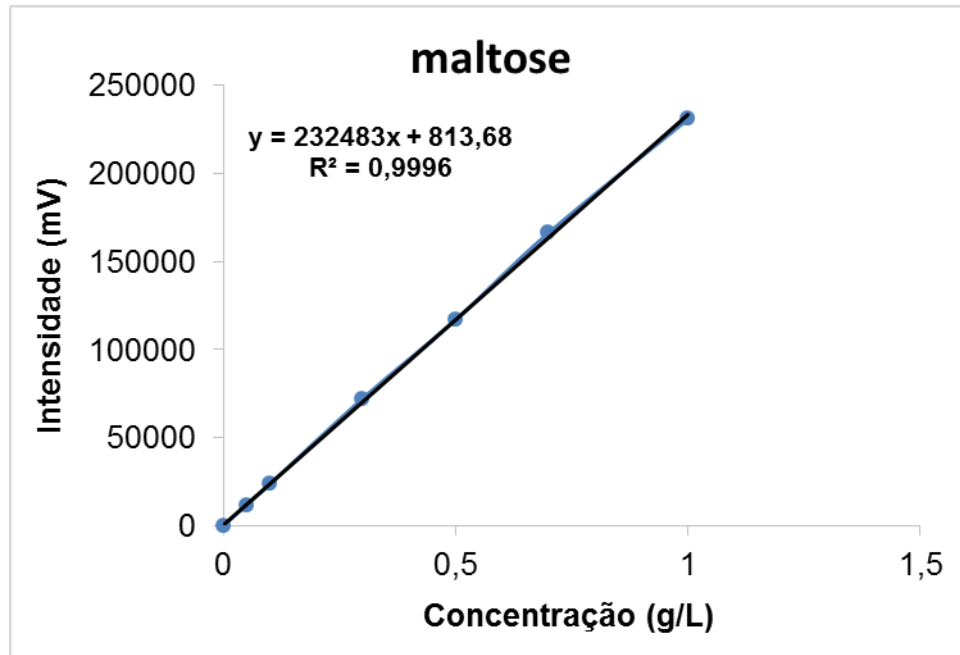


Figura IV.8: Curva analítica para determinação de glicose

