

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SUL DE
MINAS GERAIS - IFSULDEMINAS**

Patrícia Alves Caixeta

**Imobilização de Alfa-Amilases em Suporte de Glioxil-Agarose 4BCL para Aplicação na
Produção de Derivados de Hidrólise do Amido**

**MACHADO/MG
2018**

Patrícia Alves Caixeta

**Imobilização de Alfa-Amilases em Suporte de Glioxil-Agarose 4BCL para Aplicação na
Produção de Derivados de Hidrólise do Amido**

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Olga Luisa Tavano

**MACHADO/MG
2018**

C138i Caixeta, Patrícia Alves.
Imobilização de alfa-amilases em suporte glioxil-agarose 4BCL para aplicação na produção de derivados de hidrólise do amido / Patrícia Alves Caixeta. – Machado: [s.n.], 2019.
63 p. : il.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Olga Luisa Tavano.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Machado
Inclui bibliografia.

1. Amido. 2. Maltodextrinas. 3. Enzimas. 4. Amilases. 5. Enzimas imobilizadas. I. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Machado. II. Título.

664.2

Patrícia Alves Caixeta

**Imobilização de Alfa-Amilases em Suporte de Glioxil-Agarose 4BCL para Aplicação na
Produção de Derivados de Hidrólise do Amido**

Dissertação apresentada ao IFSULDEMINAS,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia
de Alimentos, para a obtenção do título de Mestre

APROVADA em 31 de julho de 2018.

Prof. Dr. Bruno Martins Dala Paula
Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Brígida Monteiro Vilas Boas
Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Sul de Minas

Prof. Dra. Olga Luisa Tavano
Universidade Federal de Alfenas

Dedico este trabalho ao meu pai, que sempre me incentivou a estudar.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Olga Luisa Tavano, pela paciência, compreensão, dedicação, orientação e incentivo a este trabalho.

Ao Ismael, pela compreensão, amor e carinho nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Humberto e Denize e às minhas irmãs Paula e Marcela, por me apoiarem mesmo à distância e na ausência.

Aos colegas do laboratório da FANUT, Carine, Renata e Roqueline.

À Brígida, pela coordenação e apoio ao programa de pós-graduação, que com carinho conduziu todos nós discentes.

Aos Sr. José Reinaldo e Sr. Feliciano por confiarem em mim, permitirem e incentivarem a estar nesta jornada.

A todos os colegas de trabalho que compreenderam a minha ausência e me apoiaram nos trabalhos.

Aos colegas do programa de pós-graduação que fizeram este percurso mais leve.

A Deus.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“(...) O trabalho é tudo. É tudo no relativo e é tudo no Absoluto. Eu diria: trabalho é a vida relativa de cada um e é a vida absoluta de todos e do Todo. Sabe por quê? Porque é energia. E energia é movimento. O Universo é movimento. E quem faz o movimento é o trabalho.”

Dr. Celso Charuri

RESUMO

O objetivo foi testar as enzimas Starmax 480 e Termamyl 120L, amilases já utilizadas na produção de maltodextrinas, imobilizadas em suporte de glioxil-agarose (4BCL). O uso de amilases imobilizadas pode ser uma maneira eficaz de finalizar esta reação, permitindo que até mesmo um produto mais puro seja obtido, uma vez que as cadeias enzimáticas seriam retiradas no final da reação interrompida por filtração. Diferentes proporções de enzima-suporte foram testadas e os derivados produzidos com baixa carga protéica apresentaram maior estabilidade e capacidade de reutilização. Derivados Starmax e Termamyl produzidos a 56 e 40 mg/g de suporte, respectivamente, atingiram taxa de imobilização de cerca de 5%, em torno de 3 mg/g de suporte. Nestas condições, conseguiram apresentar reutilização de até 4 ciclos, mantendo 2,79% e 2,03% de atividade, porém, uma grande quantidade de proteína disponibilizada não foi utilizada. Nestas condições, as mesmas enzimas foram imobilizadas com 3 mg/g de suporte. Seus derivados atingiram carga de cerca de 2,5 mg/g de suporte e atividade específica de 0,12% para a Starmax e 2,03% para Termamyl, embora com atividade mais baixa apresentaram-se mais estáveis, característica de uma ligação multipontual confirmadas pelo reuso. Puderam ser reutilizados por 8 ciclos para Starmax, mantendo 32% de atividade e 7 ciclos para Termamyl, mantendo 38% de atividade. Esses mesmos derivados com menor carga proteica apresentaram maior estabilidade à ebulição, com atividade após 10 minutos de fervura, de 40% para a Starmax e 15% para a Termamyl. Quando comparado à forma livre e enzimas imobilizadas em uso industrial ambas enzimas imobilizadas apresentaram pouco rendimento.

Palavras-chave: Maltodextrina. Hidrólise Enzimática. Amilases. Imobilização. Glioxil-agarose.

ABSTRACT

The objective was to test the enzymes Starmax 480 and Termamyl 120L, amylases already used in the production of maltodextrins, immobilized in support of glyoxyl-agarose (4BCL). Use of immobilized amylases could be an effective way to finalize this reaction, allowing even the most pure product to be obtained, since the enzymatic chains would be withdrawn at the end of the reaction interrupted by filtration. Different proportions of enzyme-support were tested and the derivatives produced with low protein loads presented greater stability and reuse capacity. Starmax and Termamyl derivatives produced at 56 and 40 mg/g carrier, respectively, achieved immobilization rate of about 5%, around 3 mg/g carrier. In these conditions, they were able to present reuse of up to 4 cycles, maintaining 2.79% and 2.03% of activity, but a large amount of available protein was not used. Under these conditions the same enzymes were immobilized with 3 mg/g support, their derivatives reached a loading of about 2.5 mg/g support and specific activity of 0.12% for Starmax and 2.03% for Termamyl, although with lower activity, were more stable, characteristic of a multipoint link confirmed by reuse, could be reused for 8 cycles for Starmax, maintaining 32% of activity and 7 cycles for Termamyl, maintaining 38% of activity. These same derivatives with lower protein load showed higher stability to boiling, with activity after 10 minutes of boiling, 40% for Starmax and 15% for Termamyl. When compared to free form and enzymes immobilized in industrial use both immobilized enzymes showed little yield.

Keywords: Maltodextrin. Enzymatic Hydrolysis. Amylases. Enzymatic Immobilization. Glyoxyl Agarose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura química da Amilose (a) e Amilopectina (b).	13
Figura 2.2: Composição de maltodextrinas com DE 20, produzidas por diferentes métodos..	16
Figura 2.3: Fluxograma esquemático do processo de hidrólise do amido para produção de maltodextrina com enzima α -amilase	17
Figura 2.4: Padrão de hidrólise de hidrolases na digestão de amido.	20
Figura 2.5: Esquema métodos de imobilização.	23
Figura 2.6: Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas livre de suporte.	25
Figura 2.7: Efeito da imobilização na estabilidade enzimática.	26
Figura 2.8: Estrutura da cadeia de agarose.	29
Figura 2.9: Preparação e aplicação do suporte glioxil-agarose.	30
Figura 3.1: Reuso de derivados de glioxil-agarose (4BCL) produzidos com diferentes concentrações da amilase Starmax 480.	44
Figura 3.2: Reuso de derivados de glioxil-agarose (4BCL) produzidos com diferentes concentrações da amilase Termamyl 120L.	45
Figura 3.3:- Atividade relativa das amilases Starmax (A) e Termamyl (B) em suporte de glioxil-agarose (4BCL) em função da temperatura do meio de reação.	46
Figura 3.4: Estabilidade térmica das amilases Starmax (A) e Termamyl (B) em suporte de glioxil-agarose (4BCL) em função do tempo de incubação.	47
Figura 3.5: Fluxograma de produção de maltodextrina em uma empresa do Sul de Minas Gerais.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Classificação das enzimas em função das reações que catalisam.	19
Tabela 2.2: Comparação das principais propriedades dos processos industriais enzimáticos, tanto da enzima livre (processo homogêneo) quanto das enzimas imobilizadas (processo de forma heterogênea).	22
Tabela 2.3: Vantagens e Desvantagens dos principais métodos de imobilização.	27
Tabela 3.1: Imobilização da amilase Starmax 480 nos suportes de glioxil-agarose.	41
Tabela 3.2: Imobilização da amilase Termamyl 120L nos suportes de glioxil-agarose.....	43

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. AMIDO	13
2.2. MALTODEXTRINAS.....	14
2.2.1. Produção de maltodextrinas	16
2.3. ENZIMAS.....	18
2.4. AMILASES	19
2.5. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	21
2.5.1. Métodos de imobilização enzimática	23
2.5.2. A escolha do suporte	27
2.5.3. Géis de Agarose.....	28
3. REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2	36
1. INTRODUÇÃO.....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1. MATERIAIS.....	38
2.2. MÉTODOS	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4. CONCLUSÃO.....	51
5. REFERÊNCIAS	52

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O amido é um polissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina. É um carboidrato de reserva e está presente nos vegetais, distribuído em grãos de cereais, tubérculos, frutas imaturas. Representa uma importante fonte de carboidrato da alimentação humana.

O amido é o principal responsável pelas propriedades tecnológicas de grande parte dos alimentos processados, uma vez que contribui para propriedades como textura, estabilizador de coloides, agente gelificante, como espessante, na retenção de água, dentre outros. Uma das desvantagens do amido é a baixa solubilidade, que pode ser solucionada através da modificação do amido, por métodos físicos, químicos ou enzimáticos.

A hidrólise do amido é uma alternativa para a redução das moléculas de amido em fragmentos menores que confere melhora na solubilidade e dulçor do produto. A hidrólise pode ser por meio ácido, com redução acentuada de pH, com necessidade de neutralização e consequente formação de sal, ou por meio enzimático, no qual trabalha-se com concentração enzimática, tempo e temperatura para a reação. A interrupção da reação é etapa predominante do processo para a determinação do composto formado.

De acordo com a hidrólise do amido, pode-se formar diferentes componentes, como as maltodextrinas de Dextrose Equivalente (DE) entre 5 a 20, dextroses, xarope de glicose, maltoses, glicose.

A imobilização enzimática é uma alternativa mais eficiente para interromper a reação, uma vez que uma etapa do processo será adicionada para realizar a filtração da enzima retirando a mesma da solução e interrompendo o processo, permitir o processo contínuo e a possibilidade de reuso da solução.

Há diferentes suportes e formas de fixação, estudá-los permite identificar os que melhor se adequam na produção de maltodextrinas através da hidrólise do amido. O suporte glioxil-agarose se liga por ligação covalente e apresenta vantagem de estabilização da reação devido à ligação multipontual, além de ser resistente à degradação microbiana, ser atóxico e de fácil manuseio.

Esta proposta, uma vez estabelecida, poderá trazer como contribuições científicas e tecnológicas: Ampliação dos conhecimentos existentes sobre a tecnologia de imobilização de amilases e suas aplicações; Melhorias na tecnologia de produção de maltodextrinas, sejam

melhorias na qualidade do produto final ou mesmo diminuição nos custos de produção, sendo de grande interesse que possam também ser usadas em escala industrial.

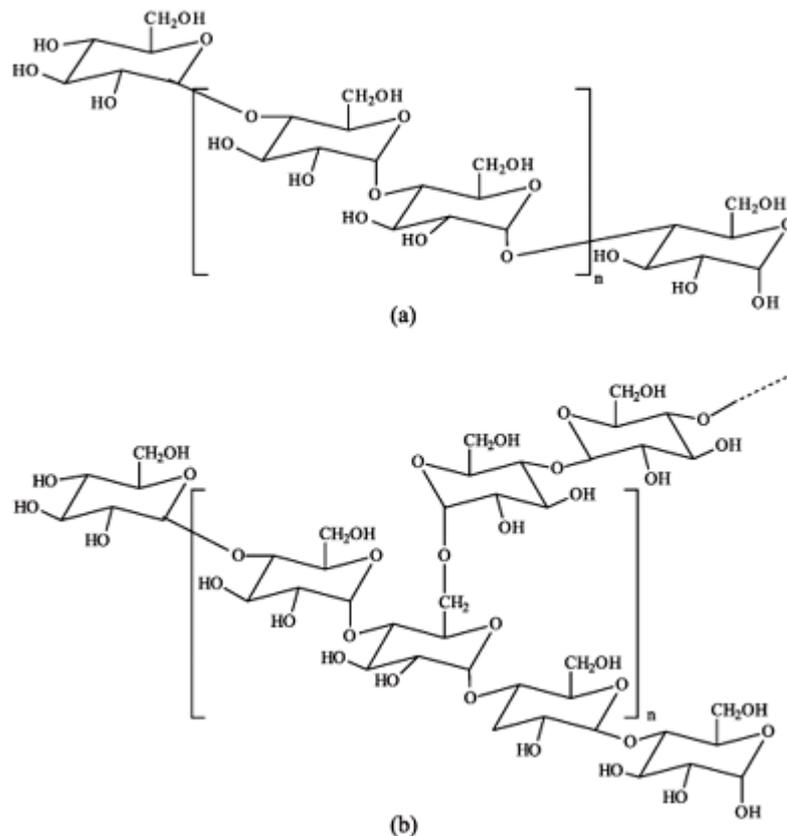
Este trabalho tem como objetivo verificar a aplicação de duas amilases já tradicionalmente utilizadas pela indústria alimentícia na produção de derivados de amido, como as maltodextrinas, em suas formas imobilizadas em suporte de glioxil-agarose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. AMIDO

O amido é um polissacarídeo, a mais importante fonte de carboidrato da alimentação humana, representando 80 a 90% de todos os polissacarídeos da dieta (DENARDIN; SILVA, 2008; SILVA et al., 2014). É composto de cadeias de amilose e amilopectina (Figura 2.1). A amilose é formada por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas α (1-4), originando uma cadeia linear (Figura 2.1 A). A amilopectina é formada por ligações α (1-4) e α (1-6), formando uma estrutura ramificada (Figura 2.1 B). As proporções dos dois polímeros dependem das fontes botânicas, das variedades da espécie e do grau de maturação do vegetal (TESTER et al., 2004).

Figura 2.1: Estrutura química da Amilose (a) e Amilopectina (b).



Fonte: Corradini et al. (2005).

A amilose é uma molécula linear, em geral possui entre 500 e 2.000 unidades de glicose e massa polímeros entre $10^4 - 10^5$ g/mol. A amilose tem uma tendência alta à retrogradação e produz géis duros e filmes fortes (ZURITA, 2010).

A amilopectina é um polímero ramificado que corresponde a um percentual de 5 a 6% de ligações α (1-6) e massa molecular entre $10^7 - 10^9$ g/mol. Possuem um grau de polimerização entre 4.700 e 12.800 unidades de glicose. A amilopectina produz géis macios, filmes fracos e flexíveis (ZURITA, 2010).

O amido tem sido muito utilizado pela indústria alimentícia como ingrediente calórico e como melhorador de propriedades físico-químicas. É utilizado para alterar ou controlar diversas características, como textura, aparência, umidade, consistência e estabilidade no armazenamento (*shelf life*). Pode também ser usado para ligar ou desintegrar; expandir ou adensar; clarear ou tornar opaco; reter a umidade ou inibi-la; produzir textura lisa ou pomposa e coberturas leves ou crocantes. Também serve tanto para estabilizar emulsões quanto para formar filmes resistentes ao óleo (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2015).

A produção de amidos modificados é uma alternativa que vem sendo desenvolvida com o objetivo de superar uma ou mais limitações dos amidos nativos e aumentar, assim, suas aplicações industriais, como modificar as características de cozimento (gomificação); diminuir a retrogradação e a tendência das pastas em formarem géis; aumentar a estabilidade das pastas ao resfriamento e descongelamento, a transparência das pastas ou géis e a adesividade; melhorar a textura das pastas ou géis e a formação de filmes; e adicionar grupamentos hidrofóbicos e introduzir poder emulsificante (PERES, 2013).

Alterações nas propriedades tecnológicas dos amidos podem ser obtidas por processos físicos, tais como tratamento térmico, exposição a radiações, por processos químicos e ainda por processos enzimáticos (CEREDA, 2002).

2.2. MALTODEXTRINAS

As maltodextrinas são produtos de hidrólise de amido, comumente caracterizado pelo grau de hidrólise expresso em dextrose equivalente (DE), que representa uma porcentagem de rompimento de ligações glicosídicas das cadeias do amido em utilização, comumente calculada pelo aumento dos terminais redutores livres gerados na solução ou, ainda, o total de detecção de açúcares redutores (ou glicose, também chamada de dextrose) sobre peso seco do amido. O valor da DE do amido íntegro seria zero, enquanto o da glicose pura seria 100. A *Food and Drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos, conforme destacam Marchal et

al. (1999), define maltodextrina como um sacarídeo não adocicado e nutritivo que consiste de unidades de glicose unidas por ligações α (1-4) e que apresenta DE menor que 20.

As maltodextrinas possuem uma ampla aplicação nas indústrias de alimentos por serem solúveis em água e não adocicadas. Elas são aplicadas em encapsulamento de essências, aromas e temperos, portadores de adoçantes sintéticos, realçadores de sabor, ajudam a fornecer consistência, como substitutos de gorduras, para prevenir a cristalização e controlar o congelamento (MARCHAL et al., 1999; WANG; WANG, 2000). Além das várias aplicações em alimentos, também são utilizadas nas áreas farmacêutica e nutricional (COUTINHO, 2007). O grau de hidrólise do amido, tipo de reação, temperatura, pH, influenciam as características físicas, químicas e funcionais das maltodextrinas.

Quando possuem baixa DE (em torno de 5% de hidrólise) apresentam características semelhantes às da gordura, podendo ser utilizada como substituto destas. Além desta propriedade funcional, também é utilizada como agente gelificante e espessante, para prevenir a cristalização, auxiliar na dispersibilidade, e controlar o congelamento (COUTINHO, 2007).

As maltodextrinas de alta DE (15% a 20%) protegem o aroma contra a oxidação, sugerindo a importância da DE na funcionalidade dos sistemas de encapsulamento. Também são muito utilizadas como auxiliares no processo de secagem por *spray dryer*, estando dividida em três níveis: antes da secagem, como auxiliar de dispersão para evitar a aglomeração do produto nas tubulações; durante a secagem, para a obtenção de uma granulação homogênea; e depois da secagem, para a dispersão do produto em água ou solvente (MORO, 2009).

Variações nos valores de dextrose equivalente resultam em maltodextrinas com diferentes propriedades físico-químicas. Entretanto, maltodextrinas com os mesmos valores de DE podem apresentar propriedades funcionais diferentes, o que reflete a composição do produto devido às condições do processo de hidrólise. A origem botânica do amido também é um importante fator para a composição molecular. Com os valores de DE é possível classificar e caracterizar os hidrolisados. Aumentando a DE das maltodextrinas ocorre o aumento na sua higroscopicidade, solubilidade em água, fluidez, osmolaridade, doçura e digestibilidade em produtos infantis. Mas, a diminuição da DE e o aumento do tamanho molecular, resultam em maltodextrinas com características de amido devido ao seu aumento de viscosidade e capacidade de formar filme (SILVA et al., 2014).

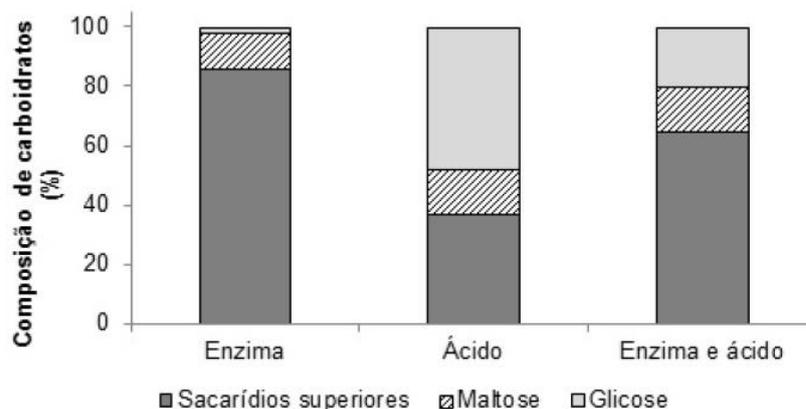
2.2.1. Produção de maltodextrinas

As maltodextrinas podem ser geradas por via ácida ou enzimática. A hidrólise química do amido, ou hidrólise ácida, é uma combinação de ácidos (sulfúrico ou clorídrico diluídos), calor e pressão. O processo consiste na suspensão do amido até pH 1,0 com temperaturas elevadas (135-150°C) e, posterior à neutralização do ácido, a mistura é filtrada, clarificada e concentrada (COUTINHO, 2007; MORO, 2009; SILVA et al., 2014). Os produtos de hidrólise ácida possuem baixa conversão de DE e contêm mais moléculas de glicose do que as produzidas enzimaticamente com o mesmo valor de DE, isto leva a um aumento da doçura (MARCHAL et al., 1999). A hidrólise ácida apresenta como vantagem básica o pequeno tempo de sacarificação, porém tem como desvantagens a corrosão dos equipamentos e a necessidade de neutralização da solução açucarada, provocando a destruição dos açúcares e a queda do rendimento (ZURITA, 2010).

A hidrólise enzimática é realizada por enzimas amilases que hidrolisam ligações α (1-4), sua modificação enzimática é mais valorizada quando comparada à hidrólise química. Surmely (1996) relata algumas vantagens do uso de enzimas:

- Na neutralização de uma hidrólise enzimática para interrupção da reação, os teores de minerais são mínimos;
- Simplificação da linha de produção, com reatores unitários de liquefação, sacarificação e descoloração;
- Ganho de energia, pois a liquefação ácida tradicional, em processo por batelada, exige cozimento sob pressão com temperatura alta. A liquefação enzimática pode ser realizada em temperatura de 85°C, durante alguns minutos.

Figura 2.2: Composição de maltodextrinas com DE 20, produzidas por diferentes métodos.

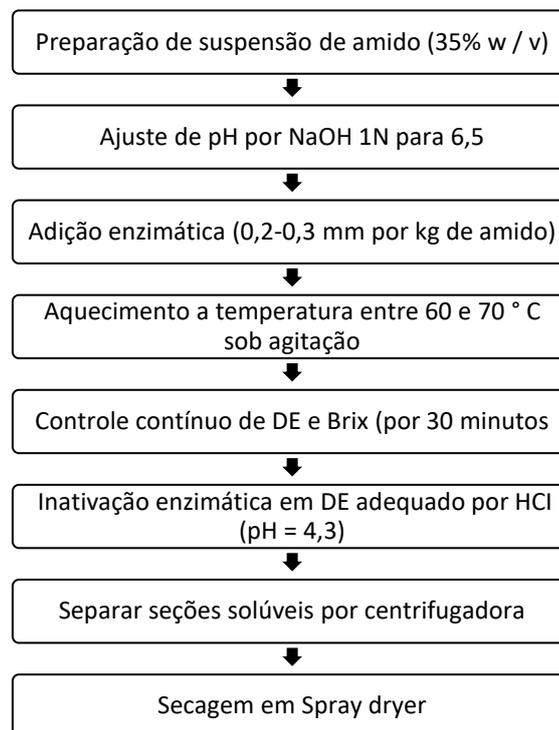


Fonte: Silva et al. (2014).

A hidrólise do amido pelos ácidos é um processo aleatório e o produto hidrolisado ácido compreende uma mistura de moléculas com tamanhos diferentes que podem variar de monômero a polímeros que se aproximam do tamanho do amido. Por outro lado, as enzimas têm vantagens sobre os ácidos, pois tem especificidade para certas ligações. As alfa amilases, que são amplamente usadas, quebram em polissacarídeos de peso molecular mais alto, tendo poucas liberações de glicose, maltose ou polissacarídeos de baixo peso molecular, conforme representado na Figura 2.2 (WANG; WANG, 2000).

Sadeghi et al. (2008) sugeriram em seu trabalho o fluxo de produção de maltodextrina, apresentado na Figura 2.3, utilizando a α -amilase Termamyl 2-x. Neste processo, a enzima foi inativada por redução do pH e posterior centrifugação para separar sais solúveis provenientes desta reação.

Figura 2.3: Fluxograma esquemático do processo de hidrólise do amido para produção de maltodextrina com enzima α -amilase



Fonte: Extraído de Sadeghi et al. (2008), tradução do autor.

Silva et al. (2014) utilizam os padrões de concentração citados por Sadeghi et al. (2008), com concentração de amido entre 30-40% de sólidos base seca, pH da solução corrigido para 6,50 com hidróxido de sódio, porém acrescenta íons cálcio uma temperatura de

liquefação entre 90-95°C e inativa a enzima com elevação de temperatura a 140°C por 10 minutos. Após reduz o pH a 4,5 e promove a filtração. Moore et al. (2005) utilizaram pH 3,0±0,5 reduzido com ácido clorídrico para a inativação da enzima e posterior neutralização do pH e filtração, sem a inativação por temperatura.

A inativação da enzima é um desafio para as empresas, uma vez que cada valor de DE determina um tipo de aplicação. Os métodos estudados utilizam elevadas temperaturas e/ou acidificação do meio para a inativação da enzima, o que aumenta a quantidade de etapas do processo e, conseqüentemente, o custo de processo.

A impossibilidade de reutilização de uma enzima e a paralização do processo são fatores que encarecem o processo enzimático. A imobilização de enzimas é um processo capaz de aumentar a eficiência de diversas enzimas, devido à possibilidade de reutilização, facilidade de remoção do meio reacional e mesmo a proteção de sua cadeia protéica de interações com outros componentes do meio (PSZCZOLA, 2001; PESSELA et al., 2003; TAVANO, 2006; TAVANO, 2013).

2.3. ENZIMAS

As enzimas são compostas de natureza proteica, formadas por aminoácidos sucessivamente ligados covalentemente entre si por ligações peptídicas, que atuam como catalisadores biológicos em todas as reações metabólicas energeticamente possíveis e aceleram essas reações por ativação específica (CEREDA, 2002; PEREIRA, 2014).

Segundo Lehninger (1985), as enzimas apresentam dupla especificidade, sendo a especificidade reacional onde uma enzima só pode catalisar um tipo de reação, como, por exemplo, a hidrólise das ligações α (1,4) glicosídicas do amido e especificidade do substrato, de forma que algumas enzimas têm especificidade restrita a um substrato e não podem atacar moléculas diferentes, mesmo com estrutura semelhante. Entretanto, outras possuem especificidade mais ampla e atuam sobre vários substratos.

Os processos enzimáticos em larga escala, devido à sua especificidade e seletividade, apresentam menor demanda, tanto em termos de custo e de tempo, permitindo que as enzimas encontrem aplicações em vários campos, como a produção de biossensores, desintoxicação de poluentes, produção de biocombustíveis, indústrias farmacêuticas e indústria alimentícia (ZUCCA et al., 2016).

O mercado global de enzimas industriais atingiu quase US\$ 4,6 bilhões e US\$ 4,9 bilhões em 2014 e 2015, respectivamente. Este mercado deverá aumentar de quase US\$ 5,0

bilhões em 2016 para US\$ 6,3 bilhões em 2021, a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 4,7% para 2016 a 2021. As enzimas industriais de alimentos deverão corresponder a um crescimento de quase US\$ 1,5 bilhões em 2016 para US\$ 1,9 bilhões em 2021, com um CAGR de 4,7% de 2016 a 2021 (BCC RESEARCH, 2017).

Este aumento pode ser justificado pela globalização, aumento da concorrência e pelo aumento das pesquisas e desenvolvimento, o que tem tornado os processos enzimáticos mais econômicos e alternativas ecológicas aos processos químicos, pois enzimas são biodegradáveis por natureza e que torna a procura de fontes mais limpas e ecológicas (BCC RESEARCH, 2017).

As enzimas podem ser de fonte vegetal, como a papaína do mamão e a bromelina do abacaxi; animal, como as pepsinas, tripsinas e pancreatina, e as de origem microbiana obtidas por bactérias, fungos filamentosos e leveduras. As enzimas de origem microbiana possuem mais vantagens por ter mais rendimento e diversidade com propriedades e especificidades diversas (CEREDA, 2002; SANTOS, 2012).

As enzimas podem ser classificadas em função das reações que catalisam, conforme a Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Classificação das enzimas em função das reações que catalisam.

Categorias	Tipo de reação catalisada
Oxiredutases	Transfere elétrons ou átomos (H ou O)
Transferases	Reação de transferência de grupo
Hidrolases	Reação de hidrólise
Liasas	Adição de grupo a ligações duplas
Isomerases	Transferência de grupo no interior de uma molécula com formação de isômeros
Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O, C-N e clivagem do APT

Fonte : Lehninger (1985).

2.4. AMILASES

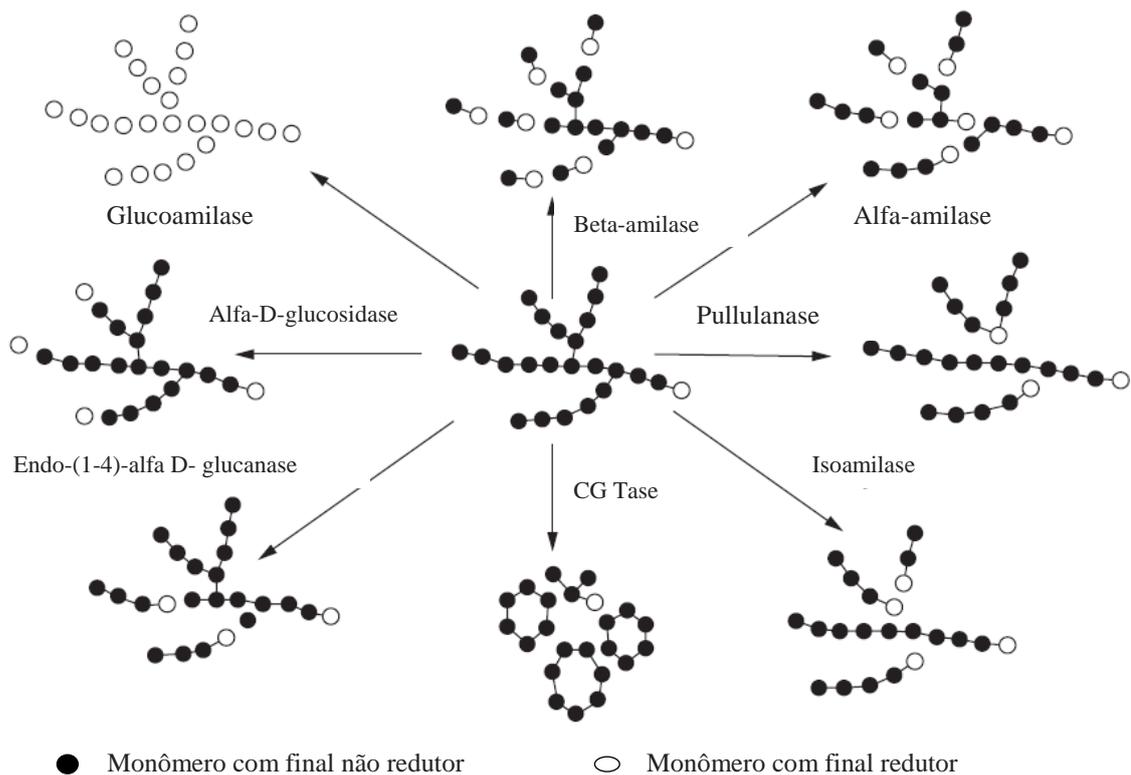
As enzimas amilolíticas pertencem à categoria das enzimas que catalisam as reações de hidrólises (hidrolases) e, mais particularmente, à categoria das enzimas que catalisam as reações de amido e outros carboidratos relacionados, tais como amilose, amilopectina, glicogênio e outros polissacarídeos (CEREDA, 2002; TAVANO et al., 2008).

Conhecer a forma de ação das enzimas sob as moléculas de amido é de grande importância para a escolha das mesmas para cada produto final desejado. Como apresentado

na Figura 2.4, cada enzima age de uma maneira na molécula de amido liberando terminais redutores e, assim, formando novos produtos.

A enzima α -amilase é encontrada em bactérias, fungos, plantas e animais. Das numerosas bactérias e fungos de onde podem ser isoladas as amilases, os *Bacillus* e *Aspergillus sp.* são os mais estudados e utilizados industrialmente (COUTINHO, 2007). As α -amilase são enzimas que catalisam especificamente e ao acaso a hidrólise das ligações glicosídicas α (1-4) do amido, na amilose, na amilopectina, mas não podem catalisar a hidrólise das ligações α (1-6) em amilopectina. A α -amilase é considerada uma enzima liquidificante, porque reduz drasticamente a viscosidade de pastas gelificadas de amido (CEREDA, 2002).

Figura 2.4: Padrão de hidrólise de hidrolases na digestão de amido.



Fonte: Tomaski e Horton (2012).

Os produtos da hidrólise apresentam moléculas de tamanhos variados e possuem a configuração α no carbono C1 na unidade de glicose redutora produzida. Elas atuam nas ligações das regiões internas do substrato e, por isso, causam um rápido decréscimo da viscosidade de amidos gelatinizados (GUZMÁN; PAREDES, 1995).

A atividade e as preparações são específicas de cada produtor ou comerciante. As unidades exigem substratos, temperaturas e pH diferentes, dificultando a comparação das atividades a partir das fichas técnicas dos produtos. Em condições fora dos parâmetros ótimos, as atividades das preparações enzimáticas e, por consequência, o perfil de hidrólise, mudam totalmente (CEREDA, 2002). Os principais fabricantes no mercado são: Novozymes, BASF Corp., Associated British Foods plc (Enzimas AB), Danisco/DuPont (Genencor Industrial Biosciences), Specialty Enzymes e Biotechnology Ltd., DSM, Maps Enzymes Ltd. e Chr. Hansen A/S, entre vários outros (BCC RESEARCH, 2017).

Starmax 480 é um produto comercial à base de α -amilases capazes de hidrolisar ligações α (1,4)-glicosídicas. De acordo com a especificação do fabricante, a enzima é composta de fonte de *Bacillus subtilis* e glicerina, apresenta-se como um líquido de cor castanha, não viscoso e totalmente solúvel em água. O produto tem melhor atividade na faixa de pH entre 5,5 e 7,2. Atua em uma faixa de temperatura entre 65 e 75°C e a permanência da temperatura em 95°C por 20 minutos inativa completamente a enzima (PROZYN, 2017).

A Termamyl® 120L é uma preparação enzimática líquida que contém uma α -amilase estável ao calor, produzida por uma cepa geneticamente modificada de *Bacillus licheniformis*. Na indústria de amido, o Termamyl® é usado para a liquefação contínua do amido a temperaturas de até 105-110 °C, aproveitando a extrema estabilidade ao calor dessa enzima. A enzima é uma endoamilase que hidrolisa ligações α (1-4) glicosídicas em amilose e amilopectina. De acordo com a especificação do fabricante, a Termamyl® exibe atividade ótima em torno de pH 7 e 90 °C. Em uma suspensão de amido, Termamyl® pode ser estabilizado pela adição de 50–70 ppm de íons de cálcio. Isso permite que ela funcione efetivamente fora dos intervalos normais de pH e temperaturas (NOVOZYMES, 2017).

2.5. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

O uso de enzimas em processos de catálise sofre inúmeras limitações dificultando a viabilidade econômica dos processos. A produção em larga escala das enzimas, por exemplo, é muito cara, e geralmente são bastante instáveis. Além disso, após a reação, as enzimas solúveis podem contaminar os produtos de reação, uma vez que sua recuperação é muito desafiadora e cara (ZUCCA et al., 2016). A necessidade de purificação, a instabilidade da estrutura tridimensional, quando isoladas do seu ambiente natural, a perda da atividade devido a reações do processo ou inibição pelo substrato ou produto, resultam em um tempo de meia-vida operacional curto e, conseqüentemente, um custo elevado do processo (MATEO et al.,

2006; SOUZA et al., 2017). Muitas dessas desvantagens podem ser superadas tornando a enzima insolúvel na reação médio.

A enzima imobilizada é definida como enzima fisicamente confinada ou localizada em certa região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, que pode ser utilizada repetida e continuamente (GERHARTZ, 1990; BICKERSTAFF, 1997).

O processo de imobilização enzimática é uma alternativa que veio para tornar o uso dos catalisadores de alto custo viáveis, através da recuperação, reutilização – o que é alcançado com a aplicação de enzimas na forma imobilizada (SOUZA et al., 2017).

O reuso do biocatalisador somente é possível quando a preparação enzimática é estável o suficiente. A estabilidade requerida também pode ser alcançada pela técnica de imobilização, uma vez que o processo pode alterar as propriedades da própria enzima, produzindo biocatalisadores com elevada atividade, especificidade e estabilidade – o que tem tornado a técnica de imobilização mais promissora em tornar o uso de enzimas em larga escala. É importante ressaltar que a técnica pode ser utilizada em conjunto com avanços na área de estabilização de proteínas alcançados pela engenharia de proteína, biologia molecular e biologia computacional (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2007; SOUZA et al., 2017).

Tabela 2.2: Comparação das principais propriedades dos processos industriais enzimáticos, tanto da enzima livre (processo homogêneo) quanto das enzimas imobilizadas (processo de forma heterogênea).

Comparação de procesos	Enzimas Livres	Enzimas Imobilizadas
Desenvolvimento dos Custos	Sem adição	Alto
Transferência de Massa	Sem problemas	Podem ocorrer limitações
Estabilidade Catalítica	Baixo	Melhorado (exempol: pH, temperatura)
Processos posteriores	Difícil e caro	Fácil
Reutilização Catalítica	Nenhum	Normalmente fáceis e eficientes
Processos Contínuos	Difícil e caro	Possíveis e eficientes
Custo Total	Usualmente alto	Geralmente baixa

Fonte: Adaptado de Zucca et al. (2016).

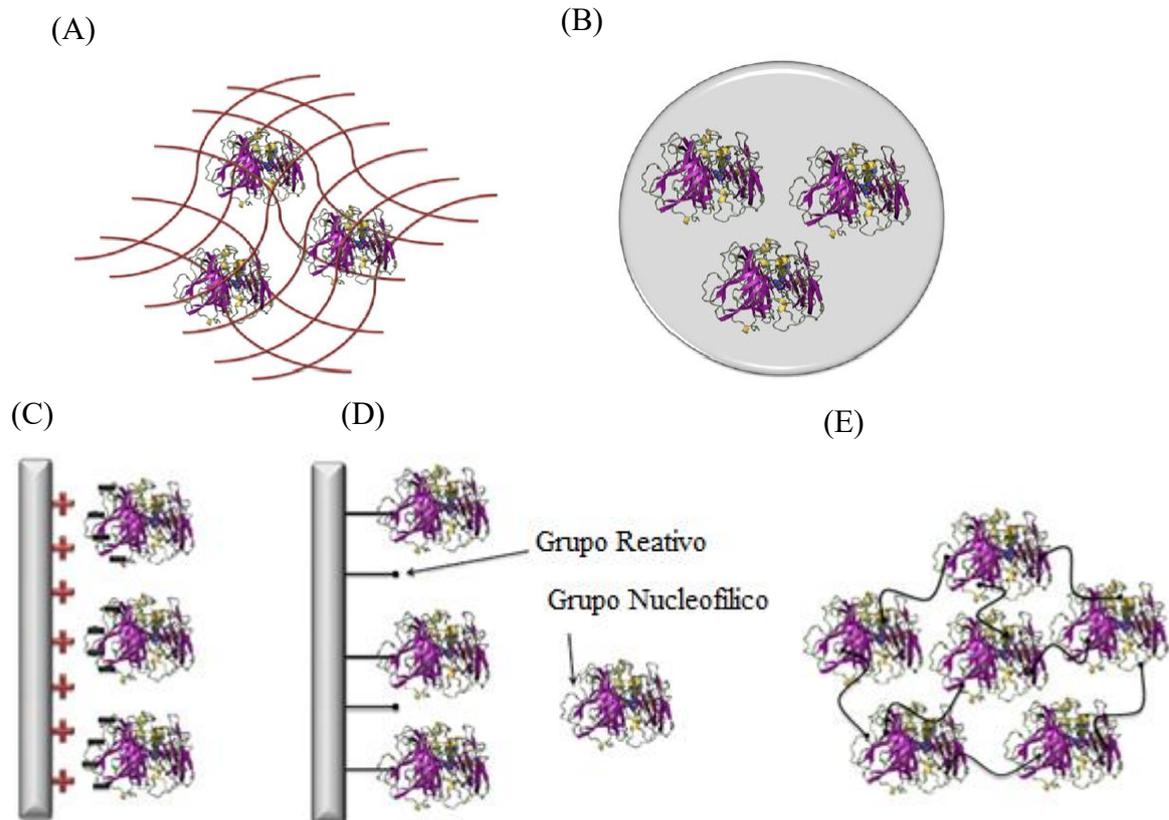
A recuperação do catalisador após a reação, por exemplo, é eficiente e imediata. A contaminação dos produtos é minimizada e a atividade catalítica enzimática pode ser completamente explorada em múltiplos ciclos, o que por si só já é capaz de proporcionar um equilíbrio econômico nas preparações enzimáticas imobilizadas; além disso, promovem uma maior estabilidade em relação ao meio, como amplas faixas de pH, temperatura, presença de solventes e podem ser usadas em processos industriais contínuos de larga escala (ZUCCA et

al., 2016). As diferenças gerais entre as enzimas livre e imobilizada estão apontadas na Tabela 2.2.

2.5.1. Métodos de imobilização enzimática

A seleção do método apropriado é parte muito importante do processo de imobilização, uma vez que desempenha o maior papel na determinação da atividade enzimática e características em uma reação particular. Fatores como a desativação enzimática e características de regeneração, custo do processo de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e as propriedades finais desejadas das enzimas imobilizadas devem ser considerados na escolha do método (MOHAMAD et al., 2015). As enzimas podem ser imobilizadas de diferentes formas, tais como: encapsulação; confinamento; adsorção; encapsulação e ligação covalente (SOUZA et al., 2017).

Figura 2.5: Esquema métodos de imobilização.



Fonte: Adaptado de Fernández-Fernández et al. (2012). Legenda: Interações físicas: (A) Confinamento; (B) Encapsulamento de enzimas; (C) Adsorção de enzimas sobre um suporte por forças iônicas; (D) Ligação Covalente; (E) Reticulação.

A. Aprisionamento/ Encapsulação

O aprisionamento é definido como um método irreversível de imobilização enzimática onde as enzimas são aprisionadas em suporte ou dentro de fibras, quer a estrutura de rede de um material ou em membranas poliméricas (MOHAMAD et al., 2015). Normalmente a retenção física de enzimas é em uma matriz porosa, como poliacrilamida, colágeno, alginato ou gelatina (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012). A enzima é primeiramente suspensa na solução de monômero e um processo de polimerização subsequente mantém a enzima retida, impedindo contato direto com o meio ambiente (Figura 2.5 - A e B). Aprisionamento é o método de imobilização mais fácil e não induz alteração estrutural da enzima. No entanto, esta metodologia é caracterizada por limitações de transferência de massa e baixa carga enzimática, que incluem possibilidade de vazamento enzimático que pode ocorrer quando os poros da matriz de suporte são muito grandes, desativação durante a imobilização, carga baixa de capacidade e abrasão do material de suporte durante o uso (MOHAMAD et al., 2015).

B. Adsorção Física

Na adsorção, as enzimas são imobilizadas no suporte por meio de ligações como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas. Nas reações em meio orgânico não são requeridas fortes interações entre a enzima e o suporte, sendo a enzima insolúvel no meio polar nestas condições, o que torna o método vantajoso (FERNANDEZ-FERNANDEZ et al., 2012; ZHENG et al., 2012; SOUZA et al., 2017).

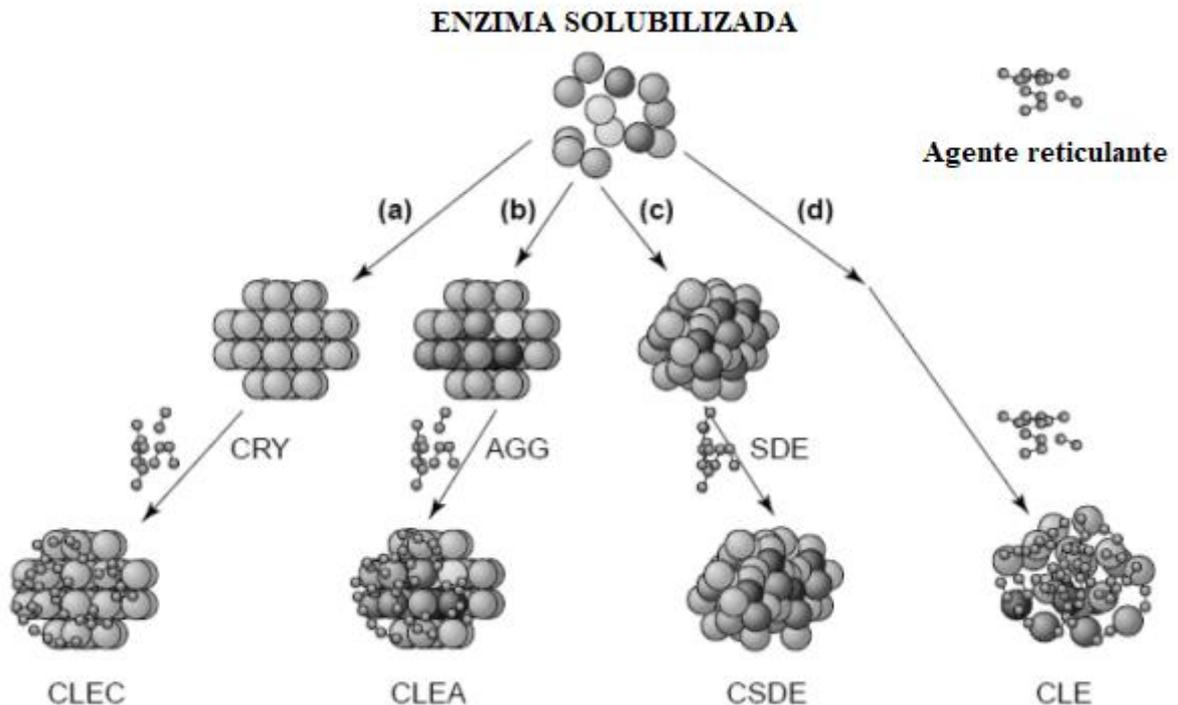
A facilidade e simplicidade da técnica, o baixo custo associado e a não necessidade de ativação do suporte são algumas das vantagens do método. Entre as vantagens tem-se a aleatoriedade da interação enzima-suporte e a possibilidade de dessorção da enzima devido a variações de temperatura, pH e força iônica (MATEO et al., 2007; BRADY, JORDAAN, 2009; MENDES et al., 2011; SOUZA et al., 2017).

C. Cross-linking (reticulação)

A interligação é outro método irreversível de imobilização enzimática que não requer suporte para prevenir perda enzimática na solução do substrato (Figura 2.6). O método também é chamado de imobilização sem portadores, no qual a enzima atua como seu próprio

portador e virtualmente enzima pura é obtida eliminando as vantagens e desvantagens associadas aos portadores (MOHAMAD et al., 2015).

Figura 2.6: Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas livre de suporte.



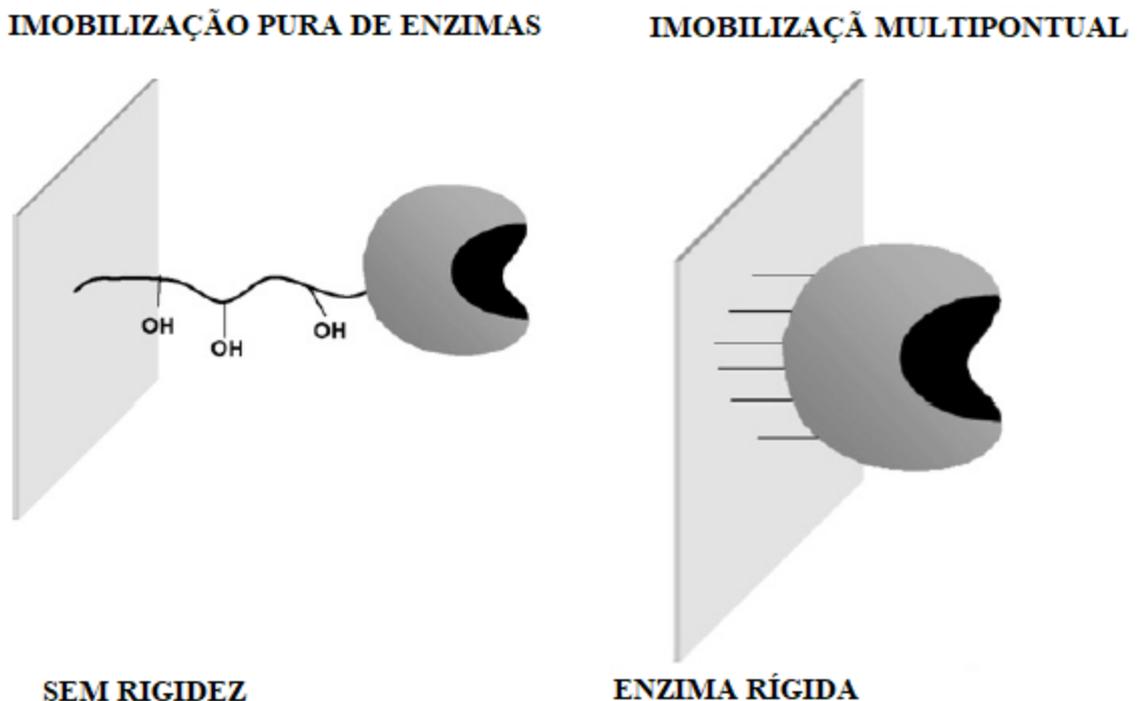
Fonte: Figura traduzida de Cao et al. (2003). Legenda: (a) cristalização; (b) agregação; (c) secagem por atomização; e (d) reticulação direta. CRY, cristais de enzima; AGG, agregados enzimáticos; SDE, enzima atomizada; CLEC, cristais de enzima reticulados; CLEA, agregados enzimáticos reticulados; CSDE, enzimas atomizadas reticuladas; CLE, enzimas solubilizadas reticuladas.

A ligação cruzada de enzimas dissolvidas via reações de grupos NH_2 de superfície com um produto químico bi-funcional cross-linker, como o glutaraldeído, produziu ligações cruzadas insolúveis com enzimas (CLEs) com retenção de atividade catalítica. No entanto, esta metodologia teve várias desvantagens: baixa atividade de retenção, fraca reprodutibilidade, baixa estabilidade mecânica e dificuldades no manuseio dos CLEs gelatinosos. A estabilidade mecânica e facilidade de manuseio poderiam ser melhoradas por cross-linking da enzima em uma matriz de gel ou em um transportador, mas isso levou a uma diluição desvantajosa da atividade (CAO et al., 2003; BRADY; JORDAAN, 2009; SHELDON; PELT, 2013).

D. Ligação Covalente

Na ligação covalente a força da ligação covalente enzima suporte é elevada e normalmente envolve vários resíduos de enzimas, proporcionando uma rigidez na sua estrutura. Esta técnica possibilita conseguir a ligação multiponto (Figura 2.7) (MATEO et al., 2007; ZUCCA et al., 2016; SOUZA et al., 2017). Isso deve reduzir qualquer mudança conformacional envolvida na inativação enzimática e aumentar consideravelmente a estabilidade da enzima, por qualquer agente de distorção (calor, solventes orgânicos, valores de pH) (MATEO et al., 2007).

Figura 2.7: Efeito da imobilização na estabilidade enzimática.



Fonte: Adaptado de Mateo et al. (2007).

O grupo funcional que participa da ligação da enzima geralmente envolve ligação através das cadeias laterais da lisina (grupos aminos, α -NH₂ da cadeia terminal, ϵ -NH₂ da lisina) e ácidos aspártico e glutâmico, grupo carboxílico, grupos fenólicos que não são essenciais para a atividade catalítica de enzima (GUISAN, 2006; BRADY; JORDAAN, 2009; MOHAMAD et al., 2015). A atividade da enzima ligada de forma covalente depende do tamanho da forma do material transportador, natureza do método de acoplamento, composição do material de suporte e condições específicas dos grupos ativos do suporte (OZTURK, 2001).

As principais vantagens desse método residem em maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e incubação em solventes orgânicos e o

fato de a enzima não ser desorvida do suporte (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012; MATEO et al., 2007). Inconvenientes da técnica estão relacionados à parcial inativação e/ou redução da atividade catalítica da enzima devido à alteração em sua conformação nativa, impostas pelas ligações entre as enzimas e os grupos reativos do suporte (SOUZA et al., 2017).

Na Tabela 2.3 é mostra-se as principais vantagens e desvantagens das técnicas mais comuns de imobilização enzimática.

Tabela 2.3: Vantagens e Desvantagens dos principais métodos de imobilização.

Tipo de Imobilização	Vantagem	Desvantagem
Adsorção Física	Reutilização do suporte; Não necessita de reagentes; Sem modificação enzimática; Barato e simples.	Sem estabilização enzimática; Não há interação específica; Possibilidade de ruptura.
Encapsulação	Sem modificação enzimática.	Limitação de transferência de massa; Possibilidade de ruptura.
Afinidade	Alta especificidade da reação.	Presença de funções específicas na enzima; Design e desenvolvimento caros.
Cross-linking	Possibilidade de estabilização enzimática; Alta força de interação; Não é necessário o suporte; Não há ruptura catalítica.	Limitação de transferência de massa; Uso de reagentes caros e tóxicos; Possível perda de atividade enzimática.
Troca iônica	Barato e simples; Mínima modificação enzimática.	Baixa especificidade; Possibilidade de ruptura.
Ligação Covalente	Ligação multipontual; Alta força de interação; Possibilidade de estabilização enzimática; Mínima ruptura.	Protocolos complexos; Uso de reagentes caros e tóxicos; Possível perda de atividade enzimática.

Fonte: Adaptado de Zucca et al. (2016).

2.5.2. A escolha do suporte

Os suportes podem ser classificados de acordo com sua origem, como materiais orgânicos e inorgânicos. Quanto à sua morfologia, podem ser porosos, não porosos e de estrutura em gel (MATEO et al., 2007; SOUZA et al., 2017).

Os materiais porosos apresentam como principal vantagem a área superficial interna disponível para a imobilização, porém devem ser suficientemente grandes para permitir o acesso da enzima ao substrato – o que pode ser um inconveniente se o substrato não se difundir no interior dos poros, porém confere uma maior estabilidade às condições adversas do meio. Os suportes não porosos apresentam como principal vantagem a acomodação das moléculas de enzima apenas na superfície externa, o que permite maior interação com o substrato, porém a área superficial é muito pequena, o que se torna uma desvantagem (MATEO et al., 2007).

Os suportes inorgânicos apresentam uma inércia microbiológica completa e excelentes propriedades mecânicas. Nesta categoria pode-se incluir matrizes baseadas em óxidos de sílica e metais, tais como mesoporos de sílica, alumínia, cerâmica, mesoporos de vidro (ZUCCA; SANJUST, 2014).

Existem várias classes de suportes orgânicos, tais como poliacrilamida e poli (vinil e álcool), poliamidas e polissacarídeos, mas mais recentemente tornaram populares a quitosana, alginato e derivados de agarose (ZUCCA et al., 2016).

Na seleção de um suporte para uma determinada aplicação devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como a possibilidade de regeneração do material. Devem ser avaliados os custos do material, a não toxicidade dos materiais e reagentes, além da área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, dentre outras (MENDES et al., 2011; ZUCCA et al., 2016).

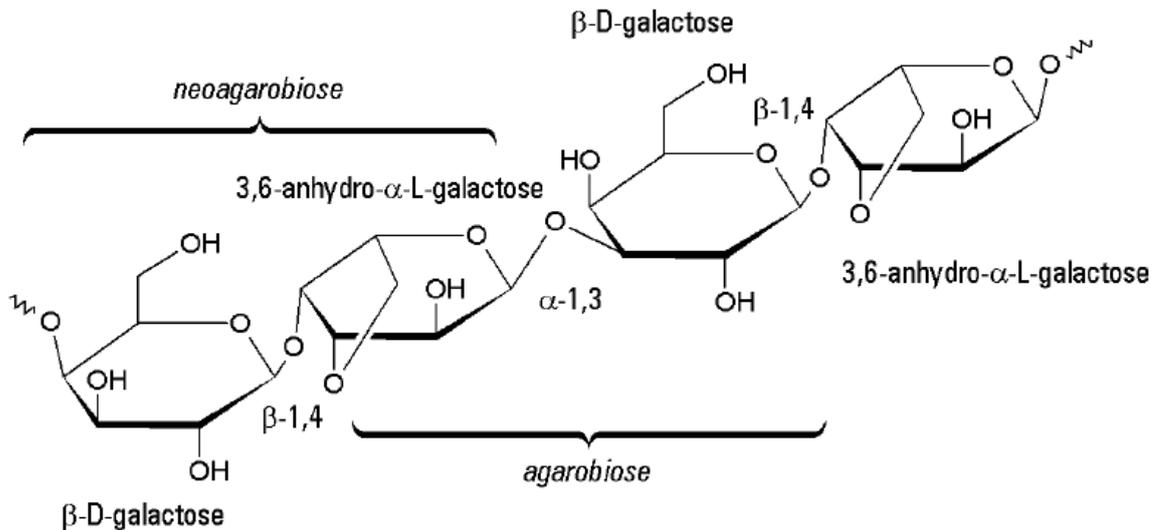
2.5.3. Géis de Agarose

O ágar é extraído das paredes celulares de algumas algas vermelhas. Agarose é um heteropolissacarídeo gelificante neutro, responsável pela maior fração de ágar. É um polímero linear com a unidade repetitiva, mostrada na Figura 2.8, contendo tanto ligações β - e glicosídicas diferentemente da maioria dos polissacarídeos mais comuns (DELATTRE et al., 2011; ZUCCA et al., 2016).

Os polímeros de agarose formam troncos de ligação apertados de grande diâmetro, muito maiores que uma enzima, e o diâmetro aumenta quando a porcentagem de agarose aumenta. Dessa forma, uma enzima com maior suporte / interação pode ser obtida usando agarose com grande porcentagem (PEDROCHE et al., 2007).

O uso da agarose como suporte para imobilização oferece, entre outras, a vantagem de ser resistente à degradação microbiana, ser mecanicamente resistente, apresentar transparência óptica, ser atóxico e de fácil manuseio (TAVANO, 2006).

Figura 2.8: Estrutura da cadeia de agarose.



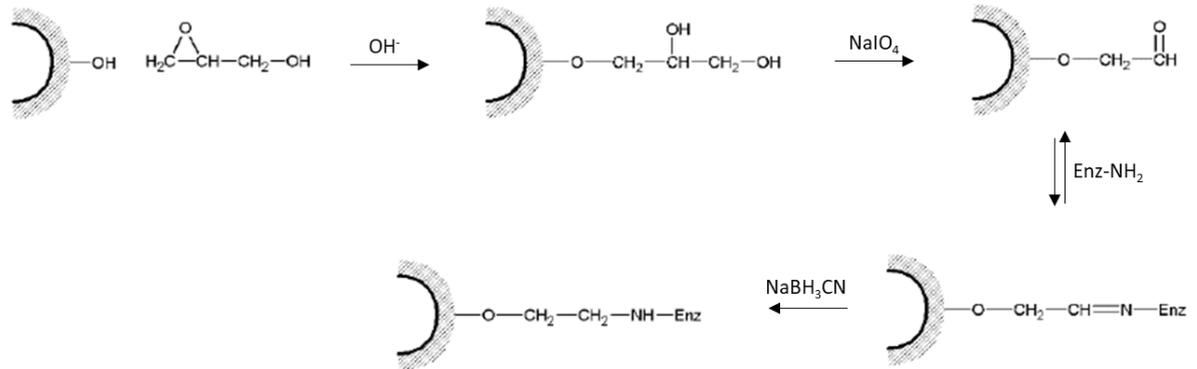
Fonte: Zucca et al. (2016). Legenda: As unidades dissacarídicas repetidas são chamadas de agarobiose e neoagarobiose. No caso da agarpectina, 2 ou 6 posições de resíduos de 3,6-anidro- α -L-galactose podem ser substituído por $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{OCH}_3$, glucuronato ou resíduos de piruvato.

Glioxil-agarose tem sido descrita há muito tempo como uma ferramenta muito apropriada para obter forte ligação covalente multiponto enzima-suporte. O glioxil-agarose é constituído de fibras de agarose bastante espessas contendo um grande número de grupos aldeídos muito estáveis ligados ao suporte. Em condições alcalinas estes suportes imobilizam proteínas, via no mínimo uma ligação de dois pontos, formando ligações estáveis e muito semelhantes à anterior. O suporte é preparado por esterificação dos grupos hidroxilas primários do suporte com glicidol para introduzir os dióis, que são posteriormente oxidados com periodato de sódio (NaIO_4) para obter o grupo glioxila (MATEO et al., 2006), como mostrado na Figura 2.9. Após a reação, a solução sofre uma redução final com boro-hidreto de sódio para tornar as ligações irreversíveis (ligações secundárias de aminoácidos) e transformar os restantes grupos de aldeídos em porções hidroxilo inertes, necessário para obter uma superfície totalmente inerte (MATEO et al., 2006).

Uma das desvantagens apontadas por Mateo et al. (2006) do glioxil-agarose para implementações industriais são os riscos de sua preparação, visto que o uso de periodato de sódio e boro-hidreto em escala industrial possuem riscos aos protocolos de segurança. O

primeiro composto é considerado contaminante e um comburente, enquanto o segundo é explosivo.

Figura 2.9: Preparação e aplicação do suporte glicil-agarose.



Fonte: Adaptado de Zucca et al. (2016).

3. REFERÊNCIAS

BCC RESEARCH, **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**. Jan 2017. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

BICKERSTAFF, G. E. (Ed) Immobilization of enzymes and cells. **Serie Methods Biotechnol.** Vol 1. The Humana Press Inc., New Jersey, 1997.

BRADY D, JORDAAN J. **Advances in enzyme immobilisation**. Biotechnol Lett. 2009;31(11):1639-50. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19590826>>. Acesso em: 16 mai. 2018.

CAO L, LANGEN L. V., SHELDON R. A. **Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?** Current Opinion Biotechnol. 2003. Disponível em: <<https://europepmc.org/abstract/med/12943847>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

CORRADINI, E. et al. Estudo Comparativo de Amidos Termoplásticos Derivados do Milho com Diferentes Teores de Amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 15, nº 4, p. 268-273, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282005000400011> Acesso em: 15 mai. 2017.

CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas. Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. v. 2. 540 p. (Série Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas, 2).

COUTINHO, A.P.C. **Produção e caracterização de maltodextrinas a partir de amidos de mandioca e batata-doce**. 2007. 137p. Dissertação – (Mestrado /Energia na Agricultura). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.

DELATTRE, C.; FENORADOSOA, T.A.; MICHAUD, P. Galactans: An overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 2011, vol. 54, nº6. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132011000600002&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 15 mai. 2017.

DENARDIN, C.C; SILVA, L. P. **Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas**. Ciência Rural, Santa Maria. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ct/2009nahead/a109cr517.pdf>> Acesso em 15 mai. 2017.

GERHARTZ, W. (ed) **Enzymes in Industry. Production and Applications**. VCH, Alemanha, 1990. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19910443604>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

GUZMÁN, M. H.; PAREDES; L.O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, n.5, p.373-403, 1995.

GUISAN, J. M. Immobilization of enzymes as the 21st century begins. In: Guisan JM, editor. **Immobilization of enzymes and cells**. 2nd ed. New Jersey (NJ): Humana Press Inc.; 2006. p.

1_13. Disponível em: < <https://www.springer.com/gp/book/9781588292902>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

FOOD INGREDIENTS BRASIL (**REVISTA FBI**) Volume XVII, nº 35, 31-37p. 2015. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/499.pdf>>. Acessado em: 15 mai. 2017.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ M. et al. **Recent developments and applications of immobilized laccase**, *Biotechnol Adv* (2012). Disponível em: <doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.013>. Acesso em: 20 abr. 2018.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; GUISÁN, J. M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme Microb Technol.** 2007; 41(5):565-9.

LEHNINGER, A. L. **Les enzymes, dans principes de biochimie**. Paris: Flammarion Médecine Sciences, 1985. p. 207-221.

MARCHAL, L. M., et al. Towards a rational design of commercial maltodextrins. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.345-355, 1999.

MATEO, C, et al. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, V 39 p.274–280, 2006. Disponível em: < DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.014>. Acesso em 15 mai. 2017.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb Technol.** 2007; 40(6):1451-63. Disponível em: < doi:10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>. Acesso em 15 mai. 2017.

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*. 2011; 34(5):831-40. Disponível em: < http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=4342>. Acesso em: 20 abr. 2018.

MORO, A. L. **Obtenção de massa de mandioca com adição de maltodextrina de amido de milho Waxy**. Botucatu, 2009, 65p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas. Disponível em: < https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/90477/moro_al_me_botfca.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 mai. 2017.

MOORE, G. R. P; CANTO, L. R; AMANTE, E. R. Cassava and corn starch in maltodextrin production. **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 4, 596-600, 2005.

MOHAMAD, N. R.; CHE MARZUKI, N. H.; BUANG, N. A; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. **An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes**, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015. 29:2, 205-220. Disponível em: <DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192>. Acesso em: 20 abr. 2018.

NOVAZYMES, **Ficha de Informação do Produto Termamyl 120L, Type L**. Versão válida a partir de 24/08/2017.

OZTURK B. **Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports** [MSc dissertation]. _Izmir (Turkey): Izmir Institute of Technology; 2001. p. 40. Disponível em: <<http://library.iyte.edu.tr/tezler/master/biyoteknoloji/T000031.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

PEDROCHE, J.; DEL MAR YUST, M.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GIRÓN-CALLE, J., ALAIZ, M., et al. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. **Enzyme Microb Technol.** 2007;40(5):1160-6. Disponível em: <doi:10.1016/j.enzmictec.2006.08.023>. Acesso em: 15 mai. 2018.

PESSELA et al. Overproduction of *Thermus* sp. Strain T2 beta-galactosidase in *Escherichia coli* and preparation by using Tailor-made metal chelate supports. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1967-1972, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154830/>>. Acesso em 15 mai. 2018.

PEREIRA, R. M. **Técnicas de imobilização e estabilização de lipases obtidas a partir de diferentes fontes microbianas**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Alfenas. Poços de Caldas, 2014. Disponível em: <http://www.unifal-mg.edu.br/engenhariaquimica/system/files/imce/TCC_2013_2/Rafael%20Matsumoto.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2018.

PERES, G. L. **Relação estrutura-propriedades da amilopectina presente na solução do amido do tipo amidex 40003 e seus complexos metálicos**. Porto Alegre, 2013, 163p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/85091/000907995.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 15 mai. 2017.

PSZCZOLA, D. E. From soybean to spaghetti: The broadening use of enzymes. **Food Technol.**, v.55, p.54-64, 2001.

PROZYN, **Ficha Técnica da Starmax 480**. Versão 20. Data 04/07/2017.

SADEGHI, A, et al. Evaluation of Different Parameters Effect on Maltodextrin Production by -amylase Termamyl 2-x. **World Applied Sciences Journal** 3 (1): 34-39, 2008.

SANTOS, R. R. **Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido**. 83p. 2012. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agroenergia/busca-de-publicacoes/-publicacao/955575/caracterizacao-e-aplicacao-de-borras-do-refino-de-oleos-vegetais-para-producao-de-lipase-fungica-por-fermentacao-no-estado-solido>>. Acesso em: 24 jun. 2018.

SILVA, M. V. et al. Produção e Caracterização de Maltodextrinas e sua Aplicação na Microencapsulação de Compostos Alimentícios por Spray Drying. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Vol.16, n_ 1, Jan/Jun 2014. Disponível em: <

<https://revistas.unicentro.br/index.php/RECEN/article/view/2882/2355>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; PESSELA, B. C.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A.; "Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte", p. 529 -568. In: RESENDE, Rodrigo Ribeiro. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017. Disponível em: <ISBN: 9788521211150, DOI 10.5151/9788521211150-15>. Acesso em 17 fev. 2018.

SURMELY, R. **Determinação dos parâmetros experimentais para a conversão enzimática rápida da fécula de mandioca em xarope de maltose de baixo custo com um perfil adequado para cervejarias**. Botucatu: Centro de Raízes e Amidos Tropicais, Universidade Estadual Paulista, 1996. 20p. (Informações Técnicas).

SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, 2013, 42, 6223—6235. Disponível em: <DOI: 10.1039/c3cs60075k>. Acesso em: 25 mai. 2018.

TAVANO, O. L. **Imobilização de amylase de *Neurospora crassa* (mutante exo-1) e produção de derivados ativos estabilizados**. Araraquara, 2006, 101p. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química.

TAVANO O. L.; PESSELA, B. C. C.; GOULART, A. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M.; MONTE, R. Stabilization of an Amylase from *Neurospora crassa* by Immobilization on Highly Activated Supports. **Food Biotechnol** 2008;22:262–75.

TAVANO, O. L., et al. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. Review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 90, p.1– 11 2013.

TESTER, R. F. et al. Starch – composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v.39, p.151-165, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521003001139>>. Acesso em 16 mai. 2017.

TOMASIK, P.; HORTON, D. Enzymatic Conversions of Starch. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**, vol. 68. 2012. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-396523-3.00001-4>>. Acesso: 13 jun. 2018.

WANG, J.; WANG, L. Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato, and rice starches. **Starch/Starke**. v. 52, p. 296-304, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1002/1521-379X\(20009\)52:8/9<296::AID-STAR296>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1521-379X(20009)52:8/9<296::AID-STAR296>3.0.CO;2-A)>. Acesso em: 16 mai. 2017.

ZHENG M-M, LU Y, DONG L, GUO P-M, DENG Q-C, LI W-L, et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. **Bioresour Technol**. 2012;115(1):141-6. Disponível em: < DOI: 10.1016/j.biortech.2011.11.128>. Acesso em: 25 mai. 2018.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. **Molecules** 2014, 19, 14139–14194. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/14139>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

ZUCCA, P; FERNANDEZ-LAFUENTE, R; SANJUST, E. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. **Molecules** 2016, 21, 1577. Disponível em: <doi:10.3390/molecules21111577> . Acesso em 20 abr. 2018.

ZURITA, E. **Efeito de enzimas comerciais e naturais utilizadas na hidrólise da mandioca sobre a qualidade sensorial da tiquira**. Dissertação de mestrado apresentado a Universidade Federal de São Carlos: UFSCar. São Carlos, 2010. Disponível em: < <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/102>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

CAPÍTULO 2

1. INTRODUÇÃO

O amido tem sido muito utilizado pela indústria alimentícia como ingrediente calórico e como melhorador de propriedades físico-químicas. É utilizado para alterar ou controlar diversas características, como textura, aparência, umidade, consistência e estabilidade no armazenamento (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2015).

As maltodextrinas são produtos de hidrólise de amido, que pode ser via ácida e/ou enzimática (COUTINHO, 2007; MORO, 2009; SILVA et al., 2014). São comumente caracterizadas pelo grau de hidrólise expresso em dextrose equivalente (DE), conforme destacam Marchal et al. (1999), que definem maltodextrina como um sacarídeo não adocicado e nutritivo que consiste de unidades de D-glicose unidas por ligações α (1-4) e que apresenta DE menor que 20. Quando possuem baixa DE (em torno de 5) apresentam características semelhantes às da gordura (COUTINHO, 2007) e com alta DE (15 a 20) protegem o aroma contra a oxidação, sugerindo a importância da DE na funcionalidade dos sistemas de encapsulamento. Também são muito utilizadas como auxiliares no processo de secagem por *spray dryer* (MORO, 2009).

A inativação da enzima ao final do processo de hidrólise é um desafio para as empresas, uma vez que cada valor de DE determina um tipo de aplicação. Os métodos estudados utilizam elevadas temperaturas e/ou acidificação do meio para a inativação da enzima, o que aumenta a quantidade de etapas do processo e, conseqüentemente, o custo de processo.

A impossibilidade de reutilização de uma enzima e as ações para paralisação do processo são fatores que encarecem o processo enzimático. A imobilização de enzimas é um processo capaz de aumentar a eficiência de aplicação de diversas enzimas, devido à possibilidade de reutilização, facilidade de remoção do meio reacional e mesmo a proteção de sua cadeia proteica de interações com outros componentes do meio (PSZCZOLA, 2001; PESSELA ET AL., 2003; TAVANO, 2006; TAVANO et al., 2013).

A enzima imobilizada é definida como enzima fisicamente confinada ou localizada em certa região definida do espaço, com retenção de sua atividade catalítica, que pode ser utilizada repetida e continuamente (GERHARTZ, 1990; BICKERSTAFF, 1997). O processo de imobilização enzimática é uma alternativa que veio para tornar o uso dos catalisadores de alto custo viáveis, através da recuperação e reutilização, o que é alcançado com a aplicação de

enzimas na forma imobilizada (Souza et al., 2017). O reuso do biocatalisador somente é possível quando a preparação enzimática é estável o suficiente (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2007; SOUZA et al., 2017).

O suporte de glioxil-agarose tem sido descrito como uma ferramenta muito apropriada para obter forte ligação covalente multipontual entre enzima-suporte. O glioxil-agarose é constituído de fibras de agarose contendo um grande número de grupos aldeídos muito estáveis que em condições alcalinas se ligam covalentemente às proteínas, geralmente por no mínimo ligação em dois pontos da cadeia proteica, o que eleva a estabilidade da enzima (MATEO et al., 2006).

As enzimas amilolíticas pertencem à categoria das enzimas que catalisam as reações de hidrólises (hidrolases) e, mais particularmente, à categoria das enzimas que catalisam as reações de amido e outros carboidratos relacionados, tais como amilose, amilopectina, glicogênio e outros polissacarídios (CEREDA, 2002; TAVANO et al., 2008). Conhecer a forma de ação das enzimas sob as moléculas de amido é de grande importância para a escolha das mesmas para cada produto final desejado.

A enzima α -amilase é encontrada em bactérias, fungos, plantas e animais. Do numeroso grupo de bactérias e fungos de onde podem ser isoladas as amilases, os mais estudados e utilizados industrialmente são os *Bacillus* e *Aspergillus* sp. (COUTINHO, 2007). A Stamax 480 é uma amilase que de acordo com a especificação técnica do fabricante (PROZYN, 2017) trabalha em temperaturas em torno de 65 a 75°C, enquanto a Termamyl 120L, de acordo com a especificação do fabricante (NOVOZYMES, 2017), trabalha com temperaturas mais elevadas em torno de 90°C.

Este trabalho tem como objetivo verificar a aplicação de duas amilases já tradicionalmente utilizadas pela indústria alimentícia na produção de derivados de amido, como as maltodextrinas, em suas formas imobilizadas em suporte de glioxil-agarose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

2.1.1. Enzima

Foram utilizadas duas enzimas: a enzima comercial Starmax 480 cedida pela empresa PROZYN[®], e a enzima comercial Termamyl 120L, cedida pela empresa NOVOZYMES[®]. As enzimas Starmax 480 e Termamyl 120L foram abordadas neste trabalho por serem as utilizadas na Indústria em processo comercial de obtenção de maltodextrina. Foram obtidas na forma de preparados líquidos que apresentaram, respectivamente, 46,29 e 29,52 mg de proteínas/mL.

2.1.2. Suportes

Suportes de matriz agarose 4BCL da empresa GE HealthCare Life Science.

2.1.3. Substrato

Foi utilizado amido de milho comercial, obtido no comércio de Alfenas/MG.

2.1.4. Equipamentos

Espectrofotometro;

Banho Maria;

Agitador;

pHmetro;

Bomba de vácuo.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Preparo do Suporte e Imobilização Enzimática

Para preparo do suporte glioxil, uma alíquota da agarose 4BCL foi ativada utilizando-se água destilada e NaOH 1,7M, em banho de gelo, evitando-se o aquecimento. A seguir, foi acrescentado NaBH₄ (borohidreto de sódio) e, sob agitação suave, glicidol (2,3-epoxi-propanol). A agitação foi mantida por 18 horas e então o gel foi filtrado e lavado abundantemente com água mili-Q, sob vácuo. A agarose assim ativada é oxidada com

periodato de sódio (NaIO₄) 100 mM, em agitação a temperatura ambiente por 90 minutos, para ruptura dos grupos gliceril e formação dos grupos glioxil (GUISÁN et al., 1997). Ao final, o gel foi filtrado à vácuo, lavando-se abundantemente com água mili-Q.

A enzima foi imobilizada utilizando-se tampão bicarbonato de sódio 100mM com pH 10,2, e a suspensão foi mantida sob agitação suave e constante, a temperatura refrigerada por 48h, juntamente com alíquota de parte reservada da solução enzimática (utilizada como controle, branco), para acompanhamento das atividades enzimáticas. Ao final das 48h, uma alíquota do sobrenadante foi retirada para medida do grau de imobilização. Esta reação de oxidação com periodato é estequiométrica, podendo-se, portanto, controlar a reação para obtenção do grau de ativação desejado (GUISÁN, 1997), o uso de 48h foi em busca de grau máximo. Após processo de imobilização, foi acrescentado borohidreto de sódio (1mg/mL de suspensão) para redução do derivado e inativação dos grupos ativos remanescentes. Após 30 minutos, a solução foi filtrada à vácuo, lavando abundantemente com água mili-Q e o derivado formado pela imobilização foi mantido em geladeira e usado para testes de atividade, estabilidade e reuso.

2.2.2. Determinação do grau de imobilização

O acompanhamento do rendimento de imobilização das enzimas após processo descrito no item 2.2.1 foi analisado considerando-se o total de proteínas ofertadas e ligadas ao suporte utilizando-se o método de determinação de proteína de Lorwy (com reagente fenol) (LOWRY, 1951). As amostras do controle e do sobrenadante foram analisadas, sendo a concentração de proteína do controle considerada 100% de proteína e a do sobrenadante a porcentagem que não aderiu ao suporte – por diferença é determinada a porcentagem de proteína aderida ao suporte.

2.2.3. Hidrólise Enzimática

Os derivados tiveram seus parâmetros de produção de maltodextrina estudados, considerando-se a quantidade de μ mol de glicose liberados por minuto de reação por mg de proteína.

O grau de polimerização durante a hidrólise do amido foi determinado reduzindo a avaliação do açúcar no produto final. Neste método, Ácido 3,5-dinitrosalisílico (3,5-DNS) na presença de açúcar e o hidróxido de sódio é reduzido a 3 amino-5 ácido nitrosalisílico. A

leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de $\delta=540\text{nm}$ (MILLER, 1959).

O substrato utilizado foi uma solução de amido diluída em água na proporção de 0,5% com água destilada, levada a aquecimento leve até sua completa dissolução.

A solução de enzima e amido foi encubada com 250 μL de solução de amido e os tempos foram registrados e interrompida com adição de 250 μL de DNS, que foram aquecidos em água fervente por 5 minutos e resfriadas logo após. Foi adicionado 2,5mL de água destilada no tubo. A leitura de absorvância foi realizada com comprimento de onda de $\delta=540\text{nm}$.

2.2.4. Reuso

Foi avaliada a possibilidade de reutilização dos derivados por diversos ciclos de hidrólise, conforme descrito no item 2.2.3. No final de cada ciclo, o derivado foi filtrado e lavado com água destilada e tampão de atividade (Fosfato de Sódio 20mM pH 6,9, 37°C) e uma nova solução de substrato foi adicionada para iniciar uma nova rodada de reação. As atividades iniciais e restantes foram avaliadas, sendo que a atividade inicial nessas condições é considerada 100%. No final de cada ciclo, o derivado foi lavado com água destilada e tampão de atividade e uma nova solução de substrato foi adicionada para iniciar uma nova rodada de reação.

2.2.5. Influência da temperatura do meio na atividade enzimática

As atividades foram determinadas, conforme item 2.2.3, tanto para as enzimas livres como para as imobilizadas em diferentes temperaturas na faixa entre 37°C a 85°C.

2.2.6. Teste de estabilidade

Os derivados foram testados quanto à sua capacidade de permanecerem em temperatura de fervura (temperatura determinada de 97°C) por período de tempo, testando-se as atividades enzimáticas após diferentes períodos de incubação. Após período de incubação, as enzimas livres e imobilizadas foram coletadas e tiveram suas atividades determinadas, conforme descrito no o item 2.2.3, a 37°C. A atividade foi expressa como atividade relativa, considerando-se a atividade antes da incubação como o valor de 100%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As enzimas Starmax 480 e Termamyl 120L foram conferidas e ambas apresentaram capacidade de hidrólise de amido, sendo que a Starmax apresentou atividade superior à Termamyl, respectivamente: 152,23 e 6,28 μmols de glicose liberados/minuto/mg de proteína. Uma vez que ambas apresentavam atividade catalítica, as duas foram utilizadas nos testes de capacidade de imobilização.

Para os ensaios de imobilização enzimática foi preparado suporte de glioxil-agarose em ativação máxima, ou seja, considerando-se ativados todos os grupamentos glioxil produzidos. A concentração de grupamentos ativos disponíveis no suporte foi caracterizada obtendo-se material com 64,24 μmols de grupos glioxil/g de suporte ou ainda 46,04 μmols de grupos glioxil/mL de suporte, uma vez que convencionou-se que cada 1 grama do suporte apresenta 1,4 mL de volume, o que condiz com a ativação máxima citada por Mateo et al. (2006) que, ao usar 4% de agarose, teve ativação máxima de 40 μmol de grupos glioxil/mL de suporte.

Primeiramente, foram realizados testes de carregamento enzimático do suporte, considerando-se diferentes concentrações de proteínas, caracterizadas em mg/de proteína/g de suporte destacadas nas tabelas, disponibilizadas para contato com o suporte para cada enzima estudada. A Tabela 3.1 reúne os vários ensaios realizados para a enzima Starmax.

Tabela 3.1: Imobilização da amilase Starmax 480 nos suportes de glioxil-agarose.

Ensaio	Carga inicial de proteína (mg de proteína/g suporte)	Carga imobilizada (mg Proteína imobilizada/g derivado)	Imobilização (%)*	Atividade do derivado ($\mu\text{Mols}/\text{min}/\text{g}$ de derivado)	Atividade do derivado ($\mu\text{Mols}/\text{min}/\text{m}$ g proteína)	Atividade recuperada**
Livre					152,233	
I	88,443	38,84	43,94%	23,846	0,614	0,40%
II	56,557	3,759	6,65%	15,969	4,248	2,79%
III	3,000	2,542	84,75%	0,482	0,189	0,12%

Fonte: Dados do autor. * (Atividade total inicial – atividade total final no sobrenadante da solução/ atividade inicial total) x 100. ** Considerando: (atividade total do derivado/atividade esperada da mesma massa de enzima) x 100. Dados de atividade a 37°C.

Ao se realizar um teste inicial de imobilização da Starmax, a princípio foi utilizada uma carga de proteína equivalente a cerca de 90mg/g de suporte (Tabela 3.1). Nestas condições, observou-se que menos de 50% da proteína inicialmente oferecida ao suporte (43,9% de acordo com os dados da Tabela 3.1) foram de fato imobilizadas. Desta forma, realizou-se novo ensaio partindo-se diretamente de condição de carregamento do suporte

equivalente a cerca de 50 mg de proteína/g de suporte. Quando esta nova condição foi testada, cerca de 3mg de proteínas foram ligadas ao suporte. Embora a atividade recuperada nesta nova condição fosse maior do que na condição anterior, sendo 2,8% em comparação a 0,4%, conforme observado na Tabela 3.1, ainda se pode ressaltar o grande desperdício de enzima já que cerca de 94% da carga inicial não foi aproveitada para composição do biocatalizador.

Passou-se então à realização de um terceiro procedimento de produção do derivado enzimático que considerasse a carga de cerca de 3mg/g de suporte. Quando esta última condição foi testada, cerca de 85% da enzima foi aproveitada na composição do derivado, embora o catalisador passasse a apresentar atividade recuperada mais baixa, com cerca de 0,12% em relação ao esperado para a mesma quantidade de enzima na forma livre (Tabela 3.1). Geralmente as distorções causadas na estrutura da enzima durante imobilização podem causar uma diminuição da atividade enzimática, embora algumas exceções podem ser encontradas (ZUCCA et al., 2016). Embora se observe esta baixa atividade, muitas vezes quando ligações multipontuais de fato ocorrem, também acontece uma maior rigidificação da cadeia proteica – o que naturalmente é esperado nestes processos de imobilização, mas que pode levar à vantagem de uma maior estabilização da enzima, que passa a conseguir se manter ativa em condições mais extremas do meio, onde a enzima livre já não poderia. Os dados da Tabela 2.3.1 indicam que a enzima assim imobilizada (menor carga no suporte) poderia estar conseguindo se ligar ao suporte por mais pontos e essa sua menor atividade pode estar refletindo tal condição. Para uma maior constatação desta possibilidade, os dados de reutilização do catalisador podem reforçar esta discussão e serão apresentados adiante.

Para os testes de imobilização da Termamyl, inicialmente foram utilizadas duas condições de carga proteica de cerca de 60 e 40 mg/g de suporte, que obtiveram igualmente 5% de taxa de imobilização, sendo a carga do substrato respectivamente 3,155 e 2,015 mg de proteína ligadas ao suporte (Tabela 3.2). A atividade recuperada nestas condições foi relativamente alta, sendo em torno de 50% e 40%, respectivamente; porém uma grande carga de proteína adicionada inicialmente não foi aproveitada nesta imobilização, cerca de 95%. Partindo do mesmo princípio discutido para a Starmax, passou-se, então, à realização de um terceiro procedimento de produção do derivado enzimático que considerasse a carga de cerca de 3mg/g de suporte. Na última condição testada, cerca de 80% da enzima foi imobilizada, embora sua atividade recuperada tenha sido baixa, cerca de 2% da atividade esperada para a mesma carga de enzima livre (Tabela 3.2). Este fato reforça o já apresentado com a enzima Starmax, indicando que de fato um maior número de ligações pode ter ocorrido entre a enzima e o suporte, levando a uma maior rigidificação da cadeia proteica, porém com

possíveis vantagens em sua estabilização e reutilização do suporte, como será apresentado a seguir.

Tabela 3.2: Imobilização da amilase Termamyl 120L nos suportes de glioxil-agarose.

Ensaio	Carga inicial de proteína (mg de proteína/g suporte)	Carga imobilizada (mg Proteína imobilizada/g derivado)	Imobilização (%) [*]	Atividade do derivado (μMols/min/g de derivado)	Atividade do derivado (μMols/min/mg proteína)	Atividade recuperada ^{***}
Livre					6,289	
I	63,118	3,155	5,00%	10,282	3,259	51,82%
II	40,400	2,015	5,00%	4,969	2,466	39,21%
III	3,000	2,415	80,51%	0,308	0,127	2,03%

Fonte: Dados do autor. ^{*} (Atividade total inicial – atividade total final no sobrenadante da solução/ atividade inicial total) x 100. ^{**} Considerando: (atividade total do derivado/atividade esperada da mesma massa de enzima) x 100. Dados de atividade a 37°C.

Tavano (2006) relata as dificuldades de difusão de um substrato macromolecular como o amido, um polímero de glicose de alto peso molecular e, principalmente, por ser composto de frações como a amilopectina, que apresenta estrutura ramificada e espacialmente desfavorável à sua difusão através da malha dos diferentes suportes. Deve ser considerada a possibilidade de ocorrência de problemas difusionais deste substrato através da “malha” do gel de agarose, o que poderia dificultar a ação de alguns derivados em estudos, o que foi observado em diferentes concentrações das enzimas, tanto para a Starmax 480 como para a Termamyl 120L, apresentadas nas Tabela 3.1 e Tabela 3.2.

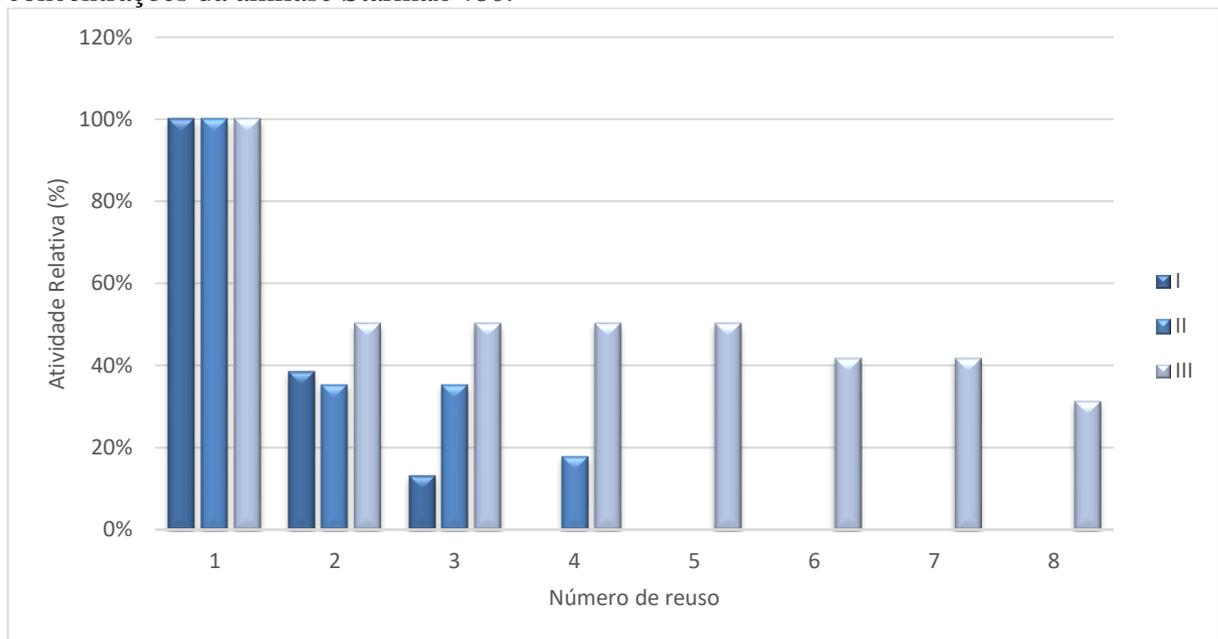
Um problema adicional no caso de amilases é o acesso ao amido devido à natureza macromolecular do substrato. Para manter alta atividade, a imobilização não deve apenas não distorcer o centro ativo, mas também orientar o centro ativo em direção ao meio de reação para permitir acesso livre deste grande substrato (TAVANO et al., 2008).

Os derivados de glioxil-agarose foram testados quanto à sua possibilidade de reuso, visto que esta é uma das vantagens da imobilização.

Observa-se que os derivados de glioxil-agarose mantiveram a atividade ao longo dos reusos, conforme dados da Figura 3.1. A enzima Starmax, submetida ao ensaio III (carga inicial de 3,0 mg/g de suporte), obteve atividade relativa até o 8º reuso de cerca de 32%, sendo sua taxa mantida em cerca de 50% do 2º ao 5º reuso. O ensaio II, com derivado contendo cerca de 3,0 mg de proteína por grama de suporte, mas preparado com carga maior, obteve atividade relativa até 4º reuso de 18%, sendo sua redução nos reusos anteriores de 36%. Já o derivado do ensaio I, com 38,84 mg de proteína/g de derivado, teve sua atividade diminuída para 39% no segundo reuso finalizando com cerca 13% no 3º reuso. Tal fato

reforça o apresentado anteriormente, o suporte com menor carga inicial de proteína teve mais oportunidade de realizar ligações multipontuais, que com sua rigidificação obteve maior estabilidade.

Figura 3.1: Reuso de derivados de glioxil-agarose (4BCL) produzidos com diferentes concentrações da amilase Starmax 480.



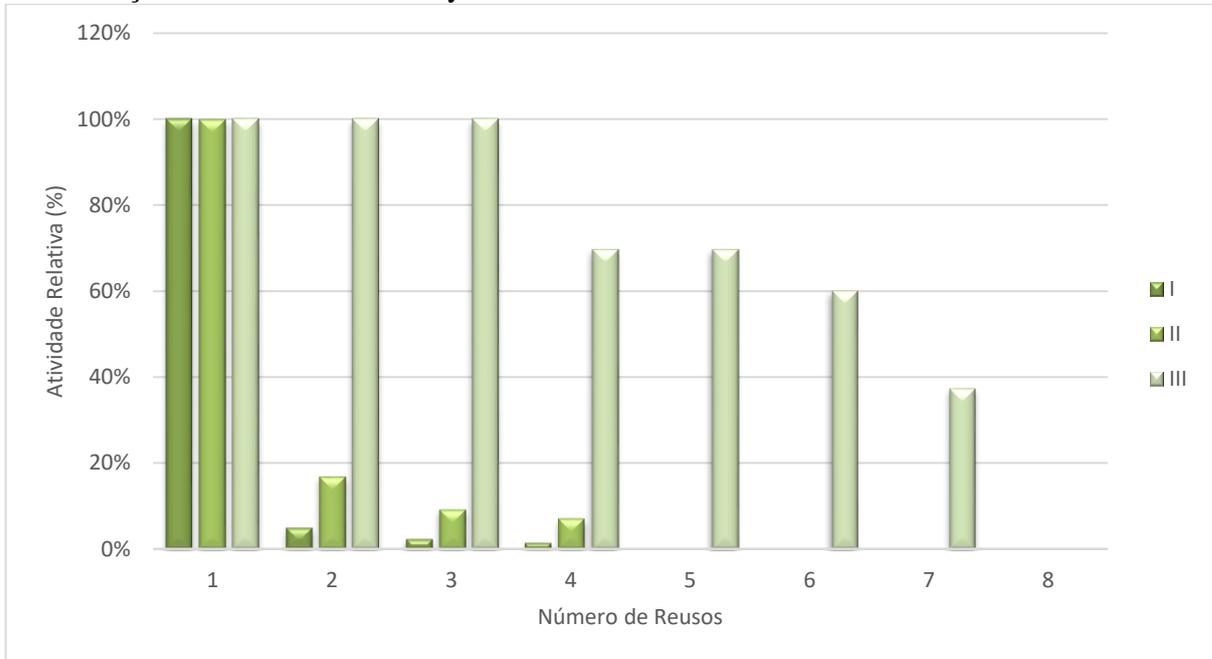
Legenda: Enzima Starmax 480 nas nos ensaios I, II e III com concentrações de respectivamente com 38,84, 3,759, e 2,543 mg/g derivado. A atividade do reuso foi determinada usando 0,5% de amido com tampão Fostato de Sódio 20mM pH 6,90 a 37°C.

Fato similar foi encontrado com os reusos da amilase Termamyl 120L (Figura 3.2). De acordo com as concentrações apresentadas na Tabela 3.2, o derivado formado pela menor carga inicial de proteína 3,0 mg/g de suporte obteve maior estabilidade ao reuso, tendo sua atividade relativa reduzida somente no 4º reuso, com uma atividade de cerca de 70%, finalizando com 38% da atividade inicial no 7º reuso, onde sua recuperação já não foi possível. As enzimas do ensaio I e II com taxa de imobilização de 5% (Tabela 3.2) foram pouco estáveis, o que demonstra que não ocorreram muitas ligações multipontuais, ao contrário do ensaio III, que com taxa de imobilização de 80% permitiu uma maior interação enzima substrato com a formação de ligações multipontuais e maior estabilidade do derivado como comprovado pelo seu reuso (TAVANO et al., 2013).

Esta estabilidade observada para os derivados das enzimas Starmax e Termamyl referentes ao ensaio III, ou seja, com produção a partir de carga inicial de 3,0 mg de proteína por grama de suporte, reforça a possibilidade de que um maior número de ligações covalentes

entre o suporte glioxil-agarose e as enzimas de fato pode ter ocorrido e, desta forma, optou-se pela utilização destes derivados para os demais testes.

Figura 3.2: Reuso de derivados de glioxil-agarose (4BCL) produzidos com diferentes concentrações da amilase Termamyl 120L.

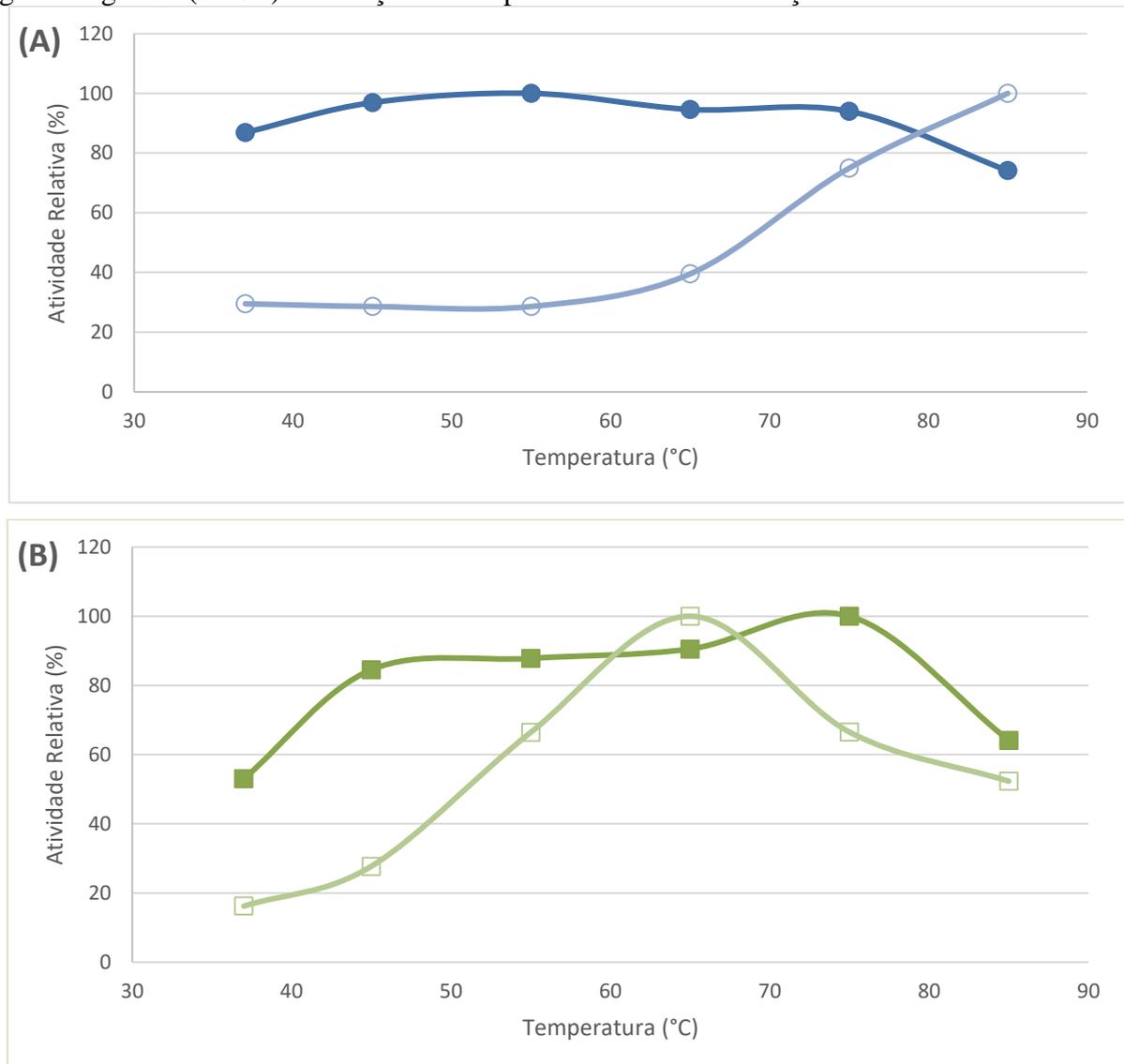


Legenda: Enzima Termamyl 120L e nas concentrações de I, II e III respectivamente com 3,155, 2,015, 2,415 mg/g derivado. A atividade do reuso foi determinada usando 0,5% de amido com tampão Fostato de Sódio 20mM pH 6,90 a 37°C.

A influência da temperatura do meio nas atividades das enzimas livres e imobilizadas foi verificada e seus resultados expressos na Figura 3.3. A enzima Starmax, na sua forma livre (Figura 3.3 [A], símbolo fechado) apresentou sua atividade máxima em 55°C, porém pode-se observar que esta enzima se manteve com alta atividade relativa por toda a faixa de temperatura testada entre 37°C e 75°C, apresentando uma redução (cerca de 25%) apenas quando a temperatura de 85°C foi utilizada. Já sua forma imobilizada apresentou comportamento distinto (Figura 3.3 [A], símbolo aberto), demonstrando dificuldade de exercer seu potencial catalítico quando em temperaturas inferiores a 70°C, sendo que o 100% de atividade foi alcançado apenas quando a temperatura testada foi de 85°C. Este comportamento novamente indica que a enzima pode ter sofrido rigidificação de sua cadeia com a imobilização no suporte para ligação multipontual (glioxil-agarose ativado ao máximo), levando a enzima a apresentar maior dificuldade de vencer a barreira energética, sendo que somente quando alta energia é oferecida ao sistema (altas temperaturas) a enzima consegue elevar seu potencial catalítico.

Observação semelhante se deu com a enzima Termamyl (Figura 3.3 [B]) que também mostrou um comportamento em que a aceleração de sua atividade foi crescente com o aumento da temperatura, apresentando um potencial catalítico de menos de 20% em temperatura do meio de 37°C, em comparação ao potencial demonstrado em 65°C. Embora a imobilização tenha a tendência de tornar a enzima mais estável, o percentual de atividade da Termamyl imobilizada foi reduzido em altas temperaturas, acima de 75°C (Figura 3.3 [B]).

Figura 3.3: Atividade relativa das amilases Starmax (A) e Termamyl (B) em suporte de glioxil-agarose (4BCL) em função da temperatura do meio de reação.



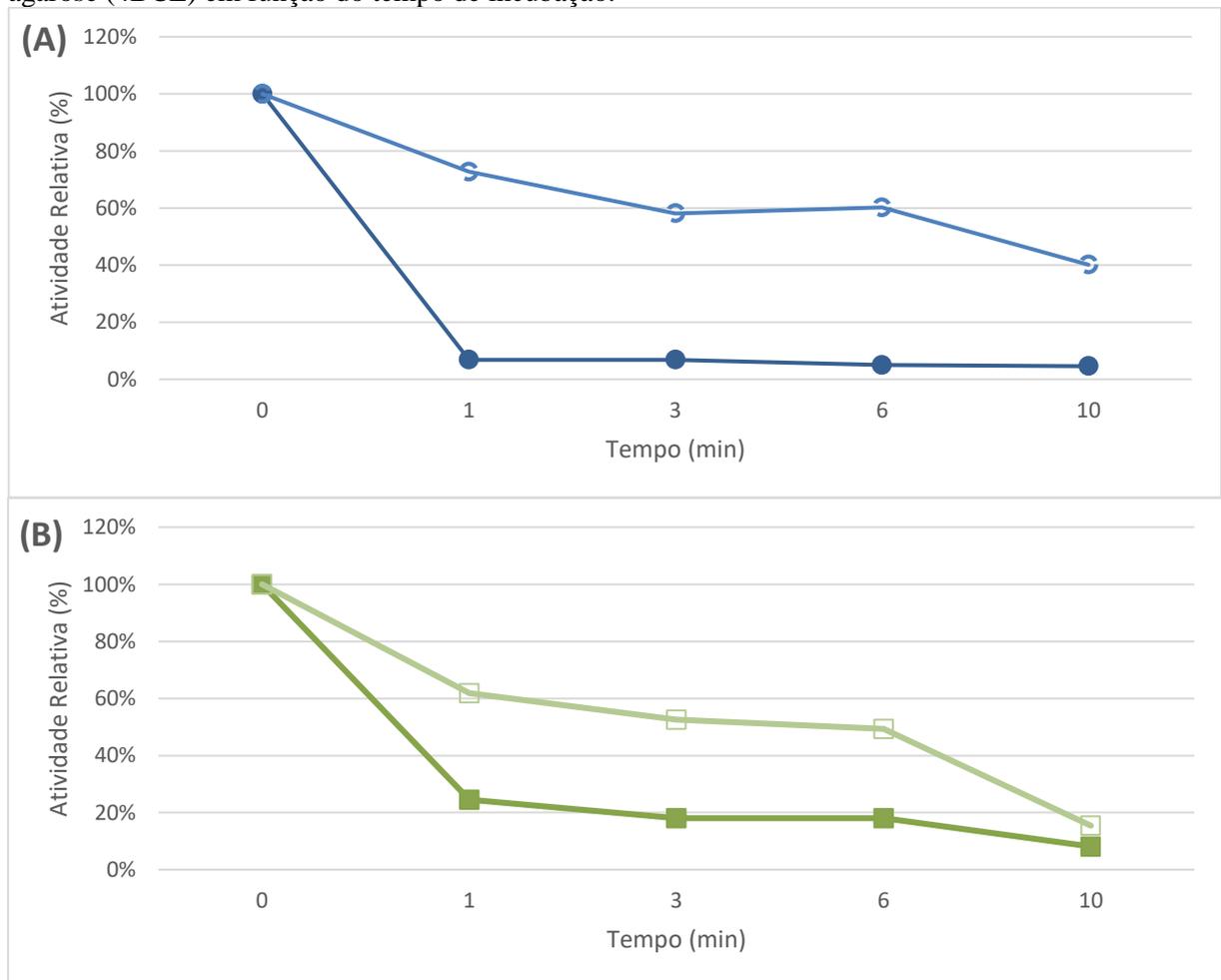
Legenda: Símbolos fechados enzimas livres: (●) Starmax e (■) Termamyl, e símbolos abertos são os derivados de glioxil-agarose com as enzimas (○) Starmax e (□) Termamyl do ensaio III, com carga inicial de 3,0 mg de proteína por grama de substrato. A atividade foi determinada usando 0,5% de amido com tampão Fostato de Sódio 20mM pH 6,90.

Embora o ensaio de atividade ótima possa ter indicado uma redução na atividade da Termamyl em temperatura acima de 65°C, sua estabilidade de incubação confirma que a

enzima imobilizada pode ser de fato mais estável do que a forma livre, como se observa pelos dados apresentados na Figura 3.4, tanto para a Starmax como para a Termamyl.

A Figura 3.4 (A) representa os resultados para o derivado da Starmax contendo 2,542 mg de proteína/g suporte e sua forma livre, após incubação sob fervura. É possível observar que, logo no primeiro minuto de incubação sob fervura (97°C), a atividade relativa da enzima livre caiu para 7% quando a enzima imobilizada manteve 73% de sua atividade inicial. Mesmo após 10 minutos submetida à esta condição extrema, a Starmax imobilizada foi capaz de manter cerca de 40% de sua atividade inicial.

Figura 3.4: Estabilidade térmica das amilases Starmax (A) e Termamyl (B) em suporte de glioxil-agarose (4BCL) em função do tempo de incubação.



Legenda: Símbolos fechados enzimas livres: (●) Starmax e (■) Termamyl, e símbolos abertos são os derivados de glioxil-agarose com as enzimas (○) Starmax e (□) Termamyl, do ensaio III, com carga inicial de 3,0 mg de proteína por grama de substrato. A atividade foi determinada usando 0,5% de amido com tampão Fostato de Sódio 20mM pH 6,90, sob fervura, temperatura aproximada de 97°C.

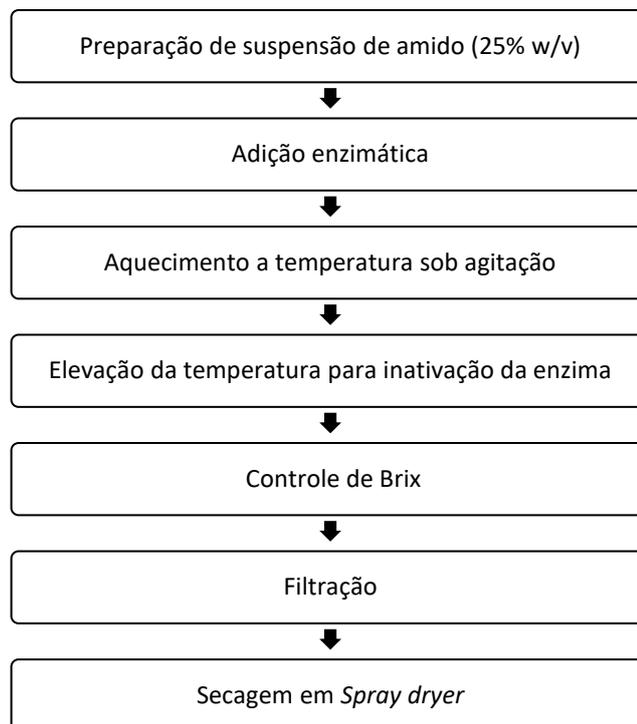
A Figura 3.4 (B) demonstra que a Termamyl (derivado contendo 2,415 mg de enzima/g de suporte) também demonstrou maior tolerância à condição de fervura em

comparação à sua forma livre, sendo que com um minuto de incubação a enzima livre passou a apresentar atividade relativa de 24% contra 62% de atividade para a forma imobilizada. Esta estabilidade se manteve até os 6 minutos de incubação, sendo que aos 10 minutos houve uma redução da atividade para apenas 8% para a enzima livre, enquanto a forma imobilizada ainda mantinha cerca de 15%.

A estabilidade térmica do derivado de glioxil-agarose (4BCL) foi comprovada ao utilizar o derivado com menor carga inicial de proteína, fato que pode ser justificado mais uma vez pela ligação multipontual da ligação covalente.

Considerando-se todas as observações de comportamentos dos biocatalisadores aqui propostos, ao se comparar o desempenho das enzimas em sua forma livre e imobilizada e se considerar a potencial aplicação no processo industrial, atualmente empregado pela empresa parceira do Sul de Minas, é importante estabelecer-se algumas considerações finais sobre esse possível desempenho destas formas enzimáticas aqui estudadas.

Figura 3.5: Fluxograma de produção de maltodextrina em uma empresa do Sul de Minas Gerais.



Fonte: Próprio autor (2018).

No processo em utilização pela empresa (Fluxograma apresentado na Figura 3.5), são utilizadas as seguintes condições para uma hidrólise enzimática em torno de DE de 20%:

- (A) Starmax 480 da Prozyn® - utiliza-se 200 mL de enzima Starmax 480 para cada tonelada de amido base seca. A solução é mantida à temperatura entre 65-75°C por 30 minutos sob agitação a 700 rpm, após o tempo de reação a temperatura do reator é elevada a 90° por 20 minutos para inativação da enzima e ajuste de brix e secagem em *spray dryer*.
- (B) Termamyl 120L da Novozymes® - utiliza-se 1000mL de enzima Termamyl 120L para cada tonelada de amido base seca, a solução é mantida a temperatura de 85-90°C por 15 minutos sob agitação a 700rpm e, após o tempo de reação, a temperatura do reator é elevada a 105°C por 10 minutos para a inativação da enzima e ajuste de brix e secagem em *spray dryer*.

Considerando-se as condições do processo industrial descritas, para a aplicação da enzima Starmax, que neste trabalho apresentou em sua forma livre 152,23 $\mu\text{Mols}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína e considerando seu derivado com a atividade de 0,4830 $\mu\text{Mols}/\text{min}/\text{g}$ de derivado, ambos a 37°C (Tabela 3.1), considera-se que para cada 1 mg de enzima livre seriam necessários o equivalente a 314,7 g de derivado. Mas, isto se considerada sua atividade a 37°C. Se fosse utilizado o derivado a 75°C (temperatura mais próxima do que se aplica no processo industrial em questão), esta relação diminuiria em até 3x, já que a esta temperatura se tem uma maior ativação da enzima, conforme visto na Figura 3.3 (A). Levando em consideração o processo industrial a 75°C, a enzima livre apresenta 164,691 $\mu\text{Mols}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína e o derivado 1,705 $\mu\text{Mols}/\text{min}/\text{g}$ de derivado; nestas condições o volume de derivado seria de 96,59g derivado para cada mg de enzima livre. Ainda assim, pode-se considerar que esta é uma massa de derivado muito alta para as proporções do processo em escala industrial, embora seja importante ressaltar que, ao final, se obtém um produto mais puro, sem a contaminação pela própria cadeia enzimática, já que a reação pode ser paralisada pela simples filtração do meio, o que também propicia uma interrupção simplificada da reação e há a possibilidade de reuso do catalisador.

Fazendo-se o mesmo exercício de consideração sobre as potenciais condições de utilização industrial apresentadas para a enzima Termamyl, a atividade recuperada para o derivado a uma temperatura de 37°C foi cerca de 2,03% da enzima livre, que apresentou 6,2892 $\mu\text{Mols}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína e ao se considerar seu derivado com a atividade de 0,308 $\mu\text{Mols}/\text{min}/\text{g}$ (Tabela 3.2), se poderia estimar que para cada 1 mg de enzima livre se deveria utilizar 20,42 g de derivado. Comparando as atividades das duas formas enzimáticas, a enzima livre apresenta atividade a 75°C, que é de 11,8753 $\mu\text{Mols}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, e a enzima imobilizada em 65°C, que é de 1,905 $\mu\text{Mols}/\text{min}/\text{g}$ de derivado, ou seja, seriam

necessários 6,23g de derivado para cada mg de proteína livre. Embora já seja uma relação de massa de derivado bem menor do que a estimada para a Starmax, essa massa torna o processo de aplicação dificultado para as proporções industriais, ainda que aqui também se destaque a possibilidade de maior pureza do produto e da reutilização por no mínimo 7 aplicações, de acordo com os ensaios expressos na Figura 3.2.

O suporte glioxil-agarose é um suporte de material poroso onde a enzima pode adentrar sua “malha” durante o processo de imobilização (PERES, 2013). Este fato torna maior o problema da utilização do derivado enzimático, em especial quando o processo inclui um substrato de alto peso molecular como o amido, que pode ter dificuldade de acesso ao interior do derivado, causando redução acentuada da atividade catalítica das enzimas por dificuldades difusionais de substratos e produtos (TAVANO et al., 2008). Embora o suporte glioxil-agarose seja reconhecido como um ótimo material para promover a estabilidade de enzimas – e neste trabalho tal expectativa tenha sido observada –, a aplicação da hidrólise de amido, substrato de cadeia de alto peso molecular, de fato se apresentou como um problema que põe em questionamento a aplicação deste biocatalizador a este processo. Outros suportes poderiam ser testados como alternativa de melhor resultado.

4. CONCLUSÃO

A imobilização das enzimas estudadas Starmax 480 e Termamyl 120L no suporte glioxil-agarose 4BCL foi possível, onde confirmou-se algumas vantagens da imobilização multipontual, como a possibilidade de reuso em 8 ciclos para a Starmax e 7 ciclos para a Termamyl, a elevação da estabilidade térmica e a facilitada interrupção da reação pela simples remoção do catalisador.

Contudo, sugere-se maiores estudos com diferentes suportes para aumentar a eficiência catalítica das duas enzimas para aumentar a eficiência catalítica para uso industrial.

5. REFERÊNCIAS

- BICKERSTAFF, G. E. (Ed) **Immobilization of enzymes and cells**. Serie Methods Biotchnol. Vol 1. The Humana Press Inc., New Jersey, 1997.
- CEREDA, M. P. (Coord.). **Agricultura: tuberosas amiláceas**. Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. v. 2. 540 p. (Série Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas, 2).
- COUTINHO, A. P. C. **Produção e caracterização de maltodextrinas a partir de amidos de mandioca e batata-doce**. 2007. 137p. Dissertação – (Mestrado /Energia na Agricultura). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL (**Revista FBI**) Volume XVII, nº 35, 31-37p. 2015. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/499.pdf>>. Acessado em: 15 mai. 2017.
- FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M., CABRERA, Z.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme Microb Technol.** 2007; 41(5):565-9.
- GERHARTZ, W. (ed) **Enzymes in Industry. Production and Applications**. VCH, Alemanha, 1990. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19910443604>>. Acesso em: 20 abr. 2018.
- GUISÁN, J. M. et al. **Immobilization of enzymes on glyoxyl-agarose: strategies for enzyme stabilization by multipoint attachment**. Methods in Biotechnology-Immobilization of Enzymes and Cells, p. 289-298, 1997.
- LOWRY, O. et al. Protein measurement whit the Folin phenol reagente. **J. Biol. Chem.**, v.193(1): p. 265-75, 1951.
- MARCHAL, L. M. et al. Towards a rational design of commercial maltodextrins. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.345-355, 1999.
- MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, V 39 p.274–280, 2006.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MORO, A. L. **Obtenção de massa de mandioca com adição de maltodextrina de amido de milho Waxy**. Botucatu, 2009, 65p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/90477/moro_al_me_botfca.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 mai. 2017.

NOVAZYMES. **Ficha de Informação do Produto Termamyl 120L**, Type L. Versão válida a partir de 24/08/2017.

PERES, G. L. **Relação estrutura-propriedades da amilopectina presente na solução do amido do tipo amidex 40003 e seus complexos metálicos**. Porto Alegre, 2013, 163p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/85091/000907995.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 15 mai. 2017.

PESSELA, et al. Overproduction of *Thermus* sp. Strain T2 beta-galactosidase in *Escherichia coli* and preparation by using Tailor-made metal chelate supports. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1967-1972, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154830/>>. Acesso em 15 mai. 2018.

PROZYN, **Ficha Técnica da Starmax 480**. Versão 20. Data 04/07/2017.

PSZCZOLA, D. E. From soybean to spaghetti: The broadening use of enzymes. **Food Technol.**, v.55, p.54-64, 2001.

SILVA, M. V. et al. Produção e Caracterização de Maltodextrinas e sua Aplicação na Microencapsulação de Compostos Alimentícios por Spray Drying. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Vol.16, n_ 1, Jan/Jun 2014.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; PESSELA, B. C.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. "Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte", p. 529 -568. In: RESENDE, Rodrigo Ribeiro. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017. Disponível em: <ISBN: 9788521211150, DOI 10.5151/9788521211150-15>. Acesso em 17 fev. 2018.

TAVANO, O. L. **Imobilização de amylase de *Neurospora crassa* (mutante exo-1) e produção de derivados ativos estabilizados**. Araraquara, 2006, 101p. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química.

TAVANO, O. L.; Pessela, B. C. C.; Goulart, A. J.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M.; Monti, R. Stabilization of an Amylase from *Neurospora crassa* by Immobilization on Highly Activated Supports. **Food Biotechnol** 2008; 22:262–75.

TAVANO, O. L, et al. Optimization of the immobilization of sweet potato amylase usingglutaraldehyde-agarose support. Characterization of the immobilized enzyme. **Process Biochemistry** 48 (2013) 1054–1058. 2013.

ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. **Molecules** 2016, 21, 1577. Disponível em: <[doi:10.3390/molecules21111577](https://doi.org/10.3390/molecules21111577)> . Acessado em 20/04/18.