



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS TECNOLOGIAS PARA PRODUÇÃO DE
XAROPE DE GLICOSE A PARTIR DE AMIDO**

ALINE COSTA DE FREITAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Março - 2012

ALINE COSTA DE FREITAS

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS TECNOLOGIAS PARA PRODUÇÃO DE
XAROPE DE GLICOSE A PARTIR DE AMIDO**

Orientador: Pedro de Oliva Neto

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

547.758 Freitas, Aline Costa de
F866d Desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de
 xarope de glicose a partir de amido / Aline Costa de Freitas. -
 Rio Claro : [s.n.], 2012
 103 f. : il., figs., tabs.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientador: Pedro de Oliva Neto

 1. Enzimas. 2. Amilases. 3. Produção de amilase. 4.
 Fermentação submersa. 5. Rhizopus. 6. Imobilização
 enzimática. I. Título.

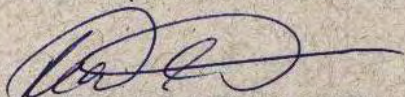
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Desenvolvimento de novas tecnologias para produção de xarope de glicose a partir de amido

AUTORA: ALINE COSTA DE FREITAS

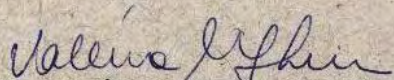
ORIENTADOR: Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



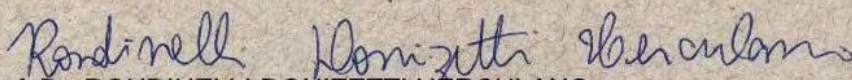
Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis



Profa. Dra. VALÉRIA MARTA GOMES DE LIMA

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis



Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis

Data da realização: 18 de abril de 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ivonei e Márcia, que me ensinaram o valor e o respeito à vida e sempre me incentivam a batalhar por meus objetivos, por mais difícil ou distante que pareça alcançá-los.

*“É melhor tentar e falhar que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”*
(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Pedro de Oliva Neto, pela orientação durante o projeto e por contribuir para meu crescimento profissional.

À professora Dra. Valéria Marta Gomes de Lima por tantos esclarecimentos de dúvidas e amizade.

Aos meus pais, Ivonei e Márcia e à minha irmã Rafaela, pelo amor, apoio incondicional e incentivo para alcançar meus objetivos.

Ao Eduardo, pelo apoio, carinho, sugestões, paciência e palavras de encorajamento durante todo esse tempo que estivemos juntos e que me ajudaram nos momentos mais difíceis. Muito obrigada!

Aos colegas do LABI - Assis, pelo companheirismo, momentos de descontração e enriquecimento profissional. Em especial, aos meus amigos Bruna, Kassandra, Bruno, Giba e Mari, pelas sugestões e ajuda nos problemas que surgiram durante a caminhada.

Aos colegas da pós graduação da Unesp de Rio Claro e agregados de S.J.R.P. e Assis, pelas risadas e compartilhamento de tantas histórias ao longo das nossas viagens.

A todos aqueles que me acolheram em Rio Claro, quando cheguei pela primeira vez no Departamento de Bioquímica e Microbiologia.

À Dr. Ana Flávia pela colaboração nas análises de Cromatografia em Campinas.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

A Deus, por sempre colocar anjos em meu caminho.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Amido	19
2.2 Enzimas: aspectos gerais	20
2.3 Amilases.....	21
2.4 Aplicações de amilases.....	23
2.4.1 Indústria alimentícia	23
2.4.2 Indústria de panificação	24
2.4.3 Indústria têxtil.....	24
2.4.4 Indústria de papel.....	25
2.4.5 Indústria de detergentes	25
2.5 Hidrólise amilolítica	25
2.6 Xarope de glicose.....	27
2.7 Imobilização de enzimas	29
2.8 Micro-organismos.....	31
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivos Gerais.....	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1. Reagentes.....	34
4.2. Micro-organismos.....	34
4.3. Condições de Fermentação	34
4.4. Atividade Enzimática	35
4.5. Determinação de proteínas	36

4.6.	Determinação de açúcares.....	36
4.7.	Caracterização do extrato enzimático bruto	36
4.7.1.	Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática.....	36
4.7.2.	Efeito do pH e temperatura na estabilidade enzimática.....	36
4.8.	Perfil da hidrólise do amido e análise dos produtos	37
4.9.	Concentração do extrato enzimático	37
4.9.1.	Precipitação com sulfato de amônio	37
4.9.2.	Precipitação por etanol	37
4.10.	Imobilização da enzima.....	38
4.10.1.	Adsorção em carvão ativado	38
4.10.2.	Adsorção em Bagaço de cana.....	38
4.10.3.	Imobilização por troca iônica em resina Amberlite™ MB20.....	38
4.10.4.	Imobilização em quitosana como agente de cross-linking.....	39
4.10.5.	Imobilização em alginato e quitosana: Peletes.....	39
4.10.6.	Imobilização em alginato e quitosana: Biofilme	40
4.11.	Imobilização da biomassa	41
4.11.1.	Biomassa	41
4.11.2.	Imobilização em alginato e quitosana: Biofilme	41
4.12.	Produção do xarope	42
4.13.	Análise dos Resultados.....	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1.	Efeito das fontes de carbono e nitrogênio na produção enzimática	43
5.2.	Efeito da temperatura de fermentação na produção enzimática	45
5.3.	Efeito do tempo de fermentação na produção enzimática	46
5.4.	Caracterização enzimática quanto ao pH e temperatura de atuação e estabilidade	49
5.4.1	Efeito do pH na Atividade enzimática e estabilidade.....	49

5.4.2	Efeito da temperatura na Atividade enzimática e estabilidade	53
5.5.	Perfil da hidrólise do amido e análise dos produtos	58
5.6.	Concentração do extrato bruto	60
5.6.1.	Precipitação com sulfato de amônio	60
5.6.2.	Precipitação com etanol.....	61
5.7.	Imobilização da enzima	63
5.7.1.	Adsorção em carvão	63
5.7.2.	Adsorção em bagaço de cana de açúcar	65
5.7.3.	Imobilização por troca iônica em resina Amberlite™ MB20	67
5.7.4.	Imobilização em quitosana como agente de cross-linking	70
5.7.5.	Imobilização em alginato e quitosana: peletes.....	72
5.7.6.	Imobilização em alginato e quitosana: biofilme	74
5.8.	Imobilização da biomassa	77
5.9.	Produção do xarope de glicose	79
6.	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
	APÊNDICE A.....	97

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Polímeros do amido. (A) Segmento linear curto da amilose com ligações α -1,4. (B) Ponto de ramificação (α -1,6) da amilopectina. (C) Disposição da amilose e amilopectina no grão de amido. As fibras de amilopectina (vermelho) formam estrutura dupla-hélice umas com as outras ou com as fibras de amilose (azul). Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2006).	20
Figura 2. Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas Fonte: adaptado de Guandalini (2007).	22
Figura 3. Etapas do processamento enzimático do amido.	27
Figura 4. Diferentes métodos de imobilização de enzimas. Fonte: Adaptado de Cardoso, Moraes e Cass (2009).	30
Figura 5. Formação do gel de alginato de cálcio por aprisionamento. Fonte: COVIZZI et al., (2007).	30
Figura 6. Efeito do tempo na atividade enzimática do extrato de <i>Rhizopus oryzae</i> (A) e <i>R. oligosporus</i> (B) e pH final do meio. Condições da fermentação: 30°C, pH 5,5, farinha de trigo tipo II como substrato. [○] Atividade enzimática; [■] pH. *Letras iguais indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$).....	47
Figura 7. Efeito do pH na atividade (A) e na estabilidade (B) da amilase de <i>R. oryzae</i> . Condições do ensaio para ambos: 60°C, 30 min. Para a estabilidade a atividade foi feita após 24 h de incubação da enzima a 25°C e comparada com a enzima não incubada e em tampão acetato 0,2 mol.L ⁻¹ , pH 5,6. Tampão citrato-fosfato, pH 3 a 7 [■]; tampão fosfato, pH 7 e 8 [○]; tampão tris-HCl, pH 8 e 9 [▲]; tampão glicina-NaOH, pH 9 e 10 [□].	50
Figura 8. Efeito do pH na atividade (A) e na estabilidade (B) da amilase de <i>R. oligosporus</i> . Condições do ensaio para ambos: 60°C, 30 min. Para a estabilidade a	

atividade foi feita após 24 h de incubação da enzima a 25°C e comparada com a enzima não incubada e em tampão acetato 0,2 mol.L-1, pH 5,6. Tampão citrato-fosfato, pH 3 a 7 [■]; tampão fosfato, pH 7 e 8 [○]; tampão tris-HCl, pH 8 e 9 [▲]; tampão glicina-NaOH, pH 9 e 10 [□]. 51

Figura 9. Efeito da temperatura na atividade (A) da amilase de *R. Oryzae*, entre 20°C e 80°C, pH 5,6 por 30 min. e na estabilidade (B) com incubação por 1 h entre 20°C e 80°C e reação à 60°C, pH 5,6, 30 min. 54

Figura 10. Efeito da temperatura na atividade (A) da amilase de *R. oligosporus*, entre 20°C e 80°C, pH 5,6 por 30 min. e na estabilidade (B) com incubação por 1 h entre 20°C e 80°C e reação à 60°C, pH 5,6, 30 min. 56

Figura 11. Termo-estabilidade da amilase após 4 h de incubação a 60°C. *R. oryzae* [○]; *R. oligosporus* [■]. Condições do ensaio: 60°C, pH 5,6, 30 min.....57

Figura 12. Curva de hidrólise do amido usando caldo de cultivo *R. oryzae* e *R. oligosporus* a 50°C e solução de amido 0,44%. 58

Figura 13. Produto da hidrólise do amido 0,44% (m/v) ao longo do tempo, utilizando extratos enzimáticos brutos de *R. oryzae* (2,18 U/mL) e *R. oligosporus* (2,52 U/mL). 59

Figura 14. Produto da hidrólise do amido pela ação da amilase adsorvida em diferentes concentrações de carvão.....63

Figura 15. Atividade enzimática dos filtrados obtidos após o processo de adsorção em carvão.....64

Figura 16. Atividade enzimática durante o re-ciclo da enzima imobilizada em bagaço de cana de açúcar.....66

Figura 17. Estrutura do glutaraldeído e PEI e grupos funcionais. Adaptado de Neri, 2008. 67

Figura 18. Atividade enzimática durante o re-ciclo da enzima imobilizada em resina Amberlite™ MB20.	68
Figura 19. Açúcar redutor (AR) produzido pela enzima imobilizada em resina Amberlite™ MB20 durante os três ciclos (mg AR/g enzima imobilizada) e AR produzido utilizando o sobrenadante (mg AR/mL de sobrenadante).....	69
Figura 20. Açúcar redutor (AR) produzido pela enzima imobilizada na forma de biofilme (mg AR/ g enzima imobilizada).	76
Figura 21. Atividade enzimática da biomassa, imobilizada em biofilme ou não.	77
Figura 22. Açúcar redutor (AR) produzido pela biomassa (mg AR / g biomassa imobilizada), imobilizada em biofilme ou não.	78
Figura 23. Reação enzimática utilizando enzima produzida por <i>R. oligosporus</i> (30 U totais) em solução de amido a 5% e 10%, a 50°C.	80

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Características dos diferentes tipos de amilases sobre o amido.....	23
Tabela 2. Produtos provenientes da hidrólise do amido e suas aplicações.	28
Tabela 3. Funções e formulações da glicose DE 38-42 nos produtos alimentícios. .	28
Tabela 4. Efeito da fonte de carbono e temperatura na produção enzimática em 96 h de fermentação, pH 5,5.....	43
Tabela 5. Composição centesimal dos substratos utilizados.	44
Tabela 6. Concentração do extrato bruto por precipitação com sulfato de amônio. .	61
Tabela 7. Concentração do extrato bruto por precipitação com etanol.	62
Tabela 8. Atividade enzimática da enzima livre (U/mL), enzima imobilizada (U/g) e sobrenadantes do processo (U/mL) e Rendimento da imobilização em bagaço de cana de açúcar.....	65
Tabela 9. Atividade enzimática da enzima livre (U/mL), enzima imobilizada (U/g) e sobrenadantes do processo (U/mL) e Rendimento da imobilização em resina Amberlite™ MB20.	68
Tabela 10. Atividade enzimática da enzima livre (U/mL), enzima imobilizada (U/g) e sobrenadantes do processo (U/mL) e Rendimento da imobilização em quitosana como agente de cross-linking.....	71
Tabela 11. Atividade enzimática da enzima livre (U/mL), enzima imobilizada (U/g) e sobrenadantes do processo (U/mL) e Rendimento da imobilização em pelete de alginato.....	73
Tabela 12. Atividade enzimática da enzima livre (U/mL), enzima imobilizada (U/g) e sobrenadantes do processo (U/mL) e Rendimento da imobilização em biofilme de alginato.....	75

RESUMO

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise do amido, dentre as quais se destaca a α -amilase, a β -amilase e a glicoamilase. Apresentam grande importância biotecnológica devido sua aplicação em vários processos industriais, principalmente alimentício. Podem ser obtidas de plantas, animais e micro-organismos, no entanto, enzimas microbianas encontram maior demanda industrial. Além da importância econômica destas enzimas, novas metodologias têm sido desenvolvidas com resíduos como substrato para muitos processos industriais. A utilização de resíduos agro-industriais não só contribui para minimizar o impacto ambiental como atribui um valor econômico a esses substratos. Além disso, a imobilização de enzimas tem sido uma estratégia utilizada para a condução de bioprocessos, uma vez que os biocatalisadores imobilizados podem ser reutilizados em processos contínuos reduzindo custos de produção. Neste trabalho foi comparada a produção de amilases de dois fungos importantes para a indústria de alimentos, *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* em fermentação submersa avaliando posteriormente os melhores métodos de imobilização da enzima, visando a produção de xarope de glicose. Os resultados mostraram que a farinha de trigo tipo II foi melhor ao farelo de mandioca e à farinha de mandioca como fonte de carbono na fermentação. As condições definidas para a fermentação foram: temperatura de 30°C e 96 h de tempo de fermentação para ambos os micro-organismos. O melhor pH para a atividade enzimática de *Rhizopus oryzae* foi 5,0, e de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* foi 4,0 e 5,0. Ambas as enzimas apresentaram 100% de estabilidade em pH 4,0 a 7,0. A melhor temperatura para a atividade enzimática da amilase de *R. oryzae* foi 50°C e de *R. oligosporus* foram 60°C e 65°C. Ambas as enzimas foram 100% estáveis na faixa de temperatura entre 20°C e 40°C, no entanto, enzima produzida por *R. oligosporus* foi mais estável nas temperaturas acima de 50°C do que a de *R. oryzae*. Os produtos da hidrólise enzimática do amido foram analisados por cromatógrafo líquido de alta eficiência, indicando glicose como produto final para ambos os micro-organismos. Estes resultados revelam que as enzimas são glicoamilases. A pré-purificação da amilase de *R. oligosporus* com concentração por sais foi mais efetiva, resultando em uma purificação de 3,4 (30-80% de sulfato de amônio) contra 1,5 pela

precipitação por solvente orgânico (75% e 90% de etanol). A enzima concentrada de *R. oligosporus* foi imobilizada utilizando diferentes protocolos, dentre eles, imobilização em bagaço de cana, resinas poliméricas, quitosana e alginato. A biomassa também foi imobilizada em biofilme de alginato. O protocolo de imobilização enzimática em biofilme de alginato foi o que apresentou o melhor rendimento de imobilização. O xarope de glicose foi produzido utilizando a enzima concentrada de *R. oligosporus* e solução de amido 10% (m/v), em 4 h de reação a 50°C. Após concentração, o xarope de glicose 20% (m/v) foi obtido com sucesso. Esses resultados indicaram que a glicoamilase produzida nas condições sugeridas neste trabalho poderia ser muito interessante para propostas industriais. Outros estudos em imobilização serão necessários para melhorar esta tecnologia para aplicação industrial.

Palavras chave: Produção de amilase, fermentação submersa, hidrólise enzimática, *Rhizopus*, imobilização enzimática, xarope de glicose.

ABSTRACT

Amylases are enzymes that catalyze starch hydrolysis, among which stands out α -amylase, β -amylase and glucoamylase. These enzymes have great importance due to its biotechnological application in various industrial processes, especially in food industry, among others. Also, they can be obtained from plants, animals and microorganisms, however microbial enzymes are the highest industrial demand. Besides economic importance, new methodologies has been developed with agricultural waste as substrate for many industrial processes. Bio-waste application in agro-industry not only minimizes environmental impacts as it increases economic value attached to these substrates. Immobilized enzymes is one strategy being used to conduct bio-processes, since immobilized biocatalysts can be reused in continuous processes and lowering production costs. In this paper two important fungi amylases from *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* were characterized for enzyme production by optimal conditions and immobilization techniques, in order to produce glucose syrup. Results showed that type II wheat flour was better than cassava bagasse and cassava flour as fermentation's carbon source. Fermentation conditions were: temperature 30°C during 96 hours for both microorganisms. Best enzymatic pH activity of *Rhizopus oryzae* was achieved at 5.0, and for *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* was 4.0 and 5.0. Both enzymes showed 100% stability from pH 4.0 to 7.0. The best temperature for amylase enzymatic activity of *R. oryzae* was 50°C and *R. oligosporus* were 60°C and 65°C. Both enzymes were 100% stable at temperature range of 20°C to 40°C, however the enzyme of *R. oligosporus* were more stable at temperatures above 50°C than *R. oryzae*. The products of starch enzymatic hydrolysis were analyzed by high-pressure liquid chromatography, indicating only glucose as final product for both microorganisms. These results revealed that the enzymes of both microorganisms are glucoamylases. The pre-purification of the amylase from *R. oligosporus* with salt concentration was more effective reaching a purification factor of 3.4 (30-80% ammonium sulfate) against 1.5 by organic solvent precipitation (75% and 90% ethanol). Concentrated enzyme from *R. oligosporus* was immobilized using different protocols, including sugarcane bagasse, polymeric resins, chitosan, alginate. Biomass was also immobilized in alginate biofilm. The protocol of enzyme immobilization with alginate biofilm was the higher yield of immobilization. Glucose

syrup was produced using concentrated enzyme and 10% starch (w/v) in 4 h time reaction at 50°C. After concentration, 20% (w/v) glucose syrup was successfully achieved. These results indicated the glucoamylase produced by the conditions proposed in this work could be very interesting for industrial propose. Other immobilization studies will be necessary to improve this technology for industrial application.

Keywords: Amylase production, submerged fermentation, enzymatic hydrolysis, *Rhizopus*, enzyme immobilization, glucose syrup.

1. INTRODUÇÃO

Amilases são enzimas que hidrolisam moléculas de amido gerando diversos produtos e atualmente representam 25% do mercado de enzimas (BORGIO, 2011). O amido contém dois tipos de polímeros, a amilose e a amilopectina, ambos constituídos de moléculas de glicose. A amilose consiste de cadeias lineares longas não-ramificadas de unidades de D-glicose conectadas por ligações do tipo α -1,4. Enquanto que a amilopectina é altamente ramificada, possui ligações do tipo α -1,4 na parte linear e ligações α -1,6 nos pontos de ramificação (NELSON e COX, 2006).

Dentre as principais amilases destacam-se a α -amilase, a β -amilase e a glicoamilase. A α -amilase atua ao longo das cadeias de amilose e amilopectina hidrolisando somente as ligações α -1,4 e liberando malto-oligossacarídeos (MENEZES, 1982). A β -amilase atua na amilose e amilopectina hidrolisando ligações α -1,4 a partir da extremidade não redutora, produzindo maltose e uma nova molécula de amido com reduzido massa molecular. A glicoamilase catalisa a reação de hidrólise das ligações α -1,4 e α -1,6 da extremidade não redutora da amilose e amilopectina transformando-os em glicose (SANTANA, 2007).

As amilases têm grande importância biotecnológica devido as suas aplicações em diversos setores industriais, como de alimentos, papel, detergentes, têxtil, química, farmacêutica e outros. Elas podem ser obtidas de diversas fontes, tais como plantas, animais e micro-organismos, no entanto, enzimas microbianas geralmente possuem maior demanda industrial (GUPTA et al., 2003). Devido a essa demanda, há um enorme interesse na descoberta de enzimas com melhores propriedades na degradação do amido, bem como no desenvolvimento de novas técnicas que reduzam o custo de produção dos derivados do amido (BURHAN et al., 2003).

No Brasil, o principal produto da hidrólise do amido é o xarope de glicose. A expressão xarope de glicose designa todas as soluções aquosas purificadas e concentradas de polímeros de D-glicose, obtidas por hidrólise do amido. Por glicose são compreendidos os hidrolisados contendo moléculas de glicose na proporção de 5 a 95%, com a condição de que predominem em relação aos demais polissacarídeos (SURMELY et al., 2003).

Além da importância econômica que as amilases representam, as novas metodologias que vêm sendo desenvolvidas buscam utilizar-se de resíduos como substrato para muitos processos industriais, uma vez que a maioria das agroindústrias gera, além do produto final, um grande volume de subprodutos. Como principais resíduos agro-industriais tem-se bagaço de cana-de-açúcar, farelo de mandioca, farelo de trigo, casca de café, polpa de beterraba, farelo e casca de arroz, entre outros.

Com o aparecimento dessas novas tecnologias, principalmente na área de enzimas e fermentação, novos caminhos têm sido abertos para a utilização de resíduos agro-industriais, contribuindo tanto para minimizar o impacto ambiental como atribuir um valor econômico ao material que será descartado.

Apesar da grande demanda e importância das amilases, ainda há dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliado à instabilidade e frequente inadequabilidade para uso em determinados solventes e condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, fatores que podem ser superados por meio de técnicas de imobilização.

A enzima imobilizada pode ser reutilizada e é normalmente mais estável em relação à enzima livre, com a vantagem adicional de possibilitar a utilização em processo contínuo (CARVALHO, CANILHA e SILVA, 2006). No entanto, um dos fatores essenciais que deve ser considerado na utilização de um determinado sistema de imobilização é o tipo de interação entre o suporte e o biocatalisador, que pode influenciar diretamente na estabilidade e nos efeitos cinéticos da catálise (SEBRÃO et al., 2007).

Neste trabalho estão sendo comparadas amilases de dois fungos importantes para a indústria de alimentos, *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, caracterizadas as condições ótimas de produção enzimática, e técnicas de imobilização, com o intuito de produzir xarope de glicose a partir de resíduos da indústria de farinha.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Amido

O amido é a principal substância de reserva nas plantas superiores e fornece de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem. A matéria-prima é disponível em quantidade suficiente e os processos industriais permitem que o amido seja extraído com elevada pureza. Trata-se de uma matéria-prima renovável, biodegradável e não tóxica (LEONEL, 2001a). Pela legislação brasileira em Portaria do Ministério da Saúde (BRASIL, 1978), considera-se amido o polissacarídeo de reserva das partes aéreas vegetais, que é o caso de grãos em cereais (milho e arroz), e fécula refere-se ao polissacarídeo das partes subterrâneas do vegetal, como tubérculos e raízes (batata e mandioca).

O amido puro é um pó branco sem sabor e inodoro, seu grânulo é inerte, estruturalmente estável, densamente condensado e insolúvel em água e álcool, sendo rompido na presença de enzimas. O tamanho e o formato dos grânulos são específicos de cada espécie de planta (PINTO, 2009). Quimicamente, o amido é um polímero constituído de moléculas de glicose unidas em ligações α -1,4 e α -1,6, as quais são estáveis a pH elevado, mas são hidrolisadas em pH baixo. No final da cadeia polimérica, encontra-se um grupo aldeído, que é conhecido como final redutor (VAN DER MAAREL et al., 2002).

É constituído por uma mistura de dois polissacarídeos: amilose e amilopectina, que estão ligados através de ligações de hidrogênio (Figura 1). O teor de cada polissacarídeo varia conforme a espécie e a idade da fonte. O amido da mandioca, por exemplo, contém aproximadamente 18% de amilose enquanto que o de milho contém cerca de 25% (BOBBIO e BOBBIO, 1992). A amilose é um polímero linear composto de até 6000 unidades de glicose com ligações do tipo α -1,4. A amilopectina é constituída por uma cadeia linear curta de 10-60 unidades de glicose unidas em ligação α -1,4 e cadeias laterais com 15-45 unidades de glicose unidas em ligação α -1,6 (SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

Aquecendo dispersões de amido em presença de água, as ligações mais fracas de pontes de hidrogênio entre as cadeias de amilose e amilopectina são rompidas e os grânulos de amido começam a intumescer, permitindo a destruição da

ordem molecular e mudanças irreversíveis nas suas propriedades, é o processo chamado gelatinização (MATSUI, 2002).

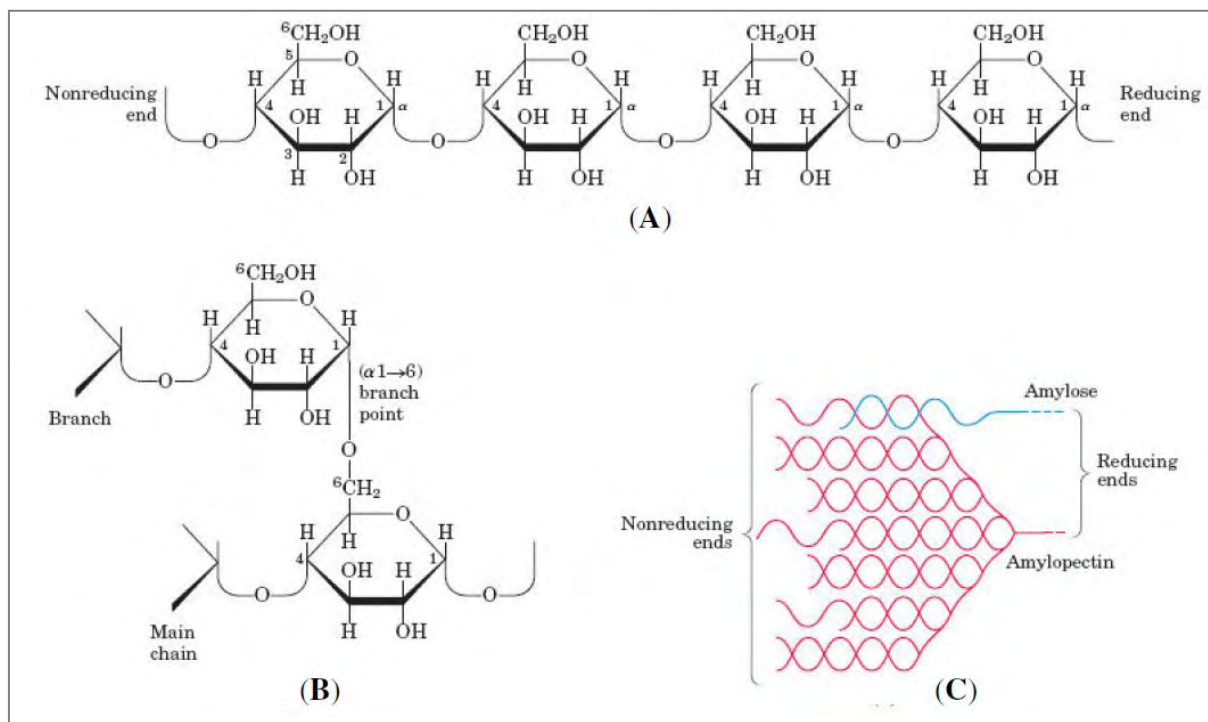


Figura 1. Polímeros do amido. (A) Segmento linear curto da amilose com ligações α -1,4. (B) Ponto de ramificação (α -1,6) da amilopectina. (C) Disposição da amilose e amilopectina no grão de amido. As fibras de amilopectina (vermelho) formam estrutura dupla-hélice umas com as outras ou com as fibras de amilose (azul). Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2006).

2.2 Enzimas: aspectos gerais

As enzimas são potentes catalisadores, definidos quimicamente como proteínas. São substâncias sólidas, mas difíceis de serem cristalizadas devido à complexidade de suas estruturas químicas. Geralmente, são solúveis em água e álcool diluído, e quando em solução são precipitadas pela adição de sulfato de amônio, álcool ou ácido tricloroacético. São inativadas pelo calor e esta, talvez seja a propriedade mais importante desses compostos em relação à tecnologia de alimentos (KIELING, 2002).

As enzimas geralmente são classificadas de acordo com o tipo de reação em que atuam. Essa classificação foi uniformizada pela comissão de Enzima da União Internacional de Bioquímica que dividiu as enzimas em seis grandes grupos.

As Oxidorredutases (Classe 1) catalisam reações de oxido-redução. As Transferases (Classe 2) realizam a transferência de certos grupos de um composto orgânico a outro. As Hidrolases (Classe 3) catalisam a hidrólise do substrato. As Liases (Classe 4) catalisam a adição ou remoção de algum grupo químico do substrato. As Isomerases (Classe 5) catalisam a conversão de isômeros. E as Ligases (Classe 6) catalisam a junção de dois compostos com a hidrólise de um ATP ou um trifosfato similar (PANDEY et al., 2006).

Como fonte de enzimas tem-se tecidos animais (glândulas principalmente), tecidos vegetais (semente, frutas e exsudações) e culturas de micro-organismos. Enzimas de glândulas e órgãos animais têm produção limitada porque são obtidas de subprodutos da industrialização de carnes, recurso alimentar nobre e dispendioso. Os vegetais têm sua limitação no fato de que pouca enzima pode ser extraída de uma grande massa vegetal.

Enzimas microbianas produzidas através do cultivo dirigido de micro-organismos em substratos apropriados não sofrem as limitações acima. Havendo disponibilidade dos insumos do substrato ou meio de cultura, sendo disponíveis e conhecidos o agente microbiano apropriado e o método e condução do cultivo, a produção é potencialmente ilimitada, dependendo da economia de respectivo processo (KIELING, 2002).

Dentre as enzimas produzidas por micro-organismos usadas industrialmente destacam-se: amilases, glicose-oxidases, lipases, proteases, pectinases, catalases, entre outras (BAUMER e DIEGO, 2008).

2.3 Amilases

As amilases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases que catalisam a hidrólise do amido e seus derivados, dentre as principais encontram-se a α -amilase, a β -amilase e a glicoamilase. Esta última produz glicose a partir do amido, a β -amilase produz maltose e a α -amilase dá origem às dextrinas. São classificadas como endoamilases ou exoamilases conforme seu ponto de atuação (Figura 2) (GUANDALINI, 2007).

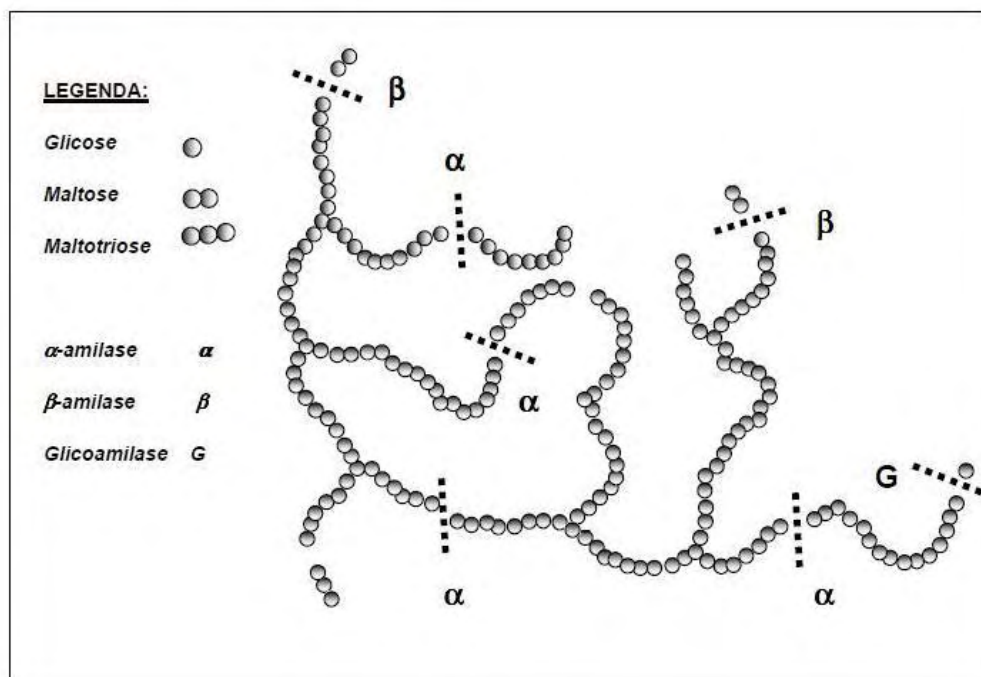


Figura 2. Representação esquemática da ação das enzimas amilolíticas Fonte: adaptado de Guandalini (2007).

A α -amilase (E.C. 3.2.1.1; α -1,4 glicano 4-glicanohidrolase) é uma endoamilase que atua ao longo das cadeias de amilose e amilopectina hidrolisando somente as ligações α -1,4 e liberando malto-oligossacarídeos. Ela rompe as ligações α -1,4 ao acaso dentro da molécula de amido, de maneira que se formam pequenas cadeias de dextrose, denominadas dextrinas. Esta enzima não rompe as ligações α -1,6, portanto, todos os pontos de ramificação ficam intactos após o tratamento com α -amilase (MENEZES, 1982).

A β -amilase (E.C. 3.2.1.2; α -1,4 glicano-maltohidrolase) é uma exoamilase que atua na amilose e amilopectina hidrolisando ligações α -1,4 a partir da extremidade não redutora, produzindo maltose e uma nova molécula de amido com reduzido peso molecular. A ação da enzima também diminui e para de agir à medida que se aproxima dos pontos de ligação α -1,6 da amilopectina.

A glicoamilase (E.C. 3.2.1.3; α -D-1,4 glicanoglicohidrolase), amiloglicosidase ou também γ -amilase é uma exoamilase que catalisa a reação de hidrólise das ligações α -1,4 e α -1,6 das extremidades não redutoras da amilose e amilopectina transformando-os em glicose (SANTANA, 2007). A Tabela 1 apresenta as características dos diferentes tipos de amilase sobre o amido.

Tabela 1. Características dos diferentes tipos de amilases sobre o amido.

Característica	α-amilase	β-amilase	Glicoamilase
Especificidade	Ligação α -1,4	Ligação α -1,4	Ligação α -1,4 e α -1,6
Mecanismo	Endoamilase	Exoamilase	Exoamilase
Principal produto da hidrólise	Dextrinas	Maltose	Glicose
Diminuição da consistência	Rápida	Lenta	Lenta
Perda da cor do iodo	Rápida	Lenta	Lenta
Aumento do poder redutor	Lento	Rápido	Rápido
Produção de glicose	Lenta	Não	Rápida
Produção de maltose	Lenta	Rápida	Não
Produção de dextrinas	Rápida	Lenta	Lenta

Fonte: QUAGLIA, 1991.

2.4 Aplicações de amilases

O amido é amplamente utilizado em vários setores industriais devido ao seu custo relativamente baixo. Tem amplas propriedades funcionais e pode ser usado em forma natural ou modificado. Várias transformações físicas, químicas e enzimáticas melhoram suas propriedades funcionais e permitem uma gama extensiva de aplicação. O recente desenvolvimento de enzimas tem melhorado o processamento de amido, tanto econômica quanto tecnicamente (MOORE et al., 2005).

2.4.1 Indústria alimentícia

O maior mercado de α -amilase está na produção de amido hidrolisado, obtendo-se glicose e frutose como produto final. Para a produção do xarope de milho com alto teor de frutose (HFCS ou *High Fructose Corn Syrups*), o amido é convertido em glicose e depois em frutose pela ação da glicose isomerase. Devido ao seu alto poder adoçante, é utilizado em grande quantidade nas indústrias de bebidas como adoçante em refrigerantes (GUPTA et al., 2003).

A produção microbiológica de amilase é considerada a primeira patente biotecnológica emitida nos Estados Unidos, pertencente ao cientista japonês Takamine Jokichi, em 1894 (BENNETT, 2001). O processo básico usado para fazer uma preparação enzimática conhecida como koji já era usada durante séculos no Japão para fazer produtos fermentados de soja. Primeiramente, as amilases no koji

transformam o amido em açúcares, mas os preparados de koji também contêm enzimas proteolíticas que convertem a proteína da soja em uma forma mais digestível e saborosa. O *sake*, também conhecido como vinho de arroz japonês faz uso de amilases do koji para alterar os carboidratos do arroz em uma forma que as leveduras possam usar para produzir álcool. Isto é aproximadamente equivalente ao malte de cevada usada na produção de cerveja (TORTORA, FUNKE e CASE, 2010)

2.4.2 Indústria de panificação

Na indústria de panificação, as amilases proporcionam melhor coloração, volume e textura dos pães. O emprego de enzimas na preparação do pão pode retardar o processo de envelhecimento mantendo o pão “fresco” por mais tempo (NOVOZYMES, 2004 APUD SPIER, 2005).

No processo fermentativo, a suplementação de farinhas com α -amilases fúngicas aumenta a taxa de fermentação e reduz a viscosidade da massa, resultando no aumento do volume e da textura do produto, além de aumentar a disponibilidade de açúcar fermentável na massa.

O aumento do teor de açúcar no produto final melhora o paladar e a qualidade de tostagem do pão (MC KNIGHT e MAZZIEIRO, 2000). As amilases fúngicas têm sido permitidas como aditivos em pães desde 1955 nos Estados Unidos e desde 1963 no Reino Unido, depois da confirmação da sua condição GRAS (Generally Recognized as Safe) (PRITCHARD, 1992).

2.4.3 Indústria têxtil

Na indústria têxtil, gomas de amido ou de derivados de amido são aplicadas para dar resistência ao fio durante o processo de tecelagem. As amilases são usadas na eliminação das gomas ao invés do uso de oxidantes, ácidos ou bases, que danificam em maior proporção a celulose do tecido (SPIER, 2005).

A enzima remove seletivamente a cobertura de amido e não ataca as fibras dos tecidos. Além disso, quebra as moléculas do amido em dextrinas que são solúveis em água, podendo ser facilmente removidas através da lavagem (HENDRIKSEN et al., 1999).

2.4.4 Indústria de papel

Gomas de amido também são utilizadas nas indústrias de papel, a goma é aplicada para fornecer proteção ao papel contra danos mecânicos durante o processamento, melhorando a qualidade do produto final e fornecendo força e flexibilidade. O amido é adicionado ao papel na etapa de prensagem, onde dois rolos fazem a transferência da pasta de amido ao papel.

A constante de viscosidade do papel é importante neste estágio para a reprodutibilidade dos resultados e cada tipo de papel requer um amido com viscosidade específica. O ajuste da viscosidade do amido natural é feito com α -amilase, em processos contínuos ou por batelada, e as condições do processo dependem da fonte de amido e do tipo de amilase utilizada (TOLAN, 1996).

2.4.5 Indústria de detergentes

A aplicação de enzimas na formulação de detergentes proporciona condições mais suaves de uso do que em detergentes que não contêm enzimas. Os primeiros detergentes para lavadoras de louças automáticas eram muito fortes causando lesão quando ingerido e não eram compatíveis com certos utensílios de cozinha. Isso induziu as indústrias de detergentes à pesquisa de soluções mais suaves e ao mesmo tempo eficientes (VAN EE et al., 1992).

Desde 1975 as α -amilases têm sido usadas em detergentes em pó para lavanderias. Cerca de 90% dos detergentes líquidos contêm α -amilase, fazendo que a demanda por α -amilases para uso em detergentes em pó para lavanderias aumentasse significativamente (KOTTWITZ et al., 1994).

Uma das limitações da amilase é a sensibilidade a agentes oxidantes presentes em alguns componentes da formulação. Por isso, as amilases têm sido utilizadas em combinação com outras enzimas, como proteases, e os compostos oxidantes têm sido substituídos por outros que não afetam a estabilidade enzimática (MITIDIERI et al., 2006).

2.5 Hidrólise amilolítica

A hidrólise completa de uma suspensão de amido resulta em uma solução formada apenas por moléculas de D-glicose, que se define como tendo Dextrose

Equivalente (DE) igual a 100. Quando a hidrólise não é total, a solução obtida apresenta uma composição de carboidratos variável, como maltose e maltodextrina, e que depende do tratamento a que foi submetida. Neste caso o DE é geralmente utilizado como medida do grau de hidrólise da suspensão (SAITO, 2005).

Os amidos podem ser hidrolisados por via química (ácidos, calor e pressão) ou enzimática. Ácidos concentrados como ácido sulfúrico e ácido clorídrico são usados para tratamento de materiais amiláceos e lignocelulósicos. Apesar dos ácidos serem agentes fortes para a hidrólise, ácidos concentrados são tóxicos, corrosivos e perigosos, requerendo reatores resistentes à corrosão (SUN e CHENG, 2002).

Além disso, um dos maiores problemas na hidrólise ácida do amido e da lignocelulose é a pobre fermentabilidade do hidrolisado, devido a degradação dos açúcares em furfurais e hidroximetilfurfurais. De acordo com Larsson et al., (1999), o hidroximetilfurfural pode ser degradado formando ácidos orgânicos e acetatos não desejáveis no hidrolisado.

Apesar da hidrólise ácida ainda ser utilizada, o uso de enzimas traz muitas vantagens. Uma delas é porque as enzimas são específicas para a reação, conseqüentemente, proporcionam a obtenção de xaropes com propriedades químicas e físicas bem definidas, além de evitar o escurecimento do produto final devido a reação ser mais branda (BALLESTEROS et al., 2002).

O processo de hidrólise enzimática do amido é realizado em duas etapas: a liquefação e a sacarificação (Figura 3). Como o amido é uma estrutura rígida, inicia-se o processo com a gelatinização visando facilitar a ação enzimática, o que reduz o tempo de processamento e melhora a qualidade final dos produtos (TAFFARELLO, 2004).

De acordo com Guandalini (2007), na liquefação é produzido, majoritariamente, maltodextrinas de variados pesos moleculares, com grau de polimerização acima de 4, ou seja, sem grande produção de monômeros ou dímeros. Na sacarificação são produzidos sacarídeos de baixo peso molecular, como glicose, maltose e maltotriose.

Segundo Taffarello (2004), a hidrólise enzimática teve grande contribuição ao processo industrial, uma vez que, paralelo ao seu desenvolvimento, houve um expressivo aumento do consumo de xaropes de açúcares como os de maltose, glicose e frutose, obtidos a partir de fontes amiláceas.

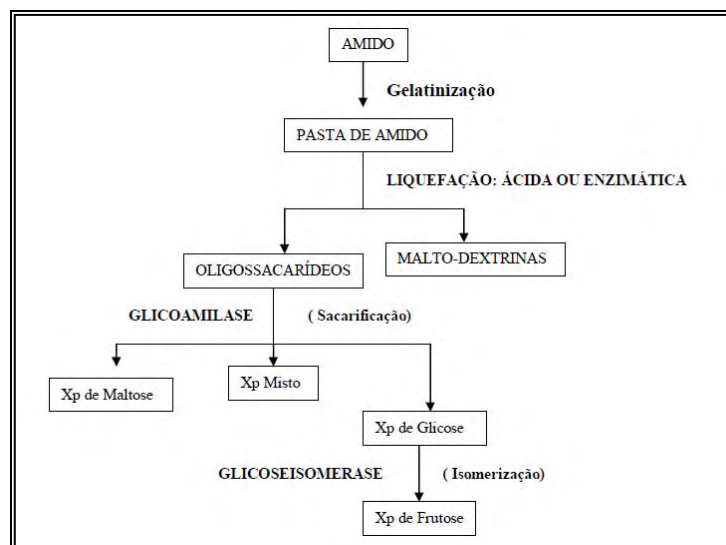


Figura 3. Etapas do processamento enzimático do amido.

2.6 Xarope de glicose

O xarope de glicose é um produto da hidrólise de amido e consiste de alguns monômeros de glicose e quantidade variada de dímeros, oligossacarídeos e polissacarídeos, dependendo do xarope em questão e seu processo de fabricação. Por glicose são compreendidos os hidrolisados contendo moléculas de glicose na proporção de 5 a 95%, com a condição de que predominem em relação aos demais polissacarídeos (SURMELY et al., 2003). Por convenção, refere-se aos produtos que possuem a dextrose equivalente (DE) entre 20 e 80 (KEARSLEY e DZIEDZIC, 1995). O Codex Alimentarius define xarope de glicose como “uma solução aquosa concentrada e purificada de sacarídeos nutritivos obtida a partir de amido, com um teor de dextrose equivalente não menor que 20% m/m (expressa como D-glicose em base seca)” (CODEX ALIMENTARIUS, 2012).

A produção de xaropes requer uma hidrólise intensa do amido. O início da produção de xaropes em grande escala deu-se nos anos trinta, quando foi desenvolvido o processo de hidrólise ácida do amido de maïs (variedade de milho). Os xaropes passaram a ser usados como adoçantes e como componentes de meios de cultura para processos fermentativos (Tabela 2). A indústria de xaropes recebeu grande impulso, quando a glicoamilase, enzima responsável pela hidrólise final dos oligossacarídeos oriundos da hidrólise do amido, e a glicose-isomerase, enzima que catalisa a isomerização da glicose em frutose, passaram a ser usadas nos anos 60 e 70, respectivamente (VITOLLO, 2010).

Tabela 2. Produtos provenientes da hidrólise do amido e suas aplicações.

Produto	Aplicações
Malto-dextrinas	Estabilizantes, gomas, pastas, espessantes
Xp mistos (42<DE<63)	Confeitaria, refrigerantes, sorvetes, baby foods, conservas
Xp de Maltose	Confeitaria
Xp de Glicose	Refrigerantes, fermentações, balas
Xp de Frutose	Refrigerantes, conservas, iogurtes, compotas

No Brasil, o principal hidrolisado é o xarope de glicose de DE 38-42. A sua composição é similar entre os diferentes produtores, podendo existir diferenças apenas em nível de cor, transparência e pureza do xarope. Nos Estados Unidos, os setores de balas, caramelos, padarias e confeitarias consomem mais de 50% da totalidade do xarope produzido (LEONEL, 2001b).

A glicose é utilizada para melhorar a estabilidade a congelamento e descongelamento sobre a cristalização e a retenção de umidade. Reduz a formação de cristais durante o congelamento e, geralmente, melhora a textura e a qualidade de muitos produtos de panificação. SURMELY (1997) fez um levantamento sobre os principais usos da glicose no Brasil, apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Funções e formulações da glicose DE 38-42 nos produtos alimentícios.

	Funções	Formulações no produto
Balas, bombons, doces e confeitos	Anticristalizante, redução do grau de doçura, aumento dos sólidos e viscosidade; Cobertura de Snacks	Balas e caramelos: 40-45%; Balas moles: 25%; Bombons: 10-25% Torrone de amendoim: 30%; Pirulito: 35%; Pipoca: 7%;
Chocolates e achocolatados	Aumento de sabor	Achocolatados: 8-12%
Doces	Controle da viscosidade	Doce de leite: 5-15%; Doces: 6%
Biscoitos e bolachas	Melhoria do sabor e da cor, distribuição da umidade	Biscoitos: 3%
Sorvetes e derivados	Diminuição do grau de doçura; Aumento da consistência de sólidos	“Ice cream” e picolés: 1,5%; Sorvete: 5-10%
Embutidos	Aumento da cor, estabilizante	Mortadela: 1,5%
Sopas e bebidas, molhos desidratados, mostarda	Aumento da cor, estabilizante	Catchup e mostarda: 1-5% (glicose em pó)

2.7 Imobilização de enzimas

Por razões de ordem técnica e econômica a maioria dos processos químicos catalisados por enzimas requerem a reutilização ou a utilização contínua do biocatalisador por um período de tempo prolongado. Sob esta perspectiva, a imobilização de enzimas é uma técnica que é capaz de permitir o re-uso ou o uso contínuo dos biocatalizadores. Do ponto de vista industrial, simplicidade e custo-benefício são as principais propriedades das técnicas de imobilização (GUISÁN, 2006).

Cantarelli (1989) define imobilização como a fixação de enzimas ou células vivas em um ambiente, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente.

Nas últimas décadas tem-se observado um interesse crescente no desenvolvimento de técnicas de imobilização de enzimas e micro-organismos, com o objetivo de minimizar os efeitos causados pela sua utilização, como a inadequabilidade para uso em determinados solventes, variações de pH e temperatura e exposição a agentes desnaturantes (CARVALHO, CANILHA e SILVA, 2006).

A imobilização do biocatalisador em um suporte, sem prejuízo de sua atividade por um período razoável de tempo, pode assegurar sua repetida utilização ou mesmo o uso em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais. Assim, de modo geral, a utilização de materiais imobilizados além de diminuir o custo por análise, aumenta a rapidez e a exatidão do processo.

No entanto, um dos fatores essenciais que deve ser considerado na utilização de um determinado sistema de imobilização é o tipo de interação entre o suporte e o biocatalisador, que pode influenciar diretamente na estabilidade e nos efeitos cinéticos da catálise (SEBRÃO et al., 2007).

Segundo Vitolo (1988), os métodos gerais empregados para a imobilização são: aprisionamento (enredamento, encapsulamento e microencapsulamento) e ligações químicas (adsorção, ligação iônica, ligações covalentes e ligações cruzadas) (Figura 4).

Dentre as técnicas de imobilização, o encapsulamento por alginato é um dos mais estudados por causa da sua simplicidade, condições brandas de gelificação e a ampla disponibilidade no mercado. O alginato de sódio é misturado com uma

solução contendo o biocatalisador, sendo, a seguir, gotejada sobre uma solução de íon bivalente (Ca^{2+} , Ba^{2+}). Quando a mistura contendo alginato entra em contato com a solução de íon bivalente forma-se um gel dentro do qual o biocatalisador fica retido (VITOLLO, 2011). Segundo Rucka e Turkiewicz (1989) o enrijecimento adicional do gel pode ser conseguido, adicionando-se glutaraldeído e/ou hexametilenodiamina, os quais podem, também, contribuir na estabilização do biocatalisador (Figura 5).

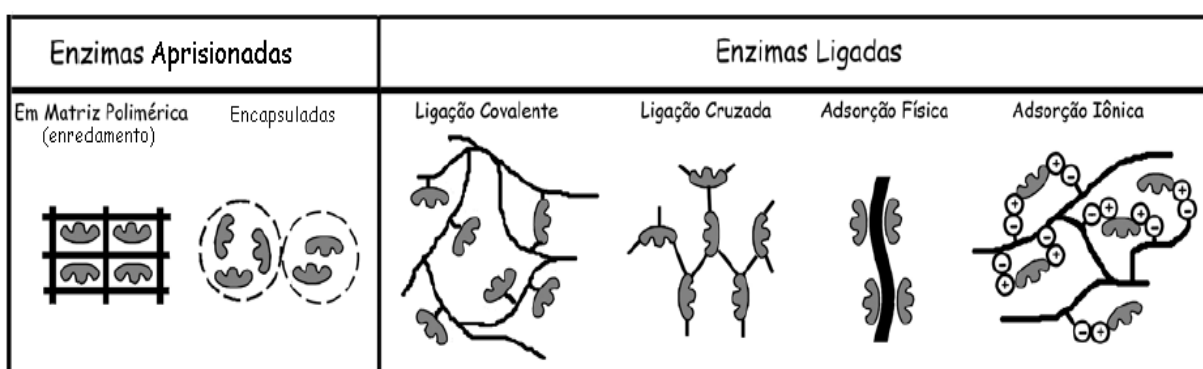


Figura 4. Diferentes métodos de imobilização de enzimas. Fonte: Adaptado de Cardoso, Moraes e Cass (2009).

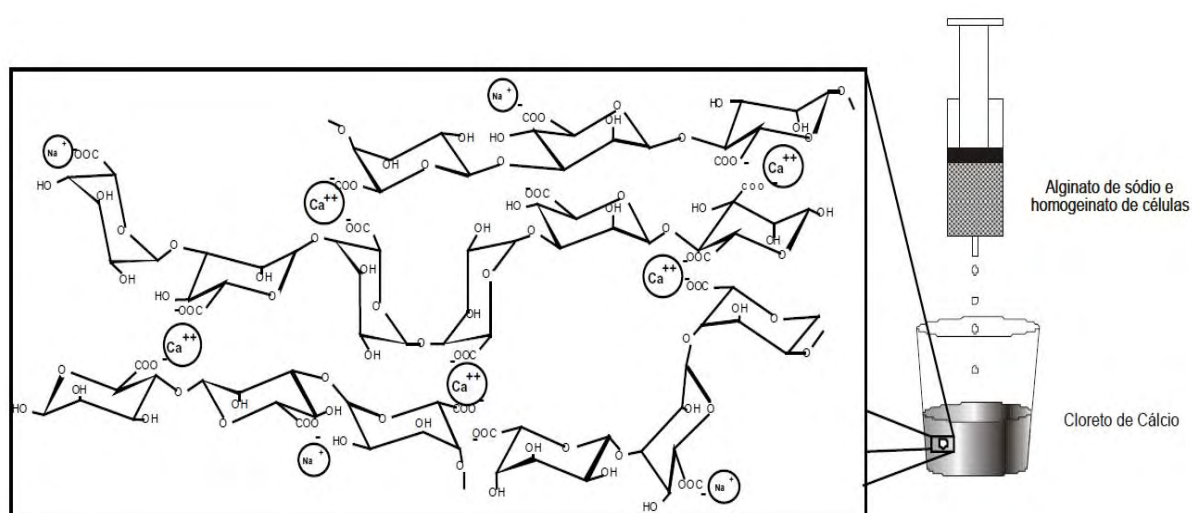


Figura 5. Formação do gel de alginato de cálcio por aprisionamento. Fonte: COVIZZI et al., (2007).

2.8 Micro-organismos

Diversos são os micro-organismos produtores de amilases, destacando as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Bacillus* (PANDEY et al., 2000a), que têm sido amplamente empregadas em processos industriais. O gênero *Rhizopus* representa um importante grupo de fungos para a produção de enzimas, sendo que várias espécies são de considerável interesse para a indústria de alimentos. Devido a necessidade da utilização de micro-organismos no setor alimentício, algumas espécies do gênero *Rhizopus*, como o *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, recebem a denominação GRAS (Generally Regarded as Safe) pela FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), classificação dada a micro-organismos de reconhecida segurança para uso alimentar (BAKIR et al., 2001).

Muitos trabalhos na literatura tratam da capacidade do *Rhizopus* em hidrolisar amido através da produção de amilases (JIN et al., 1999; PANDEY et al., 2000b; SIVARAMAKRISHNAM et al., 2006; SOCCOL et al., 1994a; SPIER, 2005). Estudos demonstraram que linhagens de *Rhizopus* também são utilizadas na produção de proteases ácidas, ácido fumárico, pectinases, lipases, ácido láctico.

Segundo Soccol et al., (1994b) *Rhizopus* ssp. é usado em fermentações em estado sólido por vários séculos, especialmente na Ásia (China, Coréia, Indonésia, Malásia, Cingapura) para preparação de alimentos fermentados. O tempeh é um alimento fermentado da Indonésia produzido pelo crescimento de *Rhizopus oligosporus* em grãos de soja. A fermentação fúngica permite uma melhor qualidade nutricional e degrada alguns compostos antinutricionais contidos no grão de soja cru (RAIMBAULT, 1998)

Bramorski et al., (1998) estudaram a produção de compostos voláteis por *Rhizopus oryzae* durante cultivo em estado-sólido em substratos agroindustriais. Quando *R. oryzae* foi cultivado em meio contendo bagaço de mandioca e farelo de soja (5:5 p/p), a taxa de produção de CO₂ foi a mais elevada (200 mL.L⁻¹).

Soccol et al., (1994a) exploraram a possibilidade de diferentes cepas de *Rhizopus* degradarem o amido cru na mandioca. Das 19 linhagens usadas, três atacaram significativamente o amido. Essa capacidade simplificaria drasticamente o processo de fermentação em estado-sólido, uma vez que os micro-organismos

geralmente preferem o amido gelatinizado, mas requer grande quantidade de energia para a gelatinização (RAIMBAULT, 1998).

No presente trabalho estes microrganismos foram estudados para a produção de enzimas amilolíticas utilizando substratos oriundos da indústria de farinha de trigo e mandioca, através de resíduos. O processo de produção enzimática foi avaliado quanto a parâmetros operacionais e foram também avaliados métodos de concentração e imobilização das amilases produzidas, com o intuito de produção de xarope de glicose.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Comparar a produção de amilases pelos fungos *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* em fermentação submersa, avaliando posteriormente os melhores métodos de imobilização da enzima, visando a produção de xarope de glicose.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Estudar a influência da fonte de carbono, temperatura e tempo de fermentação na produção enzimática.
- b) Caracterizar o extrato enzimático bruto quanto ao melhor pH e temperatura de atuação e sua estabilidade frente às variações de pH e temperatura.
- c) Concentrar o extrato enzimático bruto, selecionado a partir das melhores condições estabelecidas nas etapas anteriores, por precipitação com sulfato de amônio e etanol.
- d) Estudar diferentes métodos de imobilização do extrato concentrado e biomassa.
- e) Produzir xarope de glicose utilizando a enzima produzida nas condições otimizadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

- SIGMA-ALDRICH: soro-albumina bovina; polietilenoimina (PEI); quitosana; tripolifosfato de sódio (TPP); 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodi-imida (EDAC).
- VETEC: sulfato de amônia; fosfato de potássio monobásico; uréia; amido; cloreto de cálcio; Tween 80; iodeto de potássio; iodo sublimado.
- SYNTH: Carvão vegetal ativado em pó; alginato de sódio.
- DIFCO: batata-dextrose-ágar (BDA).
- NUCLEAR: glutaraldeído.
- BIOLIQID: kit enzimático de glicose oxidase.
- DOW CHEMICAL COMPANY: resina Amberlite™ MB20.

4.2. Micro-organismos

Foram utilizadas as cepas dos fungos *Rhizopus oryzae* CCT 3763 e *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* CCT 3762 adquiridos da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, Campinas – SP, mantidos em *slants* com meio BDA (Batata Dextrose Agar) sob refrigeração a 4°C. O repique foi feito em meio BDA e então incubado a 28°C por 7 dias, após este tempo a cultura foi mantida sob refrigeração a 4°C.

4.3. Condições de Fermentação

O meio de cultura para o pré-inóculo e fermentação submersa (SmF) foi composto por: 3% (m/v) de substrato amiláceo; 0,293% (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,15% (m/v) de KH_2PO_4 ; 0,072% (m/v) de uréia, e pH ajustado para 5,5, baseado no trabalho de Soccol et al., (1994b). Os substratos testados foram: farinha de trigo tipo II (Moinho Nacional, Assis-SP), farelo de mandioca (Halotek Fadel, Palmital-SP) e farinha de mandioca (Fortitália, Assis-SP).

O inóculo para a fermentação foi preparado com os esporangiósporos (esporos) removidos do meio BDA usando uma solução de Tween 80 a 0,01% (m/v). O número de esporos foi estimado por contagem em câmara de Neubauer.

Foram inoculados 2×10^7 esporos por grama de substrato amiláceo em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura. Os frascos inoculados foram incubados em Incubadora refrigerada com agitação orbital (Tecnal TE 421, Piracicaba-SP), a 160 rpm por 48 h, nas seguintes temperaturas:

- *Rhizopus oryzae*: 30°C e 35°C.
- *Rhizopus microsporus var. oligosporus*: 30°C, 35°C e 37°C.

Após as 48 h, foi realizada a transferência de 3 g do micélio obtido da etapa anterior para 200 mL de meio em Erlenmeyers de 1000 mL. A coleta do micélio foi feita por filtração em papel de filtro previamente esterilizado. Os frascos contendo o meio inoculado da SmF foram submetidos a agitação constante em agitador orbital a 160 rpm por 96 h seguindo as mesmas temperaturas indicadas acima.

Amostras do meio SmF foram retiradas após a fermentação, filtradas em papel filtro obtendo-se o extrato enzimático bruto, o qual foi analisado. Depois que as melhores condições das variáveis fonte de carbono e temperatura foram definidas, variou-se o tempo de fermentação entre 72 e 144 h.

4.4. Atividade Enzimática

A técnica de medida da atividade enzimática, baseada no trabalho de Souza et al., (1996), consiste em duas etapas: I - Reação enzimática com extrato enzimático; II - Reação colorimétrica com iodo. Na primeira etapa, 0,4 mL de extrato enzimático ou massa conhecida de enzima imobilizada, foram colocados para reagir com 3,2 mL de solução gelatinizada de amido 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5,6. A mistura foi incubada a 60°C por 30 minutos. O controle da reação foi feito com 0,4 mL de água no lugar do extrato enzimático.

Na segunda etapa, foram transferidos 0,1 mL da mistura anterior para tubos contendo 4,8 mL de HCL $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e 0,15 mL de solução de iodo (iodo sublimado 0,05% (m/v) e KI 0,1% (m/v)). A mistura foi levemente agitada e sua absorbância lida a 620 nm em espectrofotômetro. Um U (Unidade de enzima) ficou definido como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 10 mg de amido em 30 minutos nas condições utilizadas (SOCCOL et al., 1994b).

4.5. Determinação de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), a partir da curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina.

4.6. Determinação de açúcares

Foi realizada dosagem de açúcar redutor pelo método de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) (MILLER, 1959) e de glicose utilizando kit enzimático de glicose oxidase.

4.7. Caracterização do extrato enzimático bruto

4.7.1. Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática.

Para a determinação do melhor pH para a atividade da enzima, foram utilizados como substrato para a reação enzimática uma solução de amido 0,5% em diferentes soluções tampão: citrato-fosfato 0,2 mol.L⁻¹ (pH 3 a 7); fosfato 0,2 mol.L⁻¹ (pH 7 a 8); Tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹ (pH 8 a 9) e glicina-NaOH 0,2 mol.L⁻¹ (pH 9 a 10).

Para a determinação da melhor temperatura, as misturas da reação enzimática (extrato + substrato) foram incubadas em diferentes temperaturas: 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80°C.

4.7.2. Efeito do pH e temperatura na estabilidade enzimática

Para verificar a estabilidade a diferentes pH, uma alíquota de 0,5 mL de solução enzimática bruta foi misturada a 0,5 mL de tampão em cada valor de pH, sendo a mistura mantida a 25°C por 24 h. Após esse período, a atividade residual foi determinada.

O efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas foi avaliado incubando-se as soluções enzimáticas, em ausência de substrato, em temperaturas de 20°C a 80°C por uma hora, sendo o controle, a atividade da enzima no início do ensaio. Após uma hora a atividade residual foi determinada. As soluções enzimáticas também foram incubadas em ausência de substrato a 60°C, sendo retiradas amostras a cada 1 hora, por um período de 4 h.

4.8. Perfil da hidrólise do amido e análise dos produtos

Foi realizada uma curva de hidrólise do amido ao longo de 4 h. O substrato utilizado foi uma solução de amido 0,44% (m/v) em tampão acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,6, utilizando os extratos enzimáticos à 50°C, com retirada de amostras a cada 30 minutos. Os produtos da hidrólise foram analisados quanto ao teor de amido residual e açúcares produzidos, determinado por espectrofotometria e cromatografia, respectivamente.

Para a análise dos açúcares, os hidrolisados obtidos foram filtrados em membranas millipore 0,22 µm para posteriormente serem analisados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) com detector amperométrico, marca Dionex (Estados Unidos), fluxo 1mL.min⁻¹.

A coluna utilizada para análise foi a Carbowac PA-1 a 30°C, usando a bomba Single Grad Degas e o software de Automação Cromatográfica Chromeleon 7.0 CHM-1, da Dionex (Estados Unidos). A eluição dos açúcares foi realizada com 100 mmol.L⁻¹ de hidróxido de sódio e 50 mmol.L⁻¹ de acetato de sódio durante 9 min. As curvas de calibrações foram feitas com os padrões glicose e maltose.

4.9. Concentração do extrato enzimático

4.9.1. Precipitação com sulfato de amônio

O extrato bruto foi submetido à precipitação fracionada 25-50%, 25-80% e 30-80% de (NH₄)₂SO₄. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda em banho de gelo e depois permaneceu em repouso por 24 h a 4°C, para precipitação protéica. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm, 4°C durante 20 min. O precipitado foi solubilizado em tampão acetato de sódio 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,6 e dialisado contra o mesmo tampão 50 mmol.L⁻¹, pH 5,6 (ENGLARD e SEIFTER, 1990).

4.9.2. Precipitação por etanol

O extrato bruto foi submetido à precipitação por solvente orgânico pela adição de etanol absoluto nas concentrações de 50%, 75% e 90%, com agitação branda em banho de gelo. A mistura permaneceu em repouso por 24 h sob refrigeração de 4°C para precipitação protéica e então foi centrifugada a 4000 rpm, 4°C durante 20 min.

O precipitado foi solubilizado em tampão acetato de sódio $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5,6 (ENGLARD e SEIFTER, 1990).

4.10. Imobilização da enzima

4.10.1. Adsorção em carvão ativado

Foi adicionado carvão vegetal ativado em pó ao extrato enzimático bruto nas seguintes concentrações de carvão: 1%, 5%, 10% e 20%, a fim de promover adsorção física da enzima ao carvão. O processo foi realizado sob agitação de 160 rpm, a 4°C , por 45 minutos. O carvão com a enzima adsorvida foi filtrado, seco e utilizado na reação enzimática. O filtrado obtido foi também analisado.

4.10.2. Adsorção em Bagaço de cana

O extrato concentrado foi imobilizado em bagaço de cana de açúcar baseado no protocolo de Coelho (2007) com modificações. O bagaço de cana de açúcar, doado pela Usina do Grupo COSAN, Tarumã - SP, foi lavado, seco em estufa à 65°C por 48 h e triturado de forma a obter partículas de bagaço entre 1,00 e 1,19 mm. Quantidades de 1 g de bagaço foram adicionados em frascos Erlenmeyers de 250 mL e submetidos ao tratamento com Polietilenoimina (PEI).

Para o tratamento, 50 mL de solução de PEI 2% (v/v), pH 7,00, foi adicionada aos frascos contendo bagaço de cana. Os frascos permaneceram sob agitação a 160 rpm durante 24 h e, a seguir, foram autoclavados por 20 minutos, lavado com água e seco em estufa à 65°C por 48 h.

Em seguida, 5 mL de extrato concentrado foi adicionado a 0,25 g de bagaço tratado. A mistura ficou sob agitação de 160 rpm por 1 h, em banho de gelo. Posteriormente o bagaço foi filtrado, lavado com água e analisado quanto à atividade enzimática.

4.10.3. Imobilização por troca iônica em resina Amberlite™ MB20

O extrato concentrado foi imobilizado em resina Amberlite™ MB20 previamente tratada com PEI e glutaraldeído. Inicialmente, 1 g de Amberlite foi adicionado à 5 mL de ativador 2,5% (v/v) (PEI ou glutaraldeído), a mistura

permaneceu sob agitação de 160 rpm por 24 h. Após o tratamento, 1 g de resina tratada foi misturada a 2,5 mL de extrato concentrado, permanecendo sob agitação suave por 1 h, em banho de gelo. Em seguida, a Amberlite foi filtrada, lavada com 5 mL de água e analisada quanto à Atividade Enzimática e teor de açúcar produzido.

4.10.4. Imobilização em quitosana como agente de cross-linking

O extrato concentrado foi imobilizado segundo o protocolo de Arsenault, Cabana e Jones (2011) com modificações. Quitosana (alto peso molecular) foi solubilizada em HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ para uma concentração final de 5 g.L^{-1} . A seguir, 10 mL dessa solução foi adicionada a 0,1917 g de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodi-imida (EDAC) e 5 mL de extrato concentrado. Essa mistura ficou sob agitação suave por 48 h, a 4°C . Então o pH foi corrigido para 6,00 com NaOH 2 mol.L^{-1} e a solução permaneceu em repouso por 12 h, a 4°C e, em seguida, foi centrifugada por 20 minutos a 3000 rpm. A enzima precipitada após a centrifugação foi lavada com 5 mL de tampão acetato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5,6, e analisada quanto à atividade enzimática.

4.10.5. Imobilização em alginato e quitosana: Peletes

a) Alginato

Foi preparado 3 mL de uma solução de alginato de sódio 3% (m/v) em extrato enzimático concentrado. A mistura foi gotejada em solução de cloreto de cálcio $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ para a formação dos peletes. Após repouso inicial de 24 h, a 4°C , os peletes foram filtrados, lavados com água deionizada por 1 h, filtrados novamente e então analisados quanto à atividade enzimática. No grupo controle foi utilizado de água deionizada no lugar do extrato.

b) Alginato e glutaraldeído

Os peletes foram preparados como descrito em 4.10.5 (a), passando por uma lavagem com glutaraldeído 0,5% (v/v) por 1 h, após as 24 h de repouso inicial.

c) Quitosana

Foi preparado uma solução de quitosana (alto peso molecular) em ácido acético 1% (v/v) e adicionada ao extrato enzimático concentrado para uma

concentração final de 2% (m/v) de quitosana e volume de 3 mL. A mistura foi gotejada em solução de tripolifosfato de sódio (TPP) 5% (m/v). Após 24 h de repouso inicial, a 4°C, os peletes foram filtrados, lavados com água deionizada por 1 h, filtrados novamente e então analisados quanto à atividade enzimática. No grupo controle foi utilizado de água deionizada no lugar do extrato.

d) Quitosana e glutaraldeído

Os peletes foram preparados como descrito em 4.10.5 (c), passando por uma lavagem com glutaraldeído 0,5% (v/v) por 1 h, após as 24 h de repouso inicial.

4.10.6. Imobilização em alginato e quitosana: Biofilme

a) Alginato

Uma solução de 2,5 mL de alginato de sódio 6% (m/v) foi adicionada a 2,5 mL extrato concentrado para uma concentração final de 3% (m/v) de alginato. A mistura foi colocada em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Uma parte das placas foi seca em estufa a 30°C por 4 h, e o restante não passou pelo procedimento de secagem. Na próxima etapa, os dois grupos de placas receberam 10 mL de CaCl_2 0,15 mol.L⁻¹ para a formação do biofilme. Após repouso por 24 h, a 4°C, os biofilmes foram filtrados, e então analisados quanto à atividade enzimática e teor de açúcar produzido. No grupo controle foi utilizado água deionizada no lugar do extrato (OLIVA-NETO e MENÃO, 2009).

b) Alginato e glutaraldeído

Os biofilmes foram preparados como descrito em 4.10.6 (a), passando por uma lavagem com glutaraldeído 0,5% (v/v) por 1 h, após as 24 h de repouso inicial.

c) Alginato e PEI

Os biofilmes foram preparados como descrito em 4.10.6 (a), passando por uma lavagem com PEI 0,5% (v/v) por 1 h, após as 24 h de repouso inicial.

d) Quitosana

Uma solução de 2,5 mL de quitosana 4% (m/v) (alto peso molecular) preparada em ácido acético 1% (v/v) foi adicionada ao extrato enzimático para uma

concentração final de 2% (m/v) de quitosana. A mistura foi colocada em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Uma parte das placas foi seca em estufa a 30°C por 4 h, e o restante não passou pelo procedimento de secagem. Na próxima etapa, os dois grupos de placas receberam 10 mL de TPP 5% (m/v) para a formação do biofilme. Após repouso por 24 h, a 4°C, os biofilmes foram filtrados, lavados com água e então analisados quanto à atividade enzimática e teor de açúcar produzido. No grupo controle foi utilizado de água deionizada no lugar do extrato.

e) Quitosana e glutaraldeído

Os biofilmes foram preparados como descrito em 4.10.6 (d), passando por uma lavagem com glutaraldeído 0,5% (v/v) por 1 h, após as 24 h de repouso inicial.

f) Quitosana e PEI

Os biofilmes foram preparados como descrito em 4.10.6 (d), passando por uma lavagem com PEI 0,5% (v/v) por 1 h, após as 24 h de repouso inicial.

4.11. Imobilização da biomassa

4.11.1. Biomassa

Uma solução de 5 mL de glutaraldeído 0,5% (v/v) foi adicionada a 2,6 g de biomassa macerada por 1 h. Em seguida a mistura foi filtrada e a biomassa utilizada na reação enzimática e então analisados quanto à atividade enzimática.

4.11.2. Imobilização em alginato e quitosana: Biofilme

a) Alginato

Uma solução de 5 mL de glutaraldeído 0,5% (v/v) foi adicionada a 2,5 g de biomassa macerada por 1 h. Em seguida, foi adicionado 5 mL de solução de alginato 6% (m/v), para uma concentração final de 3% (m/v) de alginato. A mistura foi colocada em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Uma parte das placas foi seca em estufa a 30°C por 5 h, e o restante não passou pelo procedimento de secagem. Na próxima etapa, os dois grupos de placas receberam 10 mL de CaCl_2 0,15 mol.L⁻¹ para a formação do biofilme. Após repouso por 24 h, a 4°C, os biofilmes foram filtrados, e então analisados quanto à atividade enzimática.

b) Quitosana

Uma solução de 5 mL de glutaraldeído 0,5% (v/v) foi adicionada a 2,5 g de biomassa macerada por 1 h. Em seguida, foi adicionado 5 mL de solução de quitosana 4% (m/v), para uma concentração final de 2% (m/v) de quitosana. A mistura foi colocada em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Uma parte das placas foi seca em estufa a 30°C por 5 h, e o restante não passou pelo procedimento de secagem. Na próxima etapa, os dois grupos de placas receberam 10 mL de TPP 5% (m/v) para a formação do biofilme. Após repouso por 24 h, a 4°C, os biofilmes foram filtrados, lavados com água e então analisados quanto à atividade enzimática.

4.12. Produção do xarope

Para a produção do xarope de glicose uma suspensão de amido gelatinizada foi previamente preparada em tampão acetato de sódio, 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,0. Depois a solução foi incubada à 50°C por até 7 h nas seguintes condições:

- a) Extrato enzimático bruto foi adicionado à solução de amido na proporção de 1:1, resultando em uma solução final com 30 U e 5% (m/v) de amido.
- b) Enzima concentrada foi adicionada à solução de amido na proporção de 1:10,2, resultando em uma solução final com 30 U e 5% (m/v) de amido.
- c) Enzima concentrada foi adicionada à solução de amido na proporção de 1:10,2, resultando em uma solução final com 30 U e 10% (m/v) de amido.

Após este processo, o xarope resultante foi concentrado em evaporador até atingir a concentração de 20% (m/v) de glicose.

4.13. Análise dos Resultados

Para a análise dos dados foi utilizado o teste estatístico de análise de variância (ANOVA) e comparação de médias por teste Tukey a um nível de significância de 0,05. O software utilizado foi o BioEstat 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito das fontes de carbono e nitrogênio na produção enzimática

Foram realizados três ensaios utilizando diferentes substratos como fonte de carbono e diferentes temperaturas de fermentação. Verificou-se que a variável fonte de carbono influenciou a produção amilolítica, enquanto que a temperatura não causou diferenças significativas.

A farinha de trigo tipo II foi o substrato que mais influenciou positivamente na quantidade de enzima produzida, tanto para *R. oryzae* quanto para *R. oligosporus*. Utilizando este substrato a produção enzimática foi até duas vezes superior do que usando farelo de mandioca, nas fermentações conduzidas a 30°C. Nas fermentações à 37°C, a produção enzimática usando farinha de trigo tipo II foi 7,7 vezes superior à aquela usando farelo de mandioca.

Conforme mostra a Tabela 4, depois da farinha de trigo tipo II, o farelo de mandioca foi o substrato que mais influenciou na quantidade de enzima produzida, seguido da farinha de mandioca. Entretanto, a farinha de mandioca se mostrou inviável como única fonte de carbono, uma vez que não proporcionou atividades amilolíticas significativas.

Tabela 4. Efeito da fonte de carbono e temperatura na produção enzimática em 96 h de fermentação, pH 5,5.

Ensaio*	Substrato	Atividade enzimática (U/mL)				
		<i>Rhizopus oryzae</i>		<i>Rhizopus oligosporus</i>		
		30°C	35°C	30°C	35°C	37°C
1	Farinha de trigo tipo II	3,08 ± 0,35 ^a	3,77 ± 0,76 ^a	3,04 ± 0,83 ^a	3,71 ± 0,86 ^a	3,57 ± 0,78 ^a
2	Farelo de mandioca	1,16 ± 0,82 ^{ab}	0,85 ± 0,37 ^{ab}	1,60 ± 0,48 ^{ab}	1,83 ± 0,09 ^a	0,46 ± 0,28 ^b
3	Farinha de mandioca	0,30 ± 0,43 ^a	0,38 ± 0,10 ^a	0,02 ± 0,04 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a

* Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferenças não significativas dentro de um mesmo ensaio (p>0,05). Experimento realizado em quadruplicata.

As diferenças observadas na quantidade de enzima produzida entre as diferentes fontes de carbono sugerem que a composição do substrato influencia diretamente na atividade enzimática do fermentado. Após análise da composição centesimal dos substratos (Tabela 5), verificou-se que a farinha de trigo tipo II,

apesar de ser majoritariamente amilácea (76% de carboidratos e 2,7% de fibras), possui na sua composição 10,33% de proteínas, o que pode contribuir para o enriquecimento do meio de cultura.

Tabela 5. Composição centesimal dos substratos utilizados.

Determinação (%)	Farinha de trigo tipo II	Farelo de mandioca	Farinha de mandioca
Carboidratos	76,66	67,20	86,00
Proteína	10,33	2,57	< 1,00
Gorduras totais	0,96	1,18	0,00
Fibras	2,66	20,01	< 1,00

Fonte: Farinha de trigo tipo II (MOINHO NACIONAL, 2011); Farelo de mandioca (AOAC, 1994) realizado pela Instituição FEMA; Farinha de mandioca (Fortitalia Ltda.)

Além da fonte de carbono, sais minerais e nitrogênio são fatores essenciais para cumprir as exigências nutricionais dos meios de cultivo da maioria dos micro-organismos, sugerindo que um teor adicional de proteína presente no substrato pode melhorar consideravelmente a produção enzimática.

Enquanto a farinha de trigo tipo II possui alto teor de proteínas, os outros substratos utilizados, farelo e farinha de mandioca, são constituídos basicamente de amido, com 67% e 86% de carboidratos na composição, respectivamente. O farelo de mandioca possui 2,6% de proteínas, o que também poderia contribuir para um pequeno enriquecimento do meio, no entanto, também apresenta 20% de fibras, o que possivelmente o torna um substrato mais difícil de ser degradado.

Alguns trabalhos na literatura descrevem o enriquecimento do meio com nitrogênio para substratos pobres. Yu e Hang (1990) observaram um aumento no rendimento na produção de amilases por *Rhizopus oryzae* pela suplementação com nitrogênio para substratos de mandioca em cultivos a 30°C.

Jin et al., (1999) desenvolveram um processo simples, não asséptico e de baixo custo para o tratamento de águas residuais do processamento de amido, visando a produção de glicoamilase e enriquecimento protéico por *Rhizopus oligosporus*. Foi obtida alta eficiência na conversão do material, resultando em 4,5 – 5,2 g de biomassa seca a partir de um litro de resíduo. Quanto à atividade da glicoamilase, esta aumentou coincidentemente com a hidrólise do amido e síntese da biomassa, atingindo um máximo de 4 U/mL.

Wisniewski et al., (2010) utilizaram resíduo do processamento de cerveja para a produção de enzimas amilolíticas por *Macricybe titans*. Foi observado que a massa micelial foi proporcional ao teor de nitrogênio, tratamento que continha farelo mais rico em proteínas, como o farelo de soja, com 45%, indicou alta capacidade de metabolização de nitrogênio protéico pelo fungo. A maior produção enzimática ocorreu no início da colonização do substrato, não sendo, no entanto, um produtor relevante de amilases.

A produção de α -amilase por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido foi estudada por Suganthi (2011). Foram utilizados diversos resíduos agroindustriais como substrato, dentre eles: farelo de arroz, farelo de trigo, torta de óleo de coco e torta de óleo de amendoim. A maior atividade amilolítica, 43U/mg (atividade específica), foi obtida quando se utilizou torta de óleo de amendoim, em seis dias em incubação a 37°C.

5.2. Efeito da temperatura de fermentação na produção enzimática

Quanto à influência da temperatura de fermentação na produção da enzima, observou-se que, aparentemente, temperaturas mais altas contribuíram para a obtenção de um extrato com maior atividade enzimática. Contudo, as temperaturas estudadas apresentaram médias estatisticamente semelhantes ($p>0,05$) (Tabela 4).

Dalsenter (2005) verificou um efeito contrário ao observado neste trabalho. Foi avaliado o efeito do aumento da temperatura no crescimento e na produção de glicoamilase de *Rhizopus oryzae*, e estabelecido um modelo empírico que descreve a cinética do crescimento frente a essas mudanças. Foi verificada a importância do controle de temperatura na produção enzimática, onde um aumento de 6°C (34°C – 40°C) foi capaz de reduzir drasticamente a produção da enzima.

Spier (2005) também estudou o efeito da temperatura na produção enzimática. Foram utilizadas cepas de *Aspergillus* e *Rhizopus* para produção de α -amilase e amiloglucosidase por fermentação em estado sólido de fécula de mandioca e bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados mostraram que o ensaio com 90% de umidade e 30-32°C de temperatura de fermentação foi a combinação que gerou maior produção das enzimas.

Considerando que, quanto maior a temperatura a ser utilizada em uma fermentação, maior é o gasto com energia para a manutenção desse processo,

deve-se levar em conta a relação entre maior atividade enzimática e menor temperatura de fermentação. Desse modo, considerou-se que a temperatura de 30°C foi a mais indicada para este trabalho, representando assim, uma economia de energia no processo como um todo.

Outro ponto analisado entre as diferentes temperaturas foi o aspecto do material fermentado. Quando cultivado a 30°C, o meio final de fermentação ficava translúcido na cor amarelo claro, e o micélio, de coloração bege claro, era facilmente filtrado e separado do extrato. Enquanto que nos cultivos a 35°C e principalmente a 37°C, o meio final de fermentação apresentava-se turvo e de coloração marrom, o micélio também apresentava coloração marrom e era dificilmente separado do extrato por meio da filtração.

Assim, aliando o fator economia de energia e o aspecto aparentemente mais saudável da fermentação, deu-se continuidade com as próximas fermentações utilizando a temperatura de 30°C e farinha de trigo tipo II como fonte de carbono para ambos os micro-organismos.

5.3. Efeito do tempo de fermentação na produção enzimática

A Figura 6A mostra os dados de atividade enzimática do extrato produzido por *R. oryzae* em diferentes tempos. Observou-se que há uma leve tendência no aumento de atividade com o aumento do tempo até 120 h, tornando-se estável depois desse período. No entanto verificou-se que não há diferença significativa ($p>0,05$) entre os tempos de 72 e 96 h e entre 96, 120 e 144 h. Assim, considerando-se a maior atividade obtida e o menor tempo de fermentação, o tempo de 96 h se mostrou o mais adequado para a produção da enzima, uma vez que a redução deste representa economia de energia empregada no processo.

O extrato amilolítico produzido por *R. oligosporus* apresenta um comportamento semelhante ao *R. oryzae*, mas de forma mais acentuada. A atividade enzimática aumentou consideravelmente até 96 h, tornando-se constante após esse período (Figura 6B). Portanto, o tempo de 96 h também se mostrou mais favorável à produção enzimática utilizando *R. oligosporus*.

Embora o tempo de 96 h de cultivo tenha sido considerado o mais adequado para a fermentação, observou-se uma diferença na velocidade de produção da enzima entre os micro-organismos. *R. oligosporus* é mais rápido, aumentando

consideravelmente a atividade entre 72 h e 96 h. Enquanto que *R. oryzae* é mais lento quanto a produção enzimática, sendo sua atividade aumentada até 120 h. Essa diferença mostra uma vantagem do *R. oligosporus* sobre *R. oryzae*, uma vez que os bioprocessos industriais prezam por processos mais rápidos, pois assim aumentam a produtividade e diminuem o risco de contaminações.

A produção de α -amilase por *Aspergillus oryzae* foi estudada por Bogar et al., (2002) em fermentação de estado sólido com grão de cerveja e fibra de milho, onde atingiu atividade enzimática máxima em 72 h, tornando-se praticamente constante até 144 h. Silva (2009) observou um pico de atividade amilolítica em 72 h de fermentação submersa com *Aspergillus niveus*. Enquanto que Arnesen et al, (1998) e Cruz et al, 1997) obtiveram picos de produção entre 96 h e 120 h na produção de α -amilase por *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizopus sp.*, respectivamente.

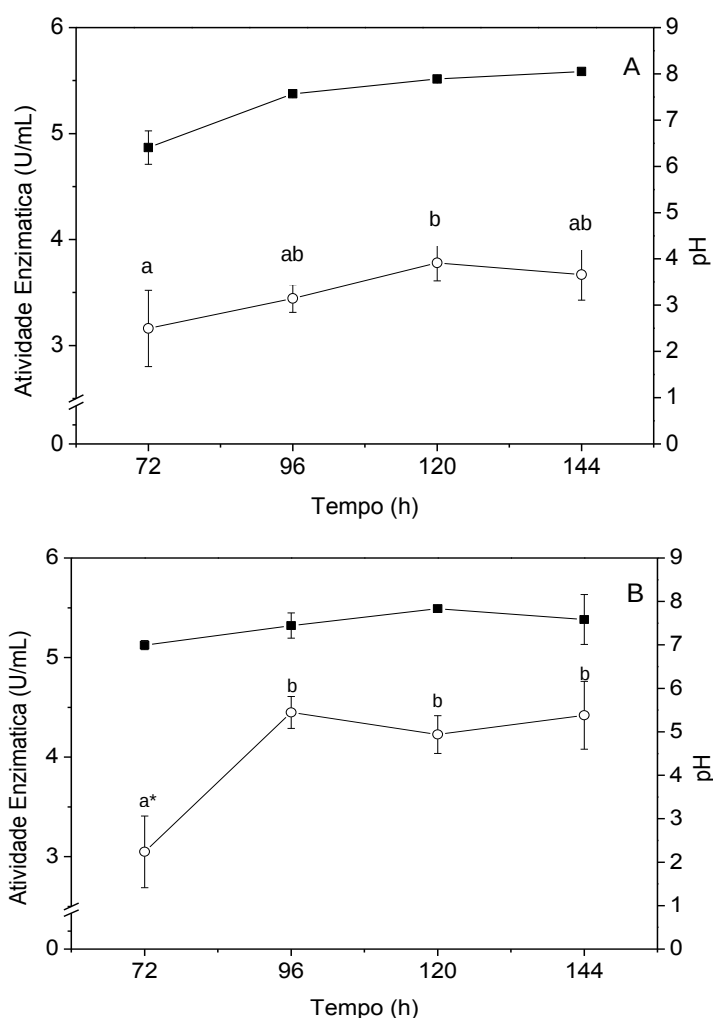


Figura 6. Efeito do tempo na atividade enzimática do extrato de *Rhizopus oryzae* (A) e *R. oligosporus* (B) e pH final do meio. Condições da fermentação: 30°C, pH 5,5, farinha de trigo tipo II como substrato. [○] Atividade enzimática; [■] pH. *Letras iguais indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$).

A variação do pH do meio de cultura ao longo do tempo também foi analisado (Figura 6). Na fermentação por *R. oryzae* o pH do meio aumentou até 8,0, e por *R. oligosporus* aumentou até 7,5, ambos com pH inicial de 5,5. Outros autores também relataram que após o término da fermentação os valores de pH foram superiores àqueles iniciais. Silva (2009) observou um aumento do pH final do meio entre 7,0 e 7,65 na fermentação de *Aspergillus niveus*, para pH inicial variando entre 3,5 e 7,5. O mesmo observado por Gonçalves (2006), para um pH inicial de 5,5.

O pH de um meio de cultura pode mudar em resposta às atividades metabólicas. A razão mais óbvia é a secreção de ácidos orgânicos, como ácido cítrico, acético ou láctico, que podem levar a uma diminuição do pH, da mesma forma que o consumo de sais de amônia. Por outro lado, a assimilação de ácidos orgânicos que podem estar presentes em certos meios conduzirá a um aumento do pH, assim como a hidrólise da uréia irá resultar em alcalinização. A cinética da variação do pH depende muito do micro-organismo. Além disso, a natureza do substrato tem uma forte influência sobre a cinética de pH, devido ao efeito de tamponamento de materiais lignocelulósicos (RAIMBAULT, 1998)

O controle do pH pode ser obtido por meio de razões diferentes de sais de amônio e uréia no substrato. Hidrólise da uréia libera amônia, que neutraliza a acidificação resultante da rápida absorção do íon amônio (RAIMBAULT e ALAZARD, 1980).

Os dados da literatura mostram que inúmeros substratos são utilizados na produção de enzimas, bem como variados micro-organismos e condições de fermentação. Assim, comprova-se a importância em se investigar o metabolismo de diferentes organismos em diversos substratos. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a produção de amilases fúngicas apresenta uma diferença significativa entre as linhagens estudadas, temperaturas e tempo de processo, bem como quanto ao substrato empregado para fermentação. A literatura também mostrou tal variedade, o que comprova a importância do estudo destes parâmetros. Além disso, é importante conhecer o perfil de atuação da enzima produzida frente a diferentes pHs e temperaturas e sua estabilidade frente às mudanças dessas variáveis, trabalho este que foi realizado no item seguinte.

5.4. Caracterização enzimática quanto ao pH e temperatura de atuação e estabilidade

5.4.1 Efeito do pH na Atividade enzimática e estabilidade

Os ensaios para a caracterização físico-química da amilase foram realizados a partir de soluções enzimáticas brutas obtidas a partir do cultivo dos fungos em fermentação submersa. Os dados apresentados referem-se à média e desvio padrão de duplicatas.

A maioria das amilases pode ser agrupada sob o mesmo modelo estrutural, apesar de terem diferentes características bioquímicas, tais como o efeito da temperatura, pH, termoestabilidade e inibidores, fatores essenciais que determinam sua adequação aos processos industriais (KEARSLEY et al., 1995).

Assim, o conhecimento do perfil enzimático é de extrema importância, pois permite um melhor direcionamento da aplicação da enzima nos bioprocessos, podendo gerar um potencial máximo de atividade.

A Figura 7A mostra o efeito do pH na atividade da amilase de *R. oryzae*. Foi observada maior atividade no pH 5,0, mantendo uma atividade residual de aproximadamente 80% e 70% nos pH 4,0 e 6,0 respectivamente. Dados da literatura mostram que as amilases fúngicas atuam melhor em pH ácido a neutro (GONÇALVES, 2006), fato que também pôde ser observado neste trabalho.

Para os experimentos de estabilidade frente à variação de pH, os extratos enzimáticos foram incubados em soluções tampão de diferentes valores de pH, que variaram de 3,0 a 10,0, por um período de 24 h e a atividade de referência (100%) foi aquela determinada no tempo zero em água destilada.

Foi verificado que a enzima de *R. oryzae* foi estável em uma ampla faixa de pH, 4,0 a 10,0 (Figura 7B). A variação observada quanto à atividade relativa para alguns valores de mesmo pH se deve provavelmente à natureza das diferentes soluções tampão utilizadas.

A ação das enzimas em uma ampla faixa de pH é uma vantagem segura na indústria, uma vez que é necessário um menor ajuste do pH entre os processos sequenciais de liquefação e sacarificação (MICHELIN, 2005).

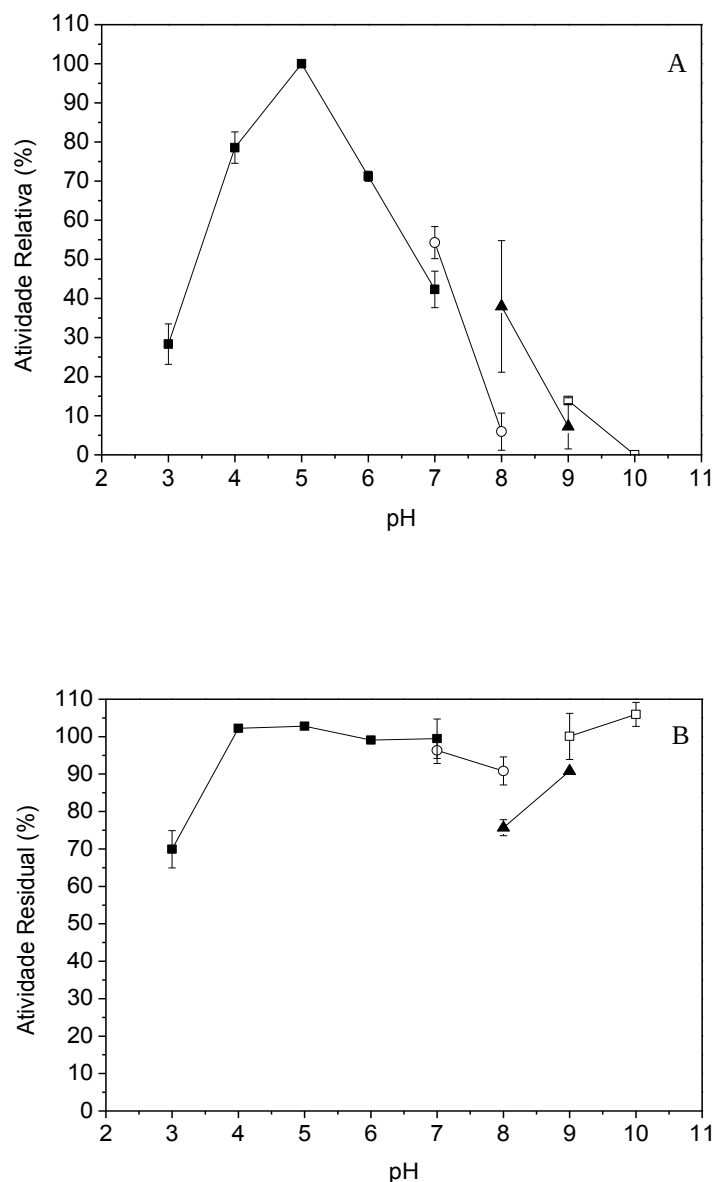


Figura 7. Efeito do pH na atividade (A) e na estabilidade (B) da amilase de *R. oryzae*. Condições do ensaio para ambos: 60°C, 30 min. Para a estabilidade a atividade foi feita após 24 h de incubação da enzima a 25°C e comparada com a enzima não incubada e em tampão acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,6. Tampão citrato-fosfato, pH 3 a 7 [■]; tampão fosfato, pH 7 e 8 [○]; tampão tris-HCl, pH 8 e 9 [▲]; tampão glicina-NaOH, pH 9 e 10 [□].

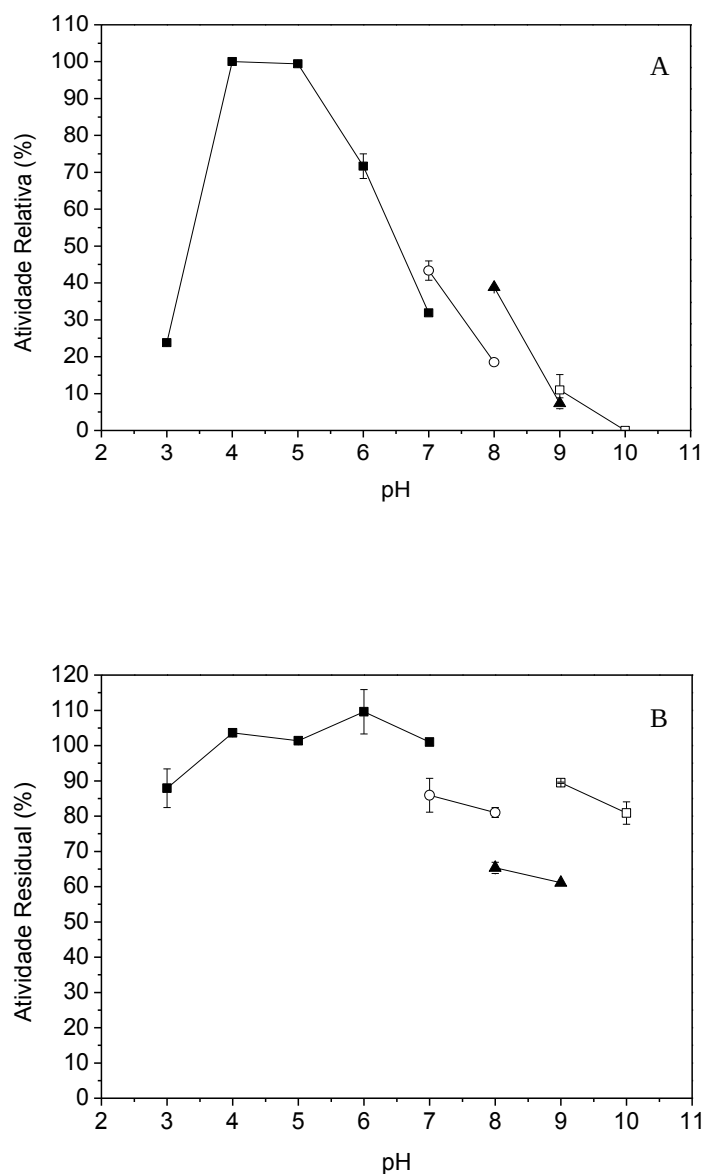


Figura 8. Efeito do pH na atividade (A) e na estabilidade (B) da amilase de *R. oligosporus*. Condições do ensaio para ambos: 60°C, 30 min. Para a estabilidade a atividade foi feita após 24 h de incubação da enzima a 25°C e comparada com a enzima não incubada e em tampão acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,6. Tampão citrato-fosfato, pH 3 a 7 [■]; tampão fosfato, pH 7 e 8 [○]; tampão tris-HCl, pH 8 e 9 [▲]; tampão glicina-NaOH, pH 9 e 10 [□].

A Figura 8A mostra o efeito do pH na atividade da amilase de *R. oligosporus*. Foi observada maior atividade nos pH 4,0 e 5,0, mantendo uma atividade residual de aproximadamente 70% em pH 6,0. Assim como a enzima produzida por *R. oryzae*, a amilase de *R. oligosporus* também apresentou boa estabilidade em vários pH, cerca de 100% na faixa de 4,0 a 7,0, mantendo-se 90% estável em pH 3,0 e aproximadamente 80% em pH 8,0, 9,0 e 10,0 (Figura 8B).

Segundo alguns autores, as amilases geralmente apresentam boa estabilidade na faixa de pH 4,0 a 11,0, sendo assim chamadas de ácido-alcalino-tolerantes (FOGARTY e KELLY, 1979; GUPTA et al., 2003; HAMILTON et al., 1994; JAMES e LEE, 1997). Porém, ficou claro neste trabalho que as amilases dos fungos estudados atuam melhor em condições ácidas.

Outros autores confirmam a tendência encontrada neste trabalho para a melhor atuação das amilases fúngicas no ambiente ácido. Silva (2009) obteve resultados semelhantes aos encontrados com a amilase de *R. oligosporus* quanto ao efeito do pH, quando comparada a amilase de *Aspergillus niveus* em meio com casca de mandioca. O pH ótimo foi determinado na faixa de 4,0 – 5,0, permanecendo estável na faixa de pH 4,0 a 7,0 depois de 24 h de incubação.

A glucoamilase também produzida por *R. oligosporus* estudada por Jin et al., (1999) apresentou máxima atividade em pH 4,0 e 5,0, sendo estável entre pH 3,0 e 9,0 por 60 minutos a 30°C.

Amilases de outros fungos também atuaram em pHs semelhantes. Gonçalves (2006) estudou a produção de amilases pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação em estado sólido e submersa. O melhor pH para a atividade da glucoamilase foi 4,5 e 5,5, utilizando maltose e amido como substrato, respectivamente, com uma estabilidade máxima entre pH 4,0 e 6,0. Para a α -amilase o melhor pH foi 5,5 para ambos os substratos, com estabilidade máxima entre 4,0 e 7,0.

A amiloglucosidase e α -amilase produzidas pelo fungo *Metharhizium anisopliae* no trabalho de Guandalini (2007) também apresentaram maior atividade em pH 5,0 para atividade amilolítica. No entanto, foi observada uma faixa menor de pH quanto à estabilidade máxima, 5,0 – 5,5 para a amiloglucosidase e 5,0 – 6,5 para α -amilase.

Analisando comparativamente as amilases produzidas por *R. oryzae* e *R. oligosporus* quanto ao efeito do pH, verificou-se que é mais viável a utilização da

enzima de *R. oligosporus*, uma vez que atua numa maior faixa de pH (3,8 – 5,4) com maior atividade relativa (90 – 100%), contra *R. oryzae* que atua entre (4,5 – 5,3) para esta mesma atividade relativa, possibilitando flexibilidade nos ajustes de pH nos processos industriais.

5.4.2 Efeito da temperatura na Atividade enzimática e estabilidade

Além da análise do pH, é essencial se conhecer o comportamento da enzima em diferentes temperaturas. A maioria das reações se processa a uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. Sendo que, a temperatura ótima é aquela na qual os níveis enzimáticos são máximos e representam o estado em que a molécula apresenta uma conformação ideal para sua máxima eficiência catalítica (LEHNINGER, NELSON e COX, 1995).

A Figura 9A mostra o efeito da temperatura, entre 20°C e 80°C, na atividade da amilase de *R. oryzae*. A maior atividade foi observada na faixa de 50°C, sendo que a 55°C e 60°C a enzima manteve cerca de 80% de sua atividade. Os resultados obtidos para a amilase de *R. oligosporus* foram um pouco diferentes (Figura 10A), a enzima mostrou maior atividade em temperaturas maiores, 60°C e 65°C, mas altas atividades também foram verificadas a 50°C e 55°C (70%), o que é interessante pois esta última mostrou maior faixa de atuação enzimática.

Observa-se que a amilase de *R. oryzae* manteve-se totalmente estável nas temperaturas de 20°C, 30°C e 40°C (100%) após 1 h de incubação, perdendo 50% da sua atividade à 50°C e 90% à 55°C e 60°C (Figura 9B). Já a amilase de *R. oligosporus* mostrou-se semelhante à enzima de *R. oryzae* apenas quanto à estabilidade em baixas temperaturas de 20°C a 40°C, mantendo 100% da atividade, o que já seria esperado tendo em vista que as proteínas são mais estáveis nesta faixa de temperatura. Porém a diferença ocorreu em temperaturas mais elevadas, pois em 50°C onde a atividade relativa era de 75%, a estabilidade foi mantida em 80%, e a 60°C com atividade relativa de 100%, a estabilidade foi mantida em 50%. (Figura 10B)

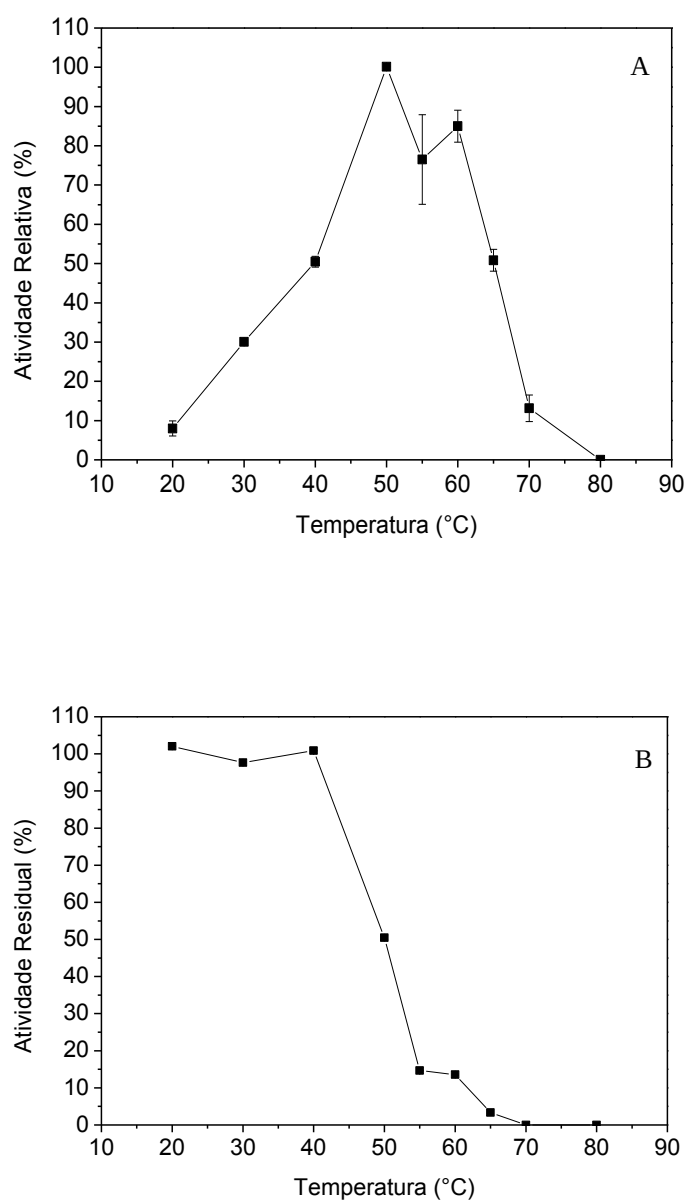


Figura 9. Efeito da temperatura na atividade (A) da amilase de *R. Oryzae*, entre 20°C e 80°C, pH 5,6 por 30 min. e na estabilidade (B) com incubação por 1 h entre 20°C e 80°C e reação à 60°C, pH 5,6, 30 min.

Devido à alta temperatura empregada em alguns processos de produção, algumas indústrias demandam enzimas mais termoestáveis, como as produzidas por micro-organismo termofílicos, sobretudo bactérias. No entanto, mesmo entre os mesófilos, como os fungos, que crescem entre 28°C e 32°C, é possível encontrar enzimas que atuam em temperaturas até 30°C acima da temperatura máxima de crescimento do micro-organismo produtor (GOMES et al., 2007).

Vários dados da literatura comprovam esse fato. A glucoamilase de *Aspergillus niveus* tem máxima atividade a 70°C e é estável por até 6 h a 55°C (SILVA, 2009). A amiloglucosidase e α -amilase de *Metharhizium anisopliae* atuam a 60°C e 70°C respectivamente (GUANDALINI, 2007).

A amilase produzida por *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* apresentou maior atividade na temperatura de 65°C. A enzima mostrou-se bastante estável, mantendo 50% de atividade após 120 minutos de incubação a 60°C. No entanto, temperaturas acima de 65°C ocasionaram instabilidade enzimática (PEIXOTO et al., 2003).

Anto et al., (2006) descreveram uma glucoamilase de *Aspergillus* sp HA-2 que apresentou temperatura ótima para atividade a 55°C. A glucoamilase de *Aspergillus oryzae* cultivada em fermentação submersa apresentou maior atividade a 65°C, e a enzima produzida em fermentação sólida a 56°C (HATA et al., 1997). Rajoka et al., (2004) produziram glucoamilase de *Aspergillus niger* nativa com máxima atividade na temperatura de 55°C, e uma glucoamilase de *A. niger* mutante na temperatura de 60°C.

Michelin (2005) estudou a produção de amilases por *Paecilomyces variotii*. A melhor temperatura de reação observada foi de 65°C e 55°C para as amilases extracelulares e intracelulares, respectivamente. Resultado semelhante foi obtido para as α -amilases de *Scytalidium thermophilum* (AQUINO et al., 2003) e *Aspergillus awamori* KT-11 (ANINDYAWATI et al., 1998). O estudo da estabilidade térmica mostrou que a enzima apresentou um elevado nível de estabilidade. A α -amilase manteve aproximadamente 95% da sua atividade a 50°C durante uma hora e 72% a 55°C. No entanto, a 60°C esta estabilidade diminuiu bastante, restando apenas 44% da atividade residual, após 1 h.

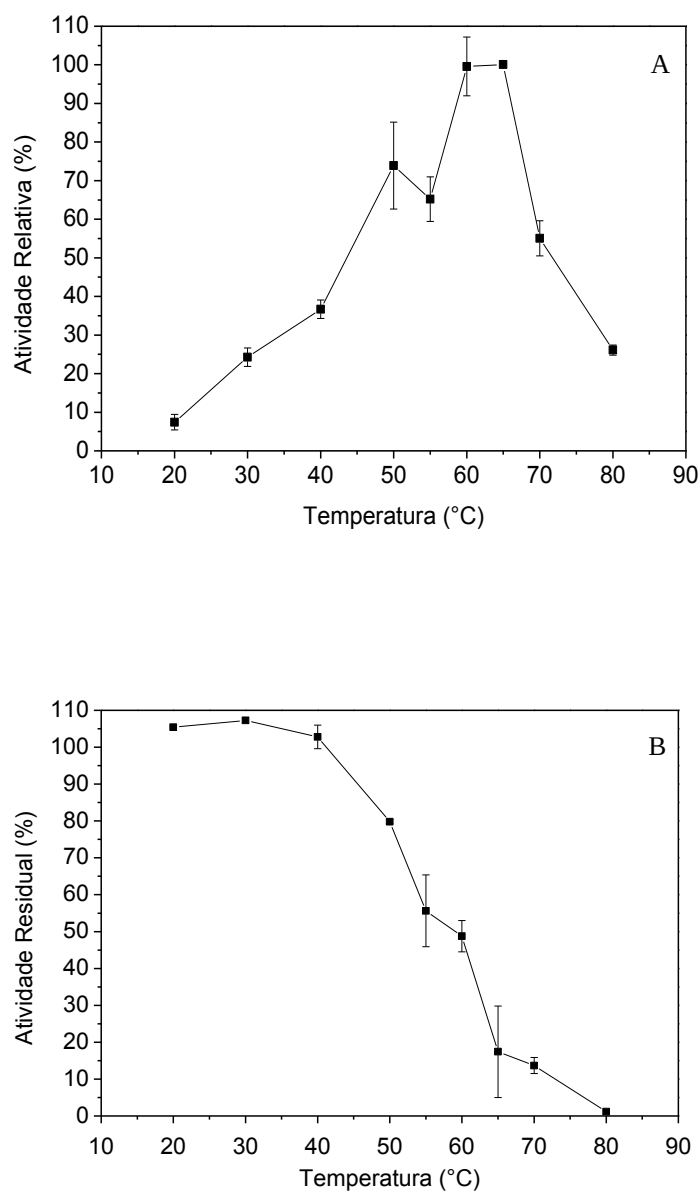


Figura 10. Efeito da temperatura na atividade (A) da amilase de *R. oligosporus*, entre 20°C e 80°C, pH 5,6 por 30 min. e na estabilidade (B) com incubação por 1 h entre 20°C e 80°C e reação à 60°C, pH 5,6, 30 min.

Sabe-se que a atividade das enzimas é altamente dependente da temperatura, à medida que se eleva a temperatura a taxa de reação aumenta, mas a estabilidade diminui devido à desnaturação térmica. Assim, fica evidente a importância em se verificar não só a atividade máxima em determinada temperatura ou pH, como também sua estabilidade ao longo do tempo.

Quanto à termoestabilidade, a enzima foi incubada a 60°C, temperatura estabelecida no protocolo de reação enzimática, e amostras foram retiradas a cada 1 h até não apresentar mais atividade. É possível observar que após 1 h de incubação as enzimas de *R. oryzae* e *R. oligosporus* perderam, respectivamente, 95% e 45% de atividade a 60°C. Assim, de acordo com os dados acima de estabilidade e a Figura 11, verifica-se que a enzima produzida pelo *R. oligosporus* é mais termoestável do que a de *R. oryzae*.

Baseado nos dados de atividade e estabilidade frente a diferentes pH e temperaturas, considerou-se a enzima de *R. oligosporus* mais interessante para dar continuidade no trabalho. Trata-se de uma possível vantagem industrial usar as amilases de *R. oligosporus* frente a *R. oryzae* se comparados: a) a maior atividade enzimática produzida no caldo fermentado (4,5 U/ml) e com menor tempo de cultivo (96 h), contra cerca de 3,7 U/ml com 120 h de cultivo de *R. oligosporus*, b) maior termo-estabilidade por exemplo na faixa de temperatura com maior atividade relativa (ex. 50°C - 60°C), c) maior faixa de pH (3,5 - 6,0) com atividade relativa de 70-100%.

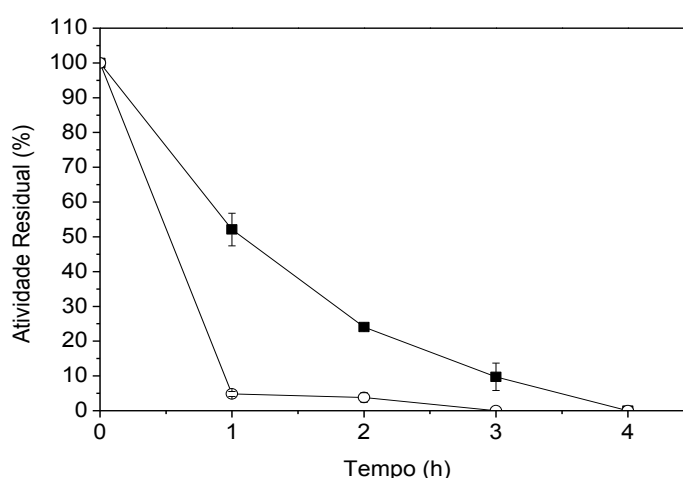


Figura 11. Termo-estabilidade da amilase após 4 h de incubação a 60°C. *R. oryzae* [○]; *R. oligosporus* [■]. Condições do ensaio: 60°C, pH 5,6, 30 min.

5.5. Perfil da hidrólise do amido e análise dos produtos

Os extratos enzimáticos de ambos os micro-organismos foram colocados para reagir em uma solução de amido 0,44% (m/v) em tampão acetato 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,6, a 50°C. As amostras, coletadas a cada 30 minutos, foram analisadas quanto ao teor de amido residual e açúcares.

A Figura 12 mostra a hidrólise do amido ao longo do tempo. Foi verificado que a partir de 2 h não era mais detectado amido nas amostras, possivelmente porque a molécula foi totalmente ou parcialmente hidrolisada pela enzima. No caso de hidrólise parcial até 2 h, provavelmente houve liberação de oligossacarídeos, que não são detectados pela análise quantitativa de amido, mas ainda podem sofrer hidrólise gerando moléculas menores, como maltose e glicose.

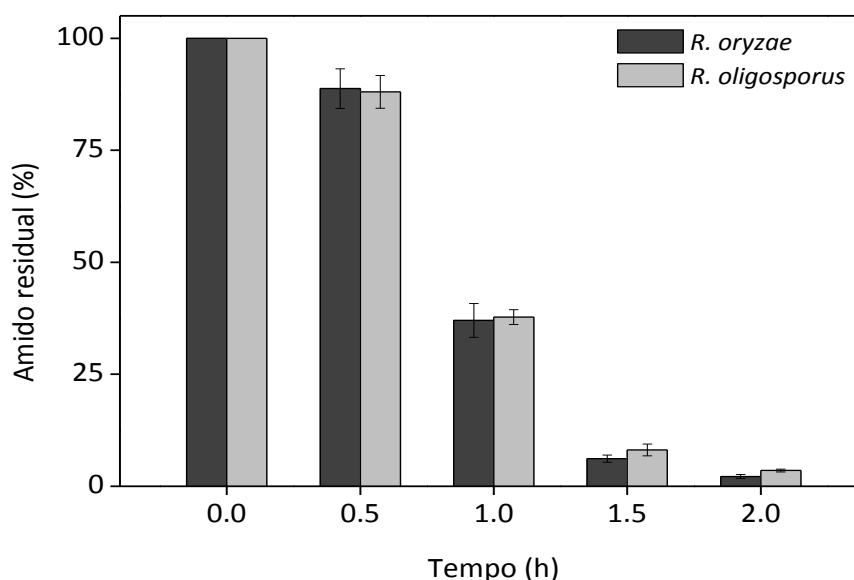


Figura 12. Curva de hidrólise do amido usando caldo de cultivo *R. oryzae* e *R. oligosporus* a 50°C e solução de amido 0,44%.

Para compreender melhor a degradação do amido, os produtos da hidrólise foram analisados por CLAE e as áreas obtidas nos cromatogramas foram comparadas com aquelas obtidas com os padrões (Apêndice A).

Durante 4 h de hidrólise, glicose foi o principal produto formado. Na Figura 13 estão representadas as curvas de formação do produto gerado pela hidrólise do amido pela enzima de *R. oryzae* e *R. oligosporus*. Os dados cromatográficos

indicam sua característica de glicoamilase, pois houve a quebra completa do amido em apenas glicose.

Possivelmente, também há formação de oligossacarídeos e maltose, pela atuação da enzima α -amilase, no entanto, esses produtos não foram detectados quantitativamente nos cromatogramas, mostrando que suas concentrações não são significantes na hidrólise.

As glicoamilases, também denominadas amiloglicosidases, são exoamilases que catalisam a reação de hidrólise das ligações α -1,4 e α -1,6 das extremidades não redutoras da amilose e amilopectina transformando-os em glicose. Por isso, teoricamente, a glicoamilase é capaz de converter totalmente a molécula de amido à glicose (SILVA, 2009)

Foi verificado que as enzimas de *R. oryzae* e *R. oligosporus* converteram, respectivamente, 95% e 96% do amido em glicose em 3,5 h de reação, o que representa que quase todo o amido foi hidrolisado em glicose.

Dado muito interessante, uma vez que se objetiva a produção de um xarope de glicose. A vantagem se dá primeiramente porque a taxa de conversão do amido em glicose foi extremamente alta, e segundo porque não houve formação significativa de outros produtos, como maltose.

Vários trabalhos da literatura descrevem a capacidade de micro-organismos do gênero *Rhizopus* produzirem especificamente glicoamilase (DALSETER, 2005; NAHAR, 2008; SILVA, 2006).

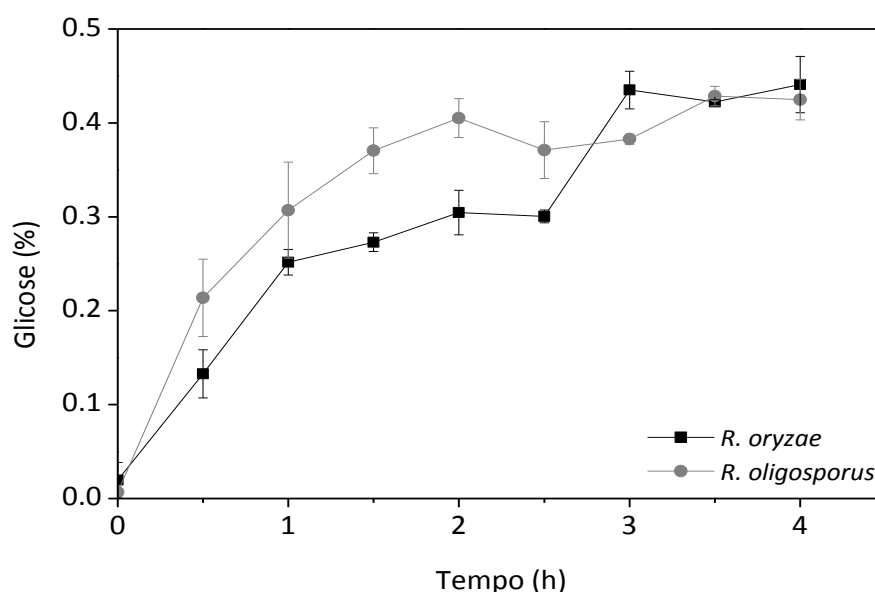


Figura 13. Produto da hidrólise do amido 0,44% (m/v) ao longo do tempo, utilizando extratos enzimáticos brutos de *R. oryzae* (2,18 U/mL) e *R. oligosporus* (2,52 U/mL).

5.6. Concentração do extrato bruto

5.6.1. Precipitação com sulfato de amônio

Uma das técnicas mais empregadas para a concentração e purificação parcial de enzimas é a precipitação de proteínas por sais ou solventes orgânicos. Isso se deve ao baixo custo e à praticidade do método quando comparado com técnicas mais sensíveis, como cromatografias e filtração em gel.

Neste trabalho foi possível realizar a concentração do extrato enzimático bruto através da precipitação da enzima utilizando várias concentrações de sulfato de amônio e etanol, obtendo diferentes graus de purificação e rendimento.

A solubilidade de uma enzima em um solvente aquoso é determinada pela distribuição de cargas presentes sob determinadas condições. Os grupos carregados interagem com íons na solução e a precipitação pode ser induzida por mudanças no pH, força iônica, adição de solventes orgânicos ou polímeros.

Assim, a solubilidade em solução aquosa pode ser resultado da interação polar entre a proteína e as moléculas da água, interação iônica entre a proteína e os íons presentes, e forças eletrostáticas repulsivas entre as moléculas carregadas ou pequenos agregados (SCOPES, 1994).

O primeiro ensaio de precipitação realizado neste trabalho foi a precipitação por sais ou também denominado “salting out”. Os sais desidratam as proteínas, atraindo as moléculas de água do meio, de modo a ficar menos água disponível para as regiões hidrofóbicas da proteína, que ficam expostas podendo interagir e agregar entre si.

Segundo Pessoa Jr. e Kilikian (2005), a precipitação fracionada torna o processo ainda mais eficiente, uma vez que muitas proteínas são precipitadas da solução em uma faixa estreita de concentração salina. Desse modo, é possível separar seletivamente certas proteínas através de um gradiente de concentração de sal.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos com a precipitação fracionada do extrato utilizando diferentes concentrações de sulfato de amônio: 25-50%, 25-80% e 30-80%. Observa-se que na concentração de 25-50%, o rendimento foi muito baixo, aproximadamente 18,8%, por isso, prosseguiu-se com os ensaios com maior concentração de sal.

Tabela 6. Concentração do extrato bruto por precipitação com sulfato de amônio.

* Ensaio	Volume (mL)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade	Atividade	Rendimento (%)	Purificação
				Específica (U/mg)	total (U)		
1 Extrato bruto	100,0	3,24	0,490	6,61	324,00	100,00	1,00
Precipitado 25-50%	8,5	7,14	0,680	10,50	20,69	18,73	1,58
Precipitado 25-80%	9,0	29,59	1,650	17,93	266,31	82,19	2,71
2 Extrato bruto	100,0	2,09	0,645	3,24	209,00	100,00	1,00
Precipitado 25-80%	12,4	14,64	1,624	9,01	181,53	86,85	2,78
Precipitado 30-80%	9,5	16,15	1,518	10,63	153,48	73,43	3,28
3 Extrato bruto	100,0	2,08	0,390	5,33	208,00	100,00	1,00
Precipitado 25-80%	12,00	12,73	1,170	10,88	152,76	73,44	2,04
Precipitado 30-80%	11,00	13,84	0,860	16,53	138,47	66,53	3,01
4 Extrato bruto	150,0	4,69	0,620	7,51	703,50	100,00	1,00
Precipitado 30-80%	7,7	50,80	1,750	29,02	388,62	55,24	3,86

* Número do ensaio.

Na dupla precipitação com concentrações de 25 e 80% de sal, obteve-se um rendimento médio de $80,8\% \pm 6,8$ e uma purificação média de $2,51 \pm 0,4$. Materiais que precipitam antes de 25% de saturação geralmente são particulados e pré-agregados ou proteínas de alto peso molecular (SCOPES, 1994). Para um bom fracionamento deve-se levar em conta a relação entre a recuperação da atividade e o grau de purificação.

Assim, visando manter o bom rendimento obtido e aumentar o grau de purificação, procedeu-se a realização de um novo ensaio utilizando a concentração de 30 e 80% de sulfato de amônio. Nesta condição verificou-se que o rendimento diminui para $65\% \pm 9,2$, mas aumentou a purificação para $3,4 \pm 0,4$.

5.6.2. Precipitação com etanol

A precipitação por solvente orgânico baseia-se na redução da atividade da água pela diminuição da constante dielétrica da solução formada. Assim, ocorre uma diminuição da solubilidade e aumento da agregação por interações eletrostáticas. Os solventes mais utilizados são o etanol, acetona, metanol e propanol.

Como consequência da redução da constante dielétrica tem-se: imobilização parcial das moléculas de água através da hidratação do grupo polar (hidroxila) do solvente orgânico, com simultâneo deslocamento das moléculas de água das zonas

hidrofílicas e, conseqüentemente, redução da densidade da camada de hidratação e da parcela de solubilidade conferida por estas zonas (SCHIMIDELL et al., 2001).

Neste trabalho foram testadas três diferentes concentrações de etanol para a precipitação da enzima: 50%, 75% e 90%. A concentração de 50% foi a menos eficaz, gerando um rendimento médio de $8,35\% \pm 1,2$ e uma purificação de $0,19 \pm 0,04$ (Tabela 7).

Tabela 7. Concentração do extrato bruto por precipitação com etanol.

* Ensaio	Volume (mL)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade	Atividade	Rendimento (%)	Purificação
				Específica (U/mg)	total (U)		
1 Extrato bruto	50,0	2,08	0,390	5,33	104,00	100,00	1,00
Precipitado 50%	5,5	1,79	1,390	1,28	9,84	9,46	0,24
Precipitado 75%	5,0	16,68	1,940	8,58	83,40	80,00	1,61
Precipitado 90%	8,0	12,52	1,200	10,43	100,16	96,30	1,95
2 Extrato bruto	50,0	4,05	0,700	5,74	202,50	100,00	1,00
Precipitado 50%	4,2	4,13	3,990	1,03	17,34	8,56	0,17
Precipitado 75%	5,3	33,76	3,920	8,61	178,92	87,90	1,50
Precipitado 90%	6,0	33,68	3,230	10,42	202,08	99,79	1,81
3 Extrato bruto	50,0	3,24	0,490	6,61	162,00	100,00	1,00
Precipitado 50%	5,0	2,28	2,000	1,14	11,40	7,03	0,17
Precipitado 75%	10,0	11,92	1,380	8,63	119,20	73,58	1,30
Precipitado 90%	10,0	12,65	1,740	7,22	112,65	69,53	1,09
4 Extrato bruto	100,0	2,09	0,645	3,24	209,00	100,00	1,00
Precipitado 75%	6,3	15,56	2,842	5,47	98,02	93,80	1,68
Precipitado 90%	6,5	10,88	2,457	4,42	70,72	67,67	1,36

* Número do ensaio.

A precipitação utilizando 75% de etanol apresentou um bom rendimento, $83,82\% \pm 8,8$, semelhante à precipitação por sal (25-80%), mas gerou uma menor taxa de purificação, $1,5 \pm 0,16$. Na concentração de 90% de etanol também foi obtido uma purificação média de $1,5 \pm 0,39$. Quanto aos valores de rendimento, percebe-se que houve uma diferença entre os rendimentos obtidos para uma mesma condição. De acordo com Scopes (1994), a composição do extrato pode influenciar a precipitação assim como sua concentração e a temperatura.

A partir da análise das concentrações por precipitação acredita-se ser mais viável a utilização de sulfato de amônio para a etapa de concentração do extrato, uma vez que o sal levou a uma maior purificação da enzima do que a utilização de etanol.

5.7. Imobilização da enzima

5.7.1. Adsorção em carvão

Segundo Vitolo (2011), a primeira proposta efetiva de imobilização de uma enzima foi a adsorção de invertase em carvão ativo. Assim, no planejamento dos experimentos de imobilização, geralmente, a adsorção é o primeiro método a ser tentado, pois dando resultados, passa a ter preferência frente aos demais métodos, já que é de baixo custo, fácil execução e possui uma grande diversidade de suportes.

Todos os protocolos usando a enzima adsorvida nas diferentes concentrações de carvão e grupo controle apresentaram atividade enzimática. Sendo o grupo controle composto apenas por carvão e água, era de se esperar que não houvesse atividade enzimática, o que não ocorreu. Possivelmente, o carvão sem enzima adsorveu o amido da solução, uma vez que a metodologia para detecção de amido é baseada no teor de amido residual, supõe-se que a diminuição na concentração de amido após a reação enzimática se deve não à hidrólise do substrato pela enzima imobilizada, mas pela sua adsorção ao carvão. Assim, procedeu-se com a análise de açúcar redutor (AR) para essas amostras.

O extrato enzimático bruto utilizado apresentou atividade de 5,96 U/mL e 0,7 mg/mL de proteína. A amilase adsorvida foi ativa na hidrólise do amido, na concentração de 1% de carvão, foi produzida a maior quantidade de açúcares redutores, seguidos pelas concentrações de 5%, 10% e 20% (Figura 14).

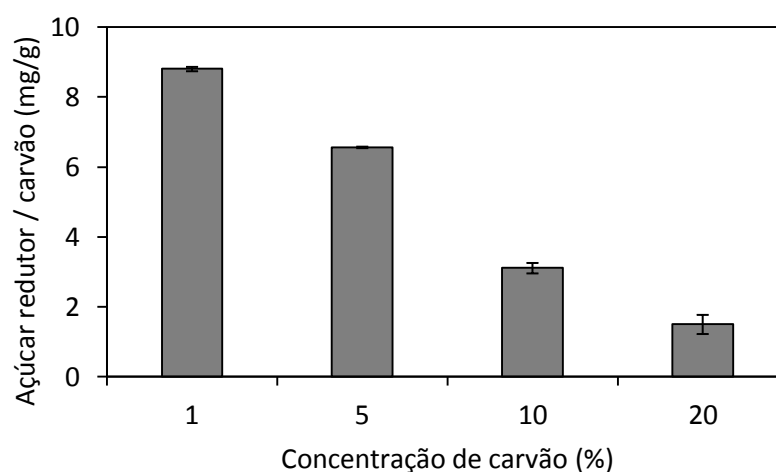


Figura 14. Produto da hidrólise do amido pela ação da amilase adsorvida em diferentes concentrações de carvão.

Vários trabalhos descrevem a possibilidade de utilização de carvão ativado para imobilizar enzimas (RANI et al., 2000) e também células (KUMAKURA, YOSHIDA e ASANO, 1992). A beta-amilase, por exemplo, foi co-imobilizada com alfa-1,6-glucosidase pela adsorção em carvão no estudo de imobilização de Cheetham (1985).

Embora este tipo de imobilização seja fácil de executar, os mecanismos envolvidos na união entre suporte e enzima são complexos, pois envolvem vários tipos de ligações não covalentes atuando simultaneamente, como pontes de hidrogênio, forças de Vander Waals, interações dipolo-dipolo, forças eletrostáticas, forças hidrofóbicas. Todas estas ligações podem ser rompidas facilmente através da variação do pH, força iônica, temperatura e natureza do solvente (VITOLLO, 2011).

Desse modo, é necessário verificar se houve de fato a adsorção. Assim, os filtrados obtidos após o processo também foram analisados. As menores concentrações de carvão, 1% e 5%, apresentaram atividade residual, indicando que essas concentrações não foram suficientes para adsorver toda enzima presente no extrato enzimático (Figura 15).

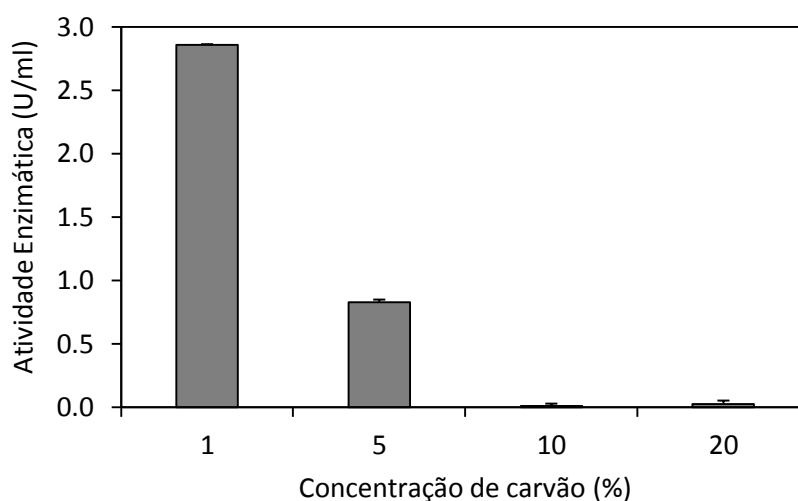


Figura 15. Atividade enzimática dos filtrados obtidos após o processo de adsorção em carvão.

Nos ensaios com 1% e 5% de carvão, possivelmente faltou superfície livre de carvão para adsorver toda a enzima presente no extrato. Enquanto que, as amostras resultantes da adsorção com 10% e 20% de carvão praticamente não apresentaram atividade amilolítica, mostrando que a quantidade de carvão utilizada foi suficiente para adsorver toda a enzima.

De acordo com Vitolo (2011), as quantidades relativas de enzima e suporte para o máximo de adsorção devem ser analisadas. Em princípio, seria razoável supor que quanto maior fosse a quantidade de enzima maior deveria ser a saturação do suporte, se sua quantidade fosse mantida constante. Contudo, se o suporte estiver saturado de enzima, a quantidade do catalisador disponível para interagir com o substrato pode depender da difusão deste até o sítio ativo, já que a reação se dá preferencialmente com as moléculas de proteína nas camadas superficiais.

Assim, apesar de o carvão ter sido capaz de adsorver a enzima, produzindo açúcar redutor após a reação enzimática, principalmente na condição de 1% de carvão, este método não foi considerado uma boa opção uma vez que foi observada atividade enzimática no filtrado, indicando uma fraca ligação entre carvão e enzima.

5.7.2. Adsorção em bagaço de cana de açúcar

Os resultados da adsorção da enzima concentrada em bagaço de cana de açúcar tratado com PEI estão apresentados na Tabela 8. A imobilização teve um baixo rendimento, de um total de 70 U, apenas 3,62 U foram imobilizadas, ou seja, 5,17%. Foi observado que grande parte da enzima adicionada para a imobilização ficou nos sobrenadantes obtidos durante ou após o processo, cerca de 96%.

Tabela 8. Atividade enzimática da enzima livre (U/mL), enzima imobilizada (U/g) e sobrenadantes do processo (U/mL) e Rendimento da imobilização em bagaço de cana de açúcar.

Amostra	Atividade Enzimática	Proteína (mg/mL)	Vol./Massa* ¹ (g) (mL)	Atividade Total (U)	Rendimento (%)
Enzima livre	14,00 ± 1,70	1,02 ± 0,09	5,00	70,00	100,00
Enzima Imobilizada	14,49 ± 0,04	0,28 ± 0,00	0,25	3,62	5,17
Sobrenadante	13,70 ± 0,45	0,72 ± 0,09	4,00	54,80	78,28
Sobrenadante (Água)	3,16 ± 0,06	0,02 ± 0,00	4,00	12,64	18,05

*1 Valores referentes à amostra de enzima livre ou sobrenadante, considerar volume (mL), para enzima imobilizada, considerar massa (g).

Mesmo apresentando um baixo rendimento de imobilização, foi feita a análise da re-utilização da enzima imobilizada por até cinco ciclos para verificar se a atividade obtida no 1º ciclo se mantinha ao longo das repetições. (Figura 16). A atividade total recuperada nos cinco ciclos foi de 20,1 U, ou seja, 28,7% da quantidade total de enzima inserida no sistema. Ainda foi observado que, no 2º e 3º ciclos, houve uma perda de, respectivamente, 75% e 92% da atividade quando comparada ao 1º ciclo.

Outros autores também utilizaram PEI na imobilização de enzimas. Mateo et al. (2000), propuseram o tratamento do suporte com polietilenoimina como uma ferramenta para melhorar a adsorção de proteínas sobre suportes catiônicos. Setenta e sete por cento de todas as proteínas contidas em extratos brutos de *Escherichia coli* foram adsorvidas. Lipase de *Candida rugosa*, beta-galactosidase de *Aspergillus oryzae* e D-aminoácido oxidase de *Rhodotorula gracilis*, foram totalmente adsorvidos em DEAE e PEI, em pH 7,0 e 4°C, apresentando 100% de atividade catalítica preservada.

Varavinit, Chaokasema e Shobsngob (2002) utilizaram α -amilase termoestável comercial de *Bacillus licheniformis* (Novo Industries, Dinamarca) na imobilização em bagaço de cana tratado por oxidação com ácido periódico (H_5IO_6). De um total de 666,4 U totais adicionadas para a imobilização, 510,9 U permaneceram no sobrenadante, 148,7 U ficaram na água de lavagem, e apenas 2,96 U foram imobilizadas no bagaço, dando um rendimento de apenas 0,44%.

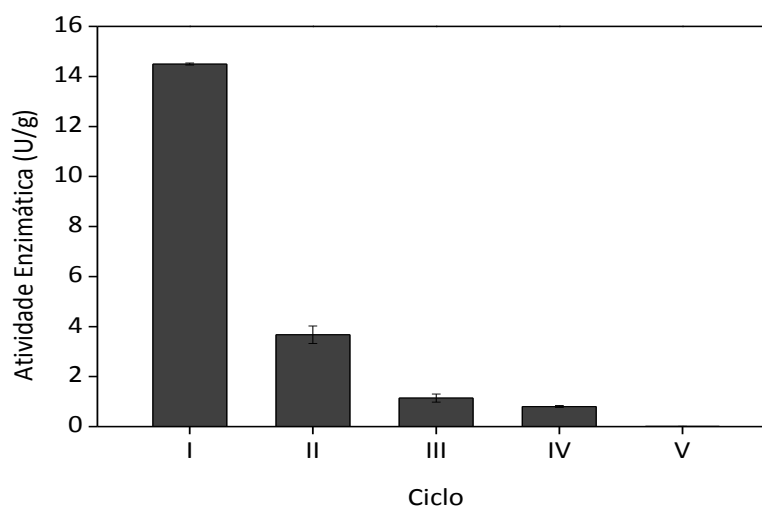


Figura 16. Atividade enzimática durante o re-ciclo da enzima imobilizada em bagaço de cana de açúcar.

Sabe-se que o tratamento do suporte, seja físico ou químico, influencia diretamente na imobilização. O uso do PEI, um polímero policatiónico, é capaz de estabelecer interação iônica forte com proteínas, mais especificamente entre a superfície do suporte ionizado e o grupo imina ionizado do polímero. Assim, o PEI reveste a superfície do suporte e otimiza a adsorção da enzima através de braços espaçadores. No entanto, uma vez que o PEI foi adsorvido sobre uma superfície, pode ser facilmente perdido juntamente com a enzima (WANG et al., 2011). Assim, o baixo rendimento da imobilização e a perda de atividade ao longo dos ciclos provavelmente se devem ao caráter fraco dessas ligações entre enzima, PEI e suporte.

5.7.3. Imobilização por troca iônica em resina Amberlite™ MB20

A enzima concentrada também foi imobilizada por interação iônica em Amberlite™ MB20, que é uma resina de leito misto ionicamente equilibrada, possui formato esférico e tamanho menor que 0,3 mm. Possui 38-44% de cátions e 56-62% de ânions. Sua matriz é um copolímero de estireno-divinilbenzeno, com grupos funcionais ácido sulfônico e trimetil amônio.

A resina passou por tratamento com PEI e Glutaraldeído. O PEI interage com hidroxilas, enquanto que o glutaraldeído interage com grupos amino através de uma reação de base, e tem sido o agente mais usado devido seu status de GRAS, baixo custo, alta eficiência e estabilidade (NAKAJIMA et al., 1993) (Figura 17).

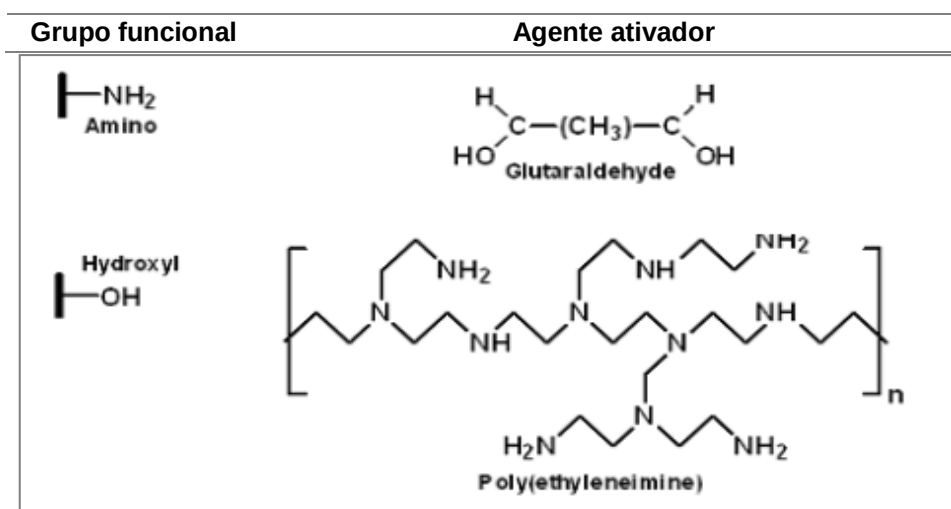


Figura 17. Estrutura do glutaraldeído e PEI e grupos funcionais. Adaptado de Neri, 2008.

Os resultados da imobilização em resina estão na Tabela 9. A taxa de imobilização foi de 0,38% e 4,76% utilizando resina tratada com PEI e glutaraldeído, respectivamente, ambos com rendimento abaixo do esperado. Cerca de 37% da enzima adicionada ao processo não foi imobilizada, permanecendo no sobrenadante quando foi utilizado PEI como agente ativador. E cerca de 31%, quando foi utilizado glutaraldeído.

Apesar do baixo rendimento de imobilização foram realizadas as análises referentes ao re-uso das enzimas imobilizadas para verificar se a atividade do 1º ciclo se mantinha ao longo das reutilizações. Observou-se que a atividade enzimática diminui drasticamente do 1º para o 2º ciclo, chegando próximo de zero, para ambos os tratamentos (Figura 18).

Tabela 9. Atividade enzimática da enzima livre (U/mL), enzima imobilizada (U/g) e sobrenadantes do processo (U/mL) e Rendimento da imobilização em resina Amberlite™ MB20.

Protocolo * ¹	Amostra	Atividade Enzimática	Proteína (mg/mL)	Vol./Massa* ² (g) (mL)	Atividade Total (U)	Rendimento (%)
-	Enzima livre	14,00 ± 1,7	1,02 ± 0,0	2,50	35,00	100,00
1	Enzima Imob. (PEI)	0,19 ± 0,1	0,48 ± 0,0	0,70	0,13	0,38
1	Sobrenadante	18,39 ± 1,5	0,54 ± 0,0	0,70	12,87	36,78
2	Enzima Imob. (Glutarald)	2,38 ± 0,0	0,44 ± 0,0	0,70	1,66	4,76
2	Sobrenadante	8,30 ± 0,0	0,58 ± 0,0	1,30	10,79	30,82

*¹ 1 – Resina tratada com PEI; 2 – Resina tratada com glutaraldeído. *² Valores referentes à amostra de enzima livre ou sobrenadante, considerar volume (mL), para enzima imobilizada, considerar massa (g).

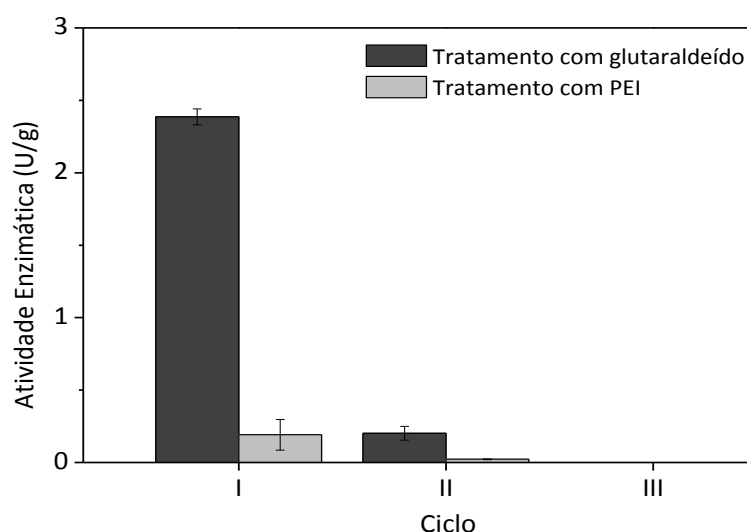


Figura 18. Atividade enzimática durante o re-ciclo da enzima imobilizada em resina Amberlite™ MB20.

A Figura 19 mostra os dados de açúcar redutor (AR) produzido em cada ciclo da reutilização da enzima e também o teor de AR produzido utilizando o sobrenadante obtido após a imobilização. Assim, como ocorre com a atividade enzimática, os valores de AR diminuem drasticamente a partir do 1 ciclo, sendo que os sobrenadantes, ou seja, a enzima que não foi imobilizada na resina, foram capazes de produzir mais açúcar do que os imobilizados nos 2º e 3º ciclos.

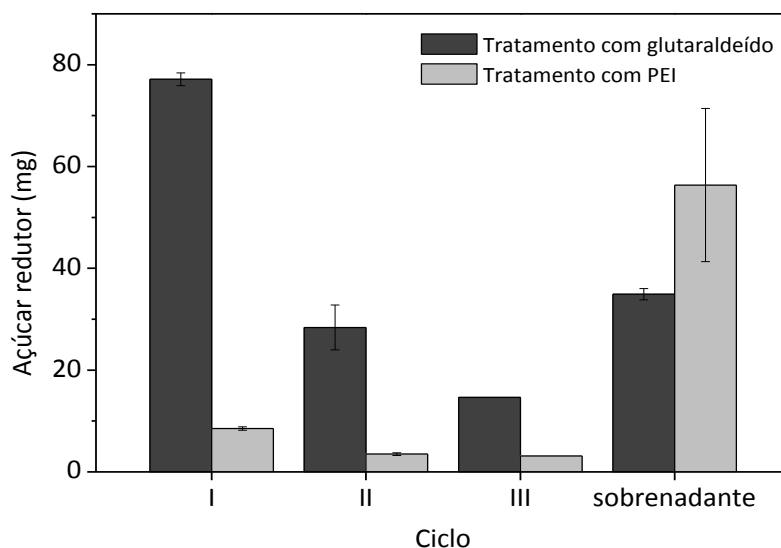


Figura 19. Açúcar redutor (AR) produzido pela enzima imobilizada em resina Amberlite™ MB20 durante os três ciclos (mg AR/g enzima imobilizada) e AR produzido utilizando o sobrenadante (mg AR/mL de sobrenadante).

Outros trabalhos na literatura também usaram resinas na imobilização de enzimas. Tomotani e Vitolo (2007) avaliaram o desempenho da glicose oxidase adsorvida em resinas aniônicas Dowex®. Os melhores resultados indicaram um índice de adsorção (porcentagem de retenção de proteína na resina) de 96%, indicando alta eficiência na imobilização.

Kumari e Kayastha (2011) estudaram a imobilização de α -amilase de soja em Amberlite MB-150 ativada com glutaraldeído 2,5% (m/v), foi obtida uma imobilização máxima de 70,4%. Tripathi et al., (2007) estudaram a imobilização da α -amilase de feijão-da-china em resina Amberlite MB-150 também tratada com glutaraldeído 2,5% (m/v), obtendo 72% de rendimento na imobilização, mostrando sucesso na imobilização de amilases de origem vegetal.

Glicoamilase comercial de *Aspergillus niger* (Nova Nordisk) foi imobilizada por meio de adsorção iônica em suportes DEAE-agarose, Q1A-Sepabeads, e

Sepabeads CE-EP3 revestidos com PEI. Observou-se que a força de adsorção foi muito maior em PEI-Sepabeads do que em Q1A-Sepabeads ou DEAE-suportes, requerendo elevada força iônica para remover a partir glicoamilase do suporte-PEI. A otimização do processo permitiu a preparação de derivados com cerca de 50% de atividade imobilizada (TORRES et al., 2004).

Eficiência esta que não foi obtida neste estudo. A adsorção de enzimas sobre resinas de troca iônica é um dos protocolos mais comuns e fáceis de executar para a imobilização reversível de enzimas com uma regeneração fácil do suporte. A principal desvantagem destes protocolos é que as enzimas podem ser libertadas do suporte durante a reação se o valor a alteração de pH ou força iônica aumentada (MIGUEL-FILHO et al., 2008)

O objetivo em utilizar agentes ativadores, como glutaraldeído e PEI, é formar um reticulado com ligações intermoleculares capazes de resistir a condições extremas de pH e temperatura e a solventes orgânicos. O reticulado possibilita a enzima resistir à desnaturação por estar mais estável estericamente. A maior desvantagem é que muitas enzimas são sensíveis ao acoplamento químico com esses agentes, podendo perder sua atividade por desnaturação (FERNANDES, 2005)

Possivelmente as ligações entre ativador, seja PEI ou glutaraldeído, enzima e suporte não foram suficientemente fortes para promover a adsorção permanente. E ainda, os ativadores podem ter desnaturado parte da enzima imobilizada, um fato que mostra indícios de desnaturação é a baixa quantidade de enzima encontrada nos sobrenadantes.

No caso do PEI, se apenas 0,38% da enzima foi imobilizada, esperava-se que o restante, ou seja, 99,62% da enzima estivesse no sobrenadante, mas foi encontrado apenas 36,78% do total de enzima do processo. No caso do glutaraldeído, o comportamento é semelhante, 4,76% da enzima foi imobilizada e apenas 30,82% estava no sobrenadante, quando esperava-se 95,24%.

5.7.4. Imobilização em quitosana como agente de cross-linking

A formação de um agregado reticulado de enzima (CLEAs - cross-linked enzyme aggregates) requer a utilização de um agente de reticulação. Geralmente o

glutaraldeído é escolhido devido ao seu baixo custo, facilidade de manipulação e capacidade para formar ligações covalentes com a maioria das enzimas.

Este trabalho se propôs a testar a quitosana como agente de reticulação ao invés de suporte, baseado no trabalho de Arsenault, Cabana e Jones (2011). Segundo Mendes et al., (2011), diferentes protocolos podem ser empregados na imobilização de enzimas em quitosana, como adsorção, encapsulação e ligação covalente. A quitosana é um polímero obtido a partir da forma desacetilada da quitina, é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável e de grande importância econômica e ambiental, representando assim várias vantagens na sua utilização.

Os resultados de atividade e rendimento estão na Tabela 10. Foi observada uma atividade relativamente alta, 6,83 U/g, quando comparada aos outros protocolos de imobilização usados neste trabalho. No entanto, esse método gerou uma massa muito pequena de material imobilizado, 0,18 g, o que resultou em uma atividade total muito baixa, 1,29 U, de um total de 70 U colocadas para a imobilização, dando um rendimento abaixo do esperado (1,29%).

Além do baixo rendimento, outro problema observado foi a desagregação do material imobilizado, o que impediu a realização de mais de um ciclo para verificar se a atividade se manteria ao longo das re-utilizações da enzima.

Tabela 10. Atividade enzimática da enzima livre (U/mL), enzima imobilizada (U/g) e sobrenadantes do processo (U/mL) e Rendimento da imobilização em quitosana como agente de cross-linking.

Amostra	Atividade Enzimática	Proteína (mg/mL)	Vol./Massa* ¹ (g) (mL)	Atividade Total (U)	Atividade Total (%)
Enzima livre	14,00 ± 1,7	1,02 ± 0,0	5,00	70,00	100,00
Enzima Imobilizada	6,83 ± 1,4	0,83 ± 0,0	0,18	1,29	1,75
Sobrenadante	3,39 ± 0,0	0,19 ± 0,0	9,40	31,86	45,52
Sobrenadante (tampão)	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0	4,90	0,00	0,00

*¹ Valores referentes à amostra de enzima livre ou sobrenadante, considerar volume (mL), para enzima imobilizada, considerar massa (g).

Ashly e Mohanan (2011) estudaram a imobilização de glicoamilase comercial de *Rhizopus sp.* (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd.) em poli(o-tuluidina), polímero sintético preparado quimicamente, utilizando glutaraldeído como agente de

reticulação para a ligação covalente. A enzima imobilizada manteve cerca de 80% atividade catalítica inicial após oito ciclos e mostrou uma estabilidade melhorada com o armazenamento em comparação com a enzima livre.

O objetivo em utilizar CLEAs era superar o problema de redução ou perda de atividade que ocorre com outros métodos de imobilização, como ligações iônicas a um suporte ou aprisionamento em matriz. De acordo com Arsenault, Cabana e Jones (2011), a insolubilização da enzima usando CLEAs é uma técnica simples para produzir um biocatalisador com atividade enzimática elevada por unidade de volume. Uma vez que não se utiliza suporte para insolubilizar a enzima, aumenta a atividade específica do biocatalisador formado.

Entretanto, não foi esse o resultado obtido. Segundo Sheldon, Schoevaart e van Langen (2006), durante a agregação a solubilidade da enzima diminui no meio circundante. Quando este processo é lento a enzima pode desnaturar por causa da severa força exercida sobre sua estrutura. Se a enzima for capaz de encontrar moléculas de proteína vizinhas para rodeá-la em tempo, as chances são bastante boas de manter sua estrutura terciária evitando a desnaturação.

Considerando que a enzima permaneceu sob agitação, ainda que lenta, por 48 h, esse pode ter sido um dos motivos para a possível desnaturação da proteína e consequentemente da baixa atividade do imobilizado. Além disso, foi verificado que grande parte da enzima ficou no sobrenadante, cerca de 45% do total de enzima adicionada no sistema, indicando que além da provável desnaturação, essa técnica não se mostrou tão eficiente para amilases, ou pelo menos, para amilases não totalmente purificadas.

5.7.5. Imobilização em alginato e quitosana: peletes

A imobilização em quitosana na forma de peletes não pôde ser analisada. Os peletes não apresentaram resistência mecânica, se desfazendo em solução alguns segundos depois de formados. Ao contrário dos peletes de alginato, que apresentaram alta resistência mecânica, os dados abaixo se referem a essas análises.

Todas as amostras referentes ao grupo controle não apresentaram atividade enzimática e teor de proteína. Observou-se que a enzima imobilizada apresentou baixa atividade enzimática para ambos os protocolos, dessa forma procedeu-se com

a análise dos sobrenadantes originados durante o processo de imobilização para verificar se a baixa atividade do pelete foi devido à desnaturação da enzima durante o processo ou à ineficácia da imobilização da enzima pelo alginato ou ambos (Tabela 11).

Tabela 11. Atividade enzimática da enzima livre (U/mL), enzima imobilizada (U/g) e sobrenadantes do processo (U/mL) e Rendimento da imobilização em pelete de alginato.

Protocolo * ¹	Amostra	Atividade Enzimática	Proteína (mg/mL)	Vol./Massa* ² (g) (mL)	Atividade Total (U)	Atividade Total (%)
-	Enzima livre	14,15 ± 1,7	1,02 ± 0,0	2,00	28,30	100,00
1	Enzima Imobilizada	0,48 ± 0,0	0,52 ± 0,0	1,32	0,64	2,26
	Sobrenadante (CaCl ₂)	6,00 ± 0,8	0,46 ± 0,0	3,20	19,20	67,84
	Sobrenadante (Água)	0,81 ± 0,1	0,04 ± 0,0	3,50	2,83	10,00
2	Enzima Imobilizada	0,33 ± 0,1	0,65 ± 0,0	1,75	0,58	2,04
	Sobrenadante (CaCl ₂)	6,80 ± 2,6	0,30 ± 0,1	3,00	20,40	72,08
	Sobrenadante (Glutarald.)	1,20 ± 0,0	0,05 ± 0,0	3,00	3,60	12,72
	Sobrenadante (Água)	0,49 ± 0,2	0,02 ± 0,0	3,40	1,71	6,06

*¹ Protocolo 1 – Pelete de alginato; Protocolo 2 – Pelete de alginato com tratamento com glutaraldeído. *² Valores referentes à amostra de enzima livre ou sobrenadante, considerar volume (mL), para enzima imobilizada, considerar massa (g).

Foi verificado que todos os filtrados apresentaram atividade enzimática, sobretudo o primeiro, onde o pelete permaneceu em repouso por 24 h. Esses dados mostram que o método de imobilização por alginato de sódio não foi eficaz para esta enzima.

Outros trabalhos tiveram sucesso na imobilização de amilase por alginato, Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides (2006) estudaram o efeito da concentração de alginato de sódio para a imobilização de α -amilase produzida por *Bacillus subtilis*. Foi observado que maiores taxas de hidrólise foram obtidas com a diminuição da concentração do biopolímero. Quase 70% do amido foi degradado em 8 h de reação quando a concentração de alginato de sódio estava restrita a 1% (m/v), enquanto que o aumento na concentração do biopolímero de 4% e 6% (m/v), resultou em uma diminuição de 27% e 32% na quantidade de açúcares redutores produzidos, respectivamente.

Rajagopalan e Krishnan (2008) também obtiveram sucesso no encapsulamento por alginato da α -amilase produzida por *Bacillus subtilis* para sua utilização na hidrólise do amido. As esferas imobilizadas preparados a partir de 3%

(m/v) de alginato e 4% (w/v) de CaCl_2 foram adequados para até 10 usos repetidos, perdendo apenas 25% da sua eficiência. Gangadharan e colaboradores (2009) estudaram a α -amilase produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* imobilizada em peletes de alginato de cálcio. As esferas mantiveram mais que 60% da sua eficiência inicial depois de cinco ciclos sucessivos e 40% de eficiência foi exibidas nos 6° e 7° ciclos.

Sabe-se que tanto a formação quanto as propriedades mecânicas e estruturais do pelete dependem de diferentes parâmetros, como a concentração do polímero e a natureza e concentração dos cátions (OUWERX et al., 1998). Desse modo, menor eficiência na imobilização pode ser explicada pela baixa concentração de alginato de sódio e cloreto de cálcio, como resultado em uma baixa formação do pelete. Isso se deve ao maior tamanho dos poros formados e conseqüentemente no maior vazamento da enzima pela matriz (DEY, SINGH E BANERJEE, 2003).

Reguly (2000) confirma que a redução da atividade enzimática das enzimas imobilizadas por encapsulamento ocorre devido à exsudação contínua da enzima, ou também ao acesso reduzido do substrato à enzima e à presença de radicais livres produzidos durante a reação de polimerização.

Bayramoglu et al. (2004) citam que o procedimento de imobilização pode causar alteração na afinidade da enzima pelo seu substrato ou diminuir a acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada, reduzindo assim, sua atividade.

Desse modo, supõe-se que a baixa eficiência na imobilização por alginato obtida nesse trabalho deve-se tanto à difusão da enzima para fora do pelete quanto ao fato de que seu sítio ativo pode não ter ficado exposto ao substrato.

5.7.6. Imobilização em alginato e quitosana: biofilme

Assim como ocorreu na formação dos peletes, os biofilmes de quitosana também não puderam ser analisados. Os biofilmes não se solidificavam após a adição do TPP, permanecendo na forma de solução.

Os dados com atividade e rendimento da imobilização em biofilme de alginato estão na Tabela 12. Verificou-se que todos os biofilmes que passaram pelo processo de secagem apresentaram menor rendimento de imobilização do que aqueles que não foram submetidos a esse procedimento.

Tabela 12. Atividade enzimática da enzima livre (U/mL), enzima imobilizada (U/g) e sobrenadantes do processo (U/mL) e Rendimento da imobilização em biofilme de alginato.

Protocolo	Amostra* ¹	Atividade Enzimática	Proteína (mg/mL)	Vol./Massa* ² (g) (mL)	Atividade Total (U)	Atividade Total (%)
	Enzima livre	14,00 ± 1,7	1,02 ± 0,0	2,50	35,00	100,00
C/ secagem	1-Enz imobiliz. (Alg)	0,95 ± 0,0	0,96 ± 0,0	0,70	0,66	1,88
	1-Sobrenadante (CaCl ₂)	2,18 ± 0,1	0,06 ± 0,0	7,50	16,35	46,71
	2- Enz imobiliz (Alg + Glut.)	0,92 ± 0,0	0,95 ± 0,0	0,73	0,67	1,91
	2- Sobrenadante (CaCl ₂)	2,09 ± 0,1	0,06 ± 0,0	7,50	15,67	44,78
	2- Sobrenadante (Glut.)	0,65 ± 0,0	0,01 ± 0,0	3,80	2,47	7,05
	3- Enz imobiliz (Alg + PEI)	0,70 ± 0,0	0,93 ± 0,0	0,70	0,49	1,40
	3- Sobrenadante (CaCl ₂)	2,30 ± 0,0	0,07 ± 0,0	7,70	17,71	50,60
	3-Sobrenadante (PEI)	0,47 ± 0,0	0,02 ± 0,0	4,00	1,88	5,37
S/ secagem	1-Enz imobiliz. (Alg)	1,37 ± 0,0	0,92 ± 0,0	1,95	2,67	7,63
	1-Sobrenadante (CaCl ₂)	3,18 ± 0,0	0,10 ± 0,0	8,70	27,66	79,04
	2- Enz imobiliz (Alg + Glut.)	1,02 ± 0,0	0,89 ± 0,0	2,09	2,13	6,09
	2- Sobrenadante (CaCl ₂)	3,24 ± 0,0	0,11 ± 0,0	8,70	28,18	80,53
	2- Sobrenadante (Glut.)	1,33 ± 0,0	0,02 ± 0,0	3,10	4,12	11,78
	3- Enz imobiliz (Alg + PEI)	0,55 ± 0,0	0,90 ± 0,0	2,10	1,15	3,30
	3- Sobrenadante (CaCl ₂)	3,31 ± 0,0	0,09 ± 0,0	8,90	29,45	84,16
	3-Sobrenadante (PEI)	1,36 ± 0,2	0,03 ± 0,0	3,50	4,76	13,16

*¹ 1 – Biofilme de alginato; 2 – Biofilme de alginato com tratamento com glutaraldeído; 3 – Biofilme de alginato com tratamento com PEI. *² Valores referentes à amostra de enzima livre ou sobrenadante, considerar volume (mL), para enzima imobilizada, considerar massa (g).

Dentre aqueles que foram secos, os biofilmes preparados somente com alginato e preparados com alginato e glutaraldeído apresentaram rendimentos bastante próximos, 1,8% e 1,9%, mostrando que neste caso, a imersão do biofilme no ativador não aumentou a eficiência da imobilização. Sendo que os biofilmes preparados com alginato e PEI foram os que apresentaram o menor rendimento, 1,4%.

Sabe-se que tanto glutaraldeído como PEI são capazes de inibir a atividade catalítica de algumas enzimas. Rosa (2008) observou que concentrações acima de 0,1% (v/v) de PEI já era capaz de inibir a atividade da papaína comercial em pó (Vetec) utilizada para evitar a floculação de *Saccharomyces cerevisiae*.

Ao analisar os dados de atividade dos sobrenadantes, verificou-se que os sobrenadantes originados dos biofilmes que passaram pela etapa de secagem continham 46%, 44% e 50% de toda a enzima inicialmente colocada para ser

imobilizada, para os biofilmes de alginato, alginato + glutaraldeído e alginato + PEI, respectivamente. Enquanto que os sobrenadantes provenientes dos biofilmes que não passaram por essa etapa, continham 79%, 80% e 84% da enzima inicialmente colocada para ser imobilizada, para os biofilmes de alginato, alginato + glutaraldeído e alginato + PEI, respectivamente.

Desse modo, pode-se supor que a etapa de secagem para a enzima imobilizada na forma de biofilme, desnatura a enzima, uma vez que o biofilme fica exposto por longas horas a uma temperatura muito acima à de armazenamento normal da enzima (refrigeração a 4°C ou congelamento a -18°C).

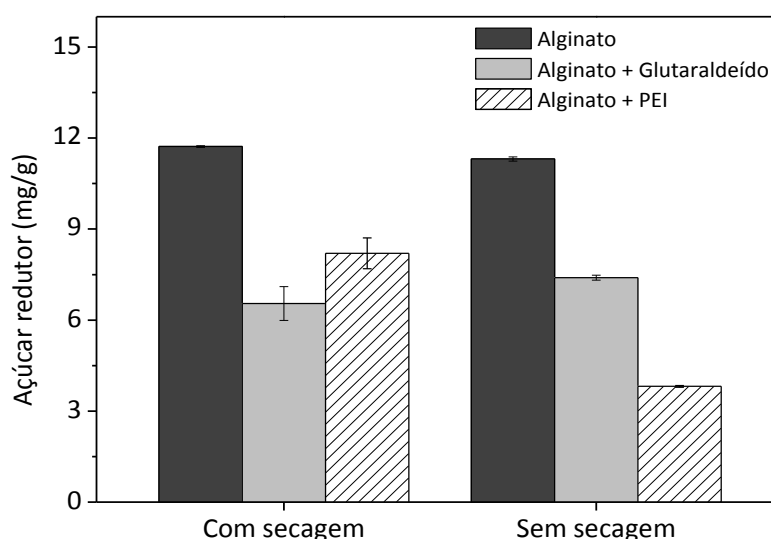


Figura 20. Açúcar redutor (AR) produzido pela enzima imobilizada na forma de biofilme (mg AR/ g enzima imobilizada).

A Figura 20 mostra os dados de açúcar redutor (AR) produzido pela reação utilizando o biofilme. Os biofilmes preparados somente com alginato foram responsáveis pela maior quantidade de AR produzido, seguindo o mesmo padrão já observado com os dados de atividade, onde a ativação com PEI ou glutaraldeído pode ter levado à desnaturação da enzima.

Outros autores também descreveram a imobilização de amilases em biofilmes compostos por polímeros. Cordeiro, Lenk e Werner (2011) imobilizaram a α -amilase comercial de *Bacillus licheniformis* (Sigma Aldrich, Alemanha) em filmes de copolímero de anidrido maleico. A atividade inicial dos imobilizados foi altamente dependente do tipo solução de imobilização. Maior atividade foi atingida nos filmes hidrofílicos de 3-D poli (etileno-*alt*-anidrido maleico) (PEMA), enquanto que a

imobilização nos filmes hidrofóbicos de poli (octadeceno-*alt*-anidrido maleico) (POMA) resultou em menor teor de enzimas e menor atividade. Os filmes de POMA possivelmente favorecem interações hidrofóbicas entre as porções hidrofóbicas da proteína e da superfície, o que pode resultar em mudanças conformacionais, e consequentemente a perda de atividade.

5.8. Imobilização da biomassa

A biomassa também foi utilizada na hidrólise enzimática objetivando seu re- uso na forma de biofilme ou usada isoladamente na forma de biomassa seca. A Figura 21 mostra os dados de atividade enzimática da biomassa seca e imobilizada em biofilme de alginato e quitosana, com e sem secagem.

Os melhores resultados foram observados quando se utilizou a biomassa isolada, ou seja, sem a adição de alginato ou quitosana, onde a atividade foi 56% superior ao segundo melhor método de imobilização usando biomassa, que foi o biofilme de quitosana.

As mesmas amostras ainda foram analisadas quanto ao teor de AR produzido (Figura 22). A condição que gerou maior quantidade de AR foi utilizando somente biomassa, seguido do biofilme de quitosana com secagem, fato já observado quanto à atividade enzimática.

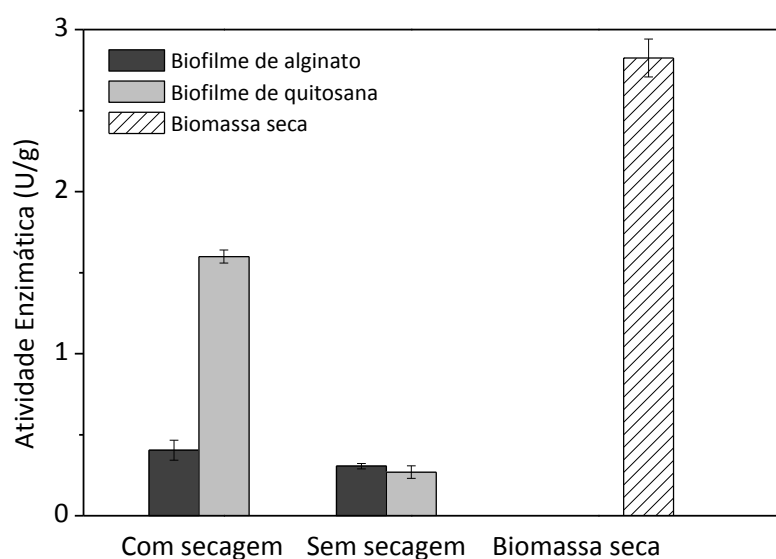


Figura 21. Atividade enzimática da biomassa, imobilizada em biofilme ou não.

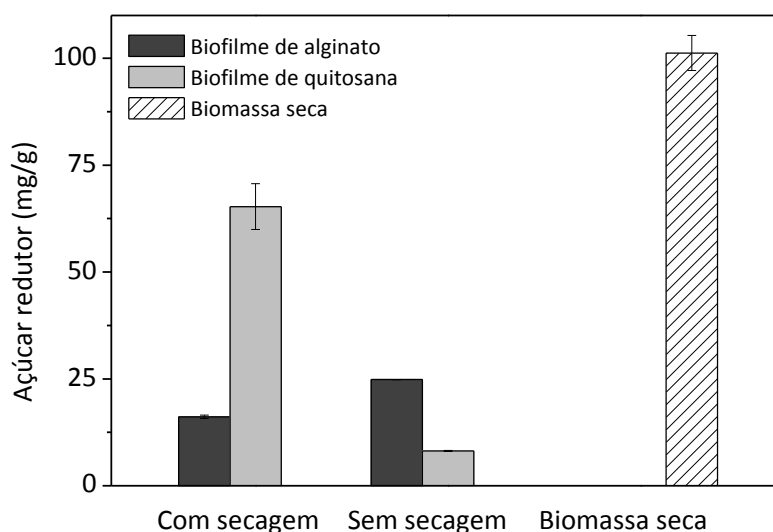


Figura 22. Açúcar redutor (AR) produzido pela biomassa (mg AR / g biomassa imobilizada), imobilizada em biofilme ou não.

Os únicos protocolos em que foi possível usar quitosana foram os biofilmes de biomassa. Sendo que, dentre os biofilmes de biomassa, o preparado com quitosana passando pela etapa de secagem foi o que apresentou melhor resultado. Contrariamente ao que foi observado nos biofilmes com enzima, onde a secagem provavelmente desnaturou parte da enzima imobilizada. Possivelmente, a célula confere proteção à enzima evitando sua desnaturação.

Outros trabalhos também avaliaram a imobilização de células. Shimizu et al., (1982) estudaram o uso de glutaraldeído e de polietilenoimina na imobilização de células de *Serratia plymuthica* em alginato, no processo de batelada para a conversão da sacarose em isomaltulose, no qual os autores descreveram a polietilenoimina como um agente de ligações cruzadas (cross-linking) nas células imobilizadas em alginato.

Covizzi (2007) avaliou pela primeira vez a imobilização de células do *Botryosphaeria rhodina*, um fungo ligninolítico produtor de lacases. Três suportes foram avaliados: Fibras Acrílicas Fina (FAF); Espuma de Poliuretano Expandido (EPE); Espuma de Poliuretano Fibroso (EPF). O EPF foi o melhor suporte por ter mostrado uma imobilização mais homogênea das células. A imobilização aumentou aproximadamente 3 vezes a produção de lacases e manteve estável o nível de produção durante 6 ciclos.

Após análise de todos os protocolos de imobilização testados, com enzima ou biomassa, verificou-se que a imobilização da amilase em biofilme de alginato foi o que resultou maior taxa de imobilização, ainda que abaixo do esperado, seguido da imobilização em bagaço de cana de açúcar. Ainda foi observado que, grande parte dos trabalhos da literatura sobre imobilização de enzimas, sobretudo amilases, utiliza enzimas comerciais ou previamente purificadas, o que pode ter sido um grande diferencial comparado a este trabalho, onde a enzima foi apenas precipitada por sais, mas não purificada. E tendo em vista que a proposta deste trabalho foi testar a imobilização da amilase de *Rhizopus* primeiramente com protocolos simples e baratos, para então, uma vez que não fosse atingido um rendimento dentro do esperado, partir para a realização de outros métodos de imobilização mais onerosos e complexos. Mesmo assim, os resultados obtidos foram extremamente importantes para se conhecer o comportamento desta glicoamilase quando em contato com os agentes de imobilização, e assim planejar com maior propriedade a execução de testes futuros.

5.9. Produção do xarope de glicose

O xarope foi preparado utilizando extrato enzimático bruto e enzima concentrada, uma vez que os testes de imobilização não apresentaram bons rendimentos. Foram utilizadas soluções de amido 5% (m/v) usando enzima bruta e concentrada, e amido 10% (m/v) usando enzima concentrada.

Na concentração de 10% de amido não foi possível fazer a reação com a enzima bruta, uma vez que o processo de gelatinização, necessário para o procedimento, fica inviável pela formação de uma pasta de amido que se solidifica e permanece nesse estado na temperatura da reação (50°C). Quando se usou a enzima concentrada, foi possível preparar a solução de amido na concentração de 10%, porque o volume de enzima a ser adicionado era pequeno, o que não ocorreria com a enzima bruta.

Na Figura 23 pode-se observar que o teor de glicose foi aumentando consideravelmente até atingir um máximo em 4 h, para todos os protocolos. A maior conversão ocorreu quando foi utilizada a enzima concentrada em solução de amido 10% (m/v), gerando um xarope com cerca de 8% de glicose, e rendimento de hidrólise superior a 80%.

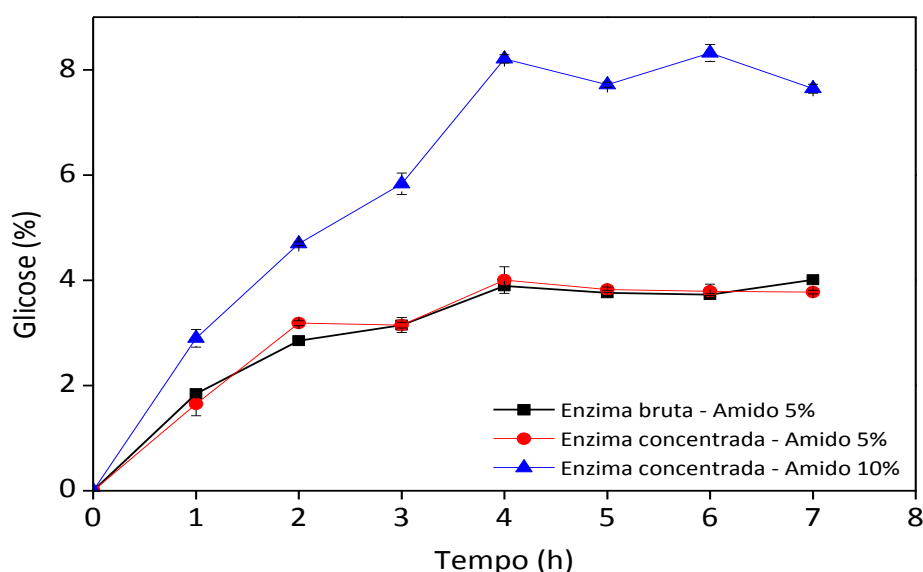


Figura 23. Reação enzimática utilizando enzima produzida por *R. oligosporus* (30 U totais) em solução de amido a 5% e 10%, a 50°C.

O xarope produzido na melhor condição (enzima concentrada e amido 10% (m/v)) foi concentrado por evaporação até alcançar 20% de glicose, que é a concentração aproximada do xarope de glicose padrão DE 38-42, um dos mais utilizados na indústria alimentícia (ADITIVOS & INGREDIENTES, 2012).

Desse modo, o presente trabalho estudou a produção de enzimas amilolíticas utilizando substratos da indústria de farinha de trigo e mandioca. Foram avaliados os parâmetros operacionais e métodos de concentração e imobilização das amilases produzidas. Para então, produzir o xarope de glicose, etapa realizada com sucesso. Os resultados indicaram que a glicoamilase produzida é forte candidata para aplicações industriais. Outros estudos em imobilização poderiam melhorar as características da enzima e permitir seu uso em larga escala.

6. CONCLUSÕES

- A farinha de trigo tipo II foi significativamente superior ao farelo de mandioca e à farinha de mandioca como fonte de carbono na fermentação. Já as melhores condições de fermentação para a produção enzimática foram 30°C em 96 h de cultivo, onde foi avaliada a relação entre o menor gasto de energia e máxima produção enzimática.

- Os estudos deste trabalho revelaram que a glicoamilase de *R. oligosporus* foi mais eficaz do que a de *R. oryzae* em termos de aplicação industrial se comparados: a) a maior atividade enzimática produzida no caldo fermentado (4,5 U/ml) e com menor tempo de cultivo (96 h), contra cerca de 3,7 U/mL em 120 h de cultivo. b) maior termo-estabilidade, por exemplo, na faixa de temperatura com maior atividade relativa (ex. 50°C - 60°C), c) maior faixa de pH (3,5 - 6,0) com atividade relativa de 70-100%.

- A análise dos produtos da hidrólise do amido por CLAE indicam que as amilases de ambos os micro-organismos deste trabalho são do tipo glicoamilases.

- O método de concentração mais eficaz foi a precipitação por sal, que resultou em um extrato com um fator médio de purificação de 3,4 contra 1,5 pela precipitação por solvente orgânico.

- Dentre os protocolos de imobilização testados, com enzima ou biomassa, a imobilização em biofilme de alginato foi o que resultou na maior taxa de imobilização, seguido da imobilização em bagaço de cana de açúcar.

- O extrato enzimático de *R. oligosporus*, concentrado pela técnica de precipitação por sais, foi muito eficiente na produção do xarope de glicose a partir de solução de amido em elevada concentração (10%), pois em apenas 4 horas atingiu rendimento de hidrólise superior a 80%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITIVOS & INGREDIENTES. **Açúcares e xaropes**. São Paulo: Editora Insumos. Disponível em: <www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/83>. Acesso em 23 de janeiro de 2012.

ANINDYAWATI, T.; MELLIAWATI, R.; ITO, K.; IIZUKA, M.; MINAMIURA, N. Three different types of α -amylase from *Aspergillus awamori* KT-11: Their purifications, properties, and specificities. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 7, p. 1351-1357, 1998.

ANTO, H.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1161-1166, 2006.

AOAC - Association Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**, 15. ed. Washington, 1994.

ASHLY, P. C.; MOHANAN, P. V. Preparation and characterization of *Rhizopus* amyloglucosidase immobilized on poly(o-toluidine). **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1422-1426, 2010.

ARNESEN, S.; HAVN ERIKSEN, S.; OLSEN, J.; JENSEN, B. Increased production of α -amylase from *Thermomyces lanuginosus* by addition of tween 80 – Evolutionary implications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, p. 249-252, 1998.

ARSENAULT, A.; CABANA, H.; JONES, J. P. Laccase-Based CLEAs: chitosan as a novel cross-linking agent. **Enzyme Research**, 2011.

AQUINO, A. C. M. M.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Studies on a thermostable α -amylase from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, p. 323-328, 2003.

BAKIR, U.; YAVASCAOGLU, S.; GUVENC, F.; ERSAYIN, A. An endo-E-1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 328-334, 2001.

BALLESTEROS, I.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 187-192, 2002.

BAUMER, J. D.; DIEGO, S. M. M. **Enzimas**. Florianópolis, 2008. Estágio em docência (Pós Graduação em Engenharia Química) - UFSC. Disponível em: <www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/apostilas/Apostila_enzimas_ja_si.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2010.

BAYRAMOGLU, G.; YILMAZ, M.; ARICA, Y. Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 591-599, 2004.

BENNETT, J. W. Adrenaline and cherry trees. **Modern Drug Discovery**. Washington: ACS Publications, v.4, n. 12, p. 47-51, 2001.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. São Paulo: Varela, p. 223, 1992.

BOGAR, B.; SZAKACS, G.; TENGEDY, R. P.; LINDEN, J. C.; PANDEY, A. Production of α -amylase with *Apergillus oryzae* on spent substrate fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102-103, p. 453 – 461, 2002.

BORGIO, J. F. Immobilization of microbial (wild and mutant strains) amylase on coconut fiber and alginate matrix for enhanced activity. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 01, n. 03, p. 255-264, 2011.

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

BRAMORSKI, A.; CHRISTEN, P.; RAMIREZ, M.; SOCCOL, C. R.; REVAH, S. Production of volatile compounds by the edible fungus *Rhizopus oryzae* during solid state cultivation on tropical agroindustrial substrates. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 4, p. 359-362, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução nº 16/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos**. Brasília, 1978.

BURHAN, A.; NISA, U.; GOKHAN, C.; OMER, C.; ASHABIL, A.; OSMAN, G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1397-1403, 2003.

CANTARELLI, C. The use of immobilized yeasts in wine fermentation. **Journal of Food Science**, n. 3, p. 3-20, 1989.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, n. 23, p. 60-70, 2006.

CHEETHAM, P. S. J. Principles of industrial biocatalysis and bioprocessing. In: Wiseman A, editor. **Handbook of enzyme biotechnology**. London: Ellis Horwood Ltd, p. 83–233, 1985.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Standard for Sugars 1 - Codex Stan 212-1999**. Disponível em: <www.codexalimentarius.net>. Acesso em 14 de fevereiro de 2012.

COELHO, T. C. **Avaliação das condições de imobilização de células de *Candida Guilhermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) visando a produção de xilitol.** 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

CORDEIRO, A. L.; LENK, T.; WERNER, C. Immobilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase onto reactive polymer films. **Journal of Biotechnology**, v.154, p. 216– 221, 2011.

COVIZZI, L. G. **Seleção de um suporte sintético para imobilizar células do *Botryosphaeria rhodina* e comparação da produção de lacase por células livres e imobilizadas.** 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, UNESP, São José do Rio Preto, 2007.

COVIZZI, L. G.; GIESE, L. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160, 2007.

CRUZ, R.; SOUZA, E. L.; HOFFMANM, E. H. E.; BELLINE, M. Z. B.; CRUZ, V. D.; VIEIRA, C, R. Relationship between carbon source, production and patter action of α -amylase from *Rhizopus* sp. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 101-105, 1997.

DALSENTER, F. D. H. **Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopus oryzae* em cultivo no estado sólido.** 2005. 136 p. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

DEY, G.; SINGH, B.; BANERJEE, R. (2003). Immobilization of α -amylase produced by *Bacillus circulans* GRS 313. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 2, p. 167–176, 2003.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation Techniques. In: Ed. Deutscher, M. P. **Guide to protein purification.** San Diego: Academic Press, 1990.

FERNANDES, E. G. R. **Biossensores Nanoestruturados para Monitoração de Glicose**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais para Engenharia) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2005.

FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. Developments in microbial extracellular enzymes. Topics in enzyme and fermentation biotechnology. In: WISEMAN, A. (Ed.) **Developments in microbial extracellular enzymes**. New York: Wiley, p. 45–108, v. 3, 1979.

GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; PANDEY, A. Immobilized bacterial α -amylase for effective hydrolysis of raw and soluble starch. **Food Research International**, v. 42, p. 436–442, 2009.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de α -amilase e glucoamilase termoestável pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* TO-03 por fermentação submersa e em estado sólido e caracterização das enzimas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

GUANDALINI, N. C. **Estudo da produção de enzimas amilolíticas pelo fungo *Metarhizium ansioptiae* utilizando resíduos amiláceos como substrato**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2007.

GUISÁN, J. M. Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins. In: GUISÁN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2nd Ed. Totowa: Human Press. 2006.

GUPTA, R; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, p. 1-18, 2003.

HAMILTON, L. M.; KELLY, C. T.; FOGARTY, W. M. Production and properties of the raw starch – digesting α -amylase of *Bacillus sp.* IMD 435. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 27–31, 1999.

HATA, Y.; ISHIDA, H.; KOJIMA, Y.; ICHIKAWA, E.; KAWATO, A.; SUGINAMI, K.; IMAYASU, S. Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid state culture (Koji) and submerged culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p. 532-537, 1997.

HENDRIKSEN, H. V.; PEDERSEN, S.; BISGARD-FRANTZEN, H. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. **Patent Application**. WO 99/35325, 1999.

JAMES, J. A.; LEE, B. H. Glucoamylases: microbial sources, industrial applications and molecular biology: a review. **Journal Food Biochemistry**, v. 21, p. 1–52, 1997.

JIN, B.; HANS, J. VAN LEEUWEN; PATEL, B.; DOELLE, H. W.; YU, Q. Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 59–65, 1999.

KEARSLEY, M. W.; DZIEDIC, S. Z. **Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives**. London: Chapman & Hall, 1995.

KIELING, D. D.; **Enzimas: aspectos gerais**. Florianópolis, 2002. Disciplina de Engenharia Bioquímica. UFSC. Disponível em: <www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/lista_exerc/enzimas_aspectosgerais.pdf> Acesso em: 23 mar. 2010.

KONSOULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Starch hydrolysis by the action of an entrapped in alginate capsules α -amylase from *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 343–349, 2006.

KOTTWITZ, B.; UPADEK, H.; CARRER, G. Applications and benefits of enzymes in detergent. **Chim Oggi**, v. 12, p. 21-24, 1994.

KUMAKURA, M.; YOSHIDA, M. ASANO, M. Preparation of immobilized yeast cells with porous substrates. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 225-229, 1992.

KUMARI, A.; KAYASTHA, A. M. Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto chitosan and Amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 8–14, 2011.

LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N. O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3, p. 151-159, 1999.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª Ed. Worth Publishers, 1995.

LEONEL, M. O farelo, subproduto da extração da fécula de mandioca. In: Cereda, M. P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001a.

LEONEL, M. Caracterização da fibra e uso do farelo de mandioca como base para produtos dietéticos. In: Cereda, M. P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001b.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 98 – 105, 2000.

MATSUI, K. N. **Desenvolvimento de materiais de biodegradáveis a partir do bagaço de mandioca**. Florianópolis, 2002. 87 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos - Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

MENDES, A. A. OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENEZES, T. J. B. Importância da sacarificação na produção de alimentos e energia. In: Furtado, J. S. **Fermentações Industriais e Transformações Microbianas**. Sociedade Brasileira de Microbiologia: São Paulo, p. 5-11, 1982.

MC KNIGHT, I.; MAZZIEIRO, G. Aplicação das enzimas amilolíticas em panificação. **Higiene Alimentar**, v.14, n.72, p.35-45, 2000.

MICHELIN, M. **Estudo da glucoamilase e da α -amilase pelo fungo *Paecilomyces variotii*: purificação, caracterização bioquímica e relações filogenéticas**. 2005, 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

MIGUEL FILHO.; PESSELA, B. C.; MATEO, C.; CARRASCOSA, A. V.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Reversible immobilization of a hexameric α -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 on polymeric ionic exchangers. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1142–1146, 2008.

MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**. New York, v.31, p. 426-428, 1959.

MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1217-1224, 2006.

MOINHO NACIONAL. **Produtos**. Disponível em: <www.moinhonacional.com.br>. Acesso em 6 junho de 2011.

MOORE, G. R. P.; DO CANTO, L. R.; AMANTE, E. R. Cassava and corn starch in maltodextrin production. **Química nova**, v. 28, n.4, p. 596-600, 2005.

NAHAR, S.; HOSSAIN, F.; FERROZA, B.; HALIM, M. A. Production of glucoamylase by *Rhizopus* sp. in liquid culture. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 4, p. 1693-1698, 2008.

NAKAJIMA, M.; NISHIZAWA, K.; NABETANI, H. A. A forced flow membrane enzyme reactor for sucrose inversion using molasses. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 9, p. 31–35, 1993.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th ed. W. H. Freeman: New York, 2006.

NERI, D. F. M. **Immobilization of b-galactosidase onto different water insoluble matrices**. 2008, Thesis - Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2008.

OLIVA-NETO, P. MENÃO, P. T. P. Isomaltulose production from sucrose by *Protaminobacter rubrum* immobilized in calcium alginate. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4252-4256, 2009.

OUWERX, C.; VELINGS, N.; MESTDAGH, M. M.; AXELOS, M. A. V. Physicochemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. **Poly Gels Networks**, v. 6, p. 393–408, 1998.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C. R.; SOCCOL, V. T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 31, p. 135-152, 2000a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000b.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1^a Ed., New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2006.

PEIXOTO, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology**, v. 6, p. 269–273, 2003.

PESSOA JR. A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri: Editora Manole Ltda, 2005.

PINTO, M. P. **Optimização dos processos de produção de xaropes de glucose e dextrose monohidratada**. Lisboa, 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) – Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

PRITCHARD, P. A. Studies on the bread improving mechanisms of fungal α -amylase. **Journal Biology Education**, v. 8, p.12-26, 1992.

QUAGLIA, G., **Ciencia y tecnología de la panificación**, Editorial Acribia, 2ªEdição, 1991.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p 199-209, 1980.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1 n. 3, 1998.

RAJAGOPALAN, G.; KRISHNAN, C. Immobilization of malto-oligosaccharide forming α -amylase from *Bacillus subtilis* KCC103: Properties and application in starch hydrolysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2008.

RAJOKA, M. I.; YASMIN, A.; LATIF, F. Kinetic of enhanced ethanol productivity using raw starch hydrolyzing glucoamylase from *Aspergillus niger* mutant produced in solid state fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 13-18, 2004.

RANI, A. S.; DAS, M. L. M.; SATYANARAYANA, S. Preparation and characterization of amyloglucosidase adsorbed on activated charcoal. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 10, n. 5, p. 471-476, 2000.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. 1 ed. Pelotas: EDUFPEl, v. 3, 2000.

ROSA, H. **Técnicas de reciclo de protease visando a desfloculação celular de *saccharomyces cerevisiae***. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2008.

RUCKA, M., TURKIEWICZ, B. Hydrolysis of sunflower oil by means of hydrophobic membrane with lipolytic activity. **Biotechnology Letters**, v.11, n.3, p.167-172, 1989.

SAITO, I. M. **Produção de hidrolisados e fibras a partir de resíduo da industrialização de mandioca submetido à pré-tratamento hidrotérmico**. Botucatu, 2005. Tese (Doutorado em Agronomia - Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, 2005.

SANTANA, N. B. **Eficiência da hidrólise do amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol**. Viçosa, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência de Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. 3^a Ed. New York: Ed. Springer, 1994.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia bioquímica**. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

SEBRÃO, D.; SILVA, V. D. S.; NASCIMENTO, M. G.; MOREIRA, M. A. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol: aplicação na síntese de ésteres. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, 2007.

SHELDON, R. A.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. M. Cross-Linked Enzyme Aggregates. In: GUISÁN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2nd Ed. Totowa: Human Press. 2006.

SHIMIZU, J.; SUZUKI, K.; NAKAJIMA, Y. Method of producing an immobilized alpha-glycosyltransferase useful in the production of palatinose from sucrose. **UK Patent** 2,082,591. 1982.

SILVA, G. **Aproveitamento biotecnológico de resíduos agroindustriais na produção de glucoamilase**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2006

SILVA, T. M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. 2009. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SIVARAMAKRISHNAN, S.; GANGADHARAN, D.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. α -Amylases from microbial sources – An overview on recent developments. **Food Technology Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 173-184, 2006.

SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J. M. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 330-336, 1994a.

SOCCOL, C. R.; ILOKI, I.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M. Comparative production of α -amylase, glucoamylase and protein enrichment of raw and cooked cassava by *Rhizopus* strains in submerged and solid state fermentations. **Journal of Food Science and Technology**, v. 31, n. 4, p. 320-323, 1994b.

SOUZA, E. L. HOFFMANN, E. H. E. CASTILHO, V. M. LIMA, V. A. L. BELLINI, M. Z. CRUZ, R. CRUZ, V. D. Produção e caracterização de α -amilase produzida por *Rhizopus* sp. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, p. 831-839, 1996.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industry – A review. **Braslian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850 – 861, 2010.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SUGANTHI, R.; BENAZIR, J. F.; SANTHI, R.; RAMESH KUMAR, V.; ANJANA HARI, N. M.; NIDHIYA, K. A.; KAVITHA, G.; LAKSHMI, R. Amylase production by *Aspergillus niger* under solid State fermentation using agroindustrial wastes. **International Journal of Engineering Science and Technology**. v. 3, n. 2, 2011.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 83, p. 1-11, 2002.

SURMELY, R. **Produção dos hidrolisados a partir de mandioca por processo enzimático**. Botucatu: Centro de Raízes e Amidos Tropicais, 1997. 125 p. Relatório de Atividade (Programa Recursos Humanos em Apoio as Empresas – Ministério de Ciência e Tecnologia) – UNESP, 1997.

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. Hidrólise do amido. In: Cereda, M. P. **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2003.

TAFARELLO, L. A. B. **Produção, purificação parcial, caracterização e aplicações alfa-amilase termo-estável produzida por bactérias**. Campinas, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2004.

TOLAN, J. S.; Pulp and Paper. In: GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial Enzymology**. 2^a Ed. New York: Stockton Press, p. 327-338, 1996.

TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Immobilized glucose oxidase as a catalyst to the conversion of glucose into gluconic acid using a membrane reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1020–1025, 2007.

TORRES, R.; PESSELA, B. C. C.; MATEO, C.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Reversible immobilization of glucoamylase by ionic adsorption on sepabeads coated with polyethyleneimine. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 4, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: An Introduction**. 10th ed. 2010.

TRIPATHI, P.; KUMARI, A.; RATH, A.; KAYASTHA, A. M. Immobilization of α -amylase from mung beans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, p. 69–74, 2007.

VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal Biotechnology**, v. 94, p. 137–155, 2002.

VAN EE, J. H.; VAN RIJSWIJK, W. C.; BOLLIER, M. Enzymatic automated dishwash detergents. **Chim Oggi**, v. 10, p. 21-24, 1992.

VARAVINITA, S.; CHAOKASEMA, N.; SHOBSNGOBB, S. Immobilization of a thermostable alpha-amylase. **Science Asia**, v. 28, p. 247-251, 2002.

VITOLO, M. Imobilização de células e enzimas. **Biotecnologia**, n. 11, 1988.

VITOLO, M. **Modificação enzimática de materiais amiláceos**. Disponível em: <www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/Texto%20sobre%20modifica%C3%A7%C3%A3o%20enzim%C3%A1tica%20de%20materiais%20amil%C3%A1ceos%20%5B1%5D.pdf>. Acesso em: 29 junho de 2010.

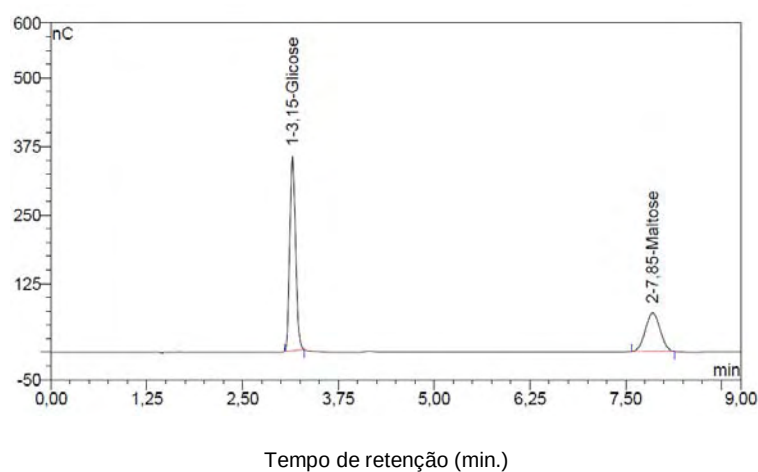
VITOLO, M. **Aspectos da Técnica de Imobilização**. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/Texto%20sobre%20imobiliza%C3%A7%C3%A3o%20de%20enzimas%20%5B1%5D.htm>>. Acesso em 02 set. 2011.

WANG, A.; GU, Z.; CUI, Z.; LIU, L. Comparison of covalent immobilization of amylase on polystyrene pellets with pentaethylenhexamine and pentaethylene glycol spacers. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9374–9379, 2011.

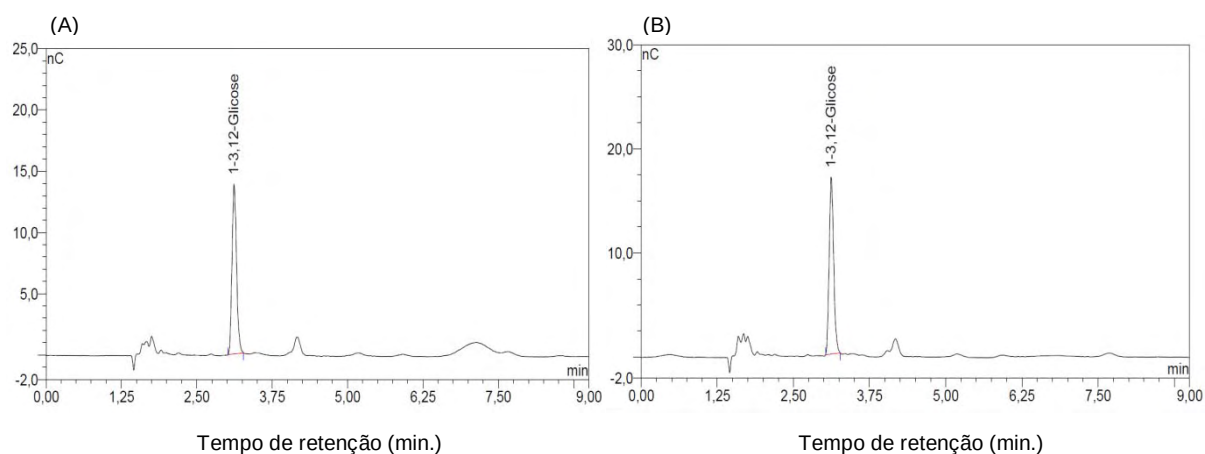
WISNIEWSKI, A. C.; ALMEIDA, M. A. L.; PALMA, M. B.; TAVARES, L. B. B. Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja. **Brasilian Journal Biosciences**, Porto Alegre, v. 8, n. 3, p. 285 – 293, 2010.

YU, R.; HANG, Y. D. Amylolytic enzyme production by *Rhizopus oryzae* grown on agricultural commodities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 15-18, 1990.

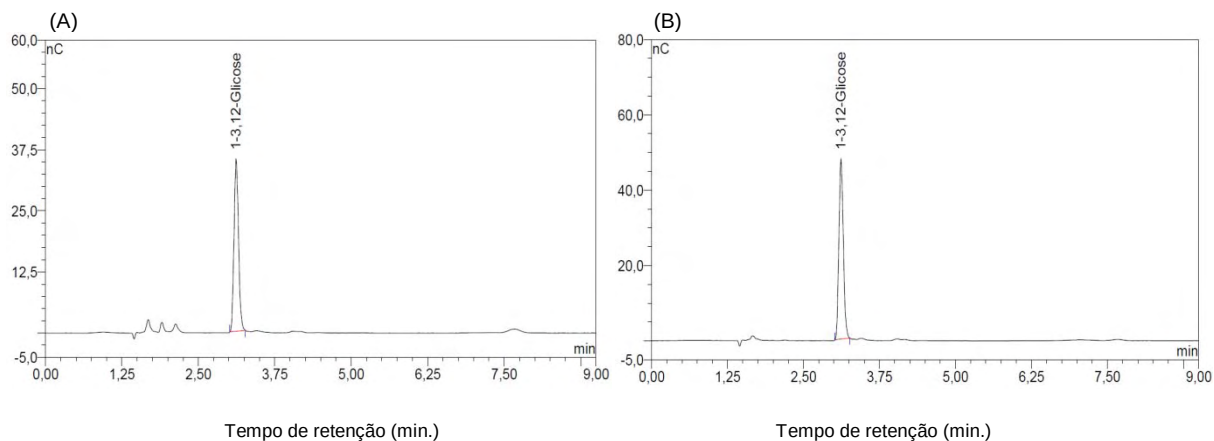
APÊNDICE A



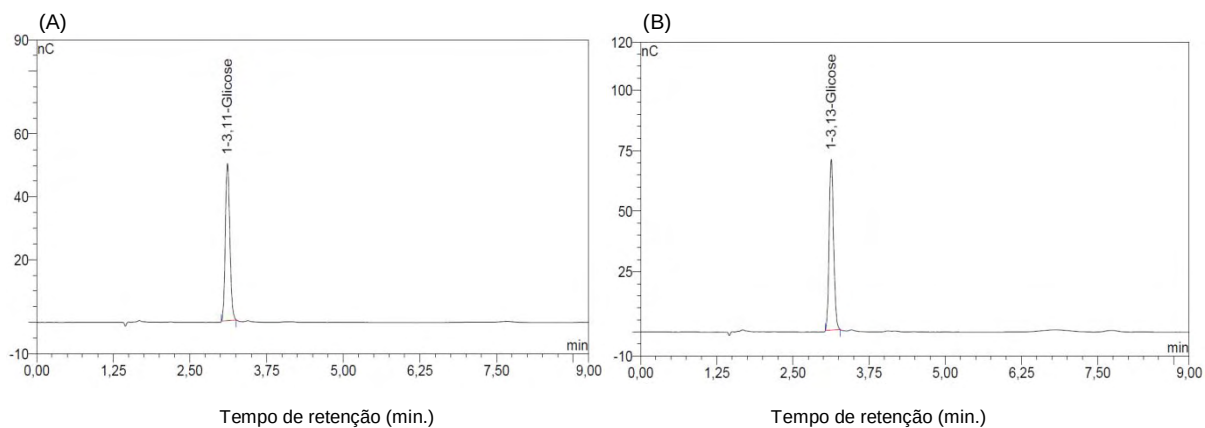
Cromatograma A. Análise dos padrões: glicose e maltose



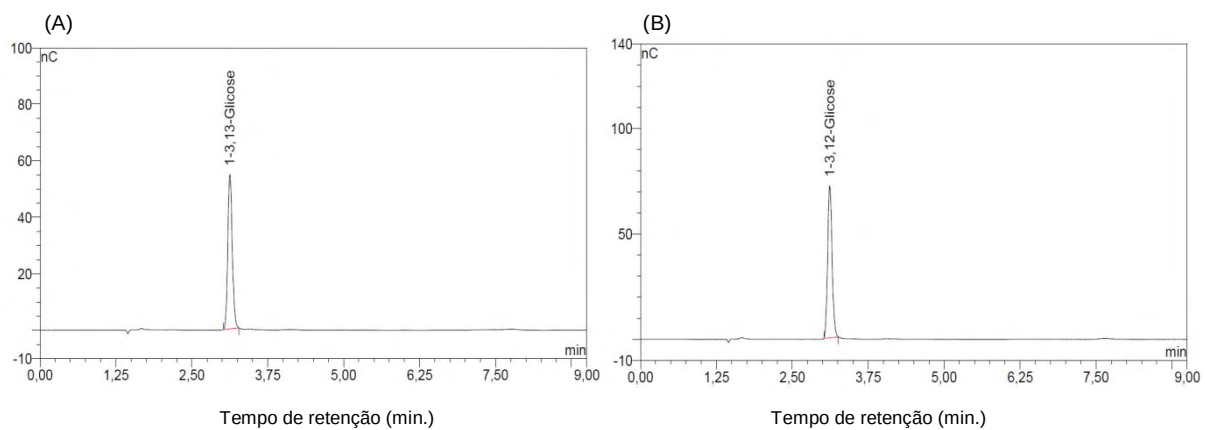
Cromatograma B. Análise dos produtos da hidrólise do amido 0,44% (m/v) pelas enzimas de *R. oryzae* (A) e *R. oligosporus* (B) no tempo zero.



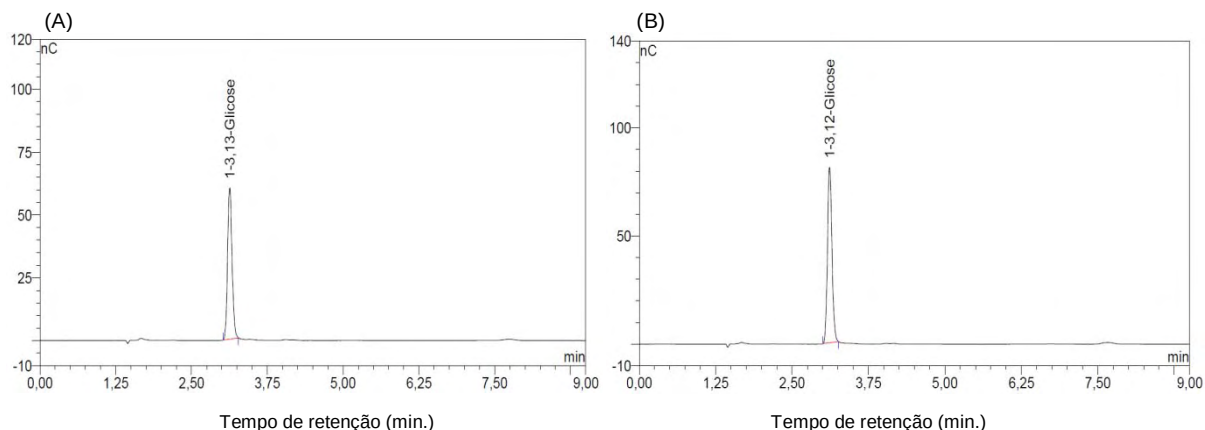
Cromatograma C. Análise dos produtos da hidrólise do amido 0,44% (m/v) pelas enzimas de *R. oryzae* (A) e *R. oligosporus* (B) em 0,5 h de reação.



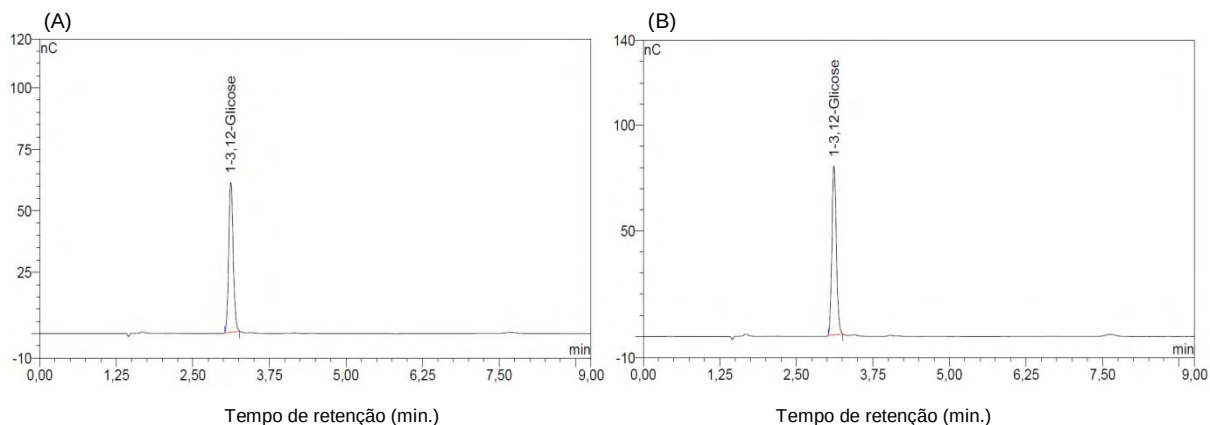
Cromatograma D. Análise dos produtos da hidrólise do amido 0,44% (m/v) pelas enzimas de *R. oryzae* (A) e *R. oligosporus* (B) em 1,0 h de reação.



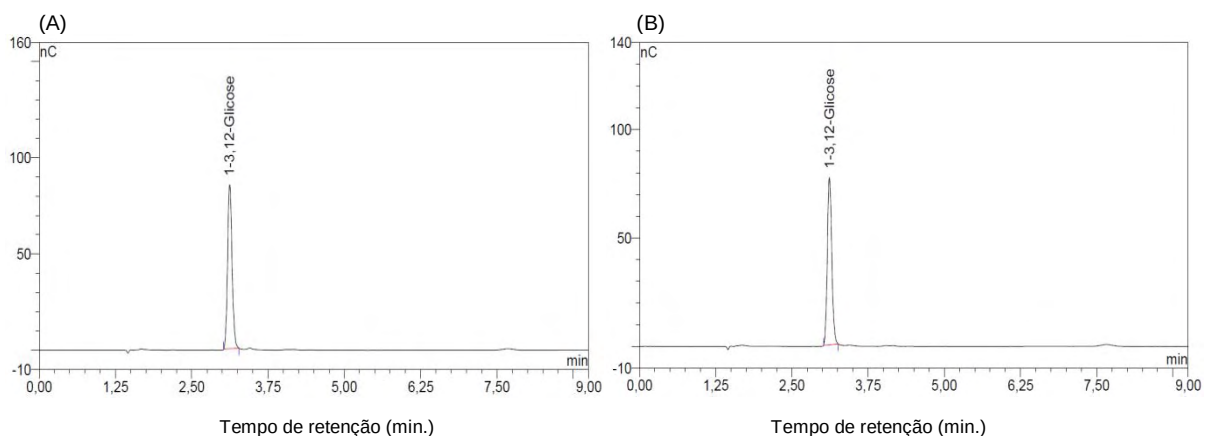
Cromatograma E. Análise dos produtos da hidrólise do amido 0,44% (m/v) pelas enzimas de *R. oryzae* (A) e *R. oligosporus* (B) em 1,5 h de reação.



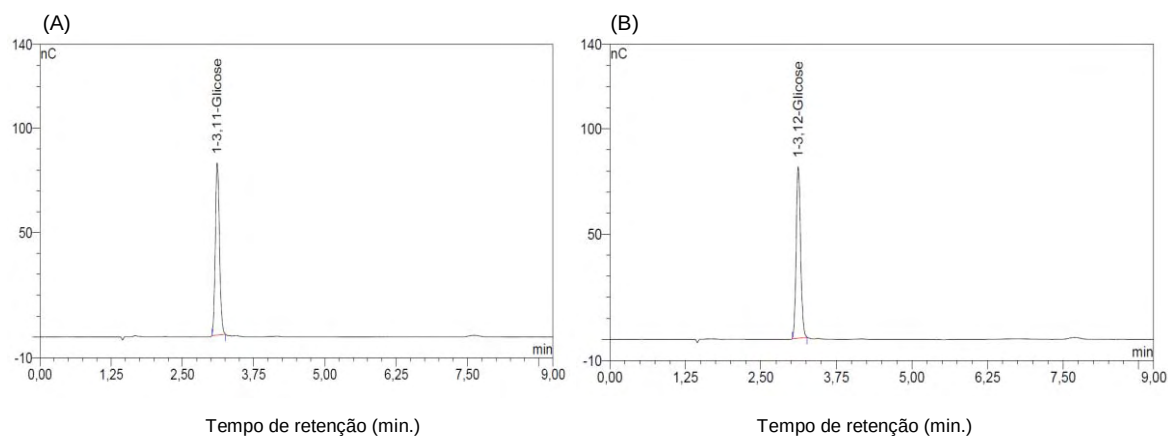
Cromatograma F. Análise dos produtos da hidrólise do amido 0,44% (m/v) pelas enzimas de *R. oryzae* (A) e *R. oligosporus* (B) em 2,0 h de reação.



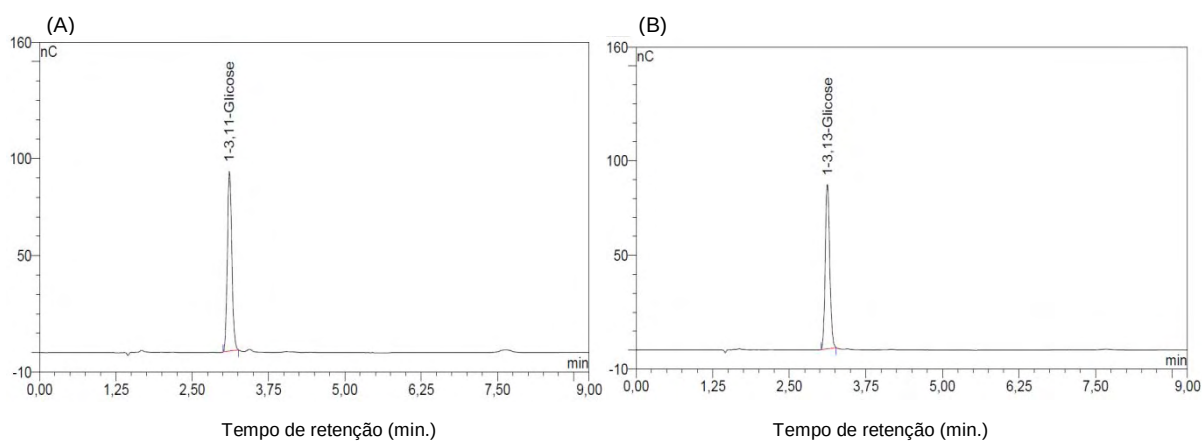
Cromatograma G. Análise dos produtos da hidrólise do amido 0,44% (m/v) pelas enzimas de *R. oryzae* (A) e *R. oligosporus* (B) em 2,5 h de reação.



Cromatograma H. Análise dos produtos da hidrólise do amido 0,44% (m/v) pelas enzimas de *R. oryzae* (A) e *R. oligosporus* (B) em 3,0 h de reação.



Cromatograma I. Análise dos produtos da hidrólise do amido 0,44% (m/v) pelas enzimas de *R. oryzae* (A) e *R. oligosporus* (B) em 3,5 h de reação.



Cromatograma J. Análise dos produtos da hidrólise do amido 0,44% (m/v) pelas enzimas de *R. oryzae* (A) e *R. oligosporus* (B) em 4,0 h de reação.