

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 19/12/2021.

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

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

Isabela da Costa Luchiari

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

Ciência dos Alimentos

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

Araraquara

2019

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

Isabela da Costa Luchiari

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

Ciência dos Alimentos

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

Araraquara

2019

L936i

Luchiari, Isabela da Costa.

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

Araraquara: [S.n.], 2019.

87 f. : il.

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

Orientador: Fernando Masarin.

Coorientador: Rubens Monti.

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

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

CAPES: 33004030055P6

Esta ficha não pode ser modificada

Agradecimentos

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

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

Ao Prof. Dr. Fernando Masarin pela oportunidade.

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

Abstract

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

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

7 CONCLUSÃO

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

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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