

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

SISTEMAS DE PROCESSOS QUÍMICOS E INFORMÁTICA

**CARACTERIZAÇÃO E RECUPERAÇÃO DAS ENZIMAS α E
 β - AMILASES POR SISTEMA DE ADSORÇÃO EM LEITO
EXPANDIDO**

Autor: José Carlos Curvelo Santana

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Co- Orientador: Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Souza

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

**Campinas - São Paulo
Setembro de 2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

C948c Curvelo Santana, José Carlos
Caracterização e recuperação das enzimas α e β - amilases por sistema de adsorção e leito expandido / José Carlos Curvelo Santana.--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Milho. 2. Malte. 3. Enzimas. 4. Diastase. 5. Adsorção. 6. Leito fluidizado. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Titulo em Inglês: Characterization and recovery of α and β amylases enzymes by expanded bed adsorption systems

Palavras-chave em Inglês: Adsorption, Expanded bed, Enzymes, Maize malte, Amylases

Área de concentração: Sistemas d Processos Químicos e Informática

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Ana Paula Brescancini Rabelo, Inês Conceição Roberto, Francislene Andréia Hasmann e Elizabete Jordão

Data da defesa: 29/09/2006

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado de José Carlos Curvelo Santana em Engenharia Química.

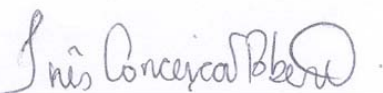
A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'E' followed by a smaller 'B' and a final flourish.

Prof Dr Elias Basile Tambourgi-orientador

Tese de Doutorado defendida por José Carlos Curvelo Santana e aprovada em 29 de setembro de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



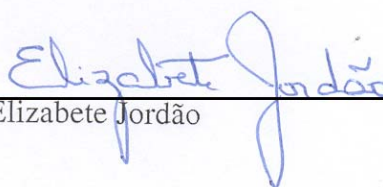
Ana Paula Brescancini Rabelo



Ines Conceição Roberto



Francislene Andreia Hasmann



Elizabete Jordão



Elias Basile Tambourgi

IDEOLOGIA

Meu partido
 É um coração partido
 E as ilusões estão todas perdidas
 Os meus sonhos foram todos vendidos
 Tão barato que eu nem acredito
 Ah, eu nem acredito
 Que aquele garoto que ia mudar o mundo
 (Mudar o mundo)
 Frequenta agora as festas do "*Grand Monde*"

Meus heróis morreram de overdose
 Meus inimigos estão no poder
 Ideologia
 Eu quero uma pra viver
 Ideologia
 Eu quero uma pra viver

O meu prazer
 Agora é risco de vida
 Meu *sex and drugs* não tem nenhum *rock 'n' roll*
 Eu vou pagar a conta do analista
 Pra nunca mais ter que saber quem eu sou
 Pois aquele garoto que ia mudar o mundo
 (Mudar o mundo)
 Agora assiste a tudo em cima do muro

Meus heróis morreram de overdose
 Meus inimigos estão no poder
 Ideologia
 Eu quero uma pra viver
 Ideologia
 Pra viver

Pois aquele garoto que ia mudar o mundo
 (Mudar o mundo)
 Agora assiste a tudo em cima do muro
 (em cima do muro)
 Meus heróis morreram de overdose
 Meus inimigos estão no poder
 Ideologia
 Eu quero uma pra viver
 Ideologia
 Pra quero uma pra viver
 Ideologia
 Pra viver

(Cazuza)

O conhecimento é uma questão de ciência,
não admite a menor desonestidade ou presunção.

O que se requer é precisamente o contrário

- honestidade e modéstia.

Se se deseja adquirir conhecimento,
é preciso tomar parte na prática que transforma a realidade.”

TSE TUNG, M..

A memória do meu pai, que se dedicou à educação dos filhos, fazendo o possível e o impossível para dar-lhes o que jamais teve – acesso a educação – e graças a ele alcancei este título que todos almejam, mas poucos conseguem . “Pai, jamais será esquecido, pois lembramos de ti em nossos pensamentos, em nossos sonhos e em todos os cantos da nossa residência, de forma que morara sempre em nossos corações.”

A minha mãe, irmãos, irmãs e todos os meus familiares, por (junto com meu pai) servirem de espelho para a minha educação e pelo incentivo ao estudo continuado.

A todas as pessoas que estiveram ao meu lado durante esta jornada, fornecendo a minha pessoa sentimentos de paz, amor, amizade e fraternidade, de tal forma que lembrar-me-ei sempre de vocês.

A estes dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Á Deus por manter-me com saúde física e mental suficiente para vencer os obstáculos que a vida nos proporciona durante a busca da felicidade, através do trabalho continuado, da realização pessoal e do amor ao próximo.

A minha mãe, irmãos, irmãs e demais familiares, que sempre estiveram ao meu lado, dando-me apoio e incentivo moral para que concluísse mais uma etapa da minha jornada.

Aos professores Elias Basile Tambourgi e Roberto Rodrigues de Souza pela orientação, dedicação, incentivo, paciência, compreensão e confiança na minha pessoa, durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado durante o período de Julho de 2003 a setembro de 2006.

Aos professores, colegas e amigos do Departamento de Engenharia e Sistemas Químicos (DESQ) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de Sergipe (UFS), principalmente aos amigos José Osmário Silvanito, e Dna Bernadete, por toda colaboração, amizade e incentivo a mim prestados.

Aos alunos de iniciação científica do Grupo de Pesquisa em Biotecnologia e Meio Ambiente (GP BIOMA) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe, principalmente àqueles que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho, Anderson Gomes Souza, André Luis Toledo, Graziela Batista Ferreira, Joana Paula Menezes Biazus, João Baptista Severo Jr., Thaís Ramaiana e Vítis Vieira de Melo.

Serei para sempre muito grato a todos vocês, muito obrigado!

RESUMO

Em atenção ao desenvolvimento de novas tecnologias é que neste trabalho foram feitos estudos de recuperação das enzimas α e β -amilases produzidas a partir das sementes de milho (*Zea mays*) em sistema de adsorção em leito expandido (ALE), para agregar valor a esta cultura, muito difundida em nosso país. Para tanto, foram feitas otimizações das etapas de produção do malte de milho, desde o processo de germinação (variando tempo) até a secagem (variando tempo e temperatura), para obter este produto com boa atividade enzimática. A caracterização hidrodinâmica da coluna de ALE foi feita para avaliar os efeitos dos: tampões fosfato (a 22°C) e Tris/HCl, com ou sem malte de milho, sobre a fluidização do leito contendo a resina de troca iônica Amberlite IRA 410. Durante a recuperação das enzimas usou-se como fatores a altura do leito fixo (4 cm) e expandido (8, 12, 16 cm), o pH (5, 6 e 7), e o tipo de tampão (fosfato ou Tris/HCl ambos a 0,05M), em condições constantes de eluição (NaCl 0,25M a 14mL/min).

Os resultados mostraram que para se obter um malte com maior atividade enzimática deve-se parar a germinação das sementes no quarto dia e secá-las a 54°C por 5-6 h. A equação de Richardson-Zaki se ajustou à fluidização das resinas sobre o efeito dos fatores estudados, e o estudo de hidrodinâmica mostrou que altura do número de pratos teóricos (*HETP*), a dispersão axial (*D_{axial}*) e o número de Peclet (*Pe*) aumentaram com a elevação da altura e da porosidade do leito. O tampão fosfato aumentou a afinidade entre a resina e as enzimas, enquanto que o tampão Tris/HCl não promoveu adsorção das mesmas. A recuperação das amilases em leito expandido foi melhor que em leito fixo e aumentou usando 8 cm (grau de expansão dois) a pH 7. O fator de purificação foi de 500 vezes a atividade inicial, provavelmente por redução de impureza. Desta forma, este trabalho contribuiu para a obtenção de condições ótimas para se produzir as α e β -amilases a partir das sementes de milho (*Zea mays*), com alto potencial enzimático e boa aceitação comercial, e assim ele poderá agregar valor à cultura do milho.

Palavras Chave: adsorção em leito expandido; purificação de α e β -amilases; malte de milho (*Zea mays*); hidrodinâmica, germinação, processo de secagem.

CHARACTERIZING AND RECOVERY OF α AND β -AMYLASES ENZYMES BY EXPANDED BED ADSORPTION SYSTEM

ABSTRACT

Aiming to development of new technologies, in this work α and β -amylases recovery from maize (*Zea mays*) malt by expanded bed adsorption (EBA) was studied in order, to aggregate value to the maize culture which is diffused into our Country. Thus, the optimization of the manufacture steps of maize malt, since the germination (changing the time) until the drying process (changing of time and temperature) were make to obtain this product with good activity. The hydrodynamic characterization of EBA column was making to evaluation of effects of: phosphate (at 22°C) and Tris/HCl buffer, with or without maize malt, on the bed fluidization using the Amberlite IRA 410 ion-exchange resin. The effects of bed (4 cm) and expanded bed height (8, 12 and 16 cm), pH (5, 6 e 7) and buffer type (phosphate or Tris/HCl, both 0.05M) on enzyme recovery were observed under fixed conditions for elution (NaCl 0.25M at 14mL/min).

The results showed that maize seeds germination must be stopped in the 4 days and drying process conducted at 54°C for 5-6 h, to obtain the maize malt with good enzymatic activity. Richardson-Zaki equation fitted to behavior of the resins fluidization on the effect of factors studied in this work, and the hydrodynamic study showed that height equivalent to the theoretical plates (**HETP**), axial dispersion (**D_{axial}**) and Peclet number (**Pe**) increased using higher bed height and voidage. The use of phosphate buffer increased to the affinity between resins and enzymes; while the Tris/HCl buffer was not promoted to enzymes adsorption on resins. Amylase recovery by expanded bed was more effective than fixed bed chromatography and increased using 8 cm (two expansion degrees) and pH 7. The purification factor was of 500 times, due to reduction of impurity. Thus, this work had contributed to found of optimal conditions of α e β -amylases production from maize (*Zea mays*) malt, at high enzymatic potential and good commercial acceptance, and in this way to aggregate value to the maize culture.

Keywords: expanded bed adsorption; α and β -amylases purification; maize (*Zea mays*) malt; hydrodynamic, germination, drying process.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	xix
NOMENCLATURA	xxiv
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	01
1 – INTRODUÇÃO	03
2 – OBJETIVOS	05
2.1 – Objetivo Geral	05
2.2 – Objetivos específicos	05
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
3.1 – Processos de purificação e pré-purificação de proteínas	06
3.1.1 - Purificação por precipitação	07
3.1.2 – Partição em sistemas bifásicos aquosos	08
3.1.3 – Processos de separação por membranas	09
3.1.4 – Processos de cristalização	11
3.1.5 – Processos de cromatografia líquida	12
3.2 – Adsorção em leito expandido	16
3.2.1 – Aplicações da adsorção em leito expandido	18
3.2.2 – Estudo de hidrodinâmica em colunas de ALE	20
3.3 – O amido e suas fontes naturais	24
3.4 – Enzimas amilolíticas	26
3.4.1 - A α-amilase	26

3.4.2 - A β -amilase	27
3.5 - Maltagem	27
3.5.1 - Limpeza e classificação dos grãos	28
3.5.2 - Maceração	28
3.5.3 - Germinação	29
3.5.4 - Secagem	30
3.6 – Processo de secagem	30
3.7 – Otimização por planejamento fatorial	34
4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE AMILÁSICA DO MALTE DE MILHO (<i>Zea mays</i>)	51
1 - INTRODUÇÃO	55
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	56
2.1 - Materiais	56
2.2 - Métodos	56
3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
3.1 - Estudo da germinação das sementes de milho	58
3.2 - Efeito do pH e da temperatura	60
3.3 - Cinética de hidrólise do amido	63
3.4 - Efeito do tempo e temperatura de armazenamento	65
4 - CONCLUSÃO	66
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

CAPÍTULO III - ESTUDO DA DEPENDÊNCIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE AMILASES DE MALTE DE *Zea mays* COM O TEMPO DE SECAGEM E ARMAZENAGEM 69

1- INTRODUÇÃO 73

2 - MATERIAIS E MÉTODOS 74

2.1 - Obtenção do malte Materiais 74

2.2 - Análise da concentração de proteína total 74

2.3 - Medida da variação do teor de glicose 74

2.4 - Determinação da atividade enzimática (AE) 75

2.5 - Processo de secagem do malte 75

2.6 - Modelos de secagem 76

2.7 - Estudo do potencial de hidrólise 76

3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES 77

4 - CONCLUSÃO 80

5 - NOMENCLATURA 81

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81

CAPÍTULO IV - OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE SECAGEM DE MALTE DE *Zea mays* PARA USO COMO FONTE ALTERNATIVA DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS 85

1 - INTRODUÇÃO 88

2 - MATERIAL E METODOS 90

2.1 - Obtenção do malte 90

2.2 - Metodologia do processo de secagem 90

2.3 - Determinação da concentração de proteína total 91

2.4 - Análise da atividade enzimática	91
2.5 - Otimização da secagem do malte	91
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
3.1 - Processo de secagem	92
3.2 - Otimização do processo de secagem	93
4 - CONCLUSÕES	96
5 – NOMENCLATURA	97
6 - AGRADECIMENTOS	97
7 – REFERENCIAS	97
CAPÍTULO V - MAXIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO MALTE DE <i>ZEA MAYS</i>	99
1 - INTRODUÇÃO	103
1.1 - Fisiologia das sementes de milho	103
1.2 - Enzimas amilolíticas	105
1.3 - Secagem	106
2 - METODOLOGIA	106
2.1 - Maceração das Sementes	106
2.2 – Germinação	106
2.3 - Amostragem	107
2.4 - Medição da atividade enzimática	107
2.5 - Determinação da concentração de proteína total	107
2.6 - Processo de secagem do malte	107

2.7 - Planejamento e otimização da secagem do malte	108
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
3.1 - Produção do malte	108
3.2 - Modelagem da germinação	110
3.3 - Secagem do malte de milho	112
3.4 - Otimização da secagem	113
4 – CONCLUSÕES	116
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS	117
6 – AGRADECIMENTOS	118
 CAPÍTULO VI - ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE AMILASES DE MALTE DE MILHO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM LEITO EXPANDIDO	119
1 - INTRODUÇÃO	123
2 - MATERIAIS E METODOS	126
2.1 – Materiais	126
2.1.1 - Reagentes	126
2.1.2 – Fluidizadores e partículas	126
2.1.3 – Coluna de ALE	127
2.1.4 – Obtenção das enzimas do malte de milho	128
2.1.5 - Traçador	128
2.2 - Métodos	128
2.2.1 – Estudo de hidrodinâmica	128
2.2.2 –Determinação da porosidade (ϵ)	128

2.2.3 – Estudos de distribuição do tempo de residência (DTR)	129
2.2.4 – Ensaio enzimáticos	130
2.2.5 – Purificação das amilases	130
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
4 - CONCLUSÕES	136
5 – REFERENCIAS	136
6 - AGRADECIMENTOS	138
CAPÍTULO VII - AVALIAÇÃO RSM DOS EFEITOS DO PH E GRAU DE EXPANSÃO SOBRE A PURIFICAÇÃO DE AMILASES DE MALTE DE MILHO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM LEITO EXPANDIDO	139
1 - INTRODUÇÃO	143
1.1 - As enzimas α e β -amilases	144
1.2 – Cromatografia usando adsorção em leito expandido (ALE)	145
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	145
2.1 - Materiais	145
2.1.1 - Reagentes	145
2.1.2 – Soluções para expansão e eluição	146
2.1.3 - Coluna de ALE usada	146
2.1.4 - Obtenção das enzimas do malte de milho	146
2.2 – Métodos	147
2.2.1 - Ensaio enzimáticos	147
2.2.2 - Purificação das amilases	147
2.2.3 – Planejamento experimental	148

2.2.4 - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	148
3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	149
4 - CONCLUSÕES	154
5 - REFERENCIAS	155
6 – AGRADECIMENTOS	157
CAPÍTULO VIII – CONCLUSÕES E SUJESTÕES	159
1 - CONCLUSÕES	161
2 – SUJESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	163
ANEXOS	167

LISTAS DE FIGURAS E DE TABELAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Princípio básico da adsorção em leito expandido, mostrando os diferentes estágios de operação (adaptada de FREJ <i>et. al.</i> , 1994).	17
Figura 2. Esquema de determinação do tempo de residência em adsorção em leito expandido (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1997)	24
Tabela 1. Composição aproximada do grão de milho.	25

CAPÍTULO II

Figura 1. Atividade amilásica (<i>AE</i>) na germinação das sementes de <i>Zea mays</i> a pH 4,8 e 30±2°C, durante oito dias.	59
Figura 2. Efeito do pH sobre atividade amilásica do malte de milho em solução de amido a 2% e a 30±2°C.	61
Figura 3. Efeito da temperatura sobre a atividade amilásica no malte de milho em solução de amido a 2% e em pH 4,8.	62
Figura 4. Determinação da energia de ativação da hidrólise do amido pelas amilases de malte de milho a pH 4,8.	63
Figura 5. Influência da concentração do substrato na velocidade de hidrólise do amido por amilases de malte milho a pH 4,8 e 30±2°C.	64

Figura 6. Gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do amido de malte de milho a pH 4,8 e $30\pm 2^{\circ}\text{C}$.	65
Figura 7. Acompanhamento da atividade durante o armazenamento do malte.	66
Tabela 1. Atividade amilásica durante a germinação das sementes de milho (<i>Zea mays</i>).	58

CAPÍTULO III

Figura 1. Curvas de dessecção geradas pelo modelo e pelos dados experimentais do processo de secagem do malte de milho.	78
Figura 2. Dependência da atividade enzimática no malte de milho com o tempo de secagem a 65°C .	79
Figura 3. Curvas de hidrólise do amido de mandioca por enzimas amilolíticas do malte de milho em biorreator operando em batelada e a 65°C .	80
Tabela 1. Modelos empíricos e semi-empíricos para descrever as curvas de secagem.	76
Tabela 2. Avaliação dos modelos pela metodologia ANOVA para um nível significância de 95%.	77

CAPÍTULO IV

Figura 1. Curva de secagem do malte de milho.	92
Figura 2. Superfície de resposta em 2 D para compreensão da dependência da atividade enzimática com o tempo e temperatura no processo de secagem do malte de milho.	95

Figura 3. Superfície de resposta em 3 D para compreensão da dependência da atividade enzimática com o tempo e temperatura no processo de secagem do malte de milho. 96

Tabela 1. Dados experimentais da secagem de malte de milho. 92

Tabela 2. Matriz de planejamento para a otimização do processo de secagem do malte de milho. 93

Tabela 3. Análise da variância (ANOVA) do modelo ajustado. 94

CAPÍTULO V

Figura 1. Esquema da síntese da enzima α -amilase, em semente de monocotilédone. 105

Figura 2. Comportamento da atividade enzimática (*AE*) durante a germinação das sementes de *Zea mays*. 110

Figura 3. Apresentação da dependência de *AE* com o tempo de germinação na forma de modelos empíricos. 111

Figura 4. Curvas de secagem do malte de sementes de milho (*Zea mays*). 113

Figura 5. Superfície de resposta que descreve o comportamento da atividade enzimática sobre influência do tempo e temperatura no processo de secagem do malte de milho (*Zea mays*). 116

Tabela 1. Dados experimentais de atividade enzimática durante a germinação das sementes de milho (*Zea mays*). 109

Tabela 2. Dados experimentais da secagem de malte de milho (*Zea mays*). 112

Tabela 3. Matriz de planejamento utilizada para realizar a otimização do processo de secagem do malte de sementes de milho (*Zea mays*). 113

Tabela 4. Análise da variância do modelo que mais se ajustou ao a otimização processo de secagem.	114
--	-----

CAPÍTULO VI

Figura 1. Esquema da coluna de ALE usada.	127
Figura 2. Esquema da determinação da DTR [1].	129
Figura 3. Modelos de Richardson-Zaki.	131
Figura 4. Curvas de DTR para o tampão Fosfato 0,07M a pH 7 e 295,15 K.	132
Figura 5. Curvas de DTR para o tampão TRIS/HCl 0,07M a pH 7 e 295,15 K.	133
 Tabela 1. Propriedades do fluidizadores e das partículas.	 127
Tabela 2. Comparação entre as velocidades terminais das partículas experimental e calculada.	132
Tabela 3. Parâmetros obtidos experimentalmente pelas curves de DRT.	132
Tabela 4. Recuperação de amilases de malte de milho (<i>Zea mays</i>) por adsorção em leito expandido com o tampão fosfato como fluidizador a pH 7.	135
Tabela 5. Recuperação de amilases de malte de milho (<i>Zea mays</i>) por adsorção em leito expandido com o tampão TRIS/HCl como fluidizador a pH 7.	135

CAPÍTULO VII

Figura 1. Esquema da coluna de ALE usada.	146
---	-----

Figura 2. Avaliação RSM das influências do **pH** e do grau de expansão (H_i/H_0) sobre o fator de purificação (**FP**). 153

Figura 3. Determinação das massas molares das amostras por eletroforese via SDS-PAGE. **S** é o padrão de massa molar, composto das seguintes proteínas: fosforilase b (94kDa), albumina de soro bovino (67kDa), albumina de ovo (43kDa), carbonihidrase (30kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lacto albumina (14,4 kDa). **M** é a amostra de malte e **A** é a amostra purificada por ALE no ensaio a pH 7 e grau de expansão 2, da Tabela 3. 154

Tabela 1. Recuperação das amilases do malte de milho (*Zea mays*) por ALE sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410 a pH 5. 149

Tabela 2. Recuperação das amilases do malte de milho (*Zea mays*) por ALE sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410 a pH 6. 150

Tabela 3 - Recuperação das amilases do malte de milho (*Zea mays*) por ALE sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410 a pH 7. 150

Tabela 4. Planejamento experimental usado para purificação das amilases do malte de milho (*Zea mays*) por adsorção em leito expandido sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410. 151

Tabela 5. Avaliação d ajuste do modelo por análise da variância (ANOVA) a 95% de nível de confiança. 152

NOMENCLATURA

	Português	Inglês
A	Primeira constante de secagem (sem dimensão)	First drying constant (dimensionless)
AE	Atividade enzimática (SKB/mg de proteína)	Enzymatic Activity (SKB/mg of protein)
AE_0	Atividade enzimática inicial (SKB/mg de proteína)	Initial enzymatic activity (SKB/mg of protein)
A_T	Área da secção cruzada da coluna cromatográfica (m ²)	Area of cross section of chromatographic column (m ²)
B	Segunda constante de secagem (adimensional)	Second drying constant (dimensionless)
b	Vetor b	b vector
$Calc$	Dados calculados	Calculated data
C_{amido}	Concentração inicial de amido (g/L)	Initial starch concentration (g/L)
$C_{am.hid}$	Concentração de glicose obtida pela hidrolise do amido (g/L)	Glucose concentration obtained by the starch hydrolyze (g/L)
$C_{Glicose}$	Conteúdo de glicose gerado da hidrolise (% p/p)	Glucose content generated by starch hydrolysis (% w/w)
D_{axial}	Dispersão axial (cm ² /s)	Axial dispersion (cm ² /s)
d_p	Diâmetro da particular (m)	Particle diameter (cm)
$[E]_0$	Concentração total de enzimas (g/L)	Total enzymes concentration (g/L)
Exp	Dados calculados	Experimental data
F_{Calc}	Teste F calculado	Calculated F test.
F_{Tab}	Teste F tabelado	Tabled F test.

g	Aceleração da gravidade (m/s ²)	Gravity acceleration (m/s ²)
H	Altura do leito (cm)	Bed height (cm)
$HETP$	Altura equivalente aos pratos teóricos (cm)	Height equivalent to theory plate (cm)
i	Nível do fator	Level of factors
K_S	Constante de secagem (mg/L)	Drying constant (mg/L)
k_{cat}	Constante cinética (min ⁻¹)	Kinetic constant (min ⁻¹)
K_M	Constante de Michaelis-Menten (g/L)	Michaelis-Menten constant (g/L)
MQ_{ep}	Média quadrática dos erros	Errors square mean
MQ_{faj}	Média quadrática da falta de ajuste	Square mean of fitting fault
MQ_R	Média quadrática devido à regressão	Square mean due to the regression
MQ_r	Média quadrática dos resíduos	Residual square mean
MQ_T	Média quadrática total	Total square mean
m_p	Massa das partículas (kg)	Particles mass (kg)
N	Número de pratos teóricos (adimensional)	Theory plates number (dimensionless)
n	Coefficiente de expansão (adimensional)	Expansion of coefficient (dimensionless)
Pe	Número de Pecletl (adimensional)	Pecletl number (dimensionless)
R	Coefficiente de correlação	Correlation coefficient
R_p	Número de Reynold (adimensional)	Particles Reynolds number (dimensionless)
R_t	Número de Reynolds terminal (adimensional)	Terminal Reynolds number (dimensionless)
S	Desvio padrão	Standard deviation
$[S]$	Concentração do substrato (g/L)	Substrate concentration (g/L)

SQ_{ep}	Soma quadrática dos erros	Error square sum
SQ_{faj}	Soma quadrática da falta de ajuste	Square sum of fitting fault
SQ_R	Soma quadrática devido à regressão	Square sum due to regression
SQ_r	Soma quadrática dos resíduos	Residual square sum
SQ_T	Soma quadrática total	Total square sum
T	Temperatura de secagem (°C)	Drying temperature (°C)
t	Tempo de secagem ou tempo de residência (h, s)	Drying time or residence time (h, s)
U	Velocidade linear (m/s)	Linear velocity (m/s)
UM	Conteúdo de umidade (% p/p)	Moisture content (% w/w)
U_T	Velocidade terminal (m/s)	End velocity (m/s)
$\hat{V}$	Estimativa da variância	Variance estimative
V_0	Velocidade inicial de reação (mol/L.min)	Initial velocity of reaction (mol/L.min)
$V_{máx}$	Velocidade máxima de reação (mol/L.min)	Maximum velocity of reaction (mol/L.min)
V_L	Volume do leito (m ³)	Bed volume (m ³)
V_P	Volume das partículas (m ³)	Particle volume (m ³)
X_{Exp}	Peso seco (adimensional)	Drying weight (dimensionless)
X	Matriz composta pelos fatores	Matrix compound of factors
X^T	Matriz transposta de X	Transposed matrix of X
x_1 e x_2	Fatores codificados	Coded factors
Y	Valores calculados das respostas	Calculated values of responses
y	Valor real das respostas	Real values of responses
$\bar{y}$	Valor da media global das respostas	Value of global mean of response
$\hat{y}$	Valor pontual das respostas	Point value of responses

	Gregas	Greeks
ϵ	Porosidade (adimensional)	Voidage (dimensionless)
ϵ_p	Erro padrão	Standard error
ρ_L	Massa específica do líquido (kg/m ³)	Specific liquid mass (kg/m ³)
ρ_p	Massa específica das partículas (kg/m ³)	Specific particle mass (kg/m ³)
μ	Viscosidade dinâmica (kg/s.m)	Dynamic viscosity (kg/s.m)
μ_{AE}	Taxa de geração de atividade enzimática (SKB/dia)	Generation rate of enzymatic activity (SKB/day)
σ	Desvio padrão	Standard deviation

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 – INTRODUÇÃO

Após o seqüenciamento de diversos genes de diferentes organismos, incluído o genoma humano completo na era pós-genômica, começa uma busca frenética, para a determinação da atividade das proteínas codificadas para cada um dos genes descritos, a fim de inferir sua função biológica e, finalmente, correlacioná-la com as diversas funções fisiológicas que estas possam apresentar e assim caracterizar sua atividade biológica; contudo, torna-se necessária a obtenção das proteínas de interesse com alto grau de pureza.

Tipicamente, o processo de purificação de uma proteína é composto por múltiplas etapas cuidadosamente definidas, que têm como fundamento a distinção das proteínas com base na seqüência de aminoácidos, no conteúdo de carboidratos e de lipídeos-estrutura tridimensional, e na sua atividade biológica, estes processos são mais conhecidos como *downstream process*.

Os *downstream process* tradicionais assemelham-se por utilizarem um número distinto de operações unitárias ao tratarem um lote de material biológico bruto para retirar material particulado e contaminantes, antes de capturarem a molécula alvo do licor de processo. Nos últimos anos, entretanto, foi dada atenção considerável ao desenvolvimento das então chamadas operações integradas de “downstream process“, das quais os três passos mais clássicos (separação sólido-líquido, concentração e isolamento primária de produtos) são fundidas em uma só unidade de operação. E desta forma, os processos semelhantes levam a uma redução do número de operações unitárias necessárias ao processo de purificação, e desta maneira permitem não só uma alta recuperação, mas também uma economia superior na obtenção destes produtos. As três mais recentes tecnologias desenvolvidas no final do século passado são: a extração líquido-líquido utilizando sistemas bifásicos aquosos, adsorção em membranas sintéticas modificadas e sorção em adsorventes fluidizados. Um membro de projeção desta última classe de operações unitárias, de uso comum em unidades de bancada, é a adsorção em leito expandido (ALE).

Em atenção ao desenvolvimento de novas tecnologias é que neste trabalho foi feito um estudo de recuperação das enzimas α e β -amilases produzidas a partir das sementes de milho (*Zea mays*) em sistemas de adsorção em leito expandido usando as resinas de troca iônica Amberlite IRA 410. Estas enzimas seriam mais uma opção aos vários processos na hidrólise do amido, principalmente pelas indústrias de álcool na produção de cerveja, em substituição a aquelas usadas sob a forma de malte de cevada (cereal este, não produzido no país) e, como em nosso país o cultivo do milho é bastante difundido, logo teríamos um produto de baixo custo e com ótimo grau de pureza proporcionado pela recuperação em leito expandido.

Uma avaliação das melhores condições de obtenção do malte desde a germinação até a secagem foi feito para que fosse possível obter um produto com boa atividade enzimática. Depois caracterizou-se hidrodinamicamente a coluna de adsorção em leito expandido para obter as condições ótimas para a recuperação de amilases do malte de milho, usando-se a resina de troca iônica amberlite IRA 410, fluidizada por solução contendo tampão fosfato ou tampão TRIS/HCl, ambos com, ou sem 2 % de malte de milho, e comparadas com a fluidizada por água destilada, a $295,15 \pm 1$ K.

Durante a recuperação das amilases de malte de milho variou-se o pH entre 5, 6 e 7, a altura do leito, fixo a 4,2 cm, e fluidizado a 8, 12 e 16 cm, usando os tampões fosfato e TRIS/HCl como agentes fluidizantes do leito, para avaliar o efeito destes fatores e encontrar a condição ótima de purificação destas enzimas.

2 - OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral:

O presente trabalho teve como objetivo obter condições ótimas de purificação de amilases de malte de milho (*Zea mays*) por adsorção em leito expandido (ALE) usando a resina de troca iônica Amberlite IRA 410.

2.2 – Objetivos específicos:

- 1) Obter condições ótimas de produção do malte de milho;
 - a) Observar o comportamento da atividade enzimática durante o tempo de germinação das sementes de malte de milho;
 - b) Avaliar a influência da temperatura e do tempo de secagem sobre a atividade enzimática do malte de milho.
- 2) Caracterizar as enzimas do malte de milho;
 - a) Analisar os efeitos do pH, da temperatura e do tempo de exposição a um determinado meio;
 - b) Determinar as constantes cinéticas de Michaelis-Menten, Velocidade máxima, energia de ativação de hidrólise do amido e ponto isoelétrico;
 - c) Observar o efeito do tempo de estocagem sobre a atividade do malte de milho.
- 3) Fazer a caracterização da hidrodinâmica da coluna usada;
 - a) Avaliar os efeitos da adição de sal (os tampões fosfato e Tris/HCl) e de biomoléculas (malte de milho) sobre o ajuste dos dados a equação de Richardson e Zaki (1954);
 - b) Determinar parâmetros como dispersão axial, número de Peclet e a altura equivalente do número de pratos teóricos em um estudo de distribuição do tempo de residência.
- 4) Purificar as α e β -amilases de malte de milho por ALE.
 - a) Estudar o efeito da expansão do leito, do pH e do tipo de tampão (fosfato ou Tris/HCl) sobre a purificação das enzimas.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Processos de purificação e pré-purificação de proteínas

A maioria dos produtos biotecnológicos de importância comercial é produzido em meios fermentativos, empregando biorreatores. A sua purificação é de extrema importância para os diversos setores industriais, como o farmacêutico, alimentício, têxtil, etc. O emprego correto de processos de purificação torna-se essencial para que se atinja êxito na seleção da molécula alvo (substância ou espécie desejada). Esta, geralmente, se encontra misturada às células, enzimas, sais e a produtos gerados durante a fermentação, necessitando assim de um tratamento que possibilite a sua isolamento destes materiais (muitas vezes indesejáveis), o que acaba elevando os custos na purificação destes produtos. Os diferentes tipos de operações unitárias utilizadas durante a recuperação ou purificação de biomoléculas alvo são chamados de *downstream processes* (VAN DER WILDER, 1999).

A avaliação do desempenho de qualquer método de purificação de enzimas se baseia na comparação entre a atividade e atividade específica (atividade por massa de proteínas totais) do material obtido após a purificação com o material não purificado, ou simplesmente bruto, assim define-se:

A recuperação da atividade (*RA*) é a relação da atividade no material purificado com à atividade no material não purificado (bruto), dada em porcentagem (SANTOS, 2001):

$$\text{Recuperação da Atividade}(RA) = \left(\frac{\text{Atividade no material purificado}}{\text{Atividade no material bruto}} \right) * 100 \quad (3.1)$$

E o fator de purificação (*FP*) é a relação entre a atividade específica no material purificado com a atividade específica no material não purificado (bruto), ou seja:

$$\text{Fator de Purificação}(FP) = \frac{\text{Atividade Específica no material purificado}}{\text{Atividade Específica no material bruto}} \quad (3.2)$$

3.1.1 - Purificação por Precipitação

O termo precipitação é usado para descrever uma operação na qual uma alteração química ou física, em uma solução protéica causa a formação de partículas insolúveis de proteína. Usualmente ela é considerada um método de concentração e utilizada antes da aplicação de métodos de maior resolução na purificação (PESSOA JUNIOR e KILIKIAN, 2005).

As primazias da aplicação da precipitação para purificação de biomoléculas são as facilidades operacionais adaptadas em *scale up*, o uso de processo contínuo, equipamentos relativamente simples, considerável número de precipitantes a serem utilizados que, por muitas vezes, são de baixo custo econômico e/ou usados em pequenas concentrações. Em soluções aquosas a precipitação pode ocorrer com o aumento ou diminuição da concentração de sais, com a adição de solventes orgânicos, calor, ajuste de pH e temperatura (PESSOA JUNIOR e KILIKIAN, 2005).

- Precipitação por sais: Este tipo de precipitação ocorre por neutralização das cargas superficiais da proteína e redução da camada de hidratação, favorecendo a agregação dos resíduos hidrofóbicos.
- Precipitação por solventes orgânicos: Uma das grandes vantagens desta técnica é a volatilidade dos solventes que permite pronta recuperação e reciclagem ao processo, além de poderem ser facilmente removidos do precipitado.
- Precipitação pela Temperatura: A variação da temperatura causa precipitação de proteínas de duas formas: sua diminuição provoca redução na solubilidade de proteínas e sais e com o seu aumento as proteínas desnaturam, perdem suas estruturas formando agregados insolúveis.
- Precipitação Isoelétrica: esta tem como princípio a neutralização das cargas globais da proteína pela alteração do pH do meio, há por isso um considerável risco de desnaturação (PESSOA JUNIOR e KILIKIAN, 2005).

SILVA *et. al.* (2003) purificaram proteases do fungo *Penicilium aurantiogriseum* usando fracionamento com sulfato de amônio. Para tanto, aquece-se e centrifugou-se o extrato bruto; o sobrenadante foi precipitado por sulfato de amônio e então se determinou a

atividades enzimáticas e a proteína total. O método de extração por aquecimento demonstrou ser um processo de semipurificação altamente eficiente com um rendimento de 86,5%.

As enzimas xilanase e β -xilosidase de *P. Janthinellum* foram purificadas por fracionamento com álcool. À medida que se elevava a concentração alcoólica de 20 a 80%, durante o processo de precipitação, a recuperação da β -xilosidase aumentava, podendo se separar esta enzima da xilanase até uma concentração de 60% de álcool, mas a partir deste a xilanase começou a precipitar chegando ao seu máximo de recuperação na fração alcoólica de 80%. A recuperação da xilanase foi de 81% e da β -xilosidase foi de 74% da atividade total no material bruto (CORTEZ and PESSOA JUNIOR, 1999).

3.1.2 – Partição em sistemas bifásicos aquosos

Os sistemas bifásicos aquosos (SBA) é um método que existe há algumas décadas e desde o seu surgimento até então, o emprego dos mesmos e as alternativas criadas para a melhoria desta técnica com o intuito de obter melhores resultados, têm crescido consideravelmente. A grande vantagem que os SBA detêm são que, criteriosamente, recuperaram e ou purificaram biomoléculas com uma louvável viabilidade econômica, apresentam uma grande rendimento na separação do constituinte de interesse, além de não interferir na atividade do mesmo (ALBERTSSON, 1986).

Sistemas bifásicos aquosos são formados quando pares de polímeros ou um polímero e um sal são misturados acima de suas concentrações críticas. Quando estas concentrações excedem certo valor, há formação de duas fases aquosas. Estas por sua vez, formam um meio propício à manutenção da atividade biológica das macromoléculas a serem particionadas (ALBERTSSON, 1986).

A escolha de um polímero a ser usado num SBA é de fundamental importância, pois o contato deste com o constituinte a ser recuperado e/ou purificado deve ser tal que não haja interferências nas atividades vitais desta biomolécula. Os polímeros mais utilizados são o PEG, o Poli (α -1,6-glicose) ou dextrano e o Hidroxipropil amido (REPAL).

As enzimas α e β -amilases de origem microbianas foram recuperadas por BLÁSQUEZ *et al.* (1998) em um SBA PEG/ MgSO_4 , FURUYA *et al.* (1995 e 1996) em um SBA PEG/ Dextrana, sendo que ambos obtiveram valores de partição seis vezes menores que SANTANA (2003) quando este concentrou estas enzimas, de malte de milho (*Zea mays*) em um SBA PEG/ CaCl_2 , provavelmente pela presença do íon cálcio no meio, o qual está na estrutura da α -amilase. Os SBAs obtidos por SANTANA (2003) foram com PEG 4000, 6000 e 8000 a pH 5, 6 e 7 e apresentaram comportamento semelhantes aos descritos pela literatura, sendo que a região ótima para a partição das enzimas amilolíticas foi aquela que se apresentava em pH 5, *tie line* 3 (25,3 % de PEG e 1,8% de CaCl_2) e massa molar do polímero 4000. Esta tendência das proteínas de sementes de milho particionarem mais em PEG de menor massa foi observada por GU and GLANTZ (2006). A composição ótima do SBA caracterizado por SANTANA (2003) foi aplicada em sistema contínuo por BIAZUS *et al.* (2006) na partição de amilases de malte de milho, no qual um fator de purificação de 130 foi obtido, valor este superior ao demais.

3.1.3 – Processos de separação por membranas

O processo de separação que utiliza membranas é uma alternativa aos processos convencionais de separação, que vem sendo muito difundido nos últimos anos, em virtude da necessidade de se reduzir o consumo de energia elétrica, assim como melhorar a qualidade dos alimentos processados (LOPES, 2005).

Segundo MALLEVIALLE *et al.* (1998), uma membrana pode ser definida como uma película delgada que separa duas fases e atua como uma barreira seletiva ao transporte de matéria. A membrana não se define como um material passivo e sim como um material funcional. Caracteriza-se por sua estrutura e seus rendimentos, uma vez que a seletividade depende principalmente da natureza dos elementos contidos nas duas fases e da força motriz que é aplicada.

No processo mais comum de separação por membrana a mistura é separada dentro de um retentor (onde parte da alimentação não passa através da membrana, pelo contrário, é retida) e um permeabilizador (onde parte da alimentação passa através da membrana). A alimentação retida e permeabilizada geralmente é um líquido ou um gás, mas também pode

ser sólida. Uma separação eficaz normalmente é difícil de realizar se os produtos a serem separados geralmente são miscíveis (SEADER and HENLEY, 1998).

Quase todos os processos de membrana industrial são feitos de polímeros sintéticos ou naturais. A membrana normalmente é um filme polimérico fino não poroso semipermeável, porém, também pode ser um polímero poroso, cerâmica, material metálico, ou mesmo um líquido ou gás. A membrana não deve dissolver, desintegrar ou quebrar.

As membranas podem ser classificadas com base no tipo de substâncias separadas ou de acordo com o tipo de força empregada. Esta força é conhecida como força motriz, que confere à membrana diferente permeabilidade para os diferentes compostos. É esta característica que permite o uso de membranas semipermeáveis em processos de separação.

Existem importantes processos de separação por membrana, dentre os quais, pode-se citar a osmose reversa, diálise, eletrodialise, microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração, pervaporação, permeabilização de gás e membranas líquidas (LOPES, 2005).

No entanto, as membranas de microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF) são as mais empregadas na purificação de proteínas, pois permitem separar solutos de elevadas massas molares, retidos no solvente em mistura com solutos de menor massa molar, que atravessam as membranas. São utilizadas em filtrações que visam concentrar e purificar concentrados enzimáticos. As membranas (MF) não servem para reter macromoléculas em solução, proteínas globulares muito grandes ou polissacarídeos, contudo, são apropriadas para recuperar estes componentes, uma vez que estas têm dimensões menores do que cerca de $0,3 \mu\text{m}$. As membranas (UF) retêm colóides e partículas em suspensão, junto com proteínas e carboidratos de massa molar maior do que 300 Da. Estas membranas suportam pressões hidráulicas entre 7 e 700 kPa (MALLEAVILLE *et al.*, 1998).

As enzimas α e β -amilases de malte de milho foram concentradas usando-se uma membrana de fibras ocas de polissulfona, modelo AMICON- H1MP01-43, com área de $0,030 \text{ m}^2$ e tamanho dos poros igual a $0,1 \mu\text{m}$. Um planejamento fatorial do tipo 2^2 foi usado para avaliar os efeitos do pH (5, 6 e 7) e da pressão transmembrana (0,05, 0,10 e 0,15 bar) sobre a recuperação das enzimas foi usado. Após a análise RSM observou-se que à medida que se reduzia a pressão transmembrana e diminuía o pH obtinham-se os melhores

resultados de purificação. A melhor condição foi a pH 5 e 0,05 bar onde o fator de purificação das amilases foi de 26 (SEVERO JUNIOR *et al.*, 2006).

3.1.4 – Processos de cristalização

A cristalização de proteínas é aplicada como técnica auxiliar a estudos cristalográficos e é tida mais como uma arte que como uma ciência. A ausência de parâmetros cinéticos e termodinâmicos dificulta o *design* deste processo para a aplicação industrial na purificação de proteínas (BERNARDO, 2002; DAVEY, 1994).

Ela é usada pela indústria química como um meio de isolamento, purificação e controle da forma dos materiais sólidos. Durante os anos de 1960 e 70, o desenvolvimento de processos em larga escala acarretou em avanços na compreensão da físico-química envolvida na cristalização de diversas substâncias (exemplo: nitrato de amônio, uréia, sulfato de amônio, ácido fosfórico, cloreto de sódio, ácidos tereftálico e adípico e paraxileno) (DAVEY, 1994, MELO *et al.*, 2004).

Enzimas são ocasionalmente cristalizadas em meios contendo soluções orgânicas e sais, sendo o método mais comum é aquele que emprega solução de sulfato de amônio. Para se obter uma boa cristalização deve-se deixar que o processo se realize por vários dias ou semanas. Alguns métodos foram falhos, como os que se empregaram sais de mercúrio para cristalizar a enzima fosfato-piruvato hidratase (4.2.1.11) que foi inativada após o final do processo (DAVEY, 1994). Sais diversos podem inibir enzimas e a imobilização ou aprisionamento destas entre poros dos cristais reduz a exposição dos seus centros ativos à catálise, e assim, diminuindo a sua atividade, o que inviabiliza o seu emprego (BAYRAMOGLU *et al.*, 2004). A solução deste problema pode estar nas sucessivas recristalizações destas enzimas (DIXON and WEBB, 1971).

Micrografias de enzimas cristalizadas estão bem catalogadas em um Atlas produzido por DIXON and WEBB (1971). Nele estão contidas as enzimas cristalizadas, como: as álcool desidrogenases de fígado de cavalo e de leveduras, catalases de fígado de vaca e de eritrócitos de cavalo, celulasas de *Irpex lacteus*, glicolato oxidases de folhas de espinafre, glicose-6-fosfato desidrogenase de glândulas mamárias de vaca, pepsina de estômago de salmão, renina de estômago de bezerros, tripsina de suco pancreático de vaca,

além de outras enzimas. α -amilases cristalizadas foram obtidas de várias fontes como as de pâncreas a saliva humana, de pâncreas de porco, de malte de cevada, de *Aspergillus*, de *B. stearothermophilus*, de *B. subtilis*, de batata doce e de trigo (DIXON and WEBB, 1971).

Um método de obtenção de cristais de α -amilase de muco de cepas de *B. amyloliquefacies* é descrito na literatura. No qual, a α -amilase foi purificada por precipitação com 80% de sulfato de amônio, posterior ultrafiltração, diálise e cromatografia em coluna contendo SP Sepharose. O eluido da cromatografia foi cristalizado pelo método da difusão de vapor em gotas a 20 °C. Vários cristais α -amilase foram obtidos na presença de 15% propanol, 12% PEG 6000 e 0,1 M PIPES (pH 7,1) após 3 meses. Outros cristais também puderam ser obtidos com 30% PEG 6000, 0,2M (NH₄)₂SO₄ e 0,1M PIPES (pH 6,5) após 3 meses de processo (SARIKAYA and MIKAMI, 2001).

3.1.5 – Processos de cromatografia líquida

Geralmente, se assume que a palavra cromatografia vem do grego *chroma* (cor) e *graphie* (escrever). Esta técnica foi primeiramente empregada em 1897 por David Talbot Day no fracionamento de componentes do petróleo em coluna contendo terra Fuller, sendo apresentada no I Congresso Internacional de Petróleo, em 1900 na cidade de Paris. Mas, foi Michael S. Tswett em 1903 que apresentou os primeiros estudos sobre o assunto, definido anos mais tarde o processo e dando-lhe o atual nome. Ele primeiramente usou uma coluna contendo carbonato de cálcio para filtrar uma solução de éter de petróleo e percebeu a separação dos componentes nela existente pela formação de espectros coloridos, podendo-se determinar facilmente a composição de cada um (AQUINO NETO e NUNES, 2003; CIOLA, 2003).

A cromatografia pode ser conceituada como um método físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases, uma estacionária, geralmente de grande área, e a outra um fluído insolúvel, na fase estacionária, que percola através da primeira. A fase estacionária poderá ser um sólido ou um líquido, enquanto que a fase móvel poderá ser um fluido líquido, um gás, ou um gás em condições supercríticas (acima da temperatura crítica e a altas pressões). Se a fase móvel for um líquido, a cromatografia será chamada de líquida, ou cromatografia em fase

líquida. Se a fase móvel for um gás ou vapor, a cromatografia se chama de cromatografia a gás ou cromatografia gasosa. A princípio, não se via aplicação da cromatografia líquida, mas a partir dos anos 80, sua aplicação se equiparou a cromatografia gasosa e atualmente é a mais utilizada principalmente por se aplicar em compostos não voláteis, fator limitante da cromatografia gasosa. Então, na captura, purificação e determinação de proteínas este tipo de cromatografia é o mais indicado, sendo que os métodos mais empregados são aqueles em que se usam colunas cromatográficas (CIOLA, 2003).

Existem vários métodos de cromatografia líquida em coluna: a cromatografia de afinidade, a cromatografia de exclusão de tamanho, a cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade, cromatografia de interação hidrofóbica e a cromatografia líquida de alto desempenho (CIOLA, 2003). Os métodos de purificação baseados no fracionamento por afinidade de precipitação, no uso de membranas e na partição líquido-líquido, também são considerados métodos cromatográficos. Um dos mais recentes e promissores métodos cromatográficos é a adsorção em leito expandido (ALE).

a) Cromatografia de afinidade tem uma larga aplicação na recuperação e purificação de enzimas, pois ela permite que após a inserção de um ligante específico às resinas cromatográficas sua seletividade aumente consideravelmente.

KAMIMURA (2000) utilizou cromatografia de afinidade para purificar lipase de *Geotrichum sp* em uma coluna de cromatografia rápida de proteína (*Fast protein liquid chromatography* – FPLC) contendo o gel Sepharose® como adsorvente. A recuperação da atividade total foi de 19,33% e o fator de purificação destas enzimas foi de 91,16 vezes maiores que o filtrado do caldo bruto.

b) a cromatografia de interação hidrofóbica se baseia na tendência das cadeias alifáticas ou de outras estruturas não polares de se associarem aos ligantes hidrofóbicos imobilizados na resina, semelhante à associação de pequenas moléculas orgânicas alifáticas em água. Esta adsorção frequentemente requer a presença de íons *salting-out*, tais como NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, por diminuírem a disponibilidade de moléculas água na solução aumentando a tensão superficial e a interação hidrofóbica (AQUINO NETO e NUNES, 2003; CIOLA, 2003; TABOADA, 1999).

Uma coluna de cromatografia rápida de proteína (*Fast protein liquid chromatography* – FPLC) contendo a resina hidrofóbica Butil Sepharose foi usada na purificação das enzimas lipases do fungo *Geotrichum sp* em trabalho realizado por TABOADA (1999) obtendo uma recuperação da atividade em torno de 60% e um fator de purificação de 14 vezes com relação ao caldo bruto. Sendo este método mais eficiente na captura das enzimas citadas, mas menos seletivo que o método anterior.

c) A cromatografia líquida de alto desempenho (*High performance liquid chromatography* – HPLC) trabalha com partícula da fase estacionária inferior a 10 micra de diâmetro, tornando-se necessário o uso de bombas de alta precisão e exatidão para operações a pressão de até 500 atm e que possam dosar vazões de 0,01 a 3 mL/min, no entanto, dependendo da substância e do detector empregado, este método pode quantificar compostos com massas inferiores a 10^{-18} g (CIOLA, 2003).

d) A cromatografia por exclusão por tamanho (*Size exclusion chromatography* - SEC) é dividida em duas modalidades, uma que emprega fase estacionária aquosa, denominada de cromatografia por filtração em gel (*Gel filtration chromatography* - GFC) que é bastante empregada na separação de biomoléculas (proteínas, polinucleotídeos, etc.) e a outra que possui fase móvel orgânica, chamada de cromatografia por permeação em gel (*Gel permeation chromatography* - GPC), tem sido muito usada na determinação da massa molar de polímeros sintéticos.

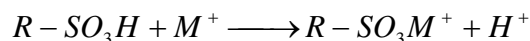
e) A cromatografia de troca iônica se dá, em geral, pela troca de íons de mesmo sinal entre uma solução e um corpo sólido insolúvel nesta solução. Esta técnica que vem sendo utilizada com sucesso desde meados do século XIX, época em que pesquisadores descobriram que certos solos tinham a capacidade de remover íon de NH_4^+ de soluções que o atravessavam, substituindo-os por uma quantidade equivalente de íons Ca^{2+} (CIOLA, 2003).

Sua primeira aplicação se deu no tratamento de água. Mas foi em 1917 que se teve o primeiro registro da sua aplicação em análises bioquímicas, foi na determinação de amônio em urina, método este desenvolvido por Folin e Bell. A partir de 1935, o valor dos processos de troca iônica nas determinações bioquímicas ficou mais enfatizado com a produção de resinas de troca iônica orgânicas de alta eficiência. Estas possuem alta resolu-

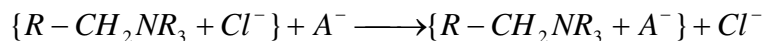
ção em trabalhos de separação de aminoácidos, peptídeos, ácidos nucleicos e derivados (AQUINO NETO e NUNES, 2003).

O sólido (trocaador de íons) deve conter seus próprios íons para que a troca se processe com rapidez e em uma extensão suficiente para ter interesse tecnológico. O sólido deve ter ainda uma estrutura molecular aberta, permeável, de modo que os íons e moléculas do solvente possam se mover para dentro e para fora de sua estrutura.

Algumas das resinas catiônicas mais usadas são as derivadas da sulfonação de anéis aromáticos contidos nas superfícies dos poros e da superfície externa de resinas derivadas do estireno. Elas possuem uma acidez superficial forte que lhe permite trocar cátions com os hidrogênios dissociáveis dos grupos sulfônicos, de acordo com a reação a seguir (CIOLA, 2003):



As resinas aniônicas são obtidas a partir da reação de anéis aromáticos com agentes clorometilantes (como o cloro metil éter, H_2COHCl) para introduzir no anel aromático o grupo cloro metila que posteriormente é reagido com uma amina terciária, produzindo um sal de cloreto de amônio quaternário na superfície da resina. Este grupo é tido como um trocaador aniônico forte. A seguir está apresentada a reação de equilíbrio de troca aniônica (CIOLA, 2003):



A lípase de *Geotrichum sp* foi purificada em resina de troca iônica Q Sepharose FF para comparar os processos de purificação por cromatografia de afinidade. A recuperação da atividade da enzima por troca iônica foi de 55,13% e o fator de purificação foi de 4,44 vezes o filtrado do caldo bruto. Isto mostra que a cromatografia de afinidade foi mais seletiva pela enzima especificada elevando seu grau de pureza no material protéico total, mas sua capacidade de captura foi duas vezes menor que a da resina de troca iônica, o que se poderia sugerir como solução deste trabalho, é a pré-purificação com a resina de troca iônica para capturar o máximo possível das enzimas, com posterior purificação com a cromatografia de afinidade para selecionar as enzimas entre as proteínas totais, agora em menor quantidade.

d) A cromatografia por adsorção em leito expandido (ALE) é bastante utilizada na recuperação de material biológico particulado como proteínas, enzimas, microorganismos. A ALE é uma técnica baseada na fluidização do leito. Embora utilizados inicialmente na década de 70, como ferramenta para a recuperação de proteínas, os leitos fluidizados, não mostraram na época muito interesse principalmente pelas dificuldades técnicas existentes, como por exemplo, a limitação das propriedades físicas das matrizes recombinantes (SANTOS, 2001). Ultimamente vem surgindo um crescente interesse na aplicação da técnica de adsorção em leito expandido para recuperar e purificar proteínas de soluções contendo ou não material particulado.

3.2 – Adsorção em leito expandido

A ALE é originária da cromatografia de proteínas, e é baseada na fluidização do leito de adsorventes cromatográficos. O acréscimo de interstícios pelo aumento dos vazios no leito permite a aplicação direta de uma alimentação bruta contendo suspensão de material biológico (ex: células, detritos, substratos insolúveis, etc.). A aplicação de uma tensão designada de cromatográfica média leva a formação de múltiplos estágios de adsorção das moléculas alvo sobre as partículas de adsorvente fluidizadas, devido a distribuição em camadas distintas pelo tamanho e densidade destas. Esta propriedade particular induz a formação de um leito classificado pela fluidização devido à redução da mobilidade local dos grãos de adsorvente utilizados na fluidização. A última das propriedades citadas é um pré-requisito essencial para o desenvolvimento do aumento de espaços vazios entre as partículas sólidas.

Dessa forma, partindo-se de um leito fixo e aumentando-se a vazão de fluido atinge-se uma velocidade na qual a força de arraste iguala-se ao peso das partículas, ou seja, a força de arraste iguala-se a queda de pressão em uma determinada área transversal. Então um leito fluidizado estável é formado quando as partículas adsorventes são suspensas devido ao equilíbrio entre a velocidade de sedimentação e a velocidade de fluido ascendente. Diferente da técnica de fluidização convencional, que é caracterizada pela ocorrência de mistura, resultando assim em uma baixa eficiência da ligação adsorvente-proteína, essa técnica opera em condições “suaves” de fluidização do leito, ocasionada pela

segregação das partículas adsorventes caracterizado por um baixo Re_p (Reynolds de partícula) da ordem de 0,5-1, aumentando então a eficiência da ligação adsorvente-partícula (SANTOS, 2001).

Conforme exposto por CHANG *et al.* (1993), a sequência de eventos na operação de um leito fixo e de um processo de purificação utilizando leito expandido são similares. Primeiramente, há estágio de contato entre o adsorvente e o adsorbato. Se isto ocorre em um leito expandido, é importante determinar as características de expansão do leito: como a altura do leito varia com a vazão do líquido de entrada e como esta expansão é afetada quando as soluções contendo particulados são usadas. Em segundo lugar, existe o questionamento se o processo de adsorção difere quando ocorre em um leito expandido. Este aspecto é convenientemente abordado determinando-se a curva de ruptura. Num terceiro momento, verifica-se como o processo de adsorção ocorre na presença de células.

A Figura 1 apresenta o princípio básico de adsorção em leito expandido. O leito é primeiramente estabilizado com uma solução tampão, quando isto ocorre, passa-se o caldo bruto, não clarificado, na mesma vazão em que permitiu a estabilização, depois o pistão é empurrado até o topo do leito e a eluição é iniciada.

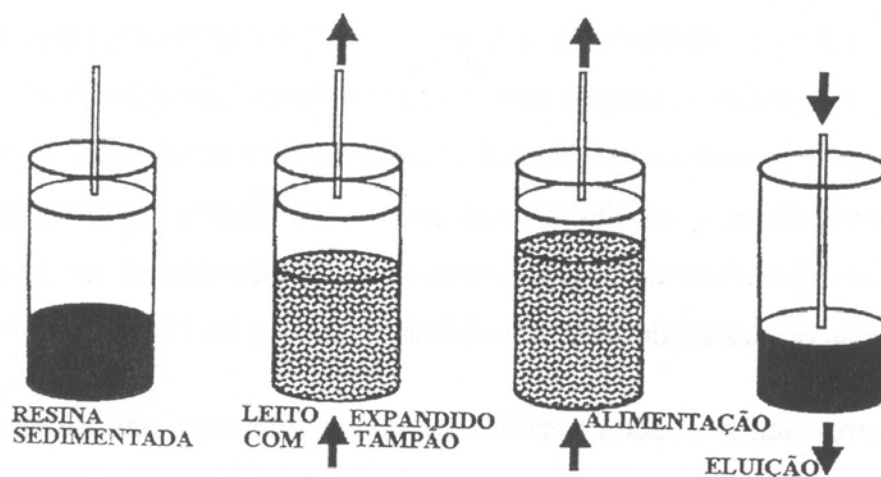


Figura 1. Princípio básico da adsorção em leito expandido, mostrando os diferentes estágios de operação (adaptada de FREJ *et. al.*, 1994).

Ainda que o descrito só seja válido para soluções livres de partículas diferentes da proteína modelo, recentes estudos evidenciaram que a fluidização pode ser bem empregada também com soluções de materiais biológicos brutos. Dependendo de alguns parâmetros do sistema, como: tipo e concentração da biomassa, características do ligante, força iônica da fase fluida e pH; podemos observar diferentes situações hidrodinâmicas durante o decorrer do processo ideal em *plug flow* até a sorção limite, onde ocorrem fluidização agregativa e caso de estagnação do meio. Contudo, a ALE no presente momento está sendo bastante estudada para que se possa caracterizar os diferentes processos a serem utilizados na recuperação de matérias de importância biotecnológica (FERNANDEZ-LAHORE *et al.*, 2001).

3.2.1 – Aplicações da adsorção em leito expandido

A enzima inulinase produzida de *Kluyveromyces marximianus* ATCC 16045 foi purificada por cromatografia em leito expandido utilizando as resinas de troca iônicas Streamline SP em trabalho realizado por KALIL (2000). No grau de expansão correspondente a duas vezes a altura do leito fixo, a recuperação da atividade alcançou 74% e o fator de purificação da enzima foi de 10,4, com relação ao caldo bruto. Ela apresentou como vantagem maior do uso deste método sobre os demais métodos cromatográficos, a ausência de passos de pré-purificação do caldo bruto, pois a expansão do leito evita a formação de torta na base do leito adsorvente, a qual obstruiria a passagem deste líquido. SANTOS (2001) purificou quitosana produzida por *Bacillus cereus* utilizando a adsorção em leito expandido com as resinas Streamline® SP e Streamline® DEAE. A recuperação da quitosana chegou a 67,4% com fator de purificação de 7,6.

Em seu trabalho Chang e colaboradores (CHANG *et al.*, 1994) purificou a glicose, 6-fosfatodehidrogenase produzida a partir de um meio fermentativo contendo *Saccharomyces cerevisiae*. O material biológico foi bruto bombeado diretamente para a coluna de adsorção em leito expandido contendo o adsorvente STREAMLINE™ vermelho H-E7B com altura do leito fixo de 20 cm, com velocidades de fluxo variando entre 20 a 280 cm/h e expansão do leito entre 2 a 4 vezes o valor da altura do leito fixo. Estes utilizaram dois padrões para fluidizar o meio: o tampão fosfato 0,05 M pH 6,0 e uma solução de glice-

rol a 25% no mesmo tampão fosfato anterior, sendo que este segundo propiciou uma maior expansão do leito, um fator de purificação de 12 vezes e uma recuperação de 86% da enzima alvo, após eluição em duas fases: a primeira com 10 mM de NaCl em 0,1 M de TRIS/ HCl pH 8,0 e a segunda com 2 M da NaCl em 0,1 M TRIS/ HCl pH 8,0.

A recuperação de albumina de soro bovina (BSA) de meio contendo lisoenzima e células de processos fermentativos foi estudada em leito expandido utilizando como adsorventes o STREAMLINE DEAE e este com uma camada de cobertura leve de ácido poliacrílico (PAA), em experimentos separados, ambos processados em uma coluna de 15 cm de altura por 1 de diâmetro. O volume de adsorvente utilizado foi de 5 mL, com velocidades lineares variando entre 52 a 250 cm/h, sendo utilizado como padrão de fluidização a solução de 20 mM de TRIS/ HCl pH 7,5 e para a eluição utilizou-se este juntamente com uma solução de 0,2 M de NaCl. Como resultado obtido, eles perceberam que a adsorção do BSA em STREAMLINE DEAE com a cobertura de PAA é maior que no STREAMLINE DEAM sem esta cobertura, chegando a 98,9 % de adsorção desta proteína, contudo a desorção no primeiro é baixa e reduz o índice de purificação, enquanto que no segundo este alcançou aproximadamente 100 %, caracterizando-o como o melhor adsorvente a ser utilizado na recuperação da BSA, para este caso (DAINIYAK *et al.*, 2002).

A recuperação do ácido láctico por adsorção em leito expandido foi estudada por Sosa e colaboradores (SOSA *et al.*, 2001) utilizando resina trocadora de íons Amberlite IRA-400 em colunas de 20 e 25 cm de altura e 1,0 e 2,5 cm de diâmetro interno. O ácido láctico foi produzido por *Lactobacillus casei* CRL686 em um bioreator contendo meio fermentativo a 40 °C e pH 5,5 com tampão amoniacal. A alimentação de material biológico proveniente deste bioreator passou por um pré-tratamento para eliminação do íon NH^+ do meio pela elevação do pH para 8,0 com NaOH 1,25 M e posterior aquecimento para facilitar a precipitação deste íon sob a forma de sal orgânico, já que este é tido como interferente no processo de adsorção. Estes variaram a massa do adsorvente nas colunas de forma que encontraram na coluna na menor coluna contendo 2,0 g de resina o melhor resultado de recuperação após a eluição do material adsorvido com solução contendo íons cloreto, 87,2 % do ácido láctico recuperado.

Num estudo sobre a aplicação de processos contínuos usando colunas associações de adsorção em leito expandido na purificação de insulina foi feita a comparação de sua eficiência com os outros processos de ALE. Utilizaram-se dez colunas de 30cm x 7,8 cm, com uma média de 15,0 g do adsorvente Sephadex G50, tempo de retenção médio de 28,8 min e número de pratos teóricos entre 371 a 670 em cada coluna. Os resultados apresentados levaram a conclusão que 99 % da insulina foi recuperada com uma pureza de 99,9 % e que este modelo apresentou como vantagem, com relação aos modelos tradicionais de ALE, um aumento de 10 % na recuperação em processos contínuos e 400 % com relação aos processos em batelada e uma redução no consumo de eluente de 72 % (XIE *et al.*, 2002).

O estudo de adsorção em leito expandido para a recuperação de Annexin V recombinante de meio fermentado por *Escherichia coli*, não clarificado foi feito por FREJ *et al.* (1994), através de testes de otimização em escala laboratorial, utilizando resina STREAMLINE® DEAE. A avaliação da eficiência de recuperação de annexin V foi feita através do rendimento, expresso como porcentagem de Annexin V na eluição pelo produto na alimentação. Os autores obtiveram um rendimento maior que 95%. As células foram separadas após fermentação, estocadas a -70°C e ressuspensas na concentração desejada e só então homogeneizadas. Os autores estudaram o efeito da concentração celular e da viscosidade no desempenho da expansão do leito.

3.2.2 – Estudo de hidrodinâmica em colunas de ALE

Em adsorção em leito expandido, como em qualquer outro estudo de fluidodinâmica deve-se atentar para a sedimentação e a fluidização do material particulado para que se possam obter as condições ideais de operação do leito expandido. Em 1954, RICHARDSON e ZAKI estudaram o comportamento de vários tipos de materiais e chegaram à equação que relacionava a velocidade do fluido (U) e a velocidade terminal da partícula (U_t) com a porosidade do meio (ϵ), descrita por:

$$\frac{U}{U_t} = \epsilon^n \quad (3.3)$$

Onde n é o índice de Richardson-Zaki ou índice de expansão é uma função do número de Reynolds terminal (Re_t).

$$Re_t = \frac{d_p \rho_L U_T}{\mu} \quad (3.4)$$

Para o regime de Stokes, onde $Re_p < 0,1$, a velocidade terminal de uma partícula isolada (U_T) é dada por:

$$U_T = \frac{g \cdot d_p^2 (\rho_p - \rho_L)}{18\mu} \quad (3.5)$$

Como Re_p é dado por:

$$Re_p = \frac{d_p \rho_L U}{\mu} \quad (3.6)$$

Em situações onde $n \ll \text{diâmetro da coluna}$, pode-se considerar as seguintes correlações para encontrar n em função de Re_t , dadas abaixo:

$$\text{Se } Re_t \text{ se encontrar entre } 0,2 \text{ e } 1, \text{ considerar: } n = 4,35 Re_t^{-0,03} \quad (3.7)$$

$$\text{Se } Re_t \text{ se encontrar entre } 1 \text{ e } 500, \text{ considerar: } n = 4,45 Re_t^{-0,1} \quad (3.8)$$

$$\text{Se } Re_t \text{ for maior que } 500, \text{ considerar: } n = 2,39 \quad (3.9)$$

A massa específica da partícula (ρ_p) é a massa (m_p) por unidade de volume da mesma (V_p), enquanto que o volume do leito (V_L) é obtido pela multiplicação da área da secção transversal da coluna (A_T) pela altura do leito (H) e assim, a porosidade do leito (ε) pode ser dada por:

$$\varepsilon = 1 - \frac{V_p}{V_L} = 1 - \frac{V_p}{A_T H} = 1 - \frac{m_p}{\rho_p A_T H} \quad (3.10)$$

Sendo assim, ao linearizar-se a equação 3.3, obtém-se uma forma de determinar experimentalmente a velocidade terminal da partícula (U_T) e o coeficiente de Richardson-Zaki (n), conhecendo-se a porosidade do meio e a velocidade do fluido (U).

$$\ln U = \ln U_T + n \cdot \ln \varepsilon \quad (3.11)$$

O grau de expansão é um número adimensional que relaciona a altura do leito após a expansão (H) com a altura do leito fixo de adsorventes (H_0) para uma determinada velocidade linear do fluido. Este é sem dúvida o método mais prático e mais utilizado na caracterização dos leitos expandidos (PESSOA JUNIOR e KILIKIAN, 2005, SANTOS, 2001):

$$\text{Grau de Expansão} = \frac{H}{H_0} \quad (3.12)$$

Para avaliar a viabilidade técnica da ALE para um determinado processo de recuperação pode-se valer de um método simples de quantificação das limitações das potencialidades hidrodinâmicas que podem surgir através da interação da biomassa com o adsorvente. O procedimento é baseado no estudo da performance da distribuição do tempo de residência (DTR) durante o emprego do licor de processo bruto o qual fornece uma percepção da situação hidrodinâmica antes das condições reais de processamento.

Distribuição do tempo de residência (DTR) é um parâmetro de grande importância no estudo da hidrodinâmica em sistemas fluidizados, pois este leva ao conhecimento do comportamento do mesmo, se este se encontra em regime empistonado (*plug flow*), de mistura perfeita (*back mixing*), ou intermediário. O conhecimento do regime é de grande importância, pois ele influencia no comportamento cinético de adsorção e levam a uma avaliação da possibilidade de aplicação do leito na recuperação das moléculas alvo.

A medida dos DTRs em ALE, entretanto, é complicada devido a presença de material biológico particulado que impedem o uso do traçadores que absorvem na região do visível, tal como a acetona. As interferências surgidas pelas partículas contidas no licor de processo requerem a identificação (localização) das substâncias que: (1) não interajam entre ambas as substâncias da matriz cromatográfica e do licor de processo e (2) que sejam de fácil detecção entre as partículas originárias da suspensão biológica de proteínas (ex: cultura em caldo). Em recente estudo foi descrito com sucesso o uso da fluorescência molecular na recuperação do triptofano como reguladora destas restrições. Contudo o nível máximo de detecção compatível com o método foi de 7 a 8 % de biomassa em peso úmido. No entanto, a biomassa contida em soluções estoque para processamento industrial é freqüentemente superior a este valor, o que leva a necessidade de aplicação de sensores óp-

ticos (FERNÁNDEZ-LAHORE *et al.*, 2001).

A DTR é comumente obtida a partir de técnicas de estímulo e resposta, como as de pulso e frontal. A DTR é normalmente caracterizada de números adimensionais como o Peclet (Pe) ou de Bondenstein (Bo) representado pela Equação 3.13. A partir da técnica de pulso com sinal negativo e da comparação das variâncias de modelos de dispersão axial em tanques em série, encontra-se os valores do coeficiente de dispersão axial (D_{axial}) e o número de pratos teóricos (N), como segue na equação abaixo:

$$Pe = \frac{H.U}{D_{axial}} \quad (3.13)$$

$$N = \frac{U.H}{2.\varepsilon.D_{axl}} \quad (3.14)$$

A Figura 2 descreve a forma gráfica de determinação do tempo de residência pela técnica frontal. Esta figura é a curva gerada pela passagem do traçador na coluna cromatográfica. Os passos seguintes são usados nesta determinação:

- 1) O leito cromatográfico é fixado em uma determinada altura e velocidade linear;
- 2) Alimenta-se a coluna com a solução contendo o traçador e aciona-se o cronômetro;
- 3) Mede-se a absorbância gerada pelo traçador na saída da coluna até que a absorbância retorne ao seu valor mínimo;
- 4) Monta-se a curva gerada pela absorbância versus o tempo de corrida, obtendo-se assim uma figura semelhante à Figura 2.

O sinal positivo é tido como a região formada pelo traçador antes de se alcançar a leitura máxima no detector (100% da absorbância), a partir deste é que se iniciam os cálculos no papel, e ao tempo referente a este valor de absorbância máxima chamamos de tempo inicial (tempo de referência), ao se seguir o fluxo se observa que a curva retorna ao valor da resposta de absorbância inicial (0% de absorbância), esta faixa da curva é chamada de sinal negativo. A partir destes dados define-se:

- a) O tempo de residência médio (t), como sendo a distância no papel entre a leitura do tempo inicial até que este alcance a metade desta leitura (50% de absorvância);
- b) O desvio padrão (σ) que é tido como sendo a metade da distância entre os pontos de leitura 15,85 e 84,15 %;
- c) E com estes obtêm-se o número de pratos teóricos pela equação 3.15 (FERNANDEZ-LAHORE *et al.*, 2001; SANTOS, 2001).

$$N = \frac{t^2}{\sigma^2} \quad (3.15)$$

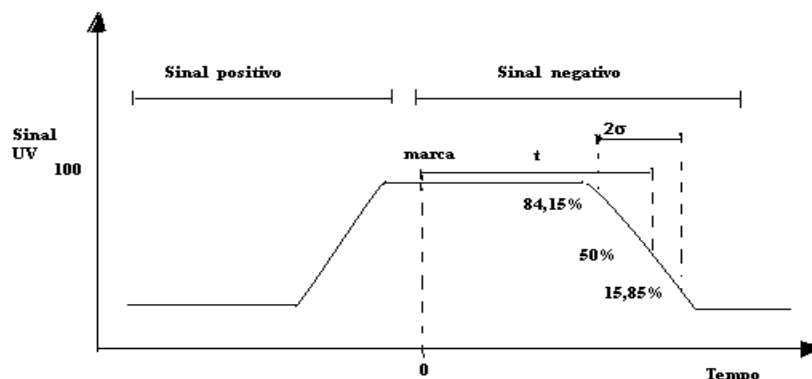


Figura 2. Esquema de determinação do tempo de residência em adsorção em leito expandido (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1997)

2.3 – O amido e suas fontes naturais

O amido é denominado por α -1,4 glicano (ou glucano) e é composto quimicamente por duas moléculas enroladas em espiral, mas separáveis, de glicanos, estruturalmente diversos: amilose, polímero linear da glicose, no qual as unidades piranosídicas desta última estão ligadas como α -1,4; constitui essa fração 20 a 26 % da molécula do amido, conforme a matéria-prima natural que a contém; amilo-pectina, polímero ramificado, no qual as unidades piranosídicas também estão em sua grande maioria como α -1,4; porém há

4 a 5 % de ligações α -1,6, o que confere à estrutura uma ramificação tipo arborescente.

O amido é, depois da celulose, o carboidrato mais encontrado na natureza, sendo encontrado principalmente no milho, no arroz, no trigo e na mandioca. O milho (*Zea mays* L.) é utilizado tanto para fins industriais (amidos modificados) e *in natura* (consumo humano e animal) (REGULY, 1996). Estes possuem composição aproximada indicadas na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1. Composição aproximada do grão de milho.

Parâmetros	Valores (%)
Umidade	12,0 - 13,5
Amido	58,0 - 65,0
Açúcares redutores	2,5 – 5,0
Proteína	9,5 - 12,5
Gordura	3,9 - 6,0
Celulose	2,0 - 4,7
Cinzas	1,3 - 2,7

Fonte: REGULY (1996).

Os estados brasileiros de maior produção de milho são Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Bahia. Existem centenas de variedades de milho disponíveis no mercado de sementes no Brasil, dentre estas podem ser citadas as AGN, AGX, AL, Bandeirantes, BR, BRS, CATI, Comum, Cruzeta, DINA, Dow, DKB, Orion, Roxo, Safrinha, Savana, SHS etc., todos com diversas cultivares diferenciadas por numeração.

No campo, em condições normais, as sementes plantadas absorvem água, incham e começam a crescer. A radícula é a primeira a se alongar, seguido pelo coleóptilo, com plumagem incluída. A rápida alongação do mesocótilo empurra o coleóptilo, em crescimento, para a superfície. Em condições de temperatura e umidade adequadas a planta emerge entre 4 a 5 dias, porem em condições de baixa temperatura e pouca umidade, a germinação pode demorar ate duas semanas ou mais. Assim que a planta expõe a extremidade do coleóptilo, o mesocótilo para de crescer.

Em síntese, a germinação ocorre apos a embebição da semente, com a conseqüente digestão das substancias de reserva, síntese de enzimas e divisão celular. No milho, não e

constatada a presença de fatores inibitórios ao processo de germinação (DANTAS, 2002; PEREIRA FILHO, 2003).

2.4 – Enzimas amilolíticas

Desde o início do século, as enzimas proteases e amilases têm sido utilizadas em processos industriais. Estas enzimas pertencem à classe designadas de hidrolases, e possuem como característica principal fazer a hidrólise de substratos, ou seja, catalisar a cisão de ligações entre moléculas fixando em um dos ramos o radical –OH e no outro o radical –H. Em relação às amilases, podemos destacar como as mais importantes em biotecnologia até o momento são as enzimas α e β amilases (CABRAL *et al.*, 2003; HALPERN, 1997; LENINGER *et al.*, 1995; RIEGEL, 2003).

2.4.1 - A α -amilase

EC 3.2.1.1; α -1,4 glicano 4-glicanohidroxilase, comumente conhecida como α -amilase, é uma grande enzima extracelular que hidrolisa aleatória, mas simultaneamente várias ligações α -1,4 não terminais de molécula de amilose, amilopectina, glicogênio e dextrinas, não atuando sobre as ligações α -1-6. Os produtos finais da hidrólise são 70 a 90%, de maltose, oligossacarídeos e dextrinas, a maioria com quatro a oito unidades de glicose, além de pequenas quantidades de D-glicose.

A α -amilase também é chamada de enzima dextrinizante e de liquefação e se encontra nos tecidos e diversos meios: saliva, pâncreas, cereais, bactérias, fungos. Sua resistência à desnaturação térmica, a qual inativa a enzima, difere conforme sua origem ou biossíntese. Algumas amilases bacterianas, de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* e *B. stearothermophilus*, têm ainda atividades ótimas próximo, aos 80°C, sendo algumas ainda ativas acima de 100°C, isto devido à presença de um íon Ca^{2+} em sua estrutura molecular. Estas possuem pH ótimo entre 5,5 a 7,0, peso molecular variando entre 20 kDa a 120kDa (DIXON and WEBB, 1971; SAID e PIETRO, 2002; WISEMAN, 1987).

O uso fundamental da α -amilase está na hidrólise do amido, inerente aos seguintes processos industriais: na indústria de panificação, no pré-cozimento de cereais, nas indústrias de fermentação para a produção de álcool e bebidas alcoólicas, na fabricação de xaropes de glicose, no preparo de gomas de dextrinas, usadas para acabamento de papéis e tecidos (DIXON and WEBB, 1971; FOGARTY and KELLY, 1979).

2.4.2 - A β -amilase

EC.3.2.1.1, α -1,4 glicano-maltohidrolase, comumente conhecida como β -amilase, é uma enzima extracelular, largamente encontrada em grãos de vegetais, degradando a amilopectina e glicogenio, hidrolisando cada segunda ligação α -1,4, mas sempre a partir dos terminas não redutores das cadeias. Estas enzimas possuem pH ótimo entre 6,5 a 7,0; com massa molar entre 20 a 50 kDa, a maioria dos seus produtos é quase sempre β -maltose, são inibidas por reagentes sulfídricos, não atuam em ligações α -1,6 e sendo assim, a hidrólise da total amilopectina não pode ser realizada pelas mesmas (DIXON and WEBB, 1967; SAID e PIETRO, 2002; WISEMAN, 1987).

A β -amilase está presente na maioria dos vegetais superiores, notadamente nos grãos de cevada, trigo, aveia, centeio e soja e só recentemente foi encontrada também em microorganismos do gênero *Bacillus circulans* e o *B. stearothermophilus* e *B. subtilis* está sendo clonado para gerar também esta enzima de 10 a 20 vezes mais que o *B. stearothermophilus* (FOGARTY and KELLY, 1979; SAID e PIETRO, 2002).

Ela é empregada no uso do malte como agente de liquefação e hidrólise de grãos e tubérculos amiláceos, ou seja, no preparo de mostos, principalmente os de cerveja e bebidas alcoólicas, reside a maior aplicação da β -amilase.

2.5 - Maltagem

O endosperma presente nos grãos de cereais contém substâncias de reservas como o amido e enzimas (amilases). Em condições especiais de temperatura e umidade, essas enzimas iniciam o processo de degradação do amido para suprir o embrião de açúcares ne-

cessários ao seu desenvolvimento, à germinação de sementes em condições controladas chamamos de maltagem (SAID e PIETRO, 2002). A maltagem é a técnica de preparo do malte, e consta de operações como: a limpeza e classificação, a maceração, a germinação e a secagem dos grãos. O processo altera os grãos e esta alteração afeta a composição dos mesmos, e estes diferem conforme o tipo de malte a ser obtido, sendo para cervejarias ou destilarias (BORZANI *et al.*, 1986).

Se for para cervejarias, que é o caso mais comum para sementes de cevada, os grãos devem ser densos, com endosperma macio e friável, sua maceração será entre 43% a 46% de umidade, após a germinação são secos a 4% de umidade em temperaturas variando de 70°C a 100°C, o que torna o malte mais escuro, reduz sua atividade enzimática, dá a cerveja uma coloração mais escura, sabor e aroma mais encorpado.

No caso do malte para destilaria, são usados grãos menores, com teor protéico mais elevado, sendo macerados na faixa de 45% a 49% de umidade, secos depois de germinados de 5% a 7% de umidade, em temperaturas variando entre 50°C a 60°C, gerando um malte de maior potencial enzimático e mais claro (AQUARONE *et al.*, 2001).

2.5.1 - Limpeza e classificação dos grãos

A limpeza é geralmente feita usando peneiras, ventiladores ou eletroímãs, isolados ou em conjunto. As peneiras e os ventiladores retiram poeira, pedregulhos, restos de plantas, insetos, sementes estranhas e quebradas e restos de animais, enquanto que o eletroímã retira resíduos metálicos. Após a limpeza, classificam-se as sementes por tamanho, para que haja uma germinação mais uniforme (AQUARONE *et al.*, 2001).

2.5.2 - Maceração

Esta tem por finalidade fornecer as sementes o teor de umidade necessário à germinação. O teor de umidade do grão após 8 horas de maceração é de 31% a 35%, necessitando de um tempo adicional de hidratação para que atinja níveis entre 45% a 46% de umidade. A água utilizada na maceração deve ter características definidas de pH e dureza, podendo ser adicionada cal (CaO), para que se atinja a alcalinidade necessária, e anti-sé-

pticos, tais como hipoclorito ou o permanganato, para que seja evitada a presença de infecções (AQUARONE *et al.*, 2001).

A quebra da dormência dos grãos é notada, quando estes começam a liberar gás carbônico, devido ao aumento da respiração, o que ocorre gradualmente com a hidratação das sementes, isto fornece suprimento de água a aleurona, fazendo com que esta sintetize as enzimas necessárias à germinação e facilite o transporte das últimas através do complexo multicelular do endosperma. A aleurona aciona todo o sistema enzimático através da produção de giberilinas naturais, cerca de 12 horas após o início da maceração. Neste período inicial, as reservas de nutrientes do endosperma, representada basicamente pela sacarose, são utilizadas para manter o processo de germinação. O embrião germina após as enzimas amilolíticas, secretadas pela aleurona, originam as modificações do endosperma. Este complexo enzimático age em seqüência para solubilizar e degradar tecidos multicelulares do endosperma, que inicialmente é rígido e aos poucos vai tornando-se friável devido à destruição da matriz protéica e dos grânulos de amido (DANTAS, 2002; SANTANA, 2003; SOUZA *et al.*, 2001).

A utilização de ácido giberílico e seus sais permite um reforço à ação das giberilinas naturais, de forma que as transformações do endosperma iniciam em períodos menores (de 6 a 8 horas) que sem este tratamento (18 horas). Normalmente são utilizadas concentrações de ácidos giberílicos e seus sais em torno de 0,25 a 1,0 mg/L na água de maceração, sendo que os melhores resultados foram obtidos ao utilizar o 0,25 mg/L por aspersão, no período de germinação das sementes (AQUARONE *et al.*, 2001).

2.5.3 - Germinação

Ao grão de cereal germinado sob condições de maltagem denominamos de malte “verde”. A duração do processo de germinação depende da velocidade com que as enzimas hidrolíticas alteram o endosperma. A faixa de temperatura empregada na germinação está compreendida entre 5°C a 25°C, com o ótimo em torno dos 15°C. Como este processo é exotérmico, há uma perda de 2% a 5% de umidade, devido ao calor liberado no processo de respiratório e ela deve ser repostada por aspersão de água. A germinação pode ser feita pelo método tradicional ou mecânico (AQUARONE *et al.*, 2001).

O método tradicional é feito em pisos de cimento, onde as sementes maceradas são espalhadas em camadas de 8 a 10 cm (podendo ser maior), constantemente revolvidas e aspergida, para se obter uma melhor aeração e reduzir as perdas de umidade, das mesmas. O tempo para que estas atinjam uma maior atividade enzimática, coincide com o tempo de paralisação da germinação das sementes, e para a cevada é percebido quando o epicótelos alcança 2 a 3 vezes o tamanho do grão (BORZANI *et al.*, 1986).

2.5.4 - Secagem

E feita para paralisar a atividade biológica da germinação, a produção de enzimas e as modificações do endosperma. O malte “verde” é seco de modo a preservar seu sistema enzimático, com temperaturas variando entre 20°C a 100°C, de acordo com o tipo de malte a ser obtido (BORZANI *et al.*, 1986; SAID e PITRO, 2002).

2.6 - Processo de secagem

A secagem de material de importância para os diversos ramos da biotecnologia (engenharias, química, bioquímica, farmacologia, etc.) constitui um verdadeiro desafio para os pesquisadores, pois a principal característica explorada destes materiais encontra-se presente, na maioria das vezes, em sua atividade biológica. Sendo assim, é na preservação (ou aumento) desta característica por um maior tempo de armazenamento que se encontra atualmente o enfoque de pesquisas para viabilizar a estocagem destes materiais por um maior tempo, e assim aumentar o tempo de viabilidade econômica destes materiais. Dentre os métodos utilizados na conservação de materiais biológicos, a secagem é o mais comum e empregado, e ela se baseia na redução da atividade de água (a_w), para evitar a proliferação de microorganismos que viriam a contaminar e deteriorar a matéria-prima (material biológico) onde se encontra a molécula alvo. Contudo, a exposição destes materiais a determinadas temperaturas por um longo tempo leva a redução ou perda da atividade dos mesmos e conseqüentemente a sua desvalorização.

A secagem, uma das operações unitárias industriais, baseada na remoção de água (ou solvente), normalmente pela ação de calor, pode ser eficazmente utilizada na conservação de materiais biológicos, particulados ou não.

No processo de secagem ocorrem transferências simultâneas de calor e massa no material, bem como entre sua superfície externa e o ambiente ao seu redor. Para tanto, a quantidade de energia necessária a ser fornecida ao material depende de sua constituição e dos níveis inicial e final de umidade.

De fato, os fenômenos de transferência de massa (água) mais pronunciados no processo de secagem são: a difusão de líquido ou vapor, e o escoamento capilar. As propriedades do material a ser seco devem ser bem conhecidas, por serem fundamentais, junto com o agente de secagem, para a maior eficiência do processo. Ademais, a secagem depende de fatores alheios, como temperatura, umidade relativa e velocidade do ar, bem como do diâmetro da partícula.

Para que se possa desenvolver um estudo do processo de secagem, é preciso lançar mão dos mecanismos de transferência de água, a qual se processa de dentro para fora do material. Tais mecanismos são descritos como:

- Transporte de vapor d'água, o qual engloba: difusões devidas ao gradiente de concentração, de Knudsen e térmica; escoamento viscoso; vaporização / condensação;
- Transporte de água líquida, influenciado por: difusões do tipo superficial e devido ao gradiente de concentração; escoamento capilar; movimento por gravidade.

Constata-se, em geral, a predominância de um mecanismo específico sobre os demais, o que não exclui a possibilidade de dois deles poderem atuar simultaneamente. No entanto, a título de praticidade matemática, recorre-se a simplificações baseadas na preponderância de certo mecanismo durante um dado instante.

Por exemplo, a difusão de Knudsen é levada em consideração apenas em situações de alto vácuo, por dar-se quando o diâmetro dos poros do material pode ser comparado ao caminho livre médio das moléculas de vapor. Já a difusão superficial de água líquida, normalmente é negligenciada no estudo da secagem por ser mais evidente sob teores de umidade muito baixos.

As curvas de dessorção são funções que relacionam a quantidade de umidade (X) em função do tempo (t), e a curva cinética de sorção de umidade, relacionando a taxa de secagem pelo conteúdo de umidade (X), e originam gráficos representativos de um processo de secagem.

Sabe-se da ocorrência de problemas nas características do material a ser seco, os quais são inerentes ao processo e devem sempre ser levados em consideração quando do estudo da aplicação de tal processo (JESUS, 2002).

Basicamente, no desenvolvimento de experimentos de secagem, o enfoque principal é voltado para o estudo:

- dos aspectos físicos e matemáticos do processo de secagem: conhecimento dos fenômenos de transporte e das propriedades termofísicas e de equilíbrio termodinâmico,, possibilitando a interpretação do processo de secagem de materiais em função do tempo.

- das alterações sofridas pelos produtos durante a secagem: fatores como a influência da secagem sobre microrganismos e seus processos metabólicos, e sobre enzimas e suas ações enzimáticas, além de conversões químicas e mudanças físicas do alimento durante a secagem determinam diretamente a qualidade final do produto.

- da otimização do processo: os secadores são selecionados e projetados de modo a fornecer a melhor combinação de qualidade e custo. Este depende principalmente da energia demandada pelo processo, a qual depende das condições de secagem e do conteúdo final de umidade.

A escassez de informações para sistemas de secagem voltados a materiais específicos, sobretudo alimentos, sob determinadas condições de operação, demandam a determinação experimental dos parâmetros que caracterizam a secagem destes, incluindo os efeitos da variação biológica, em diferentes faixas de umidade. Tais dados servem como referência na verificação da validade dos diversos modelos matemáticos existentes, contribuindo para a fundamentação dos mecanismos de inerentes à secagem (TOBINAGA e PINTO, 1992).

Dentre os maiores problemas existentes no desenvolvimento de estudos e projetos de secagem, estão à determinação e o tratamento matemático adequado das equações utili-

zadas para descrever o fenômeno. São referidas, na literatura vigente, diversas equações de secagem, das quais a maioria leva em consideração o estudo feito em leito fixo de camada fina (BARROZO *et al.*, 1994).

Os modelos matemáticos, empíricos e semi-empíricos, como forma de descrever e representar processos de secagem de materiais específicos tem sido amplamente utilizados, sendo foco de pesquisa em diversos artigos e publicações do gênero (JESUS, 2002). Mediante diversos problemas relacionados com a desidratação de alimentos sólidos, TOBINAGA e PINTO (1992) observaram os efeitos da secagem em materiais fibrosos, a partir dos músculos de peixes, alimento altamente protéico e de gordura mais leve que a carne. A potencialidade da manipulação do peixe, sob diferentes formas viáveis ao consumidor, requer um alto nível de conservação do mesmo com teores de umidade específicos. As condições ótimas do ar encontradas foram: temperatura próxima de 24 °C; velocidade por volta de 1,0 a 1,5 m/s e umidade relativa na faixa de 40 a 50%.

De posse de equações específicas para materiais orgânicos, pode-se obter suas propriedades de equilíbrio, ainda que haja restrição quanto aos domínios de validade. Sistemas específicos demandam necessariamente equações próprias que o descrevam devidamente. Isotermas de dessorção e adsorção de umidade, para sementes de *Brachiaria brizantha*, foram propostas por ZANGIACOMI *et al.* (1996). Os resultados obtidos experimentalmente foram comparados com os resultados oriundos das equações existentes na literatura, avaliando o fenômeno de histerese. O experimento foi conduzido mediante o método estático com soluções salinas saturadas, a diferentes valores de temperatura (de 25,0 °C a 50,0 °C) e umidade relativa do ar (de 11,0 % a 84,0 %). O modelo que melhor se ajustou, foi o de HENDERSON-THOMPSON, e o fenômeno da histerese foi evidenciado em todas as condições estudadas.

MANCINI *et al.* (1996) desenvolveram um estudo da secagem de soja em leito fixo e camada delgada (~40 cm), visando determinar os parâmetros de correlação linear com a umidade do grão, proposta para o coeficiente volumétrico de transferência de massa. Chegou-se à conclusão de que a correlação linear, proposta para o coeficiente volumétrico (k_{sa}), descreve satisfatoriamente o processo de transferência de massa nos grãos de soja com o referido equipamento, com desvios relativos médios abaixo de 0,1. Este mesmo mo-

delo foi testado durante a secagem de grão de milho em camada espessa em leito deslizante (MANCINE *et al.* 2002) com temperaturas variando entre 30 a 70 °C, chegando-se à conclusão que o modelo apresentou restrições na descrição do coeficiente ($k_s a$) nas faixas de umidade em que há uma forte predominância de mecanismos difusivos de transferência de massa, sendo na que para a maioria dos experimentos a correlação pode ser utilizada em programas simuladores para avaliação de desempenho de projetos de secadores de camada espessa em leito fixo ou deslizante, principalmente na secagem de produtos agrícolas.

A secagem de sementes de milho em camada fixa em secador com circulação de ar foi simulada via modelo Thompsom e de Sharaf-Eldeen. Os modelos descreveram o comportamento da retirada de umidade satisfatoriamente ficando com erros relativos médios próximos do 10,88 %, viabilizando a pesquisa, já que disponibilizou dados para o dimensionamento de secadores que serão empregados na secagem de sementes de milho (SOUZA *et al.*, 2002).

A secagem de enzimas α -amilases de em microondas foi comparada com a secagem desta mesma enzima em *spray dryer* e por liofilização em recente estudo realizado por JESUS (2002). Os resultados mostraram que a solubilidade em água e atividade enzimática do material obtido foi melhor que os encontrados para as enzimas processadas por *spray dryer* e não possuíram diferenças significativas com relação às enzimas liofilizadas, o que demonstra a validade da substituição da liofilização, pois o último torna o produto obtido de muito caro.

2.7 – Otimização por planejamento fatorial

Neste tipo de otimização, as variáveis independentes são chamadas de fatores, suas variações são chamadas de níveis e o resultado obtido, é chamado de resposta. A metodologia de avaliação do modelo é baseada na análise de variância (ANOVA) e a análise dos modelos otimizados é feita pelo método avaliação da superfície de resposta (RSM). Este tipo de otimização pode maximizar ou minimizar algumas respostas, sem fugir das especificações exigidas (BARROS NETO *et al.*, 1995 e 2001).

A análise de variância (ANOVA) é feita por parâmetros estatísticos baseados na distribuição Gaussiana para avaliar os erros dos coeficientes, o ajuste e a significância do modelo através da comparação entre os dados experimentais com os calculados. Os resultados são expressos na forma de fontes de variações quadráticas e médias, que facilitam o cálculo das porcentagens de variações explicáveis, do coeficiente de determinação e os testes F, os quais indicarão a significância e o ajuste do modelo (BARROS NETO *et al.*, 1995 e 2001).

A medida da significância do modelo é feita pela relação entre variações médias devido à regressão e devido aos resíduos (MQ_R/MQ_r). A primeira mede os desvios quadráticos médios dos valores preditos com relação aos experimentais, enquanto que a segunda representa os resíduos deixados por cada nível i deixados pelo modelo para cada resposta.

Já o ajuste dos dados ao modelo é feito pela relação entre as médias quadráticas da falta de ajuste e dos erros puros (MQ_{faj}/MQ_{ep}). A primeira estima a adequação dos dados ao modelo, enquanto que a segunda estima a variância postulada para as observações.

Todos os dois seguem uma análise estatística segundo uma distribuição Gaussiana, logo suas comparações podem ser feitas á valores do teste F, em níveis previamente estabelecidos. Para o primeiro, quanto maior que F tabelado for o valor, mais significativo é o modelo, enquanto que, o segundo este deverá ser menor que o F tabelado, para poder indicar o ajuste de dados ao modelo (BARROS NETO *et al.*, 1995 e 2001).

O coeficiente de correlação múltipla ou coeficiente de determinação (R^2) é tido como a medida da aproximação variação das observações e y_i devido à regressão à variação total em torno da média. Quanto mais próximo de um for este valor, mais explicável e mais ajustado será o modelo.

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{\sum \left(\hat{y} - \bar{y} \right)^2}{\sum \left(y_i - \bar{y} \right)^2} \quad (3.15)$$

As somas quadráticas dos desvios podem ser relacionadas segundo as equações abaixo:

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r \quad (3.16)$$

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj} \quad (3.17)$$

O cálculo dos erros padrões (ε_p) das estimativas dos parâmetros do modelo é feito através obtenção da raiz quadrada da estimativa da variância ($\hat{V}(b)$) dos elementos do vetor b , dados por:

$$\varepsilon_p = \sqrt{\hat{V}(b)} = \sqrt{(X^T X)^{-1} S^2} \quad (3.18)$$

Onde: S é o desvio padrão das repetições no ponto central. Se a metodologia empregada não for por ponto central, torna-se necessário fazer repetições em cada nível, assim obter um desvio padrão para cada nível e com isto seus erros padrões serão dados por seus desvios padrões quadrados utilizados na equação dos erros padrões.

A metodologia de avaliação da superfície de resposta é baseada na análise da equação de otimização plotada em três dimensões, onde os eixos das abscissas e o das ordenadas são formados pelos dados dos fatores, enquanto que a altura é dada pelos valores experimentais da resposta. Nesta superfície pode-se verificar através de curvas de níveis, que delimitam regiões de auge e declive, com tonalidades de cores diferentes para facilitar a interpretação do resultado da otimização. (BARROS NETO *et al.*, 1995 e 2001).

4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P. -Å. *Partition of cell particles and macromolecules*. 3ª ed., New York: John Willey, 1986.

ALMEIDA, M. S. e KURTENBACH, E. *Como purificar proteínas*, Texto capturado via <http://www.icb.ufrj.br>, julho de 2002.

AQUINO NETO, F. R. e NUNES, D. S. S. *Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins*. 1ª ed., Rio de Janeiro: Interciência, 2003, 192p.

ASCAR, J. M. *Alimentos: Aspectos Bromatológicos e Legais. Analise Percentual*. Vol.01. 1ª Ed. UNISINOS Editora. São Leopoldo – RS - Brasil. 1995, p243-252.

AGUILAR, G.; MORLON-GUYOT, J.; TREJO-AGUILAR, B; GUYOT, J. P. (2000) Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 406–413, 2000.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. *EBA HANDBOOK: Principles and Methods*, Uppsala, IBSN 91-630-5519-8, 1997, 160p.

AMRITKAR, N.; KAMAT, M.; LALI, A. Expanded bed affinity purification of bacterial α -amylase and cellulose on composite substrate analogue-cellulose matrices. *Process Biochemistry* 39, 565-570, 2004.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. & SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial: Biotechnologia na Produção de Alimentos*. V. 04, 1ª Ed.. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001, 528p.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R. E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*, Vol, 1, 1ª edição, Série Manuais, Campinas-SP: EDUNICAMP, 1995, p 302.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R. E. *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. Coleção Livros - Textos, Vol,1, 1ª ed., Campinas-SP: EDUNICAMP, 2001, 406p.

BARROZO, M. A. S.; SARTORI, D. J. M.; FREIRE, J. T. Secagem de grãos em camada fina. Um estudo sobre as equações de secagem. *Rev. Brasil. Eng. Quím.*, V. 16, p 9-15, 1994.

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

BEN ALI, M.; MHIRI, S.; MEZGHANI, M.; BEJAR, S., Purification and sequence analysis of the atypical maltohexose-forming α -amylase of the *B. stearothermophilus* US 100. *Enzyme and Microbial Technology* 28, 537-542, 2001.

BERNARDO, A. *Determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos para a cristalização de proteínas a partir da dissolução e do tempo de indução*. Campinas-SP, Faculdade de Engenharia Química. UNICAMP, 2002, 93p. (Dissertação de Mestrado)

BLAZUS, J. P. M.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R.; JORDÃO, E., Partição das enzimas α e β -amilases numa coluna de extração de palhetas rotativas em sistema bifásico aquoso contendo PEG 4000/CaCl₂. 16º Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Santos-SP. (CD) *Anais do XVI COBEQ*, Santos-SP, 2006.

BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N., Fenômenos dos transportes. 2ª ed. Tradução: A. S. TELLES, C. RUSSO, R. P. PEÇANHA, V. CALADO. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos ltda, 2002, 842p.

BLÁSQUEZ, G. CAMACHO, F.; GONZÁLEZ-TELLO, P. and ALARCÓN, F. J., Partition coefficients of α -amylase in aqueous two-phase systems PEG+MgSO₄.7H₂O at 298 K, *Biochemistry et Biophysical Acta*, 1379: 191-197, 1998.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A. e SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*, Vol.2, 1ª Ed.. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001.

BORZANI, W.; AQUARONE, E. & LIMA, U. A. *Biotechnologia: Tecnologia das Fermentações*, Vol.1, 3ª Reimpressão, São Paulo: Edgard Blucher ltda, 1986.

BORZANI, W.; AQUARONE, E. & LIMA, U. A., *Biotechnologia: Engenharia Bioquímica*, Vol.03, São Paulo: Edgard Blucher ltda, 1975.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein, Utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal, Biochem*, 72, 248-254, 1976.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R., GAMA, M. *Engenharia enzimática*. 1ª ed., Lisboa-Portugal: Lidel, 2003, 162.

CARVALHO, A. V.; GARCIA, N. H. P. & WADA, J. K. A. Caracterização Físico-Química e Curvas de Solubilidade Protéica de Sementes *In Natura*, Amêndoas Fermentadas e Torradas de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). *Anais do XVII CBF - Tecnologia de Alimentos*. Encontrado no site: www.ufpel.tche.br/sbfruti/anais_xvii_cbf/tecnologia_de_alimentos/791.htm. maio de 2005.

CHANG, Y. K.; MCCREATH, G. E. and CHASE, H. A. Purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenate using expanded bed adsorption (EBA) with STREAMLINE™ red H-E7B, *Advances in Bioprocess Engineering*. E. Galindo and O. T. Ramirez (Eds), Netherlands: Kluwer Academics Publisher, 1994, 519-525.

CIOLA, R. *Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC*. 1ª ed., 2ª reimpressão, São Paulo: Edgard Bluck, 2003, 182p.

CORTEZ, E. V. and PESSOA JUNIOR, A. xylanase and β -xylosidase separation by fractional precipitation. *Process Biochemistry* 35, 277-283, 1999.

CRUZ, A. B. *Lípase de farelo de arroz: extração, imobilização e aplicação*. Campinas – SP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000, 104 p. (Dissertação de mestrado)

DAINIAK, M. B.; GALAEV, I. Y.; MATIASSEN, B. Directed capture of product from fermentation broth using a cell-repelling ion exchanger. *Journal of Chromatography A*, 942, 123-131, 2002.

DANTAS, B. F. *Atividade amilolítica e qualidade de sementes de milho (Zea mays L.) submetidas ao alagamento*. Botucatu-SP, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2002, 75p. (Tese de Doutorado)

DAVEY, R. Crystallization: separation at molecular and supramolecular levels. In: *Separation technology: the next ten years*. John Garside (ed.). London: Institution of Chemical Engineer, 1994, p.73-95.

DIXON, M. and WEBB, E. *Enzymes*, second edition, sixth impression, by Spottiswood, Ballantyne co, Ltd, London and Colchester, ed, Longmans and co, ltd, London, Great Britain, 1971, 950p.

DUEDAHL-OLSEN, L.; KRAGH, K. M.; ZIMMERMANN, W., Purification and characterization of a malto-oligosaccharide-forming amylase active at high pH from *Bacillus clausii* BT-21. *Carbohydrate Research* 329, 97-107, 2000.

FERNADEZ-LAHORE, H. M.; LIN, D.-Q.; HUBBUCH, J. J.; KULA, M.-R. and THOMMES, J. The use of ion-selective electrodes for evaluating residence time distributions in expanded bed adsorption systems, *Biotechnology Progress*, 17, 1128 – 1136, 2001.

FOGARTY, W. M. and KELLY, C. T. *Topics in Enzyme and Fermentation, Biotechnolog*, V. 3, Chichester, G, Howood- J, Wiley & Sons, 1979.

FREIRE, J. T e SARTORI, D. J. M. Secador – Transportador Tipo Esteira. Processo de Secagem e Qualidade do Produto. 25º Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, São Carlos – SP. Anais do XXV ENEMP Vol. II, São Carlos – SP, p 475-479, 1998.

FREJ, A-K. B.; HJORTH, R., HAMMARSTRÖM, A. Pilot scale recovery of recombinant Annexin V from unclarified *Escherichia coli*, homogenate using expanded bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 44, p. 922-929, 1994.

FURUYA, T.; YAMADA, S.; ZHU, J.; YAMAGUCHI, Y. IWAI, Y. & ARAI, Y. Measurement and correlation of liquid-liquid equilibria and partition coefficients of hydrolytic enzymes for DEX T500+PEG20000+water aqueous two-phase systems at 20°C. *Fluid phase Equil.* 125: 89-102, 1996.

FURUYA, T.; IWAI, Y.; TANAKA, Y.; UCHIDA, H., YAMADA, S. & ARAI, Y. Meas. and correl. of part. coef. of hyd. enz. for dextran+poly(ethylene glycol)+water ATPS at 20°C. *Fluid phase Equil.* 110: 115-128, 1995.

GU, Z. and GLANTZ, C. E. Aqueous two-phase extraction for protein recovery from corn extracts. *Journal of Chromatography B* (2006), doi: 10.1016/j.jchromb.2006.07.025.

GUEDES, A. M. M. AND FARIAS, L. J. G. Determinação da constante de secagem de urucum (*Bixa orellana* L.) em secador convectivo de leito fixo. *Rev. Brasil. Prod. Agroind.*, 2, 1, 73-86, 2000.

HALPERN, M. J. *Bioquímica*, 1ª ed., Lisboa-Portugal: editora Lidel, 1997.

HARSA, S. and FURUSAKI, S., Chromatographic separation of amyloglucosidase from the mixture of enzymes. *Biochemical Engineering Journal* 8, 257-261, 2001.

HENDERSON, J. M. and HENDERSON, S. M. A computational procedure for deep-bed drying analysis. *J. Agric. Eng. Res.* 13, 87-95, 1968.

JESUS, S. S. *Desenvolvimento e análise do processo de secagem de α -amilase por microondas a vácuo*. Campinas – SP, Faculdade de Engenharia Química – FEQ/UNICAMP, 2002, p. 162. (Tese de Doutorado)

KALIL, S. J. *Produção de ilunilase por Kluyveromyces marxianus e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido*. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2000, 132p. (Tese de Doutorado)

KAMIMURA, E. S., Modelagem e simulação do processo de purificação de lipase por cromatografia de afinidade. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2000, 132p. (Tese de Doutorado)

LANCKRIET, H. and MIDDELBERG, A.P.J. Continuous chromatographic protein refolding. *Journal of Chromatography A*, 1022, 103–113, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. and COX, M. M. *Principios de Bioquímica*. 2ª edição, Tradução: Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. São Paulo-SP: Sarvier editora de livros médicos ltda, 1995.

LIMA, U. A. BORZANI, W. AQUARONE, E. & SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos*, Vol, 03, 1ª ed, São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001, 598 p.

LEWIS, W. K. The rate of drying of solids materials. *Ind. Eng. Chem.* 5, p 427-432, 1921.

LOPES, F. L. G. *Recuperação da bromelina a partir da polpa do Ananas comosus L. Merrill, utilizando processos de separação por membrana*. Campinas – SP, Faculdade de Engenharia Química, FEQ/UNICAMP, 2005, 157p. (Tese de Doutorado)

LUCCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR., A. Precipitação. In: *Purificação de produtos biotecnológicos*. A. PESSOA JR. & B. V. KILKIAN (Coord.). Vol.1. Barueri-SP: Ed. Manole, 2005, 89-113.

MANCINI, M. C.; CALÇADA, L. A.; HENRIQUES, A. W. S.; PEÃO, G. F. R. Secagem de soja em leito fixo. 11º Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Rio de Janeiro – RJ. Anais do XI COBEQ, p. 289-303, 1996.

MANCINE, M. C.; MASSARANI, G.; BISCAIA Jr., E. C. Transferência de massa na secagem de milho em secadores de camada espessa em leitos fixo e deslizante. *Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra*, Suplemento, V. 21, n. 01, 121-129, 2002.

MALLEVIALLE, J.; ODENDAAL, P. E.; WIESNER, M. R. *Tratamiento del agua por procesos de membrana: principios, procesos y aplicaciones*. New York: McGraw-Hill, 1998.

MELO, A. M. S.; DOS SANTOS, L. D.; SOARES, I. S., A cristalização e a recristalização: uma forma de conhecer os cristais. *Química Moderna on line*. Pesquisado no site: <http://www.moderna.com.br/artigos/quimica/0042>, setembro, 2004.

MENDU, D. R.; RATNAM, B.V.V.; PURINIMA, A. AYYANNA, C. Affinity chromatography of α -amylase from *Bacillus lincheniformis*. *Enzyme and Microbial Technology* 31:7, p.712-717, 2005.

MOHAMED, M. A. Purification and characterization of α -amylase from the infective juveniles of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, 139, p.1-9, 2004.

MORITA, T. e ASSUMPÇÃO, R. M. V. (Eds.), *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes, Padronização–Preparação–Purificação*. 2ª ed., São Paulo-SP: Edgard Blücher Ltda, 1986.

MORRIS, J. G. Cinética de Reações Catalisadas por Enzimas. In: *Físico-química para biólogos*. 1ª ed., São Paulo-SP: Ed. Polígono, EDUSP, 1972, p 323 - 367.

MULLICK, A. and FLICKINGER, M. C. Expanded bed adsorption of human serum albumin from very dense *Saccharomyces cerevisiae* suspensions on fluoride-modified zirconia. *Biotechnology and bioengineering*. 65, 65, 282-290, 1999.

NCUBE, I; ADLERCREUTZ, P.; READ, J. Purification of rape seedling lipase and its use in organic media. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 17, 327-336 1993.

NIRMALA, M. and MURALIKRISHNA Three α -amylases from malted finger millet (ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15) purification and partial characterization. *Phytochemistry*, 62, 21-30, 2003.

REGULY, J, C, *Biotecnologia dos Processos Fermentativo. Produção de enzimas – Engenharia das fermentações*, Vol.3, Pelotas-RS: EDUFPeL, 2000, 230p.

REGULY, J, C, *Biotecnologia dos Processos Fermentativo. Fundamentos – Matérias Primas Agrícolas – Processos e Produtos*. Vol.1, Pelotas-Rs: EDUFPeL, 1996, 330p.

RICARDO, C. P e TEIXEIRA, A. *Enzimas*. 4ª Edição, Lisboa – Portugal: Plátano Editora S.A., 1993, 98p.

RICHARDSON, J. F. & ZAKI, W. N. Sedimentation and fluidization: Part I, *Tran, Inst, Chem, Engs*, 32, 35-53, 1954.

RIEGEL, R. E. *Bioquímica*, 3ª ed., São Leopoldo –RS: EDUnisinos, 2003, 79-80p.

ROY, I. PAI, A. LALI, A.; GUPTA, M. N. Comparison of batch, packed bed and expanded bed purification of *A. niger* cellulase using cellulose beads. *Bioseparation* 8: 317-326, 1999.

PEREIRA FILHO, I. A. (org.) *O cultivo do milho-verde*. Brasília-DF: EMBRAPA informações tecnológicas, 2003, 210p.

PESSOA JUNIOR, A. e KILIKIAN, B. V. *Purificação de produtos biotecnológicos*. 1ª ed., Barueri-SP: Editora Manole Ltda, 2005, 448p.

PETER, H. W.; AHLERS, J. e MOREIRA, R. A. *Cinética enzimática*. 1ª ed., Fortaleza – CE: EDUFC, 1987, p12-21.

SEADER, J. D. and HENLEY, E. J. *Separation process principles*. New York: John Wiley & Sons. Ltd, 1998.

SANTANA, J. C. C. *Recuperação das enzimas α e β -amilases em sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl_2 para uso como biocatalizador amiláceos*. Campinas – SP, FEQ/ UNICAMP, 2003, 232p. (Dissertação de Mestrado)

SANTOS, E. S., *Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção em leito expandido*, Campinas, Faculdade de Engenharia Química FEQ – UNICAMP, p 152, 2001, (Tese de Doutorado)

SARIKAYA, E. and MIKAMI, B., Purification and crystallization of α -amylases from mucoid and non-mucoid *B. amyloliquefaciens* strains. *Journal of Crystal Growth* 232, 418-420, 2001.

SAID, S. e PIETRO, R., *Enzimas de interesse industrial e biotecnológicos*. 1ª ed., Rio de Janeiro: Eventos, 2002, 124p.

SEVERO JR, J. B.; OLIVEIRA, L. S. S.; SARDEIRO, F. S.; LOPES, F. L. G.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B.; SOUZA, R. R., Recuperação das enzimas α e β amilases a partir do malte de milho (*zea mays*) por microfiltração tangencial. 16º Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Santos-SP. (CD) *Anais do XVI COBEQ*, Santos-SP, 2006.

SIGMA CHEMICAL COMPANY, CATALOGE., *Biochemicals organic compounds and diagnostic reagents*, 1996, p.116-117.

SILVA JR., J. G., *Eletroforese de proteínas: Guia teórico-prático*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2001, 130p.

SILVA, M. R. O.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; SOUZA, P. M.; CORREIA, J. MOTTA, C. S.; MORREIRA, K. A.; PORTO, A. L. F. P; LIMA FILHO, J. L. Estudo de Métodos de Extração de protease Termotável produzida pelo *Penicillium aurantiogriseum*. 14º Simpósio Nacional sobre Fermentação, Florianópolis-SC, 2003. (CD) *Anais do XIV SINAFERM*, Florianópolis-SC, 2003.

SLEIMAN, M. e VENTURI FILHO, W. G. Utilização de extratos de malte na fabricação de cervejas: Avaliação físico-química e sensorial. *Brazilian Journal of Food Technology* 7, 2, 145-153, 2004.

SOSA, A. V.; CÓRDOBA, P. R. and PEROTTI, N., Fluidized bed design parameters affecting novel lactic acid downstream processing. *Biotechnology Progress* 17, 1079 – 1083, 2001.

SOUZA, C. M. A.; DE QUEIROZ, D. M.; LACERDA FILHO, A. F., Simulação do processo de secagem de sementes de milho em camada fina. *Scientia Agrícola* 59, 4, 653-660, 2002.

SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C. e CHAVES, A. C., Estudo da Atividade Enzimática na Germinação de Sementes de *Zea mays*. Livro de resumos do XX Congresso de Microbiologia, Foz do Iguaçu, Rio Grande do Sul, Brasil, 2001.

STREETER, V. L., *Mecânica dos fluidos*. Tradução de: Celso da Silva Muniz. *et al.* São Paulo: Mcgraw Hill, 1977, 736p.

TABOADA, O. W. M., Purificação de lipases de *Geotrichum sp.* Por resinas cromatográficas de interação. Modelagem, simulação e validação de parâmetros. Campinas – SP, Faculdade de Engenharia de Alimentos, FEA/UNCAMP, 1999, 152p. (Tese de Doutorado)

THOMPSON, T. L.; PEART, R. M. and FORSTER, G. H., Mathematical simulation of corn drying – A new model. *Trans. of the A. S. A. E.* 11(4), 582-586, 1968.

TOBINAGA, S. e PINTO, L. A. A. Secagem de materiais fibrosos: músculos de peixes, In: *Tópicos Especiais em Secagem*. São Carlos – SP: EDUFSCar – SP, 1992, p. 213-214.

TÜMTÜRK, H.; ÇAYAKARA, T.; KANTOGLU, O.; GÜVEN, O. Adsorption of amylase onto poly (N-vinyl 2-pyrrolidone/ itaconic acid) hydrogel. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 151, 238-241, 1999.

VAN DER WIELEN, L. A. M. Pitfalls and challenges in bioseparation process, *Advanced Course on Downstream Processing*. Delft, 1999.

VOET, D. and VOET, J. G. *Biochemistry*. 2^a Ed, Printed by John Wiley & Sons Inc. New York – USA , 1995.

VOGEL, A. I. *Análise Química Quantitativa*. 5^a edição, Revisada por G. H. Jeffery, J. Bassett; J. Mendham; R. C. Denney. Tradução: H. Macedo. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., – LTC, 1992.

WANDERLEY, K.; TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P.; ULHOA, C. J. Biochemical characterizing of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology letters*, 231, 2004, 165-169.

WANG, C. Y. and SINGH, R. P. A single layer drying equation for rough rice. *Amer. Soc. Agric. Eng.*, paper n° 78-3001, 1968.

WISEMAN, A. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Second edition, New York, EUA: edited by Ellis Horwood limited a division of John Wiley Sons, 1987.

XIE, Y.; MUN, S.; KIM, J. and WANG, N.-H. L. Standing wave design and experimental validation of a tandem simulated moving bed process for insulin purification, *Biotechnology progress*, 18, 1332 – 1344, 2002.

YAMAMOTO, S.; OKAMOTO, A. and WATLER, P. Effects of adsorbent proprieties on zone spreading in expanded bed chromatography. *Bioseparation* 10:1-6, 2001.

ZANCAN, G. T. (Org.) *Bioquímica: aulas práticas*. Departamento de Bioquímica, 6 ed, Curitiba: Editora da UFPR, 1999, 178 p.

ZANGIACOMI, C. E.; BARROZO, M. A. S.; JUNIOR. S. A.; SARTORI, D. J. M. Isotermas de dessorção e adsorção para sementes de *Brachiaria brizantha*, 11º Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Rio de Janeiro – RJ, Anais do *XI COBEQ*, 133-135, 1996.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE

AMILÁSICA DO MALTE DE MILHO (*Zea mays*)

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE AMILÁSICA DO MALTE DE MILHO (*Zea mays*)[#]

Joana Paula Menezes Biazus¹, Roberto Rodrigues de Souza¹

Departamento de Engenharia Química, CCET/ UFS, Cidade Universitária “Prof. José Aloísio de Campos”, Av. Marechal Rondon, S/N, Rosa Elze, CEP: 49000-100, São Cristóvão – SE

José Carlos Curvelo Santana, Elias Basile Tambourgi

Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos, FEQ/ UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Av. Albert Einstein, 500, Barão Geraldo, Caixa Postal: 6066, CEP: 13083-970, Campinas – SP

Este capítulo é fruto de um trabalho realizado em conjunto com o Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe, ele é composto por um artigo que está submetido à revista *Acta Scientiarum* e atualmente a segunda revisão foi re-submetida à revista. Neste é abordado um estudo detalhado da germinação das sementes de milho e posterior caracterização bioquímica das amilases do mesmo. Os resultados mostraram que na etapa de germinação a atividade enzimática nas sementes aumentou com tempo até o quarto dia de germinação, após o qual se observou uma redução da atividade enzimática, provavelmente pela geração de inibidores pela semente ou pela produção de derivados da hidrólise do amido do milho. Como se observou que o comportamento da atividade enzimática sobre influência do tempo de germinação assemelhava-se a uma curva exponencial, uma modelagem empírica, baseada na equação de crescimento de microorganismos foi testada e o modelo do $A=A_0e^{-\mu t}$ foi bem ajustado aos dados de aumento da atividade enzimática, onde A , A_0 são as atividades iniciais e após um determinado tempo de germinação das sementes do milho e μ é a taxa de geração de atividade enzimática nas sementes. A caracterização bioquímica mostrou que o malte apresenta faixa ótima de pH entre 4,3 e 6, com temperaturas ótimas de 50°C para a β -amilase e 80°C para α -amilase e os valores de K_m e V_{max} para hidrólise do amido foram, de $7,69.10^{-2}$ g/L e $7,69.10^2$ g/L.min, respectivamente.

[#]Artigo a ser publicado na *Acta Scientiarum*, foi feita a segunda revisão e atualmente está com o editor.

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE AMILÁSICA DO MALTE DE MILHO (*Zea mays*)[#]

Joana Paula Menezes Biazus¹, José Carlos Curvelo Santana², Roberto Rodrigues de Souza¹, Elias Basile Tambourgi^{2*}

¹ DEQ - CCET – UFS, Rosa Elze, São Cristóvão – SE

^{2*} Departamento de Engenharia e Sistemas Químicos, FEQ/ UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Av. Albert Einstein, 500, Barão Geraldo, Caixa Postal: 6066, CEP: 13083-970, Campinas – SP. E-mail: eliastam@feq.unicamp.br

Este trabalho objetivou estudar o processo de germinação e a caracterização da atividade bioquímica das amilases do malte de milho (*Zea mays*) para gerar uma fonte de amilase de baixo custo e boa atividade enzimática. A atividade enzimática foi monitorada todos os dias durante a germinação das sementes, para se obter a melhor condição de produção do malte. Os resultados mostraram que a atividade enzimática nas sementes foi maior no 4º dia de germinação. A caracterização bioquímica mostrou que as amilases do malte apresentam faixa ótima de pH entre 4,3 e 6, com temperaturas ótimas a 50°C e 80°C e os valores de K_m e V_{max} para hidrólise do amido foram, de $7,69 \cdot 10^{-2}$ g/L e $7,69 \cdot 10^2$ g/L.min, respectivamente.

Palavras chave: *Zea mays*, germinação, malte de milho, caracterização, α e β -amilases, atividade enzimática.

CHARACTERIZATION OF AMYLASE ACTIVITY FROM MAIZE (*Zea mays*) MALT

ABSTRACT

This work aimed to study the germination process and characterization of the amylolytic activity of the maize (*Zea mays*) malt aiming to obtain source amylases at lower cost. Enzymatic activity was monitored all days during the seed germination, for obtaining the best condition of malt production. Results showed that the enzymatic activity from maize

seeds was larger in 4th germination day. Enzymes characterization showed that the maize malt amylases have optimal zone of pH between 4.3 and 6, with optimal temperatures of 50°C and 80°C. The K_m and V_{max} values for starch hydrolysis were $7.69.10^{-2}$ g/L and $7.69.10^2$ g/L.min, respectively.

Keywords: *Zea mays*, germination, maize malt, characterizing, α and β -amylases, enzymatic activity.

1 - INTRODUÇÃO

Enzimas são substâncias de natureza protéica com atividade catalítica específica, e ainda, apresentam elevada especificidade em relação aos reagentes cujas transformações químicas catalisam (Halpern, 1997). Por serem economicamente viáveis, o emprego de enzimas em diversos setores industriais vem crescendo há vários anos. Algumas enzimas merecem destaque como, por exemplo, as α e β -amilases devido às suas amplas aplicações, como na produção de cervejas, pães, biscoitos, em indústrias têxteis, dentre outras (Jesus, 2002; Forgaty and Kelly, 1979; Wiseman, 1987).

A atividade de uma enzima pode ser determinada com base na velocidade de conversão de um reagente adequado (substrato) e está estritamente vinculada com os agentes desnaturantes, isso pelo fato da sua função catalítica depender da conformação na qual a enzima se apresenta (Riegel, 2003). A temperatura, por exemplo, é um dos agentes críticos sobre a atividade das enzimas. Quando se eleva a temperatura, a atividade aumenta, todavia o processo de desnaturação cresce devido à ação do calor (Halpern, 1997). O pH é outro parâmetro que exerce grande influência na manutenção da atividade enzimática. O efeito deste fator se dá devido a alterações no estado de ionização dos componentes do sistema, em consequência da variação da concentração de H^+ (Ricardo e Teixeira, 1993).

Aguilar *et al.* (2000) purificaram e caracterizaram amilases de *Lactobacillus manihotivorans* e obtiveram como pH e temperatura ótimos 5,5 e 55°C, respectivamente, sendo que esta enzima apresentou um ponto isoelétrico próximo de 3,8 e foi estável entre os valores de pH 5 e 6 e a temperatura de 55 °C por uma hora. Entretanto Wanderley *et. al* (2004) purificaram a α -amilase de *C. flavus* e encontraram pH e temperatura ótimos de 5,5 e 50°C, respectivamente. Nirmala and Muralikrishna (2003) purificaram e caracterizaram 3

amilases de uma variedade de milheto e detectaram atividades ótimas numa faixa de pH entre 4 a 5,5 e temperatura entre 30 a 70°C, semelhantes às amilases de cereais. Isso evidenciou uma resistência das amilases à desnaturação e que esta difere conforme sua origem ou biossíntese (Reguly, 1996).

Amilases purificadas chegam a alcançar valores comerciais próximos a US\$ 1500/g, o que torna a busca por novas fontes e processos de produção e purificação destas enzimas a custos baixos e viáveis (Biazus *et al.*, 2005). Assim, o presente trabalho objetivou estudar o processo de obtenção do malte de milho, bem como a sua caracterização quanto à sua atividade amilolítica. Para se produzir uma nova fonte de amilases e obter as suas melhores condições de emprego em processos bioquímicos.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Materiais

O secador utilizado neste trabalho foi da FENTO (São Paulo, Brasil) do tipo de bandeja, com circulação de ar. Uma balança analítica digital modelo BG 200 fornecida pela TECNAL (São Paulo, Brasil) foi usada nas medições de peso. O malte foi moído em moinho de bola, modelo BM da VIATEST (Berlim, Alemanha). As sementes de milho foram adquiridas junto à EMBRAPA (Tabuleiros Costeiro), sediada em Aracaju-SE. Os reagentes: ácido o-fosfórico PA adquirido junto a Synth (Diadema-SP, Brasil), acetato de sódio PA, ácido acético PA, ácido di-nitrosalicílico (DNS), álcool etílico PA, dextrina branca PA, iodeto de potássio PA, iodo ressublimado PA foram adquiridos da VETEC (São Paulo, Brasil) e o azul brilhante de Comassie-G foi adquirido da MERCK (Berlim, Alemanha).

2.2 - Métodos

Determinação da atividade enzimática: foi efetuada pelo método do Miles Laboratory (método do DNS) (Miller, 1959) e pelo método de Wohlgenuth modificado por Sandstedt, Kneen, Blich apresentado em Reguly (1996). Uma unidade de atividade enzimática específica (U/mg) foi definida como a quantidade de açúcares redutores (em μmol de glicose) liberada por min por mg de proteína total detectada pelo método do DNS e uma unidade SKB é o número de gramas de amido que é dextrinizado por grama de ami-

lase em uma hora (Biazus *et al.*, 2005; Reguly, 1996). Estes dois métodos são os mais empregados para a determinação da atividade amilásica e aconselhados pela FAO, sendo o primeiro, um método não específico e o outro específico para atividade da α -amilase (Reguly, 1996).

Proteína total: a determinação da concentração de proteína nas amostras foi desenvolvida pelo método de Bradford (1976).

Obtenção do malte: as sementes de milho foram selecionadas, pesadas, lavadas, postas em béquer contendo água para que estas absorvessem entre 40 a 45% de seu peso inicial em umidade. Depois as sementes úmidas foram colocadas em meio germinativo em escala laboratorial em condições ambientais de temperatura e pressão (27°C e 1 atm), por aproximadamente 4 a 5 dias. O malte foi seco na temperatura de 55°C, triturado, armazenado em sacos plásticos e guardado a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ (Biazus *et al.*, 2005; Santana, 2003). Aproximadamente 1g de mostras de sementes de milho foram coletadas diariamente, maceradas, ressuspensas em solução constituída de 0,3g de CaCl_2 e 0,6g NaCl . A atividade enzimática foi determinada usando-se o método SKB. O tempo total de monitoramento da atividade enzimática das sementes durante a germinação foi de 8 dias (Santana, 2003).

Estudo do efeito do pH e da Temperatura: para obtenção do pH ótimo, soluções de amido a 2% foram preparadas em diversos tampões: para a faixa de pH entre 3 e 4,8 usou-se o tampão acetato 0,1M, para faixa de pH entre 5 e 8 usou-se o tampão fosfato 0,1M e para a faixa de pH entre 8,5 e 10 usou-se o tampão amônio 0,1M. Todas as soluções foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Morita e Assumpção (1995) e a atividade enzimática do malte foi medida nestes valores de pH a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Para obtenção da temperatura ótima usou-se a solução de amido a 2% em tampão acetato 4,8 e as atividades enzimáticas foram determinadas nas temperaturas entre 10 e 100°C , variando-se de 10 em 10°C (Aguilar *et al.*, 2000; Nirmala and Muralikrishna, 2003; Wanderley *et al.*, 2004). O método de atividade enzimática empregado foi o do Milles Laboratory (Miller, 1959). A energia de ativação da hidrólise de amido pelas enzimas foi obtida pela regressão linear do logaritmo natural da velocidade de reação (mol/min.g de enzima) versus o inverso da temperatura (K), seguindo o método de Arrhenius (Aguilar *et al.*, 2000).

Cinética da hidrólise do amido: este estudo foi realizado a pH 4,8 e 30±2°C. Para tanto, uma solução estoque de amido a 40 g/L em pH 4,8 foi preparada em tampão acetato 0,1M, e a partir desta foram feitas as diluições. Usou-se como base matemática para obtenção dos modelos cinéticos a equação de Michaelis-Menten (equação 1).

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Onde V_{max} ($V_{máx} = k_{cat}*[E]_0$) é a velocidade máxima da reação, K_m é a constante de Michaelis–Menten, $[S]$ é a concentração do substrato, k_{cat} é a constante cinética da reação de hidrólise do amido e $[E]_0$ é a concentração total de enzimas. Seus parâmetros são encontrados pelo modelo M-M linearizado (equação 2), de acordo com Lineweaver-Burk (Halpern, 1997; Morris, 1972; Peter *et al*, 1987).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{máx}} + \frac{K_m}{V_{máx}} \frac{1}{[S]} \quad (2)$$

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Estudo da germinação das sementes de milho

Na Tabela 1, encontram-se os dados de atividade enzimática das sementes de milho durante a germinação em escala laboratorial. Foram realizados três ensaios num mesmo período com as sementes de uma mesma safra.

A Figura 1 mostra o aumento da atividade (**AE**) das amilases no decorrer 8 dias, para três ensaios com amostras de uma mesma variedade de milho, de mesma época de colheita, germinadas no mesmo período, com umidade controlada e nas condições ambientais de temperatura e pressão.

Tabela 1. Atividade amilásica durante a germinação das sementes de milho (*Zea mays*).

Tempo (Dias)		0	1	2	3	4	5	8
Atividade (SKB)	Ensaio1	0,157	0,234	2,18	5,71	21,8	6,67	5,71
	Ensaio2	0,117	0,234	2,07	5,65	24,2	8,39	7,48
	Ensaio3	0,076	0,250	1,96	5,58	26,7	10,1	8,73

Nesta Figura pode-se observar que a atividade enzimática aumentou durante a germinação em proporções semelhantes para todos os ensaios. O aumento foi lento inicialmente, aumentando exponencialmente a partir do terceiro dia, após as sementes serem postas a germinar. No quarto dia foi atingido o valor máximo de produção de enzimas tendo, a seguir, uma queda no quinto dia e a partir deste, se observa um valor praticamente constante da atividade enzimática.

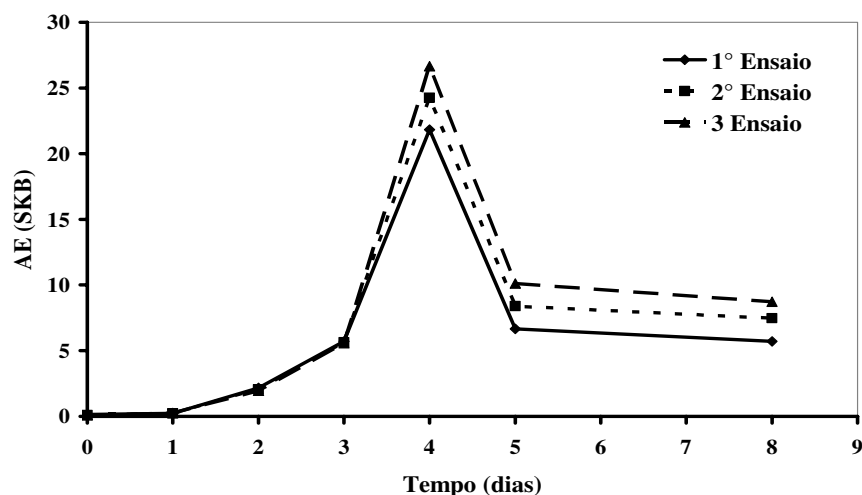


Figura 1. Atividade amilásica (*AE*) na germinação das sementes de *Zea mays* a pH 4,8 e 30±2°C, durante oito dias.

É de se esperar inicialmente uma taxa de atividade enzimática baixa nas sementes (quase que exclusivamente devido à presença das β -amilases), já que estas ainda estão em estado de dormência. Quando a água penetra na semente, facilita o transporte de glicérides (formadas pela β -amilase) e do ácido giberélico (AG) para as camadas de aleurona onde, os primeiros fornecerão energia para alimentar as células, enquanto que, o segundo ativa os genes do DNA, responsáveis pela formação das α -amilases. Com isto, percebe-se que esta geração de enzimas, a princípio, é lenta, acelerando posteriormente até que alcança seu valor máximo no quarto dia, quando a concentração de produtos gerados pelas enzimas faz com que parte destas sejam inibidas e sua atividade reduza a um valor constante (Dantas, 2002; Santana, 2003).

É perceptível quando observa-se a Figura 1 que há um comportamento semelhante a uma curva do tipo exponencial (na etapa de crescimento enzimático) do tipo $y = y_0 e^{bx}$.

Então, para provar que esta analogia é válida foram feitas as seguintes denominações: AE será a simbologia usada para a atividade enzimática (neste caso em unidade SKB); AE_0 é a atividade enzimática das sementes *in natura* ou a atividade inicial das sementes (SKB); t , o tempo de germinação das sementes (em dias); e μ_{AE} é a taxa de crescimento da atividade enzimática da semente (característica para cada variedade). Desta forma, o modelo será escrito na forma:

$$AE = AE_0 \cdot e^{\mu_{AE} t} \quad (3)$$

A partir de um ajuste exponencial dos dados de atividades enzimáticas (valores médios) da Tabela 1, foram encontrados os valores dos parâmetros AE_0 e μ_{AE} e estes estão apresentados nas equações (4), (5) e (6). Como pode ser observada, a taxa de crescimento enzimático (μ_{AE}) apresenta um valor próximo de $1,362 \text{ (dias)}^{-1}$ (0,133 de desvio, 9,8% de erro), mostrando que este valor é característico para a variedade estudada. Contudo, mesmo em amostras de uma mesma safra a atividade destas sementes no estado natural (atividade inicial, AE_0) não pode ser considerada como constante, já que seu valor médio ficou em torno de 0,110 SKB e sua variação foi de 44% (0,048 de desvio padrão), ou seja, este valor é característico das amostras, embora seus genótipos sejam parecidos.

$$AE_1 = 0,1643 \cdot e^{1,2197 \cdot t} \quad R = 0,9986 \quad (4)$$

$$AE_2 = 0,0944 \cdot e^{1,3851 \cdot t} \quad R = 0,9902 \quad (5)$$

$$AE_3 = 0,0727 \cdot e^{1,4821 \cdot t} \quad R = 0,9958 \quad (6)$$

3.2 - Efeito do pH e da temperatura

A Figura 2 mostra o efeito da variação do pH sobre a atividade das amilases de malte de milho. Os resultados permitem afirmar que a atividade amilásica foi afetada na faixa de pH estudada. Observou-se que a faixa de pH ótimo das amilases do malte de milho ficou entre 4,3 e 6,0 (máximo de atividade). Esta região corresponde a faixa de pH ótimos das α e β -amilases citadas por Aguilar *et al.* (2000), Nirmala and Muralikrishna (2003) e Wanderley *et al.* (2004). De acordo com Reguly (1996) os pH ótimos da α e β -amilases estão compreendidos entre 5,0-7,0 e 4,5-5,0, respectivamente. Após a faixa ótima de pH ocorre uma redução significativa da atividade até se estabilizar próximo dos 10% da atividade ótima. Uma provável explicação para esta diferença de comportamento parece es-

tar relacionada ao grau de ionização das moléculas e as mudanças conformacionais que podem ocorrer na estrutura protéica da enzima (Halpern, 1997; Ricardo e Teixeira, 1993).

Estes dados são de extrema importância na estratégia de purificação destas amilases, evitando a perda de atividade pelo uso de faixas de pH agressivos às enzimas e a redução da afinidade do método empregado. A faixa de pH de trabalho das amilases de malte de milho foi maior do que as do milheto estudadas por Nirmala and Muralikrishna (2003).

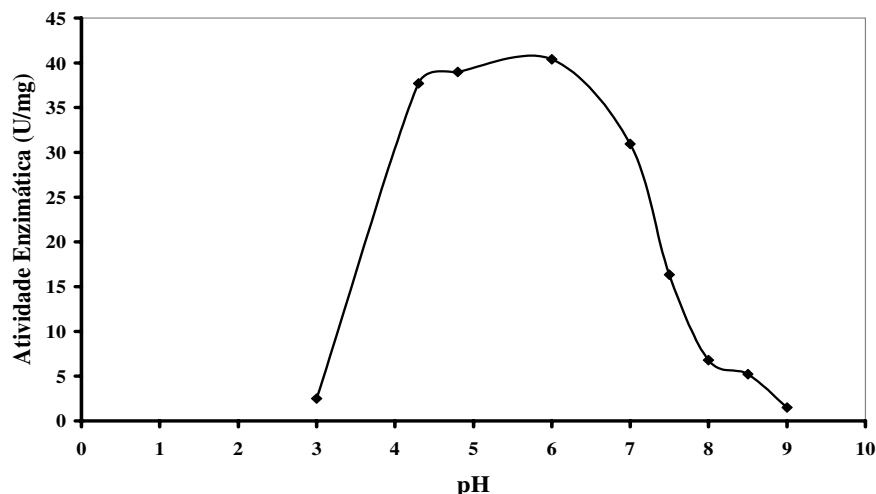


Figura 2. Efeito do pH sobre atividade amilásica do malte de milho em solução de amido a 2% e a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 10 min.

A Figura 3 descreve o perfil de atividade amilásica no malte de milho em diferentes temperaturas. Percebe-se que a atividade foi baixa e estável de 10 e 40°C . A 50°C houve uma elevação significativa da atividade, que decresceu em seguida. Isso ocorreu, provavelmente, por ter sido atingida a temperatura ótima da β -amilase do malte de milho, pois de acordo com Reguly (1996), estas enzimas apresentam temperaturas ótimas entre 50 e 57°C . A partir dos 60°C há uma queda na atividade enzimática, que é explicada pelo fato da β -amilase sofrer desnaturação acima desta temperatura (Reguly, 1996; Santana, 2003).

A seguir, percebe-se que a atividade elevou-se bruscamente após os 75°C , chegando ao seu valor máximo nos 90°C , caindo acima desta temperatura. Isto ocorre porque esta faixa de temperatura é a faixa ótima das α -amilases. Reguly (1996) relatou que existem amilases com temperaturas ótimas variando entre 70 a 100°C e até superando esta última temperatura, dependendo da origem. Nirmala and Muralikrishna (2003) obtiveram amilases de milheto germinado (malte) por cromatografia em gel. Durante a caracterização

bioquímica das frações eluidas, ele observaram que as temperaturas ótimas estavam entre 30 e 70°C, provavelmente, estas frações fossem compostas por uma mistura de β e α -amilases, já que a primeira, de acordo com Forgaty and Kelly (1979) e Reguly (1996), possui temperatura ótima bem menor que a segunda. Já Aguilar *et al.* (2000) e Wanderley *et al.* (2004) relataram valores mais baixos de temperatura ótima para a α -amilase. Em processos industriais, o amido é comumente hidrolisado a temperaturas altas, o que indica que a aplicação do malte de milho pode ser mais viável que as demais fontes, pois suas enzimas podem trabalhar a temperaturas mais elevadas.

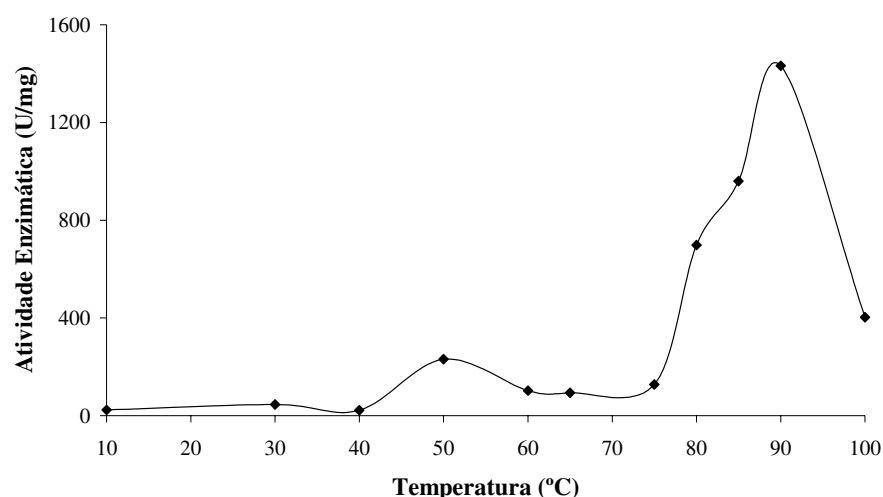


Figura 3 – Efeito da temperatura sobre a atividade amilásica no malte de milho em solução de amido a 2% e em pH 4,8, por 10 min.

De modo geral, a literatura afirma que, temperaturas elevadas de uma ou duas dezenas de graus acima da temperatura do meio natural das enzimas, levam freqüentemente, à perda de atividade (Halpern, 1997). Entretanto é notório que aos 90 °C houve um aumento muito significativo da atividade enzimática, mais precisamente da atividade da α -amilase, mostrando que esta temperatura é a ótima para esta enzima. Entretanto, não é aconselhável o emprego desta temperatura por um longo período de tempo no processo, pois acarretaria a perda da atividade das amilases e, conseqüentemente, em uma baixa eficiência da hidrólise do substrato desejado. A faixa de temperatura ótima para utilização das amilases do malte analisado em questão, situa-se entre 30 a 80°C. As amilases de malte de milho possuem uma faixa de temperatura de trabalho muito maior que as do milheto estudadas por Nirmala and Muralikrishna (2003). Estes dois efeitos opostos

combinados sugerem o seu emprego nas proximidades dos 30°C, onde as enzimas do malte de milho apresentaram termoestabilidade (o malte manteve 90% da atividade enzimática por 30 minutos).

A Lei de Arrhenius para obtenção da energia de ativação da hidrólise de amido por amilase de malte de milho está apresentada na Figura 4. Como o valor do coeficiente de correlação (R) está próximo da unidade e considerando-se o valor da constante dos gases ideais igual a 8,31451 J/mol.K, pode-se dizer que o valor da energia de ativação desta reação está próxima dos 44,5 kJ/mol. Aguilar *et al.* (2000) em seu trabalho de purificação e caracterização das amilases de *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T obteve um valor próximo ao encontrado neste trabalho (32,6 kJ/mol).

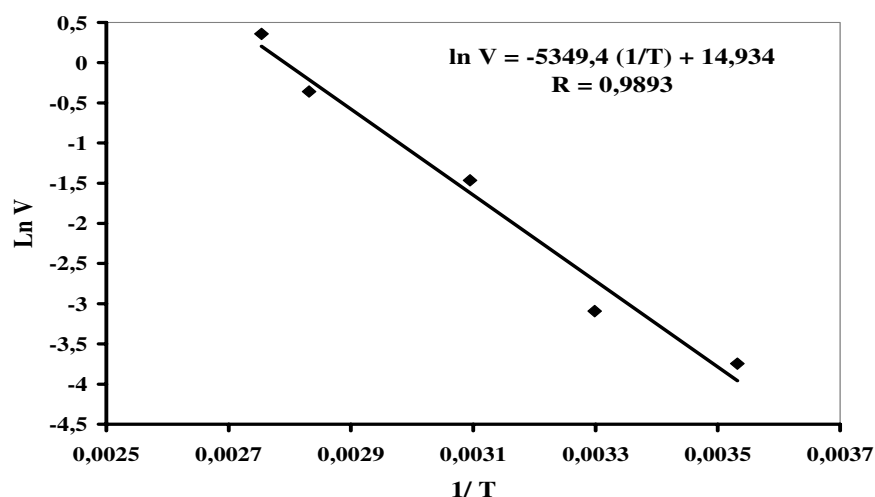


Figura 4 – Determinação da energia de ativação da hidrólise do amido pelas amilases de malte de milho a pH 4,8.

3.3 - Cinética de hidrólise do amido

A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada a pH 4,8 numa temperatura de 30°C e os dados obtidos experimentalmente permitiram a obtenção da curva de cinética, conforme está indicada na Figura 5.

A Figura 6 é a linearização dos dados cinéticos de acordo com a metodologia de Lineweaver-Burk. Pela equação 7, que apresenta o modelo que mais se ajustou aos dados experimentais, tem-se que o valor da constante K_m foi $7,69.10^{-2}$ g/L e o valor de V_{max} $7,69.10^2$ g/L.min (ou $2,48.10^4$ U/mg).

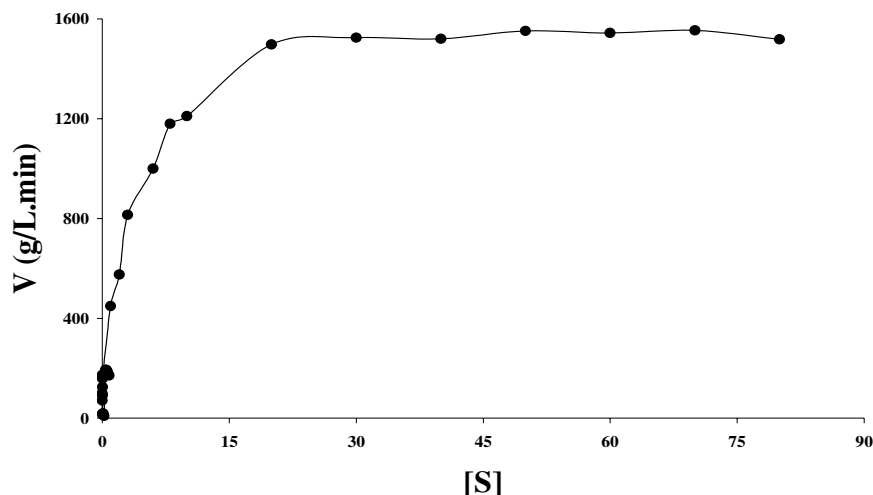


Figura 5. Influência da concentração do substrato na velocidade de hidrólise do amido por amilases de malte milho a pH 4,8 e $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

A concentração de proteínas totais medidas pelo método de Bradford (1976) foi de 58,032 mg/L (média de 6 análises), então, considerando-se esta concentração como sendo $[E]_0$, tem-se que a constante cinética (k_{cat}) é de $1,32 \cdot 10^5 \text{ min}^{-1}$. O valor de V_{max} das amilases de malte de milho chegam a ser 2,1 a 2,6 vezes maior que os apresentados pelas amilases de milheto ($4,76 \cdot 10^3$ - $5,88 \cdot 10^3 \text{ U/mg}$) e a constante K_m está entre 69 a 186 vezes menor que os valores das mesmas constantes apresentadas para o milheto (5,3-14,3 g/L), mostrando que a primeira tem mais afinidade por amido que a segunda. Como a velocidade máxima das amilases de malte de milho foi muito maior e a constante de M-M foi muito menor que as do milheto e outros cereais, então, o malte de milho possui uma alta atividade enzimática, o que potencializa o seu uso pelas indústrias de diversos ramos (Nirmala and Muralikrishna, 2003).

$$\frac{1}{V_0} = 0,0013 + 0,0001 \frac{1}{[S]} \quad R = 0,9915 \quad (7)$$

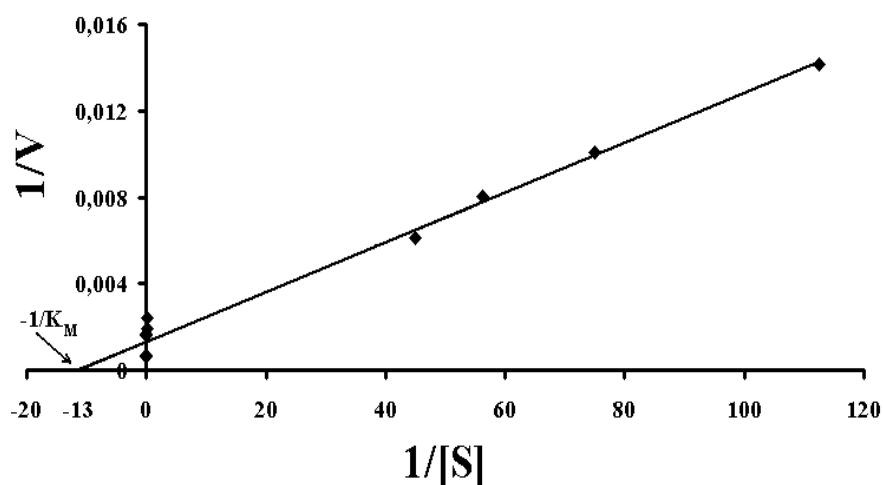


Figura 6. Gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do amido de malte de milho a pH 4,8 e 30±2°C.

3.4 - Efeito do tempo e temperatura de armazenamento

A Figura 7 mostra a variação da atividade enzimática do malte de milho durante seu armazenamento à temperatura ambiente e a 10°C. Embora o espalhamento da medida seja grande, é razoável admitir-se que até a 19ª semana os maltes ainda mantêm mais de 50% da atividade enzimática original, para ambas as temperaturas de armazenamento. No entanto, após a vigésima segunda semana de armazenamento, ambos reduzem suas atividades a valores próximos de 6% da atividade inicial, indicando que o tempo limite de prateleira deste produto, conservado a 10 ou 28°C é de aproximadamente 19 semanas. Isto mostra que não há influência da temperatura de armazenagem sobre a atividade enzimática do malte de milho, nas condições estudadas.

Tümtürk *et al.* (1999) conseguiram armazenar α -amilases em hidrogel poli (N-vinil 2-pirolidina/ ácido itacônico) por cerca de 30 dias, sem perdas significativas de atividade com relação às enzimas em tampão fosfato 10 mmol/L, mostrando que seu método foi mais eficiente que a enzima no seu meio natural, já que a redução da atividade de água no meio previne a degradação de materiais biológicos como o estudado neste trabalho.

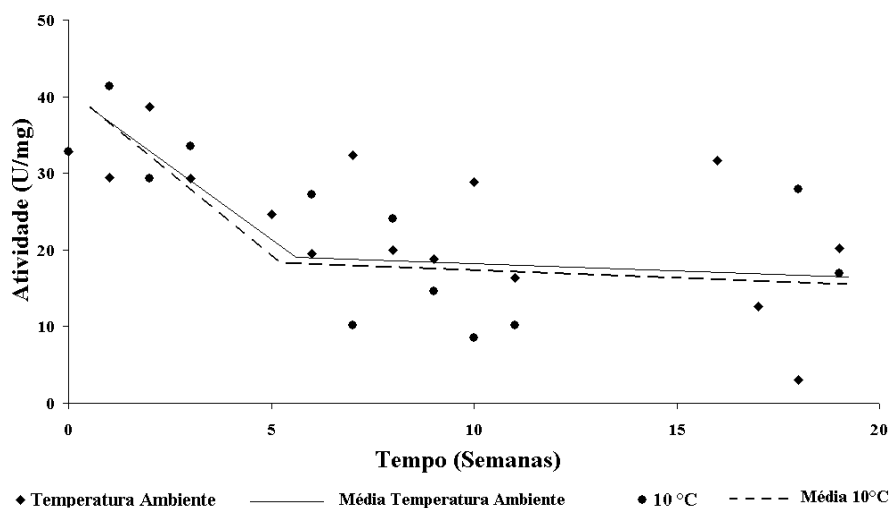


Figura 7. Acompanhamento da atividade durante o armazenamento do malte.

4 - CONCLUSÃO

A análise dos resultados permite afirmar que a faixa de pH e temperatura ótimos das amilases de malte de milho se encontra entre 4,3-6 e 50-80°C, respectivamente. A constante K_m teve valor próximo a $7,69 \cdot 10^{-2}$ g/L, com V_{max} de $7,69 \cdot 10^2$ g/L.min e k_{cat} de $1,32 \cdot 10^5$ min⁻¹. Como a velocidade máxima das amilases de malte de milho foi muito maior que as amilases de outros cereais, pode-se afirmar que o malte de milho possui um alto potencial para ser empregado nos diversos ramos industriais. Assim, este trabalho proporcionou condições de se obter as amilases de malte de milho com valores elevados de atividade enzimática, podendo-se aplicá-las em indústrias têxteis, de biscoitos, de cerveja e de fármacos, dentre outras.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, G.; MORLON-GUYOT, J.; TREJO-AGUILAR, B; GUYOT, J. P. Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 406–413, 2000.

- BLAZUS, J. P. M.; SOUZA, A. G.; SANTANA, J. C. C. SOUZA, R. R.; TAMBOUGI, E. B. Optimization of drying process of *Zea mays* malt to use as alternative source of amylolytic enzymes. *BABT*, Curitiba, v.48, Special n.6: pp. 185-190, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72. 248-254, 1976.
- DANTAS, B. F. *Atividade amilolítica e qualidade de sementes de milho (Zea mays L.) submetidas ao alagamento*. 2002. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP, 2002.
- FORGATY, W. M. and KELLY, C. T. *Topics in enzyme and fermentation. Biotechnology*. Chichester, G, Howood- J. Wiley & Sons, 1979.
- HALPERN, M. J. *Bioquímica*. 1ª ed., Lisboa: Lidel Edições Técnicas, 1997.
- JESUS, S.S. *Desenvolvimento e análise do processo de secagem de α – amilase por microondas à vácuo*. 2002. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas –SP, 2002.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31:3, 426-428, 1959.
- MORITA, T. e ASSUMPÇÃO, R. M. V. *Manual de soluções, reagentes e solventes. Padronização–preparação–purificação*. 2ª ed., São Paulo-SP: Edgard Blücher Ltda, 1995.
- MORRIS, J. G. Cinética de reações catalisadas por enzimas. In: *Físico-química para biólogos*. 1ª ed., São Paulo – SP: EDUSP, 1972, cap.7, p.323 - 367.
- NIRMALA, M. and MURALIKRISHNA, G., Three α -amylases from malted finger millet (ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15) purification and partial characterization. *Phytochemistry*, 62, p21-30, 2003.
- REGULY, J. C. *Biotecnologia dos processos fermentativos*. Pelotas-RS: EDUFPEl, 1996.
- RICARDO, C. P. e TEIXEIRA, A. *Enzimas*. 4ª Ed., Lisboa: Plátano Editora S.A., 1993.
- RIEGEL, R. E. *Bioquímica*, 3ª ed., São Leopoldo –RS: EDUnisinos, 2003.
- PETER, H. W.; AHLERS, J.; MOREIRA, R. A. *Cinética enzimática*. 1ª ed., Fortaleza-CE: EDUFC, 1987.

SANTANA, J. C. C. *Recuperação das enzimas α e β -amilases em sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl_2 para uso como biocatalizador amiláceos*. 2002. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

TÜMTÜRK, H.; ÇAYAKARA, T.; KANTOGLU, O.; GÜVEN, O. Adsorption of amylase onto poly (N-vinyl 2-pyrrolidone/ itaconic acid) hydrogel. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 151, 238-241, 1999.

WANDERLEY, K.; TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P.; ULHOA, C. J. Biochemical characterizing of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiology letters*, 231, 165-169, 2004.

WISEMAN, A. *Handbook of enzyme biotechnology*. 2° ed., New York: John Wiley Sons, 1987.

CAPÍTULO III

ESTUDO DA DEPENDÊNCIA DA ATIVIDADE

ENZIMÁTICA DE AMILASES DE MALTE DE

***Zea mays* COM O TEMPO DE SECAGEM E**

ARMAZENAGEM

ESTUDO DA DEPENDÊNCIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE AMILASES DE MALTE DE *Zea mays* COM O TEMPO DE SECAGEM E ARMAZENAGEM[#]

Graziela Batista Ferreira; Joana Paula Menezes Biazus; Roberto Rodrigues de Souza

Departamento de Engenharia Química – DEQ – UFS, Cidade Universitária “ Prof. José Aloísio de Campos”, S/N, Rosa Elze, CEP: 49100-000, São Cristóvão – SE – Brasil.

José Carlos Curvelo Santana; Elias Basile Tambourgi

Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos, FEQ/UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Av. Albert Einstein, 500, Caixa Postal: 6066, CEP: 13083-970, Barão Geraldo, Campinas-SP.

Este trabalho foi desenvolvido em conjunto com o Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe e publicado nos anais do 15º Congresso Brasileiro de Engenharia Química – XV COBEQ, realizado em outubro de 2004 na Cidade de Curitiba-PR. Ele objetivou fazer uma análise da dependência da atividade enzimática com o tempo de secagem e com o tempo de armazenagem do malte de milho. Uma modelagem empírica, baseada na equação de secagem como as de Broeker *et al.* (1974), Handersson e Handersson (1968), Lewis (1921), Thompson (1968) e Wang e Singh (1978) para se observar qual dessas descreve melhor a dessorção de umidade durante a secagem do malte de milho a 65°C, num secador com circulação de ar. Também se observou o potencial de hidrólise de amido das amilases deste malte a 65 °C e pH 5, montando os biorreatores agitados a cada semana. Os resultados mostraram que dentre os modelos empíricos empregados para simular as isotermas de secagem, o que mais se ajustou aos dados experimentais foi o Handersson e Handersson e pode-se observar que a atividade enzimática cresceu com o tempo de secagem, provavelmente devido à retirada de umidade elevar seu valor por unidade de massa do malte de milho. As curvas de hidrólise do amido apresentaram comportamento típico de cinética de Michaelis-Menten, alcançando 27% de hidrólise, no primeiro ensaio e reduzindo para 9% a partir da sexta semana.

ESTUDO DA DEPENDÊNCIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE AMILASES DE MALTE DE *Zea mays* COM O TEMPO DE SECAGEM E ARMAZENAGEM[#]

G. B. Ferreira¹; J. P. M. Biazus¹; J. C. C. Santana²; Souza, R. R.^{3*}; E. B. Tambourgi⁴

⁴Professor da Faculdade de Engenharia Química - FEQ – UNICAMP. E-mail:

eliastam@feq.unicamp.br

^{3*}Professor do Departamento de Engenharia Química – DEQ – UFS, Cidade Universitária “prof. José Aloísio de Campos”, S/N, Rosa Elze, CEP: 49100-000, São Cristóvão – SE – Brasil, E-mail:

rrsouza@ufs.br

1 idem ao 3 e 2 idem ao 4

RESUMO – Neste trabalho foram avaliadas as dependências da atividade enzimática do malte de milho (*Zea mays*) com o tempo de secagem a 65°C e armazenamento a 10 ± 1°C. O modelo empírico descreveu que a atividade enzimática aumentava linearmente com o tempo de secagem. As curvas de hidrólise do amido apresentaram comportamento típico de cinética de Michaelis-Menten, alcançando 27% de hidrólise, no primeiro ensaio e reduzindo para 9% a partir da sexta semana. O malte de milho pode ser armazenado nesta temperatura por no máximo um mês sem que haja perdas significativas na atividade enzimática. Desta forma, provou-se ser possível: produzir amilases a partir de uma fonte barata e agregar valor à cultura do milho com a produção de um derivado de alto valor comercial.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade enzimática; Armazenamento; Secagem; Malte de *Zea mays*; Amilases.

ABSTRACT – In the work were evaluated to enzymatic activity dependency of maize (*Zea mays*) malt with the drying time at 65°C and storage at 10 ± 1°C.

The empiric model introduced to linear increase of enzymatic activity by drying time augment. The starch hydrolysis curves were shown typical behavior of Michaelis-Menten kinetic; getting 27% of starch hydrolyses, in the first assay e decreased to 9% in the sixth week. The maize malt may be storage in that temperature in maximum for one month, without decreasing its enzymatic activity. Thus, it shows to be possible to produce of amylase enzymes by cheap source and to aggregate value to the maize culture with derivate production of high commercial value.

1 - INTRODUÇÃO

As enzimas α -amilase e β -amilase são muito utilizadas nas indústrias de álcool, principalmente as cervejarias, nas indústrias têxteis e nas indústrias de processamento de farinhas. Normalmente, são obtidas de malte de cevada (embora qualquer cereal germinado as contenha) ou de microrganismos. Suas temperatura e pHs ótimos variam entre 75°C e 55°C e 4,8 e 6,5; respectivamente, dependendo da sua origem (Fogarty and Kelly, 1979). Como a cevada não é cultivada no Brasil, este produto torna-se caro. Desta maneira, a obtenção das enzimas a partir do malte de sementes de milho (*Zea mays*), seria uma alternativa atraente, já que este é um produto primário muito cultivado no país.

A secagem é um método utilizado em vários países com a finalidade de preservar a atividade enzimática original do produto. Vários trabalhos em torno deste conceituado método foram realizados, principalmente, por ser um procedimento exequível economicamente e que preserva as características originais do constituinte.

A escassez de informações para sistemas de secagem voltados a materiais específicos, sobretudo alimentos, sob determinadas condições de operação, demandam a determinação experimental dos parâmetros que caracterizam a secagem destes, incluindo os efeitos da variação biológica, em diferentes faixas de umidade. Tais dados servem como referência na verificação da validade dos diversos modelos matemáticos existentes, contribuindo para a fundamentação dos mecanismos inerentes à secagem (Tobinaga e Pinto, 1992).

Dentre os modelos mais comuns citados na literatura, encontramos o modelo proposto por Lewis (1921) que se baseou no modelo de resfriamento de Newton. Mais tarde, Broecker *et al.* (1974) e Henderson e Henderson (1968) propuseram modelos que derivavam de resoluções da equação de difusão, através de considerações do primeiro e segundo termos da mesma, respectivamente. Como alguns trabalhos elaborados mostraram que estes modelos não descrevem muito bem o comportamento das isotermas, vários modelos de natureza semi-empírica e empírica foram propostos com o intuito de corrigir os modelos matemáticos e descrever melhor o comportamento cinético de dessorção de umidade (Barrozo *et al.*, 1994; Guedes e Farias, 2000).

Neste trabalho foram feitas a simulação do processo de secagem do malte de milho e a avaliação do potencial de hidrólise deste malte com o tempo, para determinar os parâmetros de secagem e armazenagem deste produto e agregar valor à cultura do milho.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Obtenção do malte

As sementes foram selecionadas, pesadas, lavadas, postas à absorção de umidade entre 40 e 45 % e colocadas em meio germinativo em escala laboratorial por aproximadamente 4 a 5 dias. O malte foi seco na temperatura de 65 °C, triturado, armazenado em sacos plásticos e guardado a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ (Santana, 2003).

2.2 - Análise da concentração de proteína total

A variação da concentração de proteína nas amostras foi medida pelo método de Bradford (1976), que consiste na análise da absorbância a 595 nm do complexo formado entre as proteínas e o reagente de Coomassie.

2.3 - Medida da variação do teor de glicose

A concentração de glicose gerada no meio foi determinada nas amostras coletadas dos biorreatores em intervalos de tempo pré-definidos, pelo método do Miles Laboratory (método do DNS) e apresentado em Reguly (1996), neste caso, é apresentada como o ami-

do hidrolisado ($C_{am. hid.}$). O teor de glicose gerada pela hidrólise do amido ($C_{Glicose}$), em porcentagem, é dado pela relação entre a concentração de glicose medida e a glicose teórica que pode ser obtida a partir da concentração inicial de amido no biorreator (C_{amido}), para cada grama de amido 1,111 g de glicose é gerada pela hidrólise, sendo assim, o rendimento é dado pela Equação 1:

$$C_{Glicose} = \left(\frac{C_{am.hid}}{C_{amido}} \right) * 100 \quad (1)$$

2.4 - Determinação da atividade enzimática (AE)

Baseou-se no método de Wohlguth, modificado por Sandstedt, Kneen & Blish (1959) apresentado em Reguly (1996). A unidade de atividade enzimática, neste caso, foi o SKB, que indica a quantidade de amido dextrinizada por um grama de amilase em uma hora. Esta análise foi feita nas amostras de malte úmido e seco, em temperatura e tempos previamente determinados.

2.5 - Processo de secagem do malte

A secagem foi realizada em um secador convectivo com circulação de ar em temperatura, umidade relativa e vazões constantes. Foram realizados ensaios em triplicata a 65°C, temperatura média entre as ótimas das enzimas. O malte (na forma de sementes) foi colocado em vidros de relógio (previamente seco a 65 °C), medido a sua massa úmida (X_0) e seca (X_i) em intervalos de tempo determinados. Para a determinação da umidade inicial dos grãos, utilizou-se exposição a 103-105°C durante 40 a 50 horas de processo, de acordo com a metodologia descrita por Ascar (1985). As isotermas de sorção foram montadas a partir da variação da massa seca adimensional (X) em função do tempo de secagem. A massa seca e a massa úmida (UM) adimensionais foram expressas como sendo:

$$X = \frac{X_i}{X_0} \quad (2)$$

$$UM = \left(\frac{X_0 - X_i}{X_0} \right) * 100 \quad (3)$$

Montou-se também uma curva que demonstra a dependência da atividade enzimática (AE) com o tempo de secagem (t).

2.6 - Modelos de secagem

Os modelos testados foram baseados nos modelos matemáticos, empíricos e semi-empíricos, apresentados na Tabela 1 encontrados em Barrozo *et al.* (1994), Guedes e Farias (2000) e Jesus (2002), com as considerações necessárias para o sistema estudado, para que se pudessem determinar os parâmetros que relacionam a dependência da variação da umidade com o tempo de secagem (t). Os parâmetros a serem determinados são: a constante de secagem (K_s), as constantes A e B , derivadas da equação de Arrhenius e equações dependentes da temperatura de secagem. A avaliação do ajuste dos modelos empíricos foi feita tomando-se como base a metodologia de análise da variância (ANOVA) descrita por Barros Neto *et al.* (1995).

Tabela.1. Modelos empíricos e semi-empíricos para descrever as isotermas de secagem.

Nº	Referência	Equação Padrão
1	Brooker <i>et al.</i> (1974)	$X = A \exp (-K_s t)$
2	Henderson and Henderson (1968)	$X = A [\exp (-K_s t) + 1/9 \exp (-9K_s t)]$
3	Lewis (1921)	$X = \exp (-K_s t)$
4	Thompson <i>et al.</i> (1968)	$t = A \ln X + B [\ln X]^2$
5	Wang and Singh. (1978)	$X = 1 + At + Bt^2$

Fontes: Barrozo *et al.*, 1994; Guedes e Farias, 2000 e Jesus, 2002.

2.7 - Estudo do potencial de hidrólise

Para acompanhar a perda do potencial de hidrólise do amido pelo malte de milho com o tempo de armazenamento, foram montados bioreatores durante o decorrer de 5 meses, até que este potencial tornasse estável. Os bioreatores foram do tipo tanques agitados, operando com fluxo em batelada, a pH 5, 65°C de temperatura e utilizando amido de mandioca (*Manihot sp*) como substrato e com ciclos de aproximadamente 5 dias. As enzimas α e β -amilases de malte do milho foram usadas como catalisadores (Cadogan and Hanks, 1995). O teor de glicose hidrolisado durante a operação dos bioreatores foi acompanhado pelo método do DNS (Reguly, 1996). As curvas de hidrólise foram montadas a partir da variação do teor de glicose ($C_{Glicose}$, %) com o tempo.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 mostra a avaliação dos modelos pela metodologia ANOVA e os parâmetros calculados pela regressão linear. Segundo Barros Neto *et al.* (1995), para que um modelo seja significativo estatisticamente o teste F (F_{cal}/F_{tab}) deve possuir um valor igual ou superior a quatro. Sendo assim, os modelos de Henderson and Henderson (1968) e de Wang and Singh (1978) foram os mais significativos estatisticamente, pois apresentam a condição citada pelo autor.

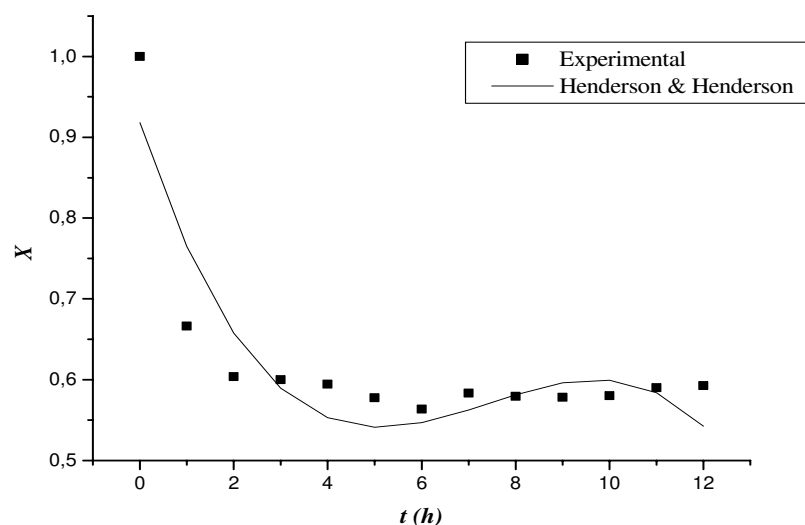
A correlação (R) faz uma avaliação estatística da aproximação (ou ajuste) dos dados preditos pelo modelo aos experimentais, ou seja, quanto mais próximos forem estes, o valor de R tenderá ao máximo (1,0). Como se pode observar na Tabela 2, os valores de R estão distantes do seu máximo, o que indica que a maioria dos modelos não se ajustou aos dados experimentais. Contudo, pode considerar o modelo de Henderson and Henderson (1968) como sendo o que mais se aproxima da descrição da curva de secagem do malte de milho já que sua correlação é a que mais se aproxima da unidade.

Tabela 2. Avaliação dos modelos pela metodologia ANOVA para um nível significância de 95%.

Tipo de Parâmetro	Modelo empírico				
	1	2	3	4	5
A	0,7046	0,8264		27,7816	-0,1313
B				76,2066	0,0087
K_s	0,0223	0,1082	0,0643	-	
R	0,4645	0,9383	1,5437	0,6649	1,3319
F_{calc}/F_{tab}	0,7207	4,1674	-	0,9720	6,2045

As curvas obtidas pelos dados experimentais e pela regressão do modelo mais significativo estatisticamente estão apresentadas Figura 1. Nesta observa-se através da isoterma obtida pelos dados experimentais, que a curva ficou estável após a segunda hora de secagem e que a umidade retirada após este tempo variou entre os 40 a 44 %. Isso mostra que a secagem do malte foi rápida, nas condições estudadas, o que reduz o gasto com o consumo energia para a obtenção do malte a partir deste processo.

Também se percebe que o modelo descreve parcialmente bem o comportamento da retirada de umidade do malte de milho com o tempo (descrevendo bem, apenas partes da isoterma), comprovando visualmente as conclusões obtidas pela metodologia ANOVA. Esta descrição parcial do comportamento das curvas de dessorção descritas pelos modelos citados já foi observada por vários autores (Barrozo *et al.*, 1994; Guedes e Farias, 2000).



Figuras 1. Curvas de dessorção geradas pelo modelo e pelos dados experimentais do processo de secagem do malte de milho.

Na Figura 2 observa-se o comportamento da atividade enzimática no malte de milho sob influência do tempo de secagem a 65°C. Percebe-se que a atividade enzimática é elevada linearmente ($R = 0,9987$) à medida que o tempo de processo é aumentado, o que se deve provavelmente a retirada, pelo arraste, de substâncias voláteis inibidoras que se mantinham sobre a superfície das enzimas. Este ajuste é meramente para facilitar a compreensão, já que não existe significância estatística para tal grau de liberdade.

Embora haja um aumento da atividade com o tempo de secagem, não é aconselhável expor o malte a esta temperatura por um tempo elevado, já que, segundo diversos autores, a exposição das enzimas a uma determinada temperatura (mesmo em sua temperatura ótima) por um longo tempo causa inibição, por desnaturação da cadeia protéica (Fogarty and Kelly, 1979; Halpern, 1997).

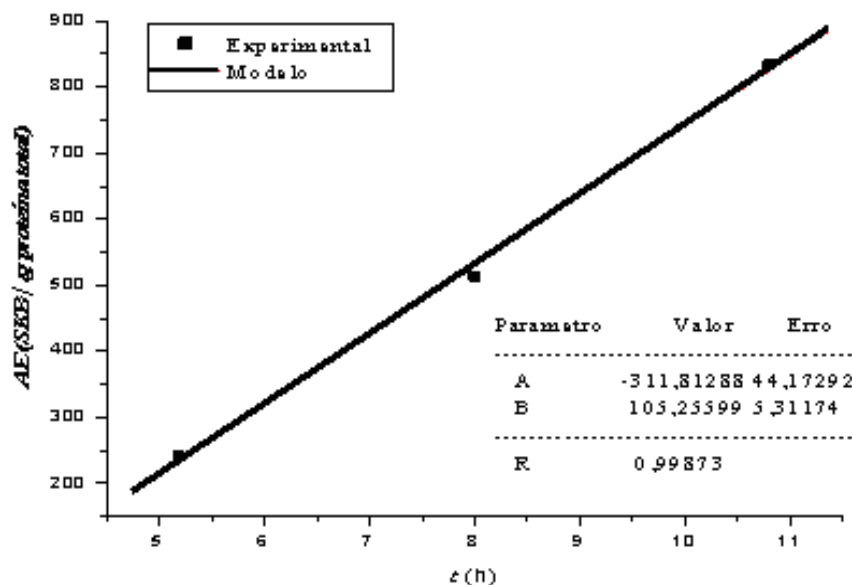
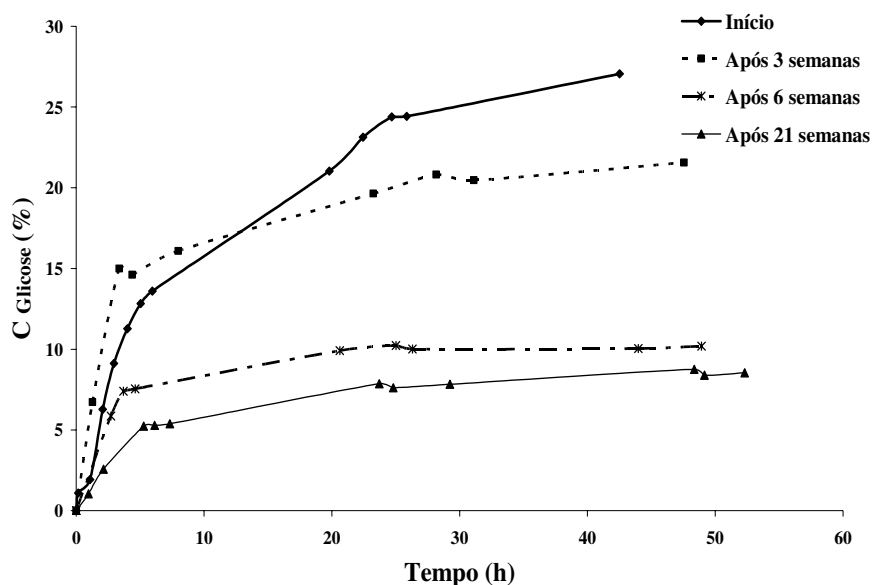


Figura 2. Dependência da atividade enzimática no malte de milho com o tempo de secagem a 65°C.

A Figura 3 apresenta as curvas de hidrólise do amido de mandioca pelas enzimas α e β -amilases de malte milho em um biorreator agitado, com alimentação em batelada a pH 5 e temperatura de 65°C, gerada pelos ensaios feitos durante o período de estudo da perda do potencial de hidrólise do malte. Percebe-se que todas possuem comportamento cinético semelhante aos descritos por Michaelis-Menten, sendo sua taxa elevada inicialmente, sofrendo uma redução após a quinta hora e tornando-se constante e praticamente igual a zero a partir da vigésima quinta hora de operação do biorreator. Este comportamento se dá devido à formação de produtos que agem como inibidores enzimáticos, que, conforme têm sua concentração aumentada, fazem com que as enzimas diminuam sua taxa de reação, até a total inibição (Halpern, 1997).

A partir da comparação entre as curvas, percebe-se que o potencial inicial de hidrólise de amido das enzimas alcançou 27% do sobre o teor total de amido, sendo este reduzido para aproximadamente 22 % após três semanas, ou seja, cerca de 18 % a menos de glicose. Após a sexta semana, seu valor ficou quase que constante, hidrolisando apenas 9% do amido inicial, o que corresponde a uma queda próxima dos 67 % do potencial de hidrólise inicial do malte de milho. Desta forma, pode-se considerar que este produto, ao ser armazenado em sacos plásticos a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ possui uma validade de aproximadamente

um mês para que seu poder de hidrólise seja mantido próximo do valor inicial.



Figuras 3. Curvas de hidrólise do amido de mandioca por enzimas amilolíticas do malte de milho em biorreator operando em batelada e a 65°C.

4 - CONCLUSÃO

A curva de secagem do malte de sementes de milho se apresentou de forma assintótica com o eixo do tempo, com umidade de estabilização média em torno de 42 %.

Os modelos estudados não descreveram bem o comportamento experimental da isoterma de secagem do malte de milho, sendo que segundo a metodologia ANOVA os modelos apresentados por Henderson and Henderson (1968) e o de Wang and Singh (1978) foram os mais significativos dentre os utilizados neste trabalho.

A análise de atividade enzimática mostrou uma dependência linear com o tempo e há elevação da atividade à medida que se aumentava o tempo de secagem por até 11 horas.

Observou-se que o potencial de hidrólise do amido diminui com o tempo, sendo seu valor inicial de 27 %, reduzindo-se a menos da metade após 6 semanas de conservação na temperatura $10 \pm 1^\circ\text{C}$.

Este trabalho demonstrou que é possível a obtenção do malte de milho a partir da secagem deste em secador convectivo com circulação de ar. Este apresentou boa atividade enzimática podendo ser utilizado por aproximadamente um mês, nas condições estudadas, sem apresentar diferenças significativas no seu potencial de hidrólise de amido. Pode-se assim, agregar valor à cultura do milho, já que o malte possui um valor relativamente alto.

5 - NOMENCLATURA

A	Constante empírica (adimensional)
AE	Atividade enzimática (SKB/ mg de proteínas)
B	Constante empírica (adimensional)
C_{amido}	Concentração de amido inicial (g/L)
$C_{glicose}$	Conteúdo de glicose gerado da hidrólise (% , p/p)
$C_{am. hid.}$	Concentração de glicose gerada pela hidrólise do amido (g/L)
K_s	Constante de secagem (h^{-1})
t	Tempo de secagem ou de hidrólise (h)
UM	Massa úmida (adimensional)
X	Massa seca (adimensional)
X_i	Massa seca nos ensaios de secagem (g)
X_0	Massa úmida inicial (g)

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASCAR, J. M. *Alimentos: Aspectos Bromatológicos e Legais. Analise Percentual*. Vol.01. 1ª Ed.. UNISINOS Ed. São Leopoldo – RS. 1985.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Vol. 1, 1ª edição, Série Manuais, Editora da UNICAMP, Campinas – SP, 1995, p 302.

BARROZO, M. A. S.; SARTORI, D. J. M.; FREIRE, J. T. Secagem de grãos em camada fina. Um estudo sobre as equações de secagem. *Rev. Brasil. Eng. Quím.*, v16, p. 9-15, 1994.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72. 248-254, 1976.

BROOEKER, D. B.; BAKKER-ARKEMA, F. W.; HALL, C. W. *Drying cereal grains*. The Avi Publishing Co, Inc. Westport, 1974.

CADOGAN, A. and HANKS, J. *Mic. & Biot.. Bio. Adv. Stud.* 1ª ed., Ed. Nelson, Croatia, 1995, 31-39.

FOGARTY, W. M. and KELLY, C. T. *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*. v.3, J. Wiley & Sons, 1979.

GUEDES, A. M. M. e FARIAS, L. J. G. Determinação da constante de secagem de urucum (*Bixa orellana L.*) em secador convectivo de leito fixo. *Rev. Brasil. Prod. Agroind.*, v2, nº 1, 73-86 2000.

HALPERN, M. J. Enzimas. In: *Bioquímica*, 1ª ed. Editora Lidel, Lisboa - Portugal, 1997, p233 - 303.

HENDERSON, J. M. and HENDERSON, S. M. A computacional procedure for deep-bed drying oanalysis. *J. Agric. Eng. Res.* 13, 87-95, 1968.

JESUS, S. S. *Desenvolvimento e análise do processo de secagem de α -amilase por microondas a vácuo*. Campinas – SP, FEQ/ UNICAMP, 2002, p. 10-15. (Tese de Doutorado)

LEWIS, W. K. The rate of drying of solids materials. *Ind. Eng. Chem.* 5, 427-432, 1921.

REGULY, J. C. *Biotechnologia dos Processos Fermentativos*. EdUFPel. v 1, 1996, p330.

SANTANA, J. C. C. *Recuperação das enzimas α e β -amiasse em Sistemas Bifásicos Aquosos PEG/ CaCl_2 para uso como biocatalizador amiláceos*. Campinas – SP, FEQ/ UNICAMP. 2003, 232p. (Dissertação de Mestrado)

TOBINAGA, S. e PINTO, L. A. A. Secagem de materiais fibrosos: músculos de peixes. In: *Tópicos Especiais em Secagem*. EDUFSCar – SP, 1992, p. 213-214.

THOMPSON, T. L.; PEART, R. M.; FORSTER, G. H. Mathematical simulation of corn drying – A new model. *Trans. Of the A. S. A. E.* 11(4), 582-586, 1968.

WANG, C. Y. and SINGH, R. P. A single layer drying equation for rough rice. *Amer. Soc. Agric. Eng.*, paper n° 78-3001, 1978.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e ao PIBIC/ CNPq-UFS pelo auxílio financeiro.

CAPÍTULO IV

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE SECAGEM DO MALTE DE *Zea mays* PARA USO COMO FONTE ALTERNATIVA DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS

Otimização do Processo de Secagem de Malte de *Zea Mays* para Uso como Fonte Alternativa de Enzimas Amilolíticas#

Joana Paula Menezes Biazus, Anderson Gomes Souza; Roberto Rodrigues de Souza

Departamento de Engenharia Química, CCET/ UFS, Cidade Universitária “Prof. José Aloísio de campos”, S/N, Rosa Elze, CEP.: 49.100-000 - São Cristóvão, Sergipe, Brasil

José Carlos Curvelo Santana; Elias Basile Tambourgi

Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos, FEQ/ UNICAMP, Cidade Universitária Prof. Zeferino Vaz. Av. Albert Einstein, 500, Caixa Postal: 6066, CEP: 13083-970, Barão Geraldo, Campinas, SP, Brasil.

Este capítulo é formado por um trabalho que foi desenvolvido em conjunto com o Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe e publicado em junho de 2005 pelo periódico *Brazilian Archives of Biology and Technology* v.48, p185-190. Sua versão original, em inglês, publicada na revista está nos anexos. Ele é uma continuidade do trabalho anterior que fez uma avaliação apenas do efeito tempo sobre a atividade do malte de milho durante a secagem. Assim este objetivou encontrar as condições ótimas de secagem do malte de milho do malte sem reduzir a atividade de suas enzimas. Fatores como tempo (entre 5 a 12 h) e temperatura (54, 65 e 76°C) de secagem foram estudados através de um planejamento fatorial e otimização RSM. Os resultados mostraram que durante o processo de secagem a taxa de dessorção de umidade ficou estável após 3-4 h de processo e a remoção da umidade do malte de milho ficou acima dos 40 % (p/p). A análise de variância (ANOVA) mostrou que o modelo que mais se ajustou foi aquele que tinha uma dependência quadrática de atividade enzimática, na forma de ***lnAE***, com o tempo (*t*) e temperatura (*T*) de secagem. As análises das superfícies de resposta mostraram que a secagem deve ocorrer a 54°C entre 5,18 a 6 h de processo, para se obter o malte com maior atividade enzimática possível.

Otimização do Processo de Secagem de Malte de *Zea Mays* para Uso como Fonte Alternativa de Enzimas Amilolíticas#

Joana Paula Menezes Biazus¹, Anderson Gomes Souza¹; José Carlos Curvelo Santana²;
Roberto Rodrigues de Souza¹, Elias Basile Tambourgi²

DEQ – CCET – UFS - Cidade Universitária “Prof. José Aloísio de campos”, S/N, Rosa Elze, CEP.: 49.100-000 - São Cristovão - Sergipe – Brasil, E-mail: rrsouza@ufs.br, DESQ – FEQ – UNICAMP – Cidade Universitária Prof. Zeferino Vaz. Barão Geraldo, Campinas – SP – Brasil

RESUMO

Este trabalho objetivou a otimização da secagem do malte de milho (*Zea Mays*) para obter um malte sem afetar a atividade das enzimas presentes neste, α e β – amilases. Os resultados mostraram que a operação do secador deve ser feita a 54°C e entre 5,18-6 h de processo. O malte obtido possuiu boas propriedades enzimáticas.

ABSTRACT

This work aimed to study the drying process optimization of maize (*Zea Mays*) malt for obtaining maize malt, without affecting enzymatic activity of α e β – amylases from maize malt. Results showed that dryer operation must occur in zone at 54°C and 5.18-6 h process time. The maize malt obtained had good enzymatic properties.

Keywords: α and β – amylases enzymes, maize (*Zea mays*) malt; drying process, optimization.

1 - INTRODUÇÃO

A secagem é utilizada em vários países com o objetivo de preservar a atividade enzimática original do produto é a secagem. É definida como sendo a remoção de uma substância volátil (comumente, mas não exclusivamente, a água) de um produto sólido, ou

seja, a operação na qual a atividade de água de um determinado produto é diminuída pela remoção de água, através de sua vaporização. A água presente no sólido é chamada de umidade. Assim, a secagem é um conjunto de ciência e tecnologia que requer minuciosas observações experimentais de alguns fenômenos que ocorrem durante o processo (Jesus, 2002).

Algumas considerações sobre conteúdo inicial de umidade do material, conteúdo final de umidade a que o material pode chegar (umidade de equilíbrio), de que maneira a água está relacionada com a estrutura do sólido, como o transporte de água é feito do interior à superfície do sólido durante a secagem e de que forma a água é transportada do interior do sólido até sua superfície, servem para fundamentar o fenômeno de secagem (Brod, 2003).

Em 1998, Freire e Sartori desenvolveram um secador transportador do tipo esteira, com o objetivo de analisar o comportamento deste equipamento frente ao processo de secagem utilizando para tanto sementes de gramínea da espécie *Brachiaria brizantha*, avaliando além da cinética de secagem também o efeito do processo sobre a qualidade do material. Assim, puderam concluir que o equipamento utilizado é viável na secagem do material usado e que o teste de qualidade mostrou haver uma tendência de queda na qualidade das sementes para temperatura igual a 48,5 °C.

Por serem economicamente viáveis o emprego de enzimas em indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxteis, e outras vem crescendo há vários anos. Suas aplicações são variadas, pode-se citar o uso na fabricação de bebidas alcoólicas, em algumas formulações como: detergentes, biosensores, pomadas, em “kits” para diagnóstico médico e atualmente na degradação de compostos e no controle do meio ambiente (Jesus, 2002). Dentre as enzimas utilizadas comercialmente merecem destaque as α -amilase e β -amilase por sua variada aplicabilidade em processos industriais, na hidrólise do amido (Fogarty e Kelly, 1979; Wiseman, 1987). Tais enzimas são obtidas comumente de malte de cevada ou de microorganismos e seus preços, após purificação, alcançam US\$ 1500,00/g (Sigma Chemical Company, 1996).

A α -amilase (EC 3.3.1.1; α -1,4 glicano, 4 - glicanohidroxilase) é uma grande enzima extracelular que hidrolisa aleatória, mas simultaneamente várias ligações α -1,4; não terminais de moléculas de amilose, amilopectina, glicogênio e dextrinas, não atuando sobre

as ligações α -1,6. Tem massa molar em torno de 50 kDa, com ponto isoelétrico 5,4, pH ótimo 4,7 e temperatura ótima próxima 75 °C (dependendo da sua origem) (Reguly, 1996; Wiseman, 1987).

A β -amilase (EC 3.2.1.1, α -1,4, glicanomaltohidrolase) é uma enzima extracelular que degrada amilopectina e glicogênio, hidrolisando cada segunda ligação α -1,4, mas sempre a partir dos terminais não redutores das cadeias. Tem pH ótimo entre 4,5 e 6,5 e temperatura ótima entre 55 e 57 °C, sendo muito rápida a sua inativação acima de 60 °C, seu ponto isoelétrico é 4,8 e sua massa molar gira em torno de 50 kDa (Reguly, 1996; Wiseman, 1987).

O milho (*Zea mays*) é um produto agrícola muito difundido no Brasil, comercializado “in natura” ou processado a baixo valor econômico. Sendo assim, a obtenção das enzimas α e β - amilases de malte de milho geraria um produto de alto valor agregado.

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi estudar minuciosamente a influência dos fatores temperatura e tempo de secagem sobre a atividade enzimática do malte de milho durante o processo de secagem, por meio de uma otimização pela Metodologia de Análise de Superfície de Resposta (RSM).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Obtenção do malte

As sementes foram selecionadas, pesadas, lavadas, postas à absorção de umidade entre 40 a 45 % e germinadas em escala laboratorial. O tempo de germinação foi entre 4 a 5 dias. O malte foi seco de acordo com as condições apresentadas na Tabela 2 e armazenado 5 °C (Santana, 2003).

2.2 – Metodologia do processo de secagem

Um secador convectivo com circulação de ar foi usado na secagem do malte de milho. O secador operou em condições temperatura, umidade relativa ($64 \pm 1\%$) e vazões constantes. Foram utilizadas três temperaturas: 54°C, 64°C e 76°C. As sementes de milho

germinadas (malte) foram postas em vidros de relógio (previamente secos e tarados). Mediram-se sua massa inicial (X_0) e as amostras foram secas por 12 h no secador. O peso seco (X_i) das amostras foi medido a cada hora. O conteúdo de umidade (UM) retirado do malte é dado pela equação 1 e o peso experimental (X_{exp}) variando com o tempo é dado pela equação 2 (Ascar, 1995; Freire e Sartori, 1998; Jesus, 2002), apresentas a seguir:

$$UM = \left(\frac{X_0 - X_i}{X_0} \right) * 100 \quad (1)$$

$$X_{exp} = \frac{X_i}{X_0} \quad (2)$$

2.3 - Determinação da concentração de proteína total

A concentração de proteínas nas amostras foi medida pelo método de Bradford (1976).

2.4 - Análise da atividade enzimática

Nas amostras de malte de milho foi determinada a atividade enzimática pelo método de Wohlguth, modificado por Sandstedt, Kneen & Blish (1959) apresentado em Reguly (1996). Uma unidade SKB é a quantidade de amido dextrinizada por um grama de amilase em uma hora.

2.5 - Otimização da secagem do malte

As influências do tempo (t) e temperatura (T) de secagem sobre a atividade enzimática (AE) do malte de milho foram estudadas usando um planejamento experimental do tipo 2^2 com design hexagonal (apresentado na Tabela 2) e otimização do processo de secagem por metodologia de superfície de resposta (RSM). Nos modelos a atividade enzimática foi usada na forma de $\ln AE$. Os modelos testados foram lineares e quadráticos. Os parâmetros dos modelos foram estimados pelo método dos mínimos quadrados e a avaliação do ajuste dos modelos foi feita pela metodologia de análise da variância (ANOVA), todos descritos em Barros Neto *et al.* (1995 e 2001). As codificações das variáveis foram as seguintes:

$$x_1 = \frac{t_i - 8}{2} \quad (3)$$

$$x_2 = \frac{T_i - 65}{11} \quad (4)$$

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Processo de secagem

A Tabela 1 apresenta os valores de massa das sementes maltadas em diferentes tempos e temperaturas. Os resultados mostram que a umidade presente no malte de milho ficou entre 40 a 43 % (p/p), e a maior dessorção de umidade foi apresentada a 75°C. Os dados da Tabela 1 serviram de base para a obtenção das isotermas de dessorção de umidade das sementes de malte de milho, como estão apresentadas na Figura 1. O peso seco começa a se estabilizar entre 3-4 horas. Neste instante, as curvas de secagem mostram-se paralelas ao eixo do tempo (Brod, 2003; Freire e Sartori, 1998; Jesus, 2002).

Tabela 1. Dados experimentais da secagem de malte de milho.

Ensaio	Temperaturas de Secagem					
	54°C		65°C		76°C	
	t (h)	X _{exp}	t (h)	X _{exp}	t (h)	X _{exp}
	0	1	0	1	0	1
1	1	0,6822	1	0,6663	1	0,6950
2	2	0,6493	2	0,6037	2	0,6408
3	3	0,6227	3	0,6000	3	0,5844
4	4	0,6136	4	0,5946	4	0,554
5	5	0,5854	5,15	0,5775	5	0,5789
6	6	0,5638	6	0,5635	6	0,5854
7	7	0,5891	7	0,5833	7	0,5586
8	8	0,5915	8	0,5796	8	0,6322
9	9	0,5667	8	0,5787	9	0,5338
10	10	0,5860	8	0,5802	10	0,5648
11	11	0,6067	9	0,5781	11	0,5469
12	12	0,5773	10	0,5802	12	0,5888
13			10,85	0,5900		
14			12	0,6027		

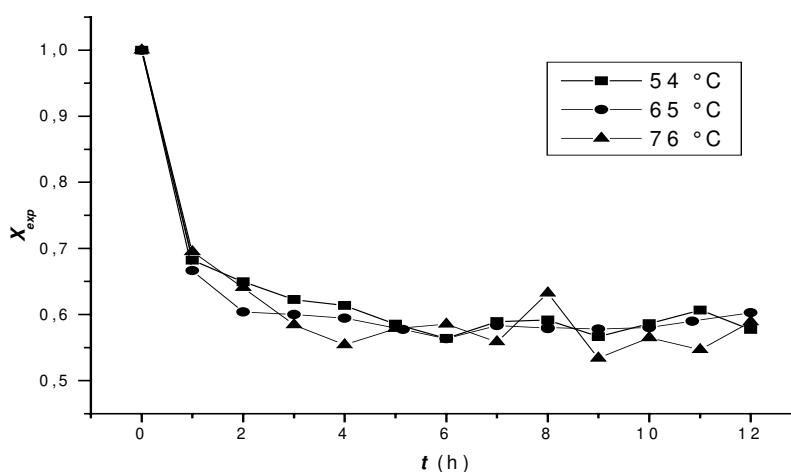


Figura 1. Curva de secagem do malte de milho.

3.2 – Otimização do processo de secagem

A Tabela 2 mostra os ensaios com os fatores com seus valores verdadeiros (t e T) e codificados (x_1 e x_2) e a resposta (AE). Estes dados foram usados para a obtenção dos parâmetros dos modelos pelo método dos mínimos quadrados e a avaliação do seu ajuste pela metodologia ANOVA (Barros Neto *et al.*, 1995; 2001).

Tabela 2. Matriz de planejamento para a otimização do processo de secagem do malte de milho.

Ensaio	t (h)	T (°C)	x_1	x_2	AE
1	6	54	-1	-1	6,684
2	10	54	+1	-1	1,710
3	6	76	-1	+1	0,1292
4	10	76	+1	+1	0,2656
5	8	65	0	0	0,4822
6	8	65	0	0	0,4522
7	8	65	0	0	0,5851
8	5,18	65	-1,41	0	0,2571
9	10,8	65	+1,41	0	0,3097

O modelo ajustado aos dados experimentais está representado pela equação 3, que mostra uma dependência quadrática da atividade (na forma de *ln AE*) com o tempo e temperatura de secagem. Há uma baixa influência do parâmetro linear do tempo e alta influência do mesmo parâmetro da temperatura, só que negativa, mas todos os parâmetros são estatisticamente significantes.

$$\ln AE = -0,6886 + 0,0476.t - 1,4522.T - 0,2910.t^2 + 0,7437.T^2 + 0,5209.t.T \quad (5)$$

Na Tabela 3 encontram-se os resultados obtidos pela análise de variância (ANOVA) para o modelo ótimo. De acordo com Barros Neto (1995 e 2001) R^2 deve ter valor próximo de 1,0 e as variâncias devem ter valores próximos de 100. Os resultados da ANOVA para as variâncias e o R^2 mostram que o modelo apresenta baixos erros devido à regressão e baixos erros devido aos métodos empregados nas análises.

Os resultados para os testes F, sendo que o primeiro ($F_{\text{calc}}/F_{\text{tab}}$) indica que o modelo é significativo, ou seja, os dados preditos se aproximam dos experimentais. O segundo ($F_{\text{tab}}/F_{\text{calc}}$) indica que os dados estão ajustados e descrevem bem a superfície de resposta. Para que os testes F sejam válidos estatisticamente a razão deve ser igual ou maior que 4 (Barros Neto et al., 1995). Os resultados mostram que o modelo foi estatisticamente significativo, mas não pode prever completamente o processo de secagem do malte de milho para otimizá-lo nas condições estudadas (Barros Neto *et al.*, 1995 e 2001).

Tabela 3. Análise da variância (ANOVA) do modelo ajustado.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F_{calc}	F_{tab}
Regressão	10,981	5	2.196		
Resíduo	0,211	3	0.070	31.269	9.01
Falta de ajuste	0,175	1	0.175		
Erro puro	0,036	2	0.018	9.718	18.51
Total	11,118	8			
% de variância explicada =				98,763	
% máxima variância explicável =				99,677	
Coeficiente de determinação (R^2) =				0,9876	

As Figuras 2 e 3 mostram as superfícies de resposta para a otimização do processo de secagem em 2D e 3D. A atividade enzimática (na forma de *lnAE*) aumentou com a redução do tempo e temperatura de secagem. Se o fator tempo for fixado em seus menores valores (-1 a -1,41 ou 5,18 a 6 h) e o fator temperatura for elevado ao seu valor máximo (+1 ou 76 °C), haverá uma grande redução na atividade enzimática, entretanto, se a temperatura estiver no seu menor valor (-1 ou 54°C) e o tempo for variado do seu mínimo (-1,41 ou 5,18 h) até o seu máximo valor (+1,41 ou 10,8 h), pouco se perderá de atividade enzimática, o que mostra que o efeito da temperatura foi critico para o processo de secagem do malte de milho. Este efeito da temperatura sobre a atividade enzimática ocorre devido à prévia inativação da β -amilase após exposição longa a temperaturas acima 54°C. Assim, pela análise das superfícies de resposta o secador operando a 54°C por 5,18-6h pode ser indicado como a condição ótima de secagem do malte de milho.

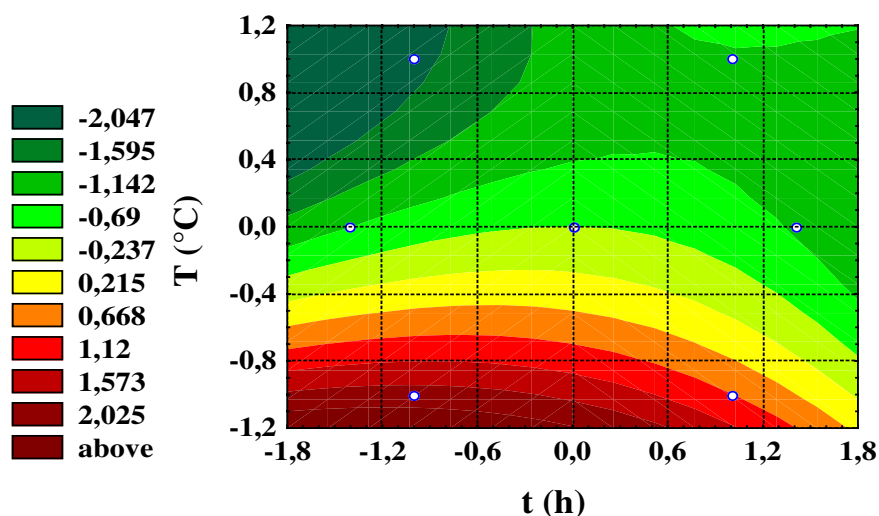


Figura 2. Superfície de resposta em 2 D para compreensão da dependência da atividade enzimática com o tempo e temperatura no processo de secagem do malte de milho.

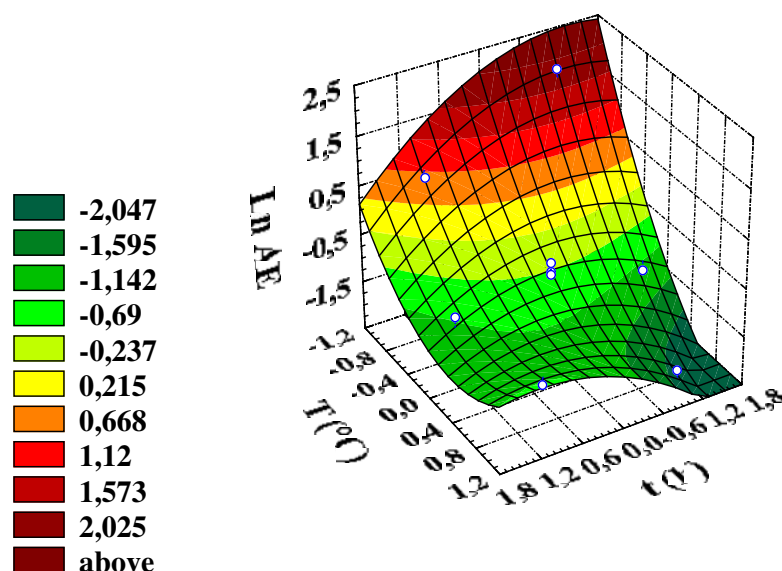


Figura 3. Superfície de resposta em 3 D para compreensão da dependência da atividade enzimática com o tempo e temperatura no processo de secagem do malte de milho.

4 - CONCLUSÕES

A análise dos resultados leva as seguintes conclusões:

- Os dados do processo de secagem mostraram que a remoção da umidade do malte de milho ficou acima dos 40 % (p/p).
- As curvas de secagem mostraram que a taxa de dessorção de umidade ficou estável após 3-4 h de processo.
- A análise de variância (ANOVA) mostrou que o modelo que mais se ajustou foi aquele que tinha uma dependência quadrática de atividade enzimática, na forma de $\ln AE$, com o tempo (t) e temperatura (T) de secagem.
- A análise das superfícies de resposta mostrou que a influência da temperatura sobre a atividade enzimática foi maior que a do tempo de secagem e que a melhor condição de operação do processo de secagem do malte de milho foi a 54°C e 5,18-6 h.

5 - NOMENCLATURA

AE	Atividade enzimática (SKB/mg de proteínas)
F_{Calc}	Teste F calculado.
F_{Tab}	Teste F tabelado.
i	Nível dos fatores
T	Temperatura de secagem (°C)
t	Tempo de secagem (h)
UM	Conteúdo de umidade (% p/p)
X	Peso seco (adimensional)
x_1 e x_2	Fatores codificados

6 - AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e PIBIC/ CNPq-UFS pelas bolsas concedidas.

7 - REFERENCIAS

Ascar, J. M. (1995) *Alimentos: Aspectos Bromatológicos e Legais. Analise Percentual*. Vol.01. 1ª Ed. UNISINOS Editora. São Leopoldo – RS - Brasil, p 243-252.

Barros Neto, B.; Scarminio, I. S. and Bruns, R. E.(2001) *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. Vol. 1, 1ª edição, Coleção Livros - Textos, EDUNICAMP, Campinas – SP, p 406.

Barros Neto, B.; Scarminio, I. S. and Bruns, R. E. (1995). *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Vol. 1, 1ª edição, Série Manuais, EDUNICAMP, Campinas – SP, p 302.

Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein. Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brod, F. P. R. (2003) *Avaliação de um Secador Vibro-Fluidizado*. MSc Thesis, Campinas – SP: Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, pp20-37.

Forgaty, W. M. and Kelly, C. T. (1979); *Topics in Enzyme and Fermentation. Biotechnolog.* V.3, J. Wiley and Sons.

Freire, J. T and Sartori, D. J. M. (1998) Secador – Transportador Tipo Esteira. Processo de Secagem e Qualidade do Produto. Paper presented at 25º Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, São Carlos – SP, p. 475-479.

Jesus, S.S. (2002) *Desenvolvimento e Análise do Processo de Secagem de α – amilase por Microondas à Vácuo*. MSc Thesis, Campinas – SP: FEQ/ UNICAMP, p. 13-15.

Reguly, J. C. (1996) *Biotecnologia dos Processos Fermentativos*. Vol.1, EDUFPeL.

Santana, J. C. C. (2003) *Recuperação das Enzimas α e (-amilases em Sistema Bifásico Aquoso PEG/ CaCl_2 para Uso como Biocatalizador de Amiláceos*. MSC Thesis, Campinas – SP, FEQ/ UNICAMP, p.232.

Sigma Chemical Company Cataloge. (1996) *Biochemicals Organic Compounds and Diagnostic Reagents*, p.116-117.

Wiseman, A. (1987) *Handbook of Enzyme Biotechnology*. 2ª ed., John Wiley Sons, New York, EUA.

CAPÍTULO V

MAXIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO MALTE DE *ZEA MAYS*

MAXIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO MALTE DE *Zea mays*

Joana Paula Menezes Biazus, Roberto Rodrigues de Souza

Departamento de Engenharia Química, CCET/ UFS, Cidade Universitária “Prof. José Aloísio de campos”, S/N, Rosa Elze, CEP.: 49.100-000 - São Cristóvão, Sergipe, Brasil

José Carlos Curvelo Santana; Elias Basile Tambourgi

Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos, FEQ/ UNICAMP, Cidade Universitária Prof. Zeferino Vaz. Av. Albert Einstein, 500, Caixa Postal: 6066, CEP: 13083-970, Barão Geraldo, Campinas, SP, Brasil.

Este trabalho foi desenvolvido em conjunto com o Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Sergipe e foi publicado pelo periódico *Brazilian Journal of Food Technology* 5ºSIPAL, p138-145, março de 2005. Ele é composto pela agregação de conhecimento gerada pelos dados dos três trabalhos anteriores, para melhorar a percepção da metodologia completa de otimização da produção do malte de milho. Assim, seu objetivo foi otimizar o processo de obtenção do malte de milho desde a germinação até a secagem. Assim este objetivou encontrar as condições ótimas de secagem do malte de milho do malte sem reduzir a atividade de suas enzimas. Fatores como tempo (entre 5 a 12 h) e temperatura (54, 65 e 76°C) de secagem foram estudados através de um planejamento fatorial e otimização RSM. Os resultados mostraram que a máxima atividade enzimática nas sementes germinadas se apresentou no quarto dia e o modelo ajustado foi semelhante ao de crescimento de microorganismos. A secagem foi rápida e sua melhor condição foi a 54 °C e em tempo menor ou igual a 6 horas. Assim, este trabalho virá a contribuir com a produção do malte de milho, pois suas etapas de processamento foram otimizadas e possibilitará agregar valor a cultura.

MAXIMIZAÇÃO DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO MALTE DE *Zea mays*#

Joana Paula Menezes Biazus¹, José Carlos Curvelo Santana²; Roberto Rodrigues de Souza^{1*}; Elias Basile Tambourgi²

^{1*}Departamento de Engenharia Química, CCET-UFS, S/N, Rosa Elze, CEP: 49.100-000 - São Cristóvão - SE – Brasil, E-mail: rrsouza@ufs.br

²DESQ/ FEQ/ UNICAMP, Av. Albert Einstein, 500, P. Box: 6066, CEP: 13083-970 - Campinas – SP – Brasil, E-mail: eliatam@feq.unicamp.br

RESUMO: Neste trabalho foram feitos estudos da otimização da germinação das sementes e do processo de secagem para a obtenção do malte de milho. Assim, fatores que influenciam na obtenção de um malte com uma boa atividade enzimática das α e β -amilases foram observados com intuito de agregar valor à cultura do milho. As sementes de milho foram umedificadas até 40 a 45 % de seu peso total e a germinação ocorreu em escala laboratorial. Diariamente era medida a atividade enzimática nas sementes (SANTANA, 2003). Os dados experimentais serviram para obter um modelo empírico que descrevesse o comportamento da atividade enzimática nas sementes com o tempo de germinação. A secagem se deu em um secador convectivo com circulação de ar em temperaturas e tempo planejados. As medições da variação da umidade e da atividade enzimática com o tempo de secagem foram feitas segundo as metodologias apresentadas em ASCAR (1985) e em REGULY (1996). A máxima atividade enzimática nas sementes germinadas se apresentou no quarto dia e o modelo ajustado foi semelhante ao de crescimento de microorganismos. A secagem foi rápida e sua melhor condição foi a 54 °C e em tempo menor ou igual a 6 horas. Assim, este trabalho virá a contribuir com a produção do malte de milho, pois suas etapas de processamento foram otimizadas e possibilitará agregar valor a cultura.

Palavras chave: Otimização, α e β – amilases, malte de *Zea mays*; secagem, germinação.

MAXIMIZING OF PRODUCTION STAGES OF MALT FROM *Zea mays*

ABSTRACT: In research work were make an optimization study in seeds germination and drying process for maize malt manufacture. Thus, looking the factors that influencing in obtaining the maize malt with high enzymatic activity of α e β – amylases, and it attempts aggregated value to maize culture. The maize seeds were humidified until 40 at 45 % of total weight and the germination was occurring in laboratorial scale. Daily the enzymatic activity was measured in the maize seeds (SANTANA, 2003). How the experimental data, the empiric model for describing to behavior of the enzymatic activity with germination time was fitting. The drying process was making in a convective dryer with air circulation in planning temperatures and time. The moisture and enzymatic activity changing with the drying time were measured by methodologies showed in the ASCAR (1985) and REGULY (1996). The maximum enzymatic activity in the maize seeds occurred in the fourth day and the fitting model was similar to microorganism grown model. The maize drying process was speed and its optimal condition was at 54 °C for time minor or equal at 6 hours. Thus, this work will go contributed with the maize malt manufacture, for its processing stages were optimized, it may be to aggregate valor to maize culture.

Keywords: Optimization, α and β – amylases, *Zea mays* malt; drying process, germination.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Fisiologia das sementes de milho

O milho (*Zea mays*) é um produto agrícola muito difundido no Brasil, comercializado “in natura” ou processado a baixo valor econômico, sendo assim, a obtenção das enzimas α e β - amilases de malte de milho gerariam um produto de alto valor agregado. Este é classificado como mono cotilédone, e suas sementes estão divididas em: camada protetora (casca), aleurona, endosperma e o embrião. O último é composto pelo cotilédone, o epicótilo (que origina o broto) e a radícula (que se origina a raiz). A Figura 1 mostra a germinação de uma monocotilédone que ocorre quando o crescimento da radícula rompe o tegumento da semente e aparece como uma raiz jovem. A energia para a germina-

ção da semente vem da respiração do açúcar do endosperma. Contudo, o embrião e o amido estão separados um do outro, ou seja, para que a semente germine deve haver ação de forças externas para ativar suas funções fisiológicas.

Naturalmente, há uma pequena atividade biológica nas sementes, devido à presença da enzima β -amilase que degrada o amido para produzir a maltose e fornecer energia para manter a atividade biológica nas células da semente. A água entrando na semente e no embrião dissolve uma substância produzida no interior do embrião. Esta substância é conhecida como ácido giberélico (AG). Este é um hormônio vegetal não muito diferente dos esteróides. O AG dissolvido é transportado com a água pelo restante dos tecidos da semente, até chegar à camada de aleurona. O AG entra no citoplasma dessas células, "ativando" certos genes do DNA nuclear. O DNA é, naturalmente, a molécula hereditária e contém as instruções para fazer todas as proteínas necessárias para a sobrevivência da planta de cevada. O mecanismo preciso sobre como o AG "ativa" o DNA é ainda desconhecido. É claro, contudo, que o modo de ação é ligar apenas alguns genes específicos do DNA (AQUARONE *et al.*, 2001; SANTANA, 2003).

Os genes que são "ligados" são transcritos. A informação arquivada em DNA é preciosa, de modo que as células de aleurona fazem uma cópia "descartável" em RNA do gene que está ligado. Esta cópia, como um tipo de projeto, é chamada de RNA mensageiro. O processo de fazer esta cópia é chamado transcrição. O RNA que foi feito no processo de transcrição é transportado até o citoplasma das células de aleurona. No citoplasma, o RNA mensageiro se junta ao ribossomo para começar o processo de produção de uma proteína. Este processo é denominado síntese protéica ou tradução. Neste processo o ribossomo examina a informação mantida na sequência de bases do RNA.

RNAs transportadores carregados com aminoácidos específicos são colocados nas posições especificadas nas instruções do RNA mensageiro e os aminoácidos são agrupados na sequência certa pelo ribossomo. A sequência de aminoácidos determina as propriedades da proteína que está sendo montada. Neste caso, a proteína crítica feita com a informação mantida no RNA é a α -amilase. Esta proteína resulta em uma enzima de mesmo nome grande importância para a indústria de alimentos (SANTANA, 2003).

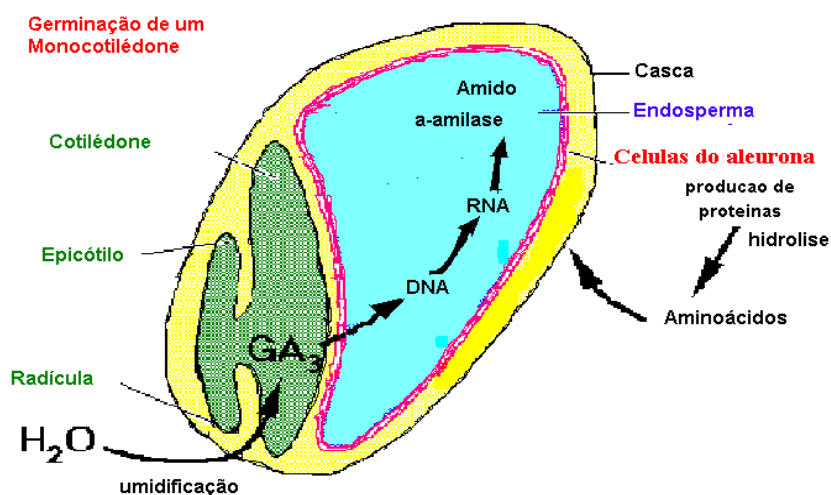


Figura 1. Esquema da síntese da enzima α -amilase, em semente de monocotilédone.

1.2 - Enzimas amilolíticas

Desde o início do século, o estudo da viabilidade de aplicação das enzimas em processos biotecnológicos têm tido um grande destaque a nível Mundial. Dentre estas enzimas podemos destacar como as mais importantes para a biotecnologia até o momento as enzimas α e β amilases. O uso fundamental das amilases está na hidrólise do amido, principalmente na indústria de panificação; no pré-cozimento de cereais nas indústrias de fermentação, para a produção de álcool e bebidas alcoólicas; na fabricação de xaropes de glicose, via hidrólise pelas amilases; no preparo de gomas de dextrinas, usadas para acabamento de papéis e tecidos, dentre outros.

As enzimas α -amilase (EC 3.3.1.1; α -1,4 glicano, 4 - glicanohidroxilase) e β -amilase (EC 3.2.1.1, α -1,4, glicanomaltoidrolase) são muito utilizadas nas indústrias de álcool, principalmente as cervejarias, em indústrias têxteis, em indústrias de processamento de farinhas. Normalmente, elas são obtidas de malte de cevada (embora qualquer cereal germinado as contenha) ou de microorganismos. Suas temperaturas e pHs ótimos variam entre 75°C e 55°C e 4,8 e 6,5; respectivamente, dependendo da sua origem (FORGATY and KELLY, 1979). Tais enzimas são obtidas comumente de malte de cevada ou de microorganismos e seus preços, após purificação, alcançam US\$ 1,500.00 (SIGMA CHEMICAL Co., 1996).

1.3 - Secagem

Um método utilizado em vários países que visa contribuir com a preservação da atividade enzimática original do produto é a secagem. A secagem é a remoção de uma substância volátil (comumente, mas não exclusivamente, a água) de um produto sólido, ou seja, a operação na qual a atividade de água de um determinado produto é diminuída pela remoção de água, através de sua vaporização. A água presente no sólido é chamada de umidade. Assim, a secagem é um conjunto de ciência e tecnologia que requer minuciosas observações experimentais de alguns fenômenos que ocorrem durante o processo (JESUS, 2002).

Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi otimizar as etapas de produção do malte de milho para obter um produto final com boa atividade enzimática. Para tanto estudou-se minuciosamente a influência dos fatores tempo de germinação, no processo de maltação, temperatura e tempo, no processo de secagem, sobre a atividade das enzimas amilolíticas do malte de milho.

2 - METODOLOGIA

2.1 - Maceração das Sementes

Sementes selecionadas provenientes da EMBRAPA-SE foram limpas com água destilada, para eliminar ácidos voláteis e outras substâncias retidas na superfície dos grãos, depois as sementes foram umedecidas até que as mesmas atingissem entre 40 a 45% de umidade, trocando-se a água a cada uma hora. O tempo de duração deste processo girou em torno de 12 a 14 horas, sendo observada a máxima absorção relativa de umidade pelas sementes durante a lavagem e nas primeiras 4 horas do período de absorção de umidade (AQUARONE *et al.*, 2001; SANTANA, 2003).

2.2 - Germinação

Foi feita em bancada de laboratório, onde as sementes úmidas foram distribuídas sobre uma superfície artificial, a superfície era composta de folhas de papel de filtro (tamanho A4) e estas sobre camadas de algodão, para reter o máximo possível de umidade

na superfície, evitando assim que as sementes perdessem umidade. As sementes foram umedificadas com água destilada, utilizando-se borrifadores. A germinação foi interrompida após o 8º dia, quando se observou o aparecimento de folíolos nos brotos (AQUARONE *et al.*, 2001; SANTANA, 2003).

2.3 - Amostragem

As amostras foram coletadas diariamente em um mesmo horário, sendo depois moídas em moinho de parafuso e uma pequena massa variando entre 1,0 g a 2,0g da mesma foram solubilizadas a 50 mL em solução de NaCl e CaCl₂ a 3 e 2 g/L respectivamente (SANTANA, 2003).

2.4 - Medição da atividade enzimática

Foi feita pelo Método de Wohlguth, modificado por Sandstedt, Kneen, Blish, o qual se baseia na dextrinização de certa massa de amido solúvel que sob influência de um excesso de β -amilase, pela α -amilase em uma hora, sendo sua unidade usual dada em SKB (REGULY, 1996).

2.5 - Determinação da concentração de proteína total

A variação da concentração de proteína no malte foi acompanhada a cada hora de secagem, sendo determinada pelo método de BRADFORD (1976), que consiste na análise da absorbância a 595 nm do complexo formado entre as proteínas e o reagente de Coomassie bilitante blue - G.

2.6 - Processo de secagem do malte

Este foi realizado em um secador convectivo com circulação de ar em condições temperatura, umidade relativa e vazões constantes. Foram utilizadas três temperaturas: 54°C, 64°C e 76°C seguindo o planejamento previamente feito em torno das temperaturas ótimas das enzimas (veja a Tabela 2). As sementes de milho germinadas (malte) foram pos-

tas em vidros de relógio previamente secos e tarados nas devidas temperaturas, medidos os seus pesos úmidos e postas a secagem nas temperaturas indicadas. Após cada hora de processo (12 h no total) foram coletadas amostras para medir o peso seco das sementes e obter a umidade nelas contida, por diferença de peso. Para a determinação da umidade inicial dos grãos foi feita a exposição das sementes a 103-105°C durante 40 a 50 horas de processo de acordo com a metodologia descrita por ASCAR (1985). O peso das sementes maltadas secas (X_i) foi dividido pelo peso úmido (X_0) e assim, ele foi adimensionalizado (X_{exp}). Foram montadas as isotermas de dessorção para as temperaturas citadas, que estão apresentadas na Figura 4 (FREIRE e SARTORI, 1998; JESUS, 2002).

2.7 - Planejamento e otimização da secagem do malte

Neste item foi investigada a influência do tempo (t) e temperatura (T) de secagem sobre a atividade enzimática (AE) do malte de milho, para tanto foi feito um planejamento experimental do tipo 2^2 com “design” hexagonal (ver Tabela 3). Os modelos testados foram lineares, quadráticos, nas formas logarítmica e exponencial dos fatores com a resposta. Os cálculos matriciais para a obtenção das estimativas dos parâmetros dos modelos foram feitos pelo método dos mínimos quadrados, a avaliação do ajuste dos modelos foi feita pela metodologia de análise da variância (ANOVA) e a otimização pela metodologia de análise de superfície de resposta (RSM), todos descritos em BARROS NETO *et al.* (1995 e 2001). As codificações utilizadas neste planejamento fatorial foram as seguintes:

$$x_1 = \frac{t_i - 8}{2} \quad (1) \quad \text{e} \quad x_2 = \frac{T_i - 65}{11} \quad (2)$$

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Produção do malte

Na tabela a seguir encontram-se os dados de atividade enzimática das sementes de milho durante a germinação em escala laboratorial. Foram realizados três ensaios num mesmo período com as sementes de uma mesma safra. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e seus valores médios estão apresentados para cada ensaio na Tabela 1.

A seguir vemos a Figura 2 que mostra o crescimento de atividade enzimática (*AE*) das amilases durante o decorrer de um período de 8 dias, para três ensaios com amostras de uma mesma variedade de milho, de mesma época de colheita, germinadas no mesmo período, com umidade controlada e nas condições ambientais de temperatura e pressão.

Tabela 1. Dados experimentais de atividade enzimática durante a germinação das sementes de milho (*Zea mays*).

Tempo (dias)	Atividade Enzimática (SKB)		
	Ensaio 01	Ensaio 02	Ensaio 03
0	0,157	0,117	0,0762
1	0,234	0,234	0,25
2	2,182	2,074	1,959
3	5,714	5,648	5,581
4	21,818	24,242	26,667
5	6,667	8,386	10,105
8	5,714	7,48	8,727

Nesta figura pode-se observar que a atividade enzimática durante a germinação, apresenta comportamento semelhante para ambos os ensaios. Vê-se que a atividade enzimática apresenta crescimento lento até o terceiro dia após as sementes serem postas a germinar, sendo que no quarto dia alcançam seu valor máximo em ambos os experimentos, gerando um pico nos gráficos, para depois cair a um valor constante. É de se esperar inicialmente uma taxa de atividade enzimática baixa nas sementes (quase exclusivamente devido à presença das β -amilases) já que estas ainda estão em estado de dormência. Quando a água penetra na semente, facilita o transporte de glicerídeos (formas pela β -amilase) e do ácido giberélico (AG) para as camadas de aleurona onde, os primeiros fornecerão energia para alimentar as células, enquanto que, o segundo ativa os genes do DNA, responsáveis pela formação das α -amilases. Com isto percebe-se que esta geração de enzimas a princípio é lenta, acelerando posteriormente até que alcança seu valor máximo no quarto dia, quando a concentração de produtos gerados pelas enzimas faz com que parte destas sejam inibidas e sua atividade reduza a um valor constante (SANTANA, 2003).

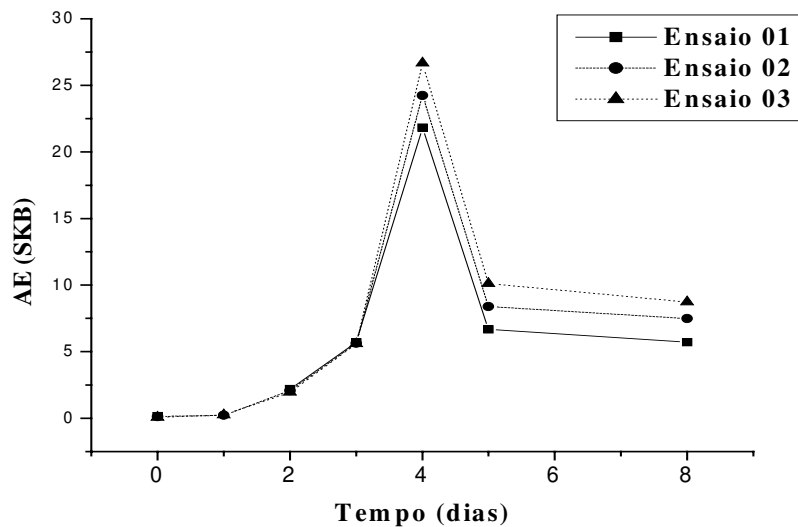


Figura 2. Comportamento da atividade enzimática (*AE*) durante a germinação das sementes de *Zea mays*.

3.2 - Modelagem da germinação

É perceptível quando observamos a Figura 3 que há um comportamento semelhante a uma curva do tipo exponencial, na etapa de crescimento enzimático (primeira parte antes dos picos nos gráficos). Logo este comportamento pode ser modelado semelhante ao da taxa de crescimento microbiano, do tipo $y = y_0 e^{\mu x}$. Então, em nosso estudo, para provar que esta analogia é válida faremos as seguintes denominações:

AE será a simbologia usada para a atividade enzimática (neste caso em SKB);

*AE*₀ é a atividade enzimática das sementes 'in natura' ou a atividade inicial das sementes (SKB);

t, o tempo de germinação das sementes (em dias);

E μ é a taxa de crescimento da atividade enzimática da semente característica para cada variedade.

Desta forma, nosso modelo será escrito como sendo:

$$AE = AE_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

A partir de um ajuste exponencial dos dados de atividades enzimáticas (valores médios), obtidas experimentalmente em escala laboratorial e apresentados na Tabela 1, foram encontrados os valores dos parâmetros AE_0 e μ os valores apresentados na seguir nas equações 4, 5 e 6. Como vemos a taxa de crescimento enzimático (μ) apresenta um valor próximo de $1,362 \text{ (dias)}^{-1}$ (0,133 de desvio, 9,8% de erro), mostrando que este valor é característico para a variedade estudada. Contudo, mesmo em amostras de uma mesma safra a atividade destas no estado natural (atividade inicial, AE_0) não pode ser considerada como constante, já que seu valor médio ficou em torno de 0,110 e sua oscilação foi de 44 % (0,048 de desvio padrão), ou seja, este valor é característico das amostras, embora seus genótipos sejam parecidos.

$$AE_{(1)} = 0,1643 e^{1,2197 t} \quad R = 0,9986 \quad (4)$$

$$AE_{(2)} = 0,0944 e^{1,3851 t} \quad R = 0,9902 \quad (5)$$

$$AE_{(3)} = 0,0727 e^{1,4821 t} \quad R = 0,9958 \quad (6)$$

A Figura 3 mostra as curvas geradas pelos modelos empíricos que correlacionam à atividade enzimática com o tempo de germinação das sementes de milho. Perceba que os dados estão bem ajustados às curvas, além das correlações estarem próximas dos seus valores máximos (1,0), indicando assim, um bom ajuste dos modelos.

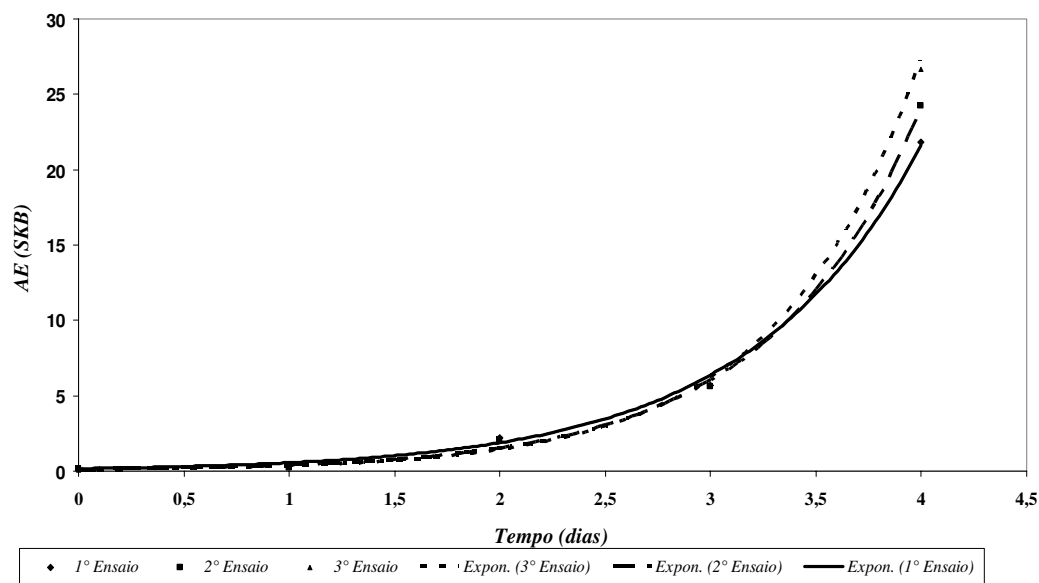


Figura 3. Apresentação da dependência de AE com o tempo de germinação na forma de modelos empíricos.

3.3 - Secagem do malte de milho

A Tabela 2 apresenta os valores dos pesos secos adimensionalizados das sementes maltadas em suas devidas temperaturas de secagem. Percebe-se através da análise destes dados que o valor de umidade presente no malte de milho ficou em torno dos 40 a 43 % do peso total das sementes e que os menores valores de peso seco se apresentaram a 75°C.

Estes dados serviram de base para a obtenção das isotermas de sorção de umidade das sementes de malte de milho, como estão apresentadas na Figura 4. Através da análise gráfica, vê-se que a umidade nas sementes começa a se estabilizar entre a terceira e quarta hora de secagem, quando os gráficos se apresentam assintóticos com o eixo das abscissas, comportamento este, já apresentado por vários autores, sendo que na isoterma a 75 °C observam-se os maiores valores de dessorção de umidade.

Tabela 2. Dados experimentais da secagem de malte de milho (*Zea mays*).

Ensaio	Temperaturas de Secagem					
	54°C		65°C		76°C	
	<i>t</i> (h)	<i>X_{exp}</i>	<i>t</i> (h)	<i>X_{exp}</i>	<i>t</i> (h)	<i>X_{exp}</i>
	0	1	0	1	0	1
1	1	0,6822	1	0,6663	1	0,6950
2	2	0,6493	2	0,6037	2	0,6408
3	3	0,6227	3	0,6000	3	0,5844
4	4	0,6136	4	0,5946	4	0,554
5	5	0,5854	5,15	0,5775	5	0,5789
6	6	0,5638	6	0,5635	6	0,5854
7	7	0,5891	7	0,5833	7	0,5586
8	8	0,5915	8	0,5796	8	0,6322
9	9	0,5667	8	0,5787	9	0,5338
10	10	0,5860	8	0,5802	10	0,5648
11	11	0,6067	9	0,5781	11	0,5469
12	12	0,5773	10	0,5802	12	0,5888
13			10,85	0,5900		
14			12	0,6027		

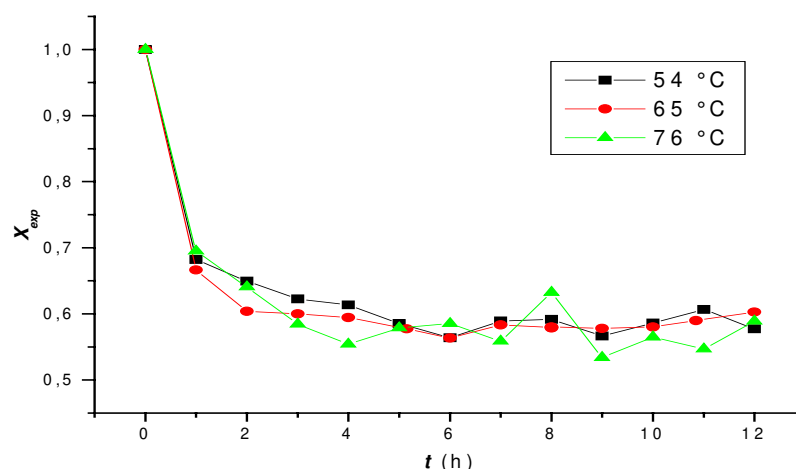


Figura 4. Curvas de secagem do malte de sementes de milho (*Zea mays*).

3.4 - Otimização da secagem

A Tabela 3 apresenta os ensaios realizados a partir da combinação dos pontos do “design” elaborado para o planejamento. Nesta encontram-se os valores experimentais de atividade enzimática específica (*AE*), resposta *y*, obtida em cada ensaio. Estes serviram de base para a regressão pelo método dos mínimos quadrados e obtenção dos modelos, bem como a posterior avaliação destes pela metodologia ANOVA, como será visto a seguir.

Tabela 3. Matriz de planejamento utilizada para realizar a otimização do processo de secagem do malte de sementes de milho (*Zea mays*).

Ensaio	<i>t</i> (h)	<i>T</i> (°C)	<i>x</i> ₁	<i>x</i> ₂	<i>AE</i>
1	6	54	-1	-1	6,684
2	10	54	+1	-1	1,710
3	6	76	-1	+1	0,1292
4	10	76	+1	+1	0,2656
5	8	65	0	0	0,4822
6	8	65	0	0	0,4522
7	8	65	0	0	0,5851
8	5,18	65	-1,41	0	0,2571
9	10,8	65	+1,41	0	0,3097

Na Tabela 4 encontram-se os resultados obtidos pela análise de variância (ANOVA) para o modelo ótimo. Nela encontramos valores de análise da variância explicável, máxima explicável e correlação múltipla (R^2), pois quanto próximos estes valores estiverem de 100 (1º e 2º) e 1,0 (3º), menor será a quantidade de erros acumulada no modelo. Percebe-se que os valores citados abaixo se enquadram no pedido pela literatura, então pelo conceito dos mesmos, pode-se afirmar que o modelo apresenta baixos erros devido à regressão (variâncias e R^2) e baixíssimos erros devido aos métodos empregados nas análises.

As duas colunas finais da Tabela 4 apresentam os testes F , sendo que o primeiro indica que o modelo é significativo, ou seja, os dados preditos se aproximam dos experimentais e o segundo indica que os dados estão ajustados e descrevem bem a superfície de resposta. Para validar o primeiro teste é necessário que o valor do F_{calc} (calculado) seja quatro vezes maior que o F_{tab} (tabelado) (BARROS NETO *et al.*, 1995), condição esta que se aproxima da encontrada na Tabela 4, mostrando que o modelo é significativo dentre os estudados neste trabalho. No caso do segundo teste, a condição de validade é inversa, ou seja, F_{calc} tem que ser quatro vezes menor que F_{tab} (BARROS NETO *et al.*, 1995), mas para o modelo observa-se que o F_{calc} é duas vezes menor que o F_{tab} , isto significa que os dados não conseguem descrever bem a superfície, embora seja o modelo que mais se ajustou ao processo (BARROS NETO *et al.*, 1995 e 2001).

Tabela 4. Análise da variância do modelo que mais se ajustou ao a otimização processo de secagem.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F_{calc}	F_{tab}
Regressão	10,981	5	2,196		
Resíduos	0,211	3	0,070	31,269	9,01
Falta de Ajuste	0,175	1	0,175		
Erro Puro	0,036	2	0,018	9,718	18,51
Total	11,118	8			
% de variância explicada =				98,763	
% máxima variância explicável =				99,677	
Coeficiente de Determinação (R^2) =				0,9876	

A seguir está apresentada a equação 6, que descreve o modelo ótimo para avaliar a dependência da atividade enzimática durante o processo de secagem do malte de milho. Percebe-se que nesta equação a atividade enzimática específica (*AE*) está na forma de logaritmo natural e sua dependência com os fatores, tempo (*t*) e temperatura (*T*) de secagem.

$$\ln AE = -0,6886 + 0,0476.t - 1,4522.T - 0,2910.t^2 + 0,7437.T^2 + 0,5209.t.T \quad (6)$$

A superfície de resposta obtida a partir do modelo ótimo está apresentada na Figura 5. Percebe-se que a atividade enzimática (na forma de *ln*) aumenta com a redução do tempo e temperatura de secagem, isto mostra que ao se fixar o tempo na faixa dos menores valores (máximo de atividade), -1 a -1,41 (5,18 e 6 h) e aumentarmos a temperatura ao seu maior valor, +1 (76 °C), a atividade cai bruscamente.

Enquanto que se fixarmos a temperatura no seu menor valor, -1 (54°C) e variarmos o tempo do seu menor valor, -1,41 (5,18 h), para o maior, +1,41 (10,8 h), a atividade sofrerá uma leve redução, indicando que o efeito da temperatura é crítico neste processo.

Isto se deve ao fato das β -amilases possuírem temperaturas ótimas próximas dos 54°C e desta feita, elas serão as primeiras a serem inativadas por desnaturação térmica ao serem expostas a maiores temperaturas por um longo tempo de secagem.

Enquanto que as α -amilases por possuírem temperaturas ótimas próximas e até acima de 76 °C, mas também serem inativadas pelo calor (como qualquer outra enzima) ao serem expostas por um longo tempo a uma determinada temperatura (AQUARONE *et al.*, 2001; FORGATY and KELLY, 1979; WISEMAN, 1987).

O produto de interesse neste processo de secagem é o malte de milho seco, para que se evite a fácil contaminação por microrganismos e aumente o seu tempo de prateleira; e com boa atividade enzimática, pois sem sua função catalítica este produto não possuirá interesse comercial. Sendo assim, pela análise das superfícies de resposta pode-se indicar a região ótima para o processo de secagem do malte de milho (*Zea mays*), como sendo aquela que se encontra a 54°C de temperatura e 5,18 a 6 h de secagem.

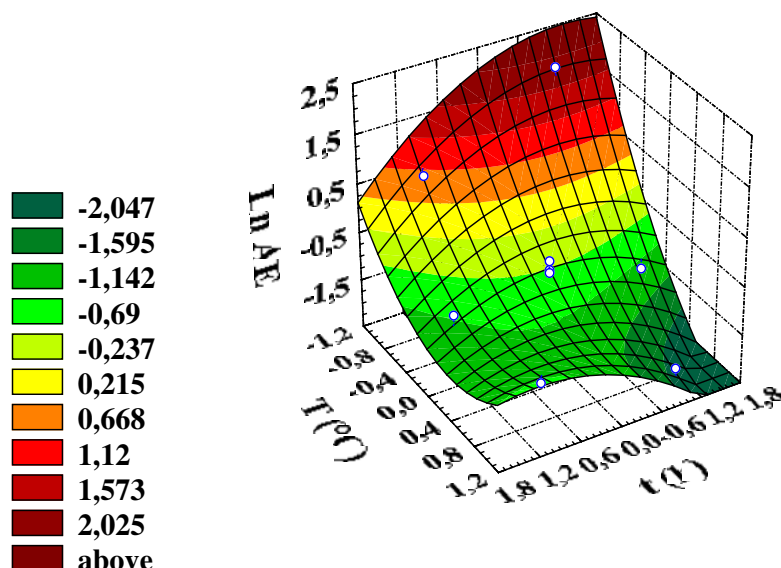


Figura 5. Superfície de resposta que descreve o comportamento da atividade enzimática sobre influência do tempo e temperatura no processo de secagem do malte de milho (*Zea mays*).

4 - CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados e discussões pode afirmar que:

- A plotagem dos dados de tempo em dias e atividade enzimática em SKB, resultou numa curva em forma de pico, onde a máxima atividade das sementes foi observado no quarto dia de germinação e observamos que até a formação do pico a atividade enzimática (AE) é uma função exponencial do tempo (t), do tipo: $AE = A_0 e^{\mu t}$, onde AE_0 é a atividade da semente 'in natura' e μ é a taxa de crescimento da atividade enzimática da semente característica de cada variedade, análogo ao crescimento de microrganismos. Desta forma temos um estudo definido das sementes de *Zea mays*, que otimiza o quarto dia de germinação como sendo a sua máxima atividade enzimática, o que é de grande utilidade nos processos de maltagem destas sementes.

- Os dados do processo de secagem mostraram que a umidade retirada do malte de milho ficou acima dos 40 % do peso total das sementes, sendo que seus maiores valores se encontraram na temperatura de 76°C. As isotermas de secagem apresentaram comportamento assintótico com o eixo do tempo, como descrito na literatura e sua taxa se

tornou constante a partir da terceira ou quarta hora de processo, mostrando que a partir desta faixa de tempo o produto já está seco e pronto para ser armazenado.

- Pela análise da variância (ANOVA), o modelo que mais se ajustou ao processo de secagem do malte de milho foi aquele que apresentou a dependência quadrática da atividade enzimática na forma de logaritmo natural (*lnAE*) com o tempo (*t*) e a temperatura de secagem (*T*). A análise das superfícies de resposta mostrou uma influência maior da temperatura que a do tempo de secagem sobre a atividade enzimática no malte de milho e indicou como a melhor região para se processar a secagem do malte de milho (*Zea mays*), como sendo aquela que se encontra a 54°C de temperatura e 5,18 a 6 h de secagem.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS

ASCAR, J. M.. Alimentos: Aspectos Bromatológicos e Legais. Análise Percentual. Vol.01. 1ª Ed. UNISINOS Editora. São Leopoldo – RS - Brasil. 1995, p243-252.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. Vol. 1, 1ª edição, Coleção Livros - Textos, EDUNICAMP, Campinas – SP, 2001, p 406.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. Planejamento e Otimização de Experimentos. Vol. 1, 1ª edição, Série Manuais, EDUNICAMP, Campinas – SP, 1995, p 302.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976.

FOGARTY, W. M. and KELLY, C. T.; Topics in Enzyme and Fermentation. Biotechnolog. V.3, J. Wiley & Sons, 1979.

FREIRE, J. T e SARTORI, D. J. M. Secador – Transportador Tipo Esteira. Processo de Secagem e Qualidade do Produto. 25º Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, São Carlos – SP. Anais do XXV ENEMP V. II, São Carlos – SP, p 475-479, 1998.

JESUS, S.S. Desenvolvimento e Análise do Processo de Secagem de α – amilase por Microondas à Vácuo. Campinas – SP: FEQ/ UNICAMP. 2002, p. 13-15. (Dissertação de Mestrado).

SANTANA, J. C. C. Recuperação das enzimas α e β -amilases em sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl_2 para uso como biocatalizador amiláceos. Campinas – SP, FEQ/ UNICAMP, 2003, 232p. (Dissertação de Mestrado)

SIGMA CHEMICAL COMPANY, CATALOGUE. Biochemicals organic compounds and diagnostic reagents, 1996, p.116-117.

WISEMAN, A. Handbook of Enzyme Biotechnology. 2^a ed., John Wiley Sons, New York, EUA, 1987.

6 – AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e ao PIBIC-UFS/CNPq pela concessão das bolsas.

CAPÍTULO VI

ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE AMILASES DE MALTE DE MILHO POR CROMATOGRRAFIA DE TROCA IÔNICA EM LEITO EXPANDIDO

ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE AMILASES DE MALTE DE MILHO POR CROMATOGRAPHIA DE TROCA IÔNICA EM LEITO EXPANDIDO[#]

Joana Paula Menezes Biazus, João Baptista Severo Jr., Roberto Rodrigues de Souza

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Sergipe, Cidade Universitária,
Prof. José Aloísio de Campos, Av. Marechal Rondon, S/N, Rosa Elze, CEP: 49.100-000, São
Cristóvão, SE, Brasil. E-mail: rrsouza@ufs.br

José Carlos Curvelo Santana e Elias Basile Tambourgi

Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária
“Zeferino Vaz”, Av. Albert Einstein, 500, Caixa Postal: 6066, CEP 13081-970, Campinas, SP,
Brasil.

O presente capítulo é resultado de um trabalho elaborado em conjunto com o Departamento de Engenharia Química (DEQ), da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e publicado na revista *Process Biochemistry* vol. 41, n° 8, pp.1786-1791, em abril de 2006. A partir do malte milho obtido nas condições ótima de produção, uma solução do mesmo a 20g/L foi preparada em tampão fosfato e em tampão Tris/HCl ambos a 0,07M e a pH 7. Então, a purificação das amilases deste malte por cromatografia de adsorção em leito expandido sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410 foi estudada, observando os efeitos da expansão do leito e do tipo de tampão. O comportamento hidrodinâmico da coluna de leito expandido sob os efeitos da adição de biomoléculas (malte de milho) e do tipo de sais também foi estudado. O estudo da distribuição do tempo de residência mostrou que a HETP, a dispersão axial e o número de Peclet aumentaram com a altura e a porosidade do leito e com a velocidade linear. A capacidade de adsorção de amilases sobre a resina aumentou com a expansão do leito e o tampão fosfato foi o melhor para a recuperação de amilases do malte de milho sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410. O fator de purificação foi superior a 500 vezes o valor da atividade contida no malte do milho, mostrando que o processo foi eficiente e que a resina possui afinidade com as enzimas estudadas.

[#] Artigo publicado pelo periódico *Process Biochemistry* 41(8), 1786-1791, 2006.

ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE AMILASES DE MALTE DE MILHO POR CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM LEITO EXPANDIDO

Biazus, J. P. M.¹; Severo Jr., J.B.¹; Santana, J.C.C.²; Souza, R. R.^{1*}; Tambourgi, E.B.²

^{1*} Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Sergipe, Cidade Universitária, Prof. José Aloísio de Campos, Av. Marechal Rondon, S/N, Rosa Elze, CEP: 49.100-000, São Cristóvão, SE, Brasil. E-mail: rrsouza@ufs.br

² Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

No presente trabalho foi estudado os efeitos da expansão do leito e do tipo de tampão sobre a adsorção de amilases de malte de milho sobre a resina de troca iônica Amberlite 410. O comportamento hidrodinâmico de uma coluna de adsorção em leito expandido sob efeitos da concentração de biomoléculas e do tipo de sal também foram estudados para obter a condição ótima de recuperação de amilases sobre a resina de troca iônica. A distribuição do tempo de residência mostrou que a HEPT, a dispersão axial e o número de Peclet aumentaram com a altura e porosidade do leito e com a velocidade linear. A capacidade de adsorção das amilases sobre a resina aumentou com a altura do leito e o tampão fosfato é o melhor tampão para se recuperar as amilases de malte de milho sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410.

Palavras chaves: Amilase, malte de milho, adsorção em leito expandido, resina de troca iônica Amberlite IRA 410, coeficiente de Richardson-Zack.

ABSTRACT

In the present work the effects of bed expansion and buffer type on the adsorption of amylases from maize malt on Amberlite 410 ion-exchange resin was studied. The hydrodynamic behavior

of an expanded bed adsorption column on effects of the biomolecules and salt concentration and salt type were so studied to obtain of the optimal conditions of amylases recovery on ion-exchange resin. Residence time distribution showed that HEPT, axial dispersion and the Peclet number increased with bed height, bed voidage and linear velocity. The adsorption capacity of amylases on the resin increased with bed height and the phosphate buffer is the best buffer for recovering of amylases from maize malt on the Amberlite IRA 410 ion-exchange resin.

Keywords: Amylase, maize malt, expanded bed adsorption, Amberlite IRA 410 ion-exchange resin, Richardson-Zack coefficient.

1 - INTRODUÇÃO

Os três principais *downstream processes* são a extração em sistemas bifásicos aquosos, separação por membranas e sorção em leito fluidizado. A adsorção em leito fluidizado (ALE) é um *downstream process* desenvolvido da cromatografia de proteínas, mas diferencia-se daquela por apresentar o leito de adsorventes cromatográficos fluidizado. Isto permite a alimentação bruta sobre a coluna cromatográfica sem um tratamento inicial para eliminar o material biológico suspenso, e como o leito expandido aumenta a superfície de contato do adsorvente, torna mais efetiva a interação com a molécula alvo [1, 2, 3]. Atualmente vários estudos sobre o comportamento do leito expandido estão sendo realizados para melhor compreensão dos efeitos do tipo e tamanho dos adsorventes [4, 5], da altura do leito, da velocidade linear [6], da fluidização e das soluções de eluição sobre a distribuição do tempo de residência (DTR) [3, 7] para aplicação em recuperação de biomoléculas importantes.

Dainiak *et al.* [5] propuseram uma nova técnica para tratamento de resinas de troca aniônicas na adsorção de um produto de fermentação denominado de ácido *shikimic* aplicando o mosto fermentado, contendo células, diretamente da dorna de fermentação. As resinas aniônicas Amberlite 401 e 458 foram tratadas com o polímero hidrofílico de ácido poli-acrilamida (PAA), passando para as formas PAA-Amberlite 401 e PAA-Amberlite-458. A capacidade de ligação do ácido *shikimic* pura foi de 81 mg/mL de adsorvente para ambas as PAA-Amberlite com ligações cruzadas e Amberlite naturais no modo fluidizado de operação da coluna. A capacidade de liga-

ção reduziu para 17 e 15 mg/mL, respectivamente, quando usou-se o mosto fermentado filtrado e para cerca de 10 mg/mL para as PAA-Amberlite com ligações cruzadas quando usou-se o mosto fermentado contendo células diretamente. A Amberlite natural não pode ser usada diretamente na adsorção do ácido *shikimic* devido a obstrução imediata da coluna e ao colapso do leito expandido. As PAA-Amberlite com ligações cruzadas foram usadas repetidamente para a direta adsorção do ácido *shikimic* proveniente de fermentadores industriais.

Em recente trabalho, a albumina de soro humano (HSA) de suspensão alta densidade de *Saccharomyces cerevisiae* foi recuperada por adsorção em leito expandido de zirconia modificada (FmZr) [6]. A hidrodinâmica do leito expandido foi estudada como uma função da expansão do leito usando estudos de DTR com nitrito de sódio como traçador. A 5% da curva de ruptura, os autores perceberam que a capacidade de ligação de proteínas decresceu de 22 mg HSA/mL de volume do leito de adsorvente a uma densidade de 20 g DCW/L de leveduras, para 15 mg HSA/mL de volume do leito de adsorvente a uma densidade de 40 g DCW/mL leveduras e permaneceu sem variar para altas concentrações de leveduras (60 a 100g DCW/L). Entretanto, a capacidade de equilíbrio reduziu monotonicamente como uma função da concentração de leveduras (20 a 100 g DCW/L) e a capacidade de ligação a 100 g DCW/L de leveduras foi cinco vezes menor que a 20 g DCW/L de leveduras. A redução da capacidade de equilíbrio a altas concentrações de células resultou da adsorção de células sobre a superfície das partículas, restringindo o acesso da HSA a área superficial intrapartícula. De acordo com Mullick and Flickinger [6], na remoção da HSA adsorvida e das leveduras das partículas de zirconia usou-se cerca de 1500 a 2000 volumes da coluna de NaOH a 0,25 M. Não se observou efeitos significantes sobre a performance da cromatografia neste tratamento.

Em seu trabalho, Fernandez-Lahore *et al.* [3] examinaram a possibilidade de uso de um eletrodo de íon-seletivo (ISE) para a determinação da DTR em fluido celular turvo. A compatibilidade do IES com a elevação da alimentação bruta é melhor que a sensibilidade de outros traçadores usados e permite uma melhora no estudo de sistemas hidrodinâmicos de leitos sob relevantes condições operacionais. Com a faixa linear do par correspondente ISE-traçador, são normalmente medidas ambas as taxas e pH durante a adsorção em leito expandido (ALE) de proteínas. As DTR analisadas após obtenção dos pulsos perfeitos traçados pelo íon em termos de PDE (PDE, dispersão axial, transferência de massa em *plug flow* com zonas estagnadas) deram

uma descrição quantitativa delineada da situação hidrodinâmico durante o processo da ALE. De acordo com os autores, os dados proporcionaram uma ferramenta para a predição do processo de adsorção com a definição do tipo e da composição da alimentação bruta. Os melhores resultados foram obtidos usando suspensão de leveduras contendo células intactas a diferentes concentrações de biomassa (maiores que 7,5% em peso) e condutividade do tampão (5-12 mS) em uma coluna de ALE enchida com o adsorvente Streamline Q XL em fase fluidizada.

Na sedimentação de leitos expandidos a fluidização de partículas deve-se ter atenção especial a obtenção de condições ideais de operação. Em 1954, Richardson e Zaki [8] estudaram o comportamento de vários tipos de materiais e chegaram à equação que relacionava a velocidade do fluido (U) e a velocidade terminal da partícula (U_T) com a porosidade do meio (ε), a qual é dada por:

$$\frac{U}{U_T} = \varepsilon^n \quad (1)$$

Onde n é o índice de Richardson-Zaki ou índice de expansão é uma função do número de Reynolds terminal (Re_t).

$$Re_t = \frac{d_p \rho_L U_T}{\mu} \quad (2)$$

Para o regime de Stokes, onde $Re_p < 0,1$, a velocidade terminal de uma partícula isolada (U_T) é dada por:

$$U_T = \frac{g \cdot d_p^2 (\rho_p - \rho_L)}{18\mu} \quad (3)$$

Como Re_p é dado por:

$$Re_p = \frac{d_p \rho_L U}{\mu} \quad (4)$$

Com a linearização da equação 1 é possível obter n experimentalmente pelo uso da equação 5.

$$\ln U = \ln U_T + n \cdot \ln \varepsilon \quad (5)$$

Com os recentes avanços na biotecnologia, os *downstream processes* estão sendo aplicados na purificação de material biológico, principalmente as proteínas e enzimas de interesse comercial. As α e β -amilases destacam-se entre as enzimas comerciais, por terem diversas aplicações em processos industriais, essencialmente na hidrólise do amido, por isso elas são usadas pelas indústrias de alimentos, farmacêuticas e têxteis [9, 10]. O milho (*Zea mays*) é um produto agrícola muito difundido no Brasil, é comercializado na forma *in natura* ou pouco processado e com baixo preço de custo. Por esse motivo, a obtenção de α e β -amilases puras do malte de milho iria agregar valor a cultura do milho [9].

Tendo em vista no desenvolvimento de novas tecnologias, no presente trabalho foi estudado os efeitos da expansão do leito e do tipo de tampão sobre a adsorção de amilase de malte de milho sobre a resina de troca iônica Amberlite 410. Também foi estudado o comportamento hidrodinâmico de uma coluna de adsorção em leito expandido sob efeitos das concentrações de biomoléculas e sal e do tipo de sal usado para obter a condição ótima de recuperação das amilases sobre a resina de troca iônica.

2 - MATERIAIS E METODOS

2.1 - Materiais

2.1.1 - Reagentes

A resina de troca iônica usada foi a Amberlite IRA 410 da VETEC (São Paulo, Brasil). As sementes de milho foram obtidas da EMBRAPA, Aracaju, Sergipe, Brasil. O ácido di-nitro salicílico (DNS), o sulfato de cobre e o tartarato duplo de sódio e potássio usados foram da VETEC (São Paulo, Brasil). O hidrogeno fosfato de potássio, o hidrogeno fosfato de di-sódio, TRIS e o ácido clorídrico foram obtidos da MERK (Alemanha).

2.1.2 - Fluidizadores e partícula

Os líquidos fluidizadores usados foram: a água destilada (H_2O), o tampão fosfato 0,07 M a pH 7, o tampão TRIS/HCl 0,07 M a pH 7 e o malte de milho a 2% nos tampões fosfato ou TRIS/HCl ambos a 0,07 M e pH 7. As propriedades físicas dos fluidizadores e do adsorvente estão apresentadas na Tabela 1. As propriedades da água foram encontradas na literatura [11] e as

dos demais fluidos foram medidas pelo uso de viscosimetria e pela variação do peso de 1 mL do fluido. Estas propriedades são usadas para o cálculo da U_T por substituição na equação 3.

Tabela 1. Propriedades do fluidizadores e das partículas.

<i>Fluidizadores</i>	<i>Propriedades</i>	
	ρ_L (kg/m ³)	μ (kg/s.m)
H ₂ O*	997.5	9.384x10 ⁻⁴
Tampão fosfato	1011	9.870x10 ⁻⁴
Fosfato+Malte	1004	9.872x10 ⁻⁴
Tris HCl	1007	1.037x10 ⁻³
Tris HCl+Malte	996.5	1.051x10 ⁻³
<i>Partícula</i>	ρ_P (kg/m ³)	d_p (m)
Resina Amberlite IRA 410	1120	4.4x10 ⁻⁴

*Fonte: Streeter [11].

Onde: d_p é o diâmetro da partícula, ρ_L e ρ_P são as massas específicas do líquido e da partícula e μ é a viscosidade dinâmica.

2.1.3 – Coluna de ALE usada

Um esquema da coluna de ALE usada neste trabalho está apresentado na Figura 1. Uma coluna de vidro com dimensões de 1x30 cm, contendo um pistão de altura ajustável e alimentação na parte inferior e saída na parte superior da coluna. Uma tela de mesh 60 entre as junções inferiores da coluna e na parte inferior do pistão para evitar perda de adsorventes. Uma régua foi usada na lateral da coluna o ajuste da altura do leito.

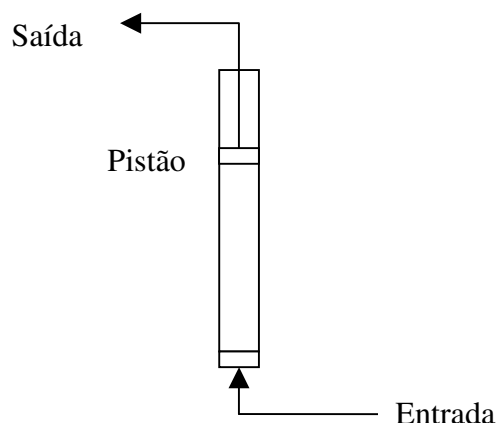


Figura 1. Esquema da coluna de ALE usada.

2.1.4 – Obtenção das enzimas do malte de milho

As sementes foram selecionadas, pesadas e lavadas. Estas sementes absorveram entre 40 a 45 % de umidade e germinaram em escala laboratorial a temperatura e pressão ambiente (300,15 K e 1 atm) por aproximadamente 4 a 5 dias. O malte foi seco a 327 K por 5 horas e estocado a 278,15 K [9, 10]. Soluções contendo 20 g/L (ou 2%, peso/volume) de malte de milho foram preparadas com os tampões fosfato 0,07 M e TRIS/HCl 0,07M a pH 7,0 [9].

2.1.5 - Traçador

Como traçador usou-se 5 mL de uma solução de glicose a 5 mg/L [3]. A concentração de glucose foi determinada pelo método de Milles. Para cada 1 mL amostra contendo glicose é adicionado 1 mL de água destilada e 3 mL do reagente do DNS e essa mistura é aquecida até a ebulição por 5 cinco minutos. Depois de resfriada, a absorbância da mistura é lida a 540 nm [12].

2.2 - Métodos

2.2.1 – Estudo de hidrodinâmica

Dois g de resina Amberlite IRA 410 foram utilizados em todos os ensaios; o que dava aproximadamente 4 cm de leito fixo na coluna. A alimentação dos fluidizadores foi feita pela parte inferior da coluna, com velocidades lineares entre 0,0002 e 0,0080 m/s e, a altura do leito expandido medida, a cada passo, pelo uso da régua ao lado da coluna. O índice de Richardson-Zaki (n) e a velocidade terminal experimental da partícula (U_{TExp}) foram obtidos pelo uso da equação 5 e a velocidade terminal calculada (U_{Tcalc}) foi obtida pelo uso da equação 3 [3, 7, 8, 13].

2.2.2 – Determinação da porosidade (ϵ)

A porosidade do leito (ϵ) foi obtida pela substituição dos dados de massa específica (ρ_p) e a massa (m_p) do adsorvente, a área da secção transversal da coluna (A_T) e a altura do leito (H), na seguinte equação:

$$\epsilon = 1 - \frac{V_p}{V_L} = 1 - \frac{V_p}{A_T H} = 1 - \frac{m_p}{\rho_p A_T H} \quad (6)$$

Onde V_L e V_p são os volumes do leito e da particular, respectivamente.

2.2.3 – Estudo da distribuição do tempo de residência (DTR)

Os tampões fosfato e TRIS/HCl a 0,07 M e a pH 7,0 foram usados para fluidizar o leito até as alturas de estudo (aproximadamente 2, 3 e 4 vezes a altura do leito fixo). Cinco mL do traçador (solução de glicose) foi injetada abaixo da coluna (antes do leito de partículas). Amostras foram coletadas temporariamente na saída da coluna. A variação da concentração de glicose foi medida pelo método de Milles [12]. As curvas de DTR foram obtidas pelo método do pulso. Na Figura 2 está mostrando como a DTR foi determinada experimentalmente. O tempo de residência médio (t) e desvio padrão (σ) são substituídos na equação 7 para obter a altura equivalente dos pratos teóricos ($HETP$).

$$HETP = \frac{t^2}{\sigma^2} * H \quad (7)$$

A dispersão axial (D_{axial}) foi calculada pela equação 8, a seguir:

$$HETP = \frac{U}{2 \varepsilon D_{axl}} H \quad (8)$$

E o número de Peclet (Pe) foi obtido pela equação 9, dada por [3, 4, 7]:

$$Pe = \frac{H * U}{D_{axial}} \quad (9)$$

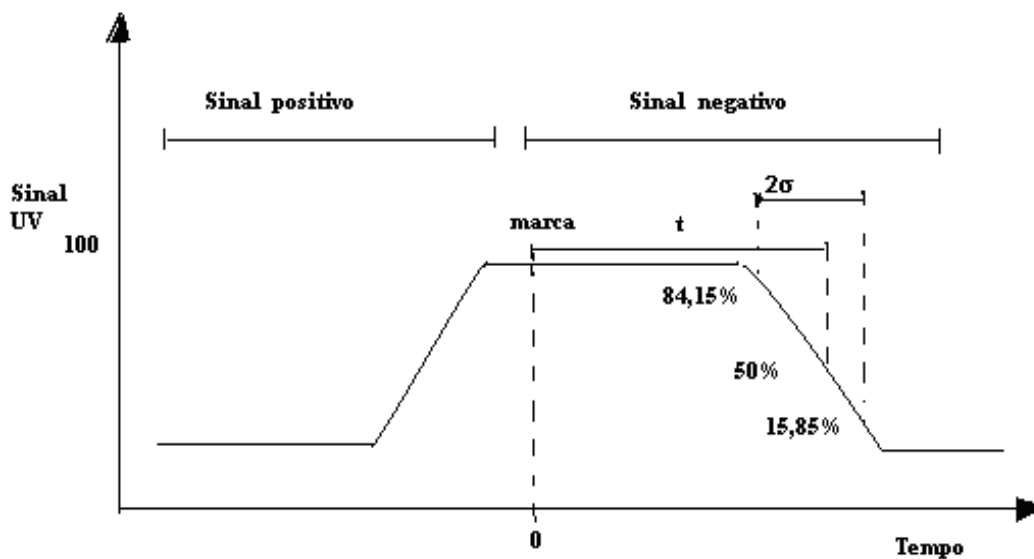


Figura 2. Esquema da determinação da DTR [1].

2.2.4 – Ensaaios enzimáticos

Os ensaios de atividade das amilases seguiram o método do Laboratório Milles [10, 12; 15]. A 20 mL amido solúvel a 2% e pH 4,8 (Tampão acetato 0,1 M) foram hidrolisados por 500 μ L amostra de enzima em 10 min a 333.15 $\pm$ 2 K. A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de Bradford [14] com BSA como proteína padrão. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como μ mol de glicose gerada por min sob as condições do ensaio. A atividade específica foi calculada como atividade por μ g de proteína.

2.2.5 – Purificação das amilases

A adsorções de enzimas em leito fixo ou expandido foram realizadas a 295.15 K e pH 7. O leito de adsorventes foi pré-equilibrado na altura de trabalho (veja a Tabela 3) com um dos tampões Fosfato 0,07M ou TRIS/HCl 0,07 M a pH 7. 5 mL da solução de malte de milho a 2% no tampão usado foi injetada abaixo do leito da coluna para promover a adsorção das enzimas sobre a resina Amberlite IRA 410. A eluição foi feita pelo uso de uma solução de NaCl 0,25 M a 14 mL/min de fluxo descendente. A atividade e a concentração de proteínas foram medidas periodicamente durante a adsorção, lavagem e eluição [7, 10, 14, 15, 16, 17].

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 3 as curvas de $\ln U$ versus $\ln \varepsilon$ estão apresentadas. Nesta pode-se observar o bom ajuste dos dados pelos valores das múltiplas correlações (R^2) estarem próximos do ótimo (cerca de 1,0), isso sugere que a equação de Richardsson-Zaki é um bom modelo para predição da fluidização de partículas.

Houve uma redução do valor de n ao se adicionarem sais (de fosfatos ou o TRIS) e material biológico (malte de milho) a água destilada. Isto mostra que há uma força de resistência a fluidização das resinas na seguinte ordem de sistemas $H_2O > TRIS/HCl > TRIS/HCl + Malte > Tampão Fosfato > Tampão Fosfato + Malte$. Para os fluidizadores contendo malte de milho e sal houve um maior efeito da força de atrito sobre o grau de expansão do leito que os demais sistemas devido às interações partículas-partículas, partículas-líquido e partículas-biomoléculas, provocando um aumento na velocidade linear necessária para a manutenção do leito em um de-

terminado nível que os demais [3, 6, 7, 8].

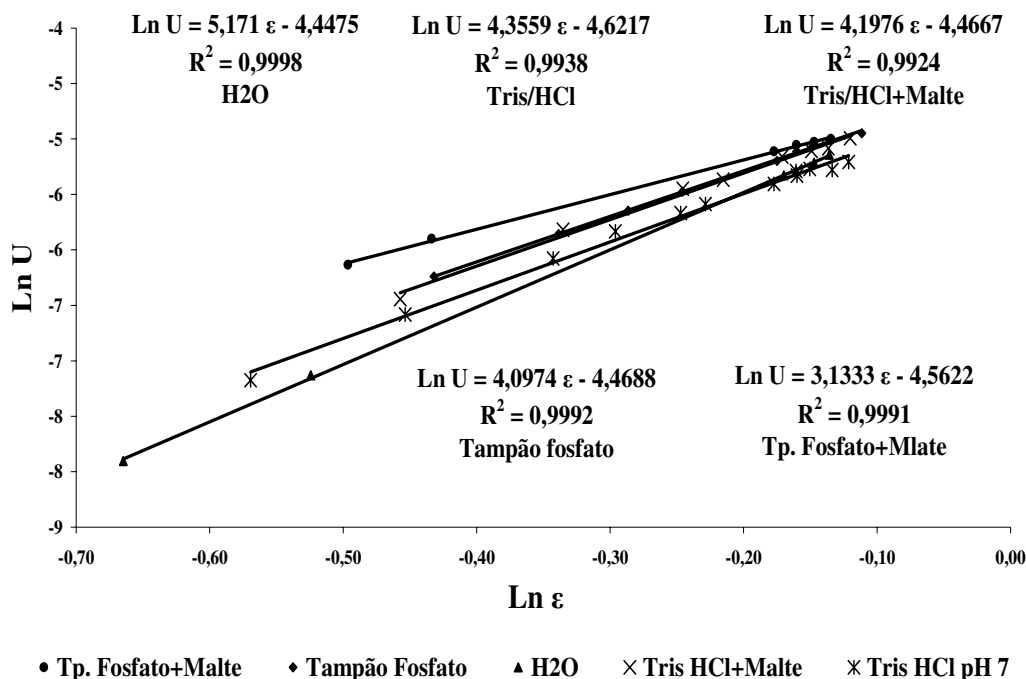


Figura 3. Modelos de Richardson-Zaki.

A Tabela 2 faz a comparação entre as velocidades terminais das partículas experimental (U_{TExp}) e calculadas (U_{TCalc}) para os fluidos e temperaturas estudadas. Pode ser observado que os entre estas velocidades são baixos e podem estar associados principalmente as medidas experimentais de viscosidade e massa específica e a confiabilidade dos dados tabelados. Os baixos erros sugerem que a equação de Richardson-Zaki é um bom modelo para prever o comportamento hidrodinâmico das partículas do adsorvente em sistemas de leito expandido, até mesmo quando o fluidizador contém grandes quantidades de materiais biológicos suspensos [1, 6, 7, 8]. A velocidade terminal da partícula diminuiu com a adição de sal e material biológico, devido às massas específicas (ρ) e viscosidades (μ) dos fluidizadores serem maiores que as da água.

A adsorção de proteínas sobre partículas de zirconia modificada com fluoreto (FmZr) (38 a 75 μm , área superficial de 29 m^2/g e densidade de 2,8 g/cm^3) em modo fluidizado foi estudada.

Numa expansão de três vezes a altura do leito inicial a HAS (4 mg/mL) pode ser adsorvida, por causa da alta densidade das partículas de zirconia porosa. Não há registro de adsorção de proteínas em leito expandido por suspensão contendo mais que 50 g DCW/L de células. A característica da expansão do leito de FmZr foi bem descrita pela correlação de Richardson-Zaki, obtendo uma velocidade terminal da partícula de 3,1 mm/s e um coeficiente de expansão de 5,4 [6].

Tabela 2. Comparação entre as velocidades terminais das partículas experimental e calculada.

Fluido	U_T (m/s)		Erro (%)
	<i>Exp.</i>	<i>Calc.</i>	
H ₂ O	0,0134	0,0135	-0,74
Tampão fosfato	0,0115	0,0114	+0,88
Fosfato+Malte	0,0104	0,0121	-14,05
Tris HCl	0,0104	0,0112	-7,21
Tris HC+Malte	0,0115	0,0121	-5,19

Onde: *Exp* e *Calc* são os valores experimentais e calculados,

As Figuras 4 e 5 mostram as curvas de DTR para o traço formado pela passagem da glicose no leito da coluna. Elas possuem picos, característico de curvas de DTR, que demonstram a variação da glicose durante a passagem no leito da coluna, mostrando que a solução de glicose pode ser usada como traçador na determinação de parâmetros de DTR [1, 3, 4].

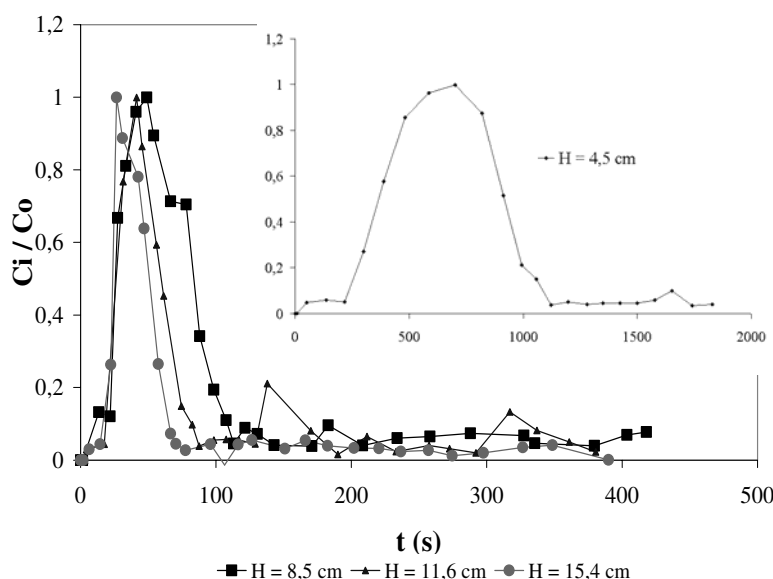


Figura 4. Curvas de DTR para o tampão Fosfato 0,07M a pH 7 e 295,15 K. C_0 e C_i são as concentrações de glicose inicial e no tempo i e t é o tempo do processo.

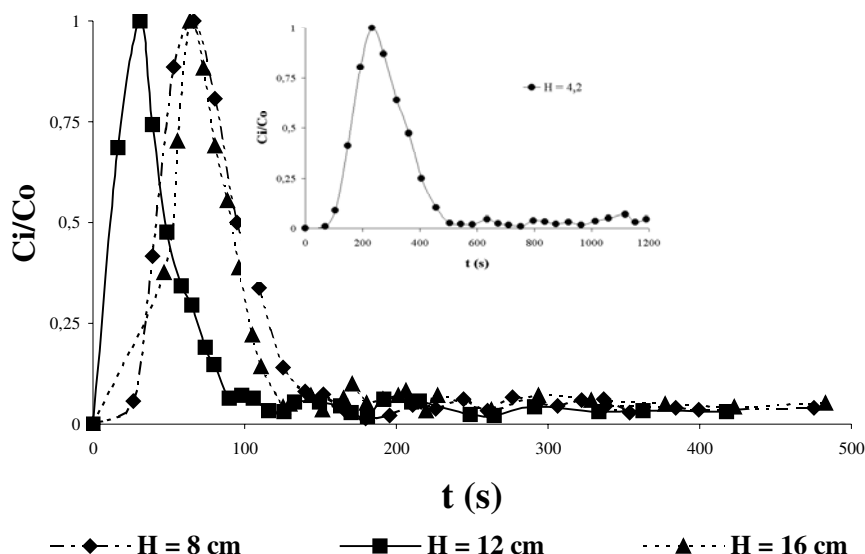


Figura 5. Curvas de DTR para o tampão TRIS/HCl 0,07M a pH 7 e 295,15 K.

A Tabela 3 mostra os resultados experimentais de DTR obtidos após substituição dos dados nas equações 6, 7, 8 e 9 de acordo com a metodologia apresentada por Fernández-Lahore *et al.* [3], Santos [7] e Yamamoto *et al.* [4]. Na tabela podemos ver que a dispersão axial aumentou com a velocidade linear e altura do leito. Houve uma elevação em dez vezes da dispersão quando a altura inicial do leito foi dobrada e alcançou um valor trinta vezes maior quando a altura foi quadruplicada. Isto facilita o transporte de material biológico entre o leito e aumenta o contato entre este material e as partículas do leito, bem como, possibilita a alimentação de material biológico diretamente do tanque de fermentação, evita a compactação do leito e reduzindo custos com pré-tratamentos e com pré-purificações, que são os principais problemas dos outros métodos cromatográficos [1, 3]. O número de Peclet (Pe) é um parâmetro mede a taxa de transferência de massa no. Ele aumentou com a altura do leito, dobrando com a máxima altura do leito, o que facilita a transferência de massa no sistema comparando-se com o leito fixo. A HETP variou com todos os parâmetros estudados.

Tabela 3. Parâmetros obtidos experimentalmente pelas curvas de DRT.

Fluidizador	Leito	H (cm)	ϵ	U (m/s)	$HEPT$	D_{axial} (cm ² /s)	Pe
Fosfato	Fluidizado	15,4	0,848	0,0058	33	2,477	3,628
		11,6	0,797	0,0045	25	1,536	3,411
		8,5	0,724	0,0030	18	0,835	3,097
	Fixed	4,2	0,440	0,0004	9	0,0887	1,885
TRIS/HCl	Fluidized	15,9	0,852	0,0048	34	2,105	3,653
		11,5	0,796	0,0038	25	1,265	3,411
		8,11	0,710	0,0023	17	0,6104	3,044
	Fixed	4,2	0,440	0,0002	9	0,0005	1,886

Onde: D_{axial} é a dispersão axial do fluido na coluna, H é a altura do leito, $HEPT$ é a altura equivalente do número de pratos teóricos, ϵ é a porosidade, Pe é o número de Peclet e U é a velocidade linear do fluido.

Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentados os resultados da recuperação da amilases sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410 usando os tampões fosfato e TRIS/HCl como fluidizadores, respectivamente. Como a solução de malte de milho é instável, a atividade do material bruto medida a cada dia antes dos ensaios. Pelas Tabelas, compreendemos que o TRIS/HCl não é um bom meio para promover a adsorção de amilases devido a resina ser seletiva a ions cloreto (do HCl) e isto reduziu a capacidade de ligação da resina de troca iônica Amberlite IRA 410 a amilases. O tampão fosfato promoveu boa afinidade entre as amilases e a resina, e a 8 cm de leito expandido (dois graus de expansão) é a melhor sistema para a recuperação de amilases por cromatografia em leito expandido em resina de troca iônica Amberlite IRA 410. Há um decréscimo da purificação com o grau de expansão, se assemelhando aos valores dos leitos fixos de 4,2 cm. A recuperação da atividade alcançou valores maiores que 89% da atividade do malte (material bruto) mostrando que a Amberlite IRA 410 teve boa afinidade com as amilases do malte de milho. No meio original (malte de milho) tem amido e produtos de hidrólise do amido, estes são inibidores e não são capturados pela resina, por este motivo a recuperação da atividade foi maior que 100% em alguns casos, e o fator de purificação foi alto [9, 15, 16],

Tabela 4. Recuperação de amilases de malte de milho (*Zea mays*) por adsorção em leito expandido com o tampão fosfato como fluidizador a pH 7.

leitos	H (cm)	Amostras	Atividade (U)	Proteína (µg)	AE (U/mg)	Recuperação da Atividade	Fator de Purificação
Fixo	4,2	Malte	2,087	885,43	2,357	100	1
		Eluido	1,229	8,7175	141,0	58,89	59,81
Expandido	8	Malte	1,894	893,28	2,121	100	1
		Eluido	3,906	3,2650	1196	206,1	564,0
	12	Malte	0,0365	832,49	0,044	100	1
		Eluido	0,0385	18,128	2,118	105,5	48,30
	16	Malte	0,0365	832,49	0,044	100	1
		Eluido	0,0325	16,658	1,951	89,04	44,50

Onde: AE é a atividade específica e H é a altura do leito.

Tabela 5. Recuperação de amilases de malte de milho (*Zea mays*) por adsorção em leito expandido com o tampão TRIS/HCl como fluidizador a pH 7.

leitos	H (cm)	Amostras	Atividade (U)	Proteína (µg)	AE (U/mg)	Recuperação da Atividade	Fator de Purificação
Fixo	4,2	Malte	12,384	739,1	16,756	100	1
		Eluido	0	0	0	0	0
Expandido	8	Malte	36,324	739,1	49,146	100	1
		Eluido	0	0	0	0	0
	12	Malte	16,451	662,5	24,832	100	1
		Eluido	0	0	0	0	0
	16	Malte	20,106	622,3	32,309	100	1
		Eluido	0	0	0	0	0

4 - CONCLUSÕES

O modelo de Richardson-Zack teve um bom ajuste aos dados experimentais nas condições de estudo, mostrando baixos erros relativos. O estudo de DTR mostrou que há elevação da HEPT, da D_{axial} e do P_e com a altura e porosidade do leito e com a velocidade linear. O tampão TRIS/HCl não é um bom para promoveu a adsorção das amilases pois o íon cloreto interage com a resina, entretanto, o tampão fosfato aumentou a afinidade entre esta enzimas e a resina, e que o leito expandido a 8 cm de altura é o melhor sistema para a recuperação das amilase por cromatografia em resinas de troca iônica Amberlite IRA 410.

5 – REFERENCIAS

- [1] Amersham Pharmacia Biotech, EBA Handbook: Principles and Methods. Uppsala, IBSN 91-630-5519-8, 1997, p160.
- [2] Roy, I.; Pai, A.; Lali, A. and Gupta, M. N., Comparison of batch, packed bed and expanded bed purification of *A. niger* cellulase using cellulose beads. *Bioseparation* 8: 317-326, 1999.
- [3] Fernadez-Lahore, H. M.; Lin, D.-Q.; Hubbuch, J. J.; Kula, M.-R. and Thommes, J., The use of ion-selective electrodes for evaluating residence time distributions in expanded bed adsorption systems. *Biotechnology Progress*, 17, 1128-1136, 2001.
- [4] Yamamoto, S.; Okamoto, A. and Watler, P, Effects of adsorbent properties on zone spreading in expanded bed chromatography, *Bioseparation* 10: 1-6, 2001.
- [5] Dainiak, M. B.; Galaev, I. Y. and Matiasson, B., Directed capture of product from fermentation broth using a cell-repelling ion exchanger. *Journal of Chromatography A*, 942, 123-131, 2002.
- [6] Mullick, A. and Flickinger, M. C., Expanded bed adsorption of human serum albumin from very dense *Saccharomyces cerevesiae* suspensions on fluoride-modified zirconia. *Biotechnology and Bioengineering* 65:65, 282-290, 1999.
- [7] Santos, E. S., Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção em leito expandido. PhD thesis, State of University of Campinas, SP, Brazil, 2001.

- [8] Richardson, J. F. and Zaki, W. N., Sedimentation and fluidization: Part I. *Tran. Inst. Chem. Engs.*, 32, 35-53, 1954.
- [9] Biazus, J. P. M.; Souza, A. G.; Santana, J. C. C.; Souza, R. R.; Tambourgi, E. B., Optimization of Drying Process of *Zea Mays* Malt to Use as Alternative Source of Amylolytics Enzymes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, special, 185-190, 2005.
- [10] Nirmala, M. and Muralikrishna, G., Three α -amylase from malted finger millet (*Ragi*, *Eleusine coracana*, Indaf-15) - Purification and partial characterization. *Phytochemistry* 62, 21-23, 2003.
- [11] Streeter, V. L., *Mecânica dos fluidos*. Celso da Silva Muniz, *et al.*, trans, São Paulo: Mcgraw Hill, 1977, 736p.
- [12] Miller, G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry* 31:3, 426-428, 1959.
- [13] Chang, Y. K.; McCreath, G. E. and Chase, H. A., Purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenate using expanded bed adsorption (EBA) with STREAMLINETM red H-E7B, In: *Advances in Bioprocess Engineering*. E. Galindo and O. T. Ramirez (Eds), Kluwer Academic Publisher, printed in the Netherlands, 519-525, 1994.
- [14] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein, Utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem*, 72, 248-254, 1976.
- [15] Aguilar, G.; Morlon-Guyot, M.; Trejo-Aguilar, B.; Guyot, J. P., Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 406-413, 2000.
- [16] Kalil, S. J., Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido. PhD thesis, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil, 2000.
- [17] Lanckriet, H. and Middelberg, A. P. J., Continuous chromatographic protein refolding. *Journal of Chromatography A*, 1022, 103-113, 2004

6 – AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Brasil) pelas bolsas concedidas.

CAPÍTULO VII

AVALIAÇÃO RSM DOS EFEITOS DO pH E DO GRAU DE EXPANSÃO SOBRE A PURIFICAÇÃO DE AMILASES DE MALTE DE MILHO POR CROMATOGRAPHIA DE TROCA IÔNICA EM LEITO EXPANDIDO

Avaliação RSM dos efeitos do pH e grau de expansão sobre a purificação de amilases de malte de milho por cromatografia de troca iônica em leito expandido

Joana Paula Menezes Biazus, João Baptista Severo Jr., Roberto Rodrigues de Souza

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Sergipe, Cidade Universitária, Prof. José Aloísio de Campos, Av. Marechal Rondon, S/N, Rosa Elze, CEP: 49.100-000, São Cristóvão, SE, Brasil.

José Carlos Curvelo Santana e Elias Basile Tambourgi

Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Av. Albert Einstein, 500, Caixa Postal: 6066, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brasil.

Este capítulo apresenta mais um trabalho que foi desenvolvido em conjunto com o Departamento de Engenharia Química (DEQ), da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e será submetido a um periódico internacional de alto impacto. No capítulo anterior foi notado que o tampão fosfato foi o melhor meio de fluidização do leito a ser usado na purificação das amilases de malte de milho usando a resina de troca iônica Amberlite 410. Neste trabalho se estudou os efeitos do pH e grau de expansão do leito sobre a adsorção de amilases de malte de milho sobre resina expandida. Variou-se a altura do leito expandido em 2, 3 e 4 vezes a altura do leito fixo (4,2 cm) e o pH do tampão fosfato 0,05 M em 5, 6 e 7. O modelo quadrático foi o que mais se ajustou aos dados do comportamento do fator de purificação sob efeito do pH e grau de expansão. A análise RSM mostrou que a capacidade de adsorção de amilases sobre a resina aumentou com os pH extremos (5 ou 7) e reduziu com o grau de expansão. A eletroforese via SDS-PAGE mostrou que a α e β -amilases purificadas do malte de milho tiveram massa molar de 69,4 kDa e 45,6 kDa, respectivamente. O maior fator de purificação foi encontrado para o grau de expansão 2 a pH 7 e seu valor foi próximo dos 500. Este trabalho mostrou que como se obter amilases de malte de milho com alto grau de pureza.

#Este manuscrito será submetido a um periódico internacional de alto impacto, em 2006.

Avaliação RSM dos efeitos do pH e grau de expansão sobre a purificação de amilases de malte de milho por cromatografia de troca iônica em leito expandido

**Biazus, J. P. M.¹; Severo Jr., J. B.¹; Santana, J. C. C.^{2*};
Souza, R. R.¹; Tambourgi, E. B.²**

¹ DEQ/UFS, Av. Marechal Rondon, S/N, Rosa Elze, CEP: 49.100-000, São Cristóvão, SE, Brasil.

^{2*} Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6066, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brasil. E-mail: jccurvelo@yahoo.com.br

RESUMO

Neste trabalho os efeitos do pH e grau de expansão sobre a adsorção de amilases de malte de milho sobre a resina de troca iônica Amberlite 410 foram estudados por metodologia de análise de superfície de resposta (RSM). Variou-se a altura do leito expandido em 2, 3 e 4 vezes a altura do leito fixo (4,2 cm) e o pH do tampão fosfato 0,05 M em 5, 6 e 7. O modelo quadrático foi o que mais se ajustou aos dados do comportamento do fator de purificação sob efeito do pH e grau de expansão. A análise RSM mostrou que a capacidade de adsorção de amilases sobre a resina aumentou com os pH extremos (5 ou 7) e reduziu com o grau de expansão. A eletroforese via SDS-PAGE mostrou que a α e β -amilases purificadas do malte de milho tiveram massa molar de 69,4 kDa e 45,6 kDa, respectivamente. O maior fator de purificação foi encontrado para o grau de expansão 2 a pH 7 e ficou próximo de 500. Este trabalho mostrou que como se obter amilases de malte de milho com alto grau de pureza.

Palavras chaves: Purificação, α e β -amilases, malte de milho, adsorção em leito expandido, resina de troca iônica Amberlite IRA 410, metodologia de superfície de resposta.

ABSTRACT

RSM evaluation of pH and expansion degree on amylases purification from maize malt by expanded bed ion-exchange chromatography

In this work the effects of pH and bed expansion degree on the adsorption of amylases from maize malt on Amberlite 410 ion-exchange resin were studied by response surface methodology (RSM). The bed height was varied in 2, 3 and 4 times of fixed bed height (4.2 cm) and the 0.05M phosphate buffer was used at pH 5, 6 and 7. The square model was more than fitting to the purification factor behavior on effect of pH and expansion degree. RSM analysis showed that the adsorption capacity of amylases on the resin increased with the pH extremes (5 or 7) e reduced with the expanded bed height. SDS-PAGE electrophoresis showed that α and β -amylases purified from maize malt have molecular weight of 69.4kDa and 45.6kDa, respectively. Purification faction was higher at 2 expansion degree at pH 7 and it was about 500 times. This work showed as obtained an amylases from maize malt with high pureness.

Keywords: Purification, α and β -amylases, maize malt, expanded bed adsorption, Amberlite IRA 410 ion-exchange resin, response surface methodology.

1 - INTRODUÇÃO

As α e β -amilases destacam-se entre as enzimas comerciais, por terem diversas aplicações em processos industriais, essencialmente na hidrólise do amido, por isso elas são usadas pelas indústrias de alimentos, farmacêuticas e têxteis [1, 2]. A despolimerização do amido por amilases é a base para vários processos indústrias como o da preparação de xaropes de glicose, e de pães e bebidas. As amilases são ferramentas usadas na digestão animal resultando na formação de açúcares, que são subsequentemente utilizados em varias atividades metabólicas [1, 2, 3].

O milho (*Zea mays*) é um produto agrícola muito difundido no Brasil, é comercializado na forma *in natura* ou pouco processado e com baixo preço de custo. Por

esse motivo, a obtenção de α e β -amilases puras do malte de milho iria agregar valor a cultura do milho [1]. De acordo com a Sigma [4] as enzimas amilases têm preço de 1500US\$ por grama de proteínas purificadas.

Com os recentes avanços na biotecnologia, os *downstream processes* estão sendo aplicados na purificação de material biológico, principalmente as proteínas e enzimas de interesse comercial. Os usos de materiais e processos de purificação de baixos custos na e de varias metodologias de otimização são essenciais para a redução d preço de custo de obtenção do material biológico puro. A Amberlite IRA 410 é uma resina de troca iônica com baixo preço no comércio [4] e seu uso em adsorção em leito expandido reduz os custo de purificação de enzimas devido este processo não precisar de passos de pré-purificação [2].

Tendo em vista no desenvolvimento de novas tecnologias, no presente trabalho os efeitos do pH e grau de expansão sobre a adsorção de amilase de malte de milho sobre a resina de troca iônica em leito expandido. A condição ótima de purificação das amilases sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410 foi obtida por metodologia de superfície de resposta (RSM). Este trabalho inova pelo uso da adsorção em leito expandido utilizando a resina de troca iônica Amberlite IRA 410 e usa uma fonte de amilases não comercial, o malte de milho.

1.1 – As enzimas α e β -amilases

A α -amilase (EC 3.3.1.1) é uma enzima extracelular encontrada em vários vegetais superiores, animais e microorganismo. Ela catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas α -D- (α -1,4) nos componentes do amido e carboidratos semelhantes [5]. Seu ponto isoelétrico é 5,4, seus pH e temperatura ótimos são 4,7 e 75 °C, respectivamente, tem massa molar variando entre 50-120 kDa [6, 7], mas as massas molares de α -amilases de malte de *finger millet* estão entre 22-26 kDa [3], a α -amilase de *T. lanuginosus* IISc 91 é de 24kDa [8], α -amilase de *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T, de *L. plantarum* L137, de *L. amylovorus* and *L.* e de *amylophilis* são de 135 kDa, 230 kDa, 140 kDa and 100 kDa, respectivamente [9], isto mostra que a massa molar da α -amilase depende da fonte de obtenção da enzima [1, 2, 6, 9].

A β -amilase (EC 3.2.1.2) também é uma enzima extracelular que hidrolisa ligações glicosídicas α -D-(α -1,4) dos componentes do amido, mas ela age somente nas ligações não redutoras das moléculas. Esta enzima tem pH ótimo entre 4,5-6,5, sua temperatura ótima está entre 55-57 °C e ela é rapidamente inativada a 60 °C. Seu ponto isoelétrico é no pH 4,8, sua massa molar é abaixo de 50kDa e ela é encontrada em vários cereais [1, 6, 7].

1.2 – Cromatografia usando adsorção em leito expandido (ALE)

A adsorção em leito expandido é uma nova ferramenta usada em processos biotecnológicos. Ela se baseia na fluidização, principalmente explorando a propriedade de classificação (segregação) do leito expandido [10, 11, 12]. A principal vantagem do uso da adsorção em leito expandido sobre os métodos cromatográficos convencionais é a possibilidade de se submeter à alimentação contendo partículas celulares diretamente à coluna. A cromatografia convencional, em leito fixo, normalmente requer passos preliminares como a centrifugação ou filtração para reduzir o material particulado [10, 13]. Isto permita a alimentação bruta diretamente na coluna cromatográfica sem um tratamento inicial para eliminação do material biológico suspenso, e como o leito expandido aumenta a superfície de contato do adsorvente, promovendo uma maior interação com a molécula alvo e assim uma maior eficiência de adsorção. Como as células suspensas podem entrar diretamente no leito expandido, o rendimento pode ser aumentado e o tempo de processo é reduzido [10, 14, 15].

2 - MATERIAIS E METODOS

2.1 - Materiais

2.1.1 - Reagentes

A resina de troca iônica usada foi a Amberlite IRA 410 da VETEC (São Paulo, Brasil). As sementes de milho foram obtidas da EMBRAPA, Aracaju, Sergipe, Brasil. O ácido di-nitro salicílico (DNS), o sulfato de cobre e o tartarato duplo de sódio e potássio usados foram da VETEC (São Paulo, Brasil). O hidrogeno fosfato de potássio, o hidrogeno fosfato de di-sódio, TRIS, dodecil sulfato de sódio (SDS), azul brilhante de comassie e o ácido clorídrico foram obtidos da MERK (Alemanha). Os reagentes usados para a eletrofo-

rese foram do *kit* de eletroforese adquirido junto a BIO-RAD (Alemanha).

2.1.2 – Soluções para expansão e eluição

Soluções de tampão fosfato a 0,05 M nos pH 5, 6 e 7 foram usadas para expandir o leito de adsorventes. Solução de NaCl a 0,25 M foi usada na eluição das enzimas.

2.1.3 – Coluna de ALE usada

Um esquema da coluna de ALE usada neste trabalho está apresentado na Figura 1. Uma coluna de vidro com dimensões de 1x30 cm, contendo um pistão de altura ajustável e alimentação na parte inferior e saída na parte superior da coluna. Uma tela de 60 mesh foi colocada entre as junções inferiores da coluna e na parte inferior do pistão para evitar perda de adsorventes. Uma régua foi usada na lateral da coluna o ajuste da altura do leito [11, 12, 13, 16].

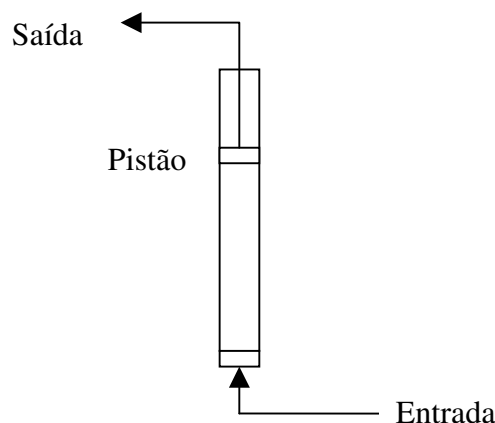


Figura 1. Esquema da coluna de ALE usada.

O grau de expansão é dado pela equação seguinte:

$$\text{Grau de expansão} = \frac{\text{Altura do leito expandido}}{\text{Altura do leito fixo}} = \frac{H_i}{H_0} \quad (1)$$

2.1.4 - Obtenção das enzimas do malte de milho

As sementes foram selecionadas, pesadas e lavadas. Estas sementes absorveram entre 40 a 45 % de umidade e germinaram em escala laboratorial a temperatura e pressão ambiente (27 ° e 1 atm) por aproximadamente 4 a 5 dias. O malte foi seco a 54°C por 5 h

e estocado a 5 °C [1, 2, 3, 17]. Soluções foram preparadas misturando-se 2 g de malte de milho com os tampões fosfato 0,05 M (pH 5, 6 ou 7) até 100 mL [2].

2.2 - Métodos

2.2.1 - Ensaio enzimáticos

Os ensaios de atividade das amilases seguiram o método do Laboratório Milles [3, 18]. A 20 mL amido solúvel a 2% e pH 4,8 (Tampão acetato 0,1 M) foram hidrolisados por 500µL amostra de enzima em 10 min a 30 ± 2 °C. A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de Bradford [19] com BSA como proteína padrão. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como µmol de glicose gerada por min sob as condições do ensaio. A atividade específica foi calculada como atividade por mg de proteína.

2.2.2 - Purificação das amilases

A adsorções de enzimas em leito fixo ou expandido foram realizadas a 22°C e pH 5, 6 e 7. O leito de adsorventes foi pré-equilibrado na altura de trabalho (veja a Tabela 1) com um dos tampões fosfato 0,05M nos pHs de trabalho (veja a Tabela 2). 5 mL da solução de malte de milho a 2% no tampão usado foi injetada abaixo do leito da coluna para promover a adsorção das enzimas sobre a resina Amberlite IRA 410. A eluição foi feita pelo uso de uma solução de NaCl 0,25 M a 14 mL/min de fluxo descendente. A atividade e a concentração de proteínas foram medidas periodicamente durante a adsorção, lavagem e eluição [12, 13, 14, 16]. A recuperação da atividade (**RA**) e o fator de purificação (**PF**) foram dados pela seguinte equação:

$$RA = \left(\frac{\text{Atividade na amostra eluída}}{\text{Atividade na amostra bruta}} \right) * 100 \quad (2)$$

$$FP = \frac{\text{Atividade específica na amostra eluída}}{\text{Atividade específica na amostra bruta}} \quad (3)$$

2.2.3 – Planejamento experimental

Um planejamento experimental do tipo 2^2 com *design* quadrado com face centrada foi realizado para encontrar a condição ótima de purificação das enzimas α e β -amilase do malte de milho por adsorção em leito expandido avaliando-se os efeitos do pH (x_1) e do grau de expansão, H_i/H_0 (x_2) sobre o fator de purificação, FP (Y). Os ensaios estão mostrados na Tabela 4 e a seguinte codificação das variáveis foi usada:

$$x_1 = pH - 6 \quad (4) \quad \text{e} \quad x_2 = \frac{H_i}{H_0} - 2 \quad (5)$$

A avaliação do ajuste do modelo foi feita pela metodologia ANOVA e a otimização pela metodologia de análise de superfície de resposta (RSM) em *software Statistica* versão 5.0 para *Windows* [20, 21, 22, 23].

2.2.4 – Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese via SDS-PAGE foi desenvolvida em uma mini-célula PROTEAN II (Bio-Rad, USA) com gel formado a partir de uma solução contendo 12 % de gel de acrilamida, usando como marcadores de massa molar os padrões de proteína do kit da Bio-Rad [3, 5]. As proteínas das amostras brutas de malte de milho e do purificado da ALE foram separada sobre uma camada homogênea 0,8 mm do gel de resolução formado com acrilamida a 12% (p/v) e do gel de separação formado com acrilamida a 4,8% (p/v) com o sistema tampão usado por Laemmli [24], em uma célula do tipo Bio-Rad Protean II. Volume iguais de tampão que continham Tris/HCl 25mM, pH 6,8, glicerol a 20% (v/v), SDS a 8% (w/v) e azul de bromo fenol a 0,04% (p/v) foi adicionado as amostras de proteína e misturados com 2-mercaptanol a 2,5% (v/v), esta mistura foi aquecida ao ponto de bolha por 10 min e injetada na bandas do gel de separação. As proteínas foram separadas a amperagem constante de 20 mA usando o tampão de corrida contendo Tris 25mM, glicina a 192mM e SDS a 0,1% (p/v) em pH 8,3. As proteínas separadas foram visualizadas após fixação com azul brilhante de coomassie G-250 (solução de fixação: ácido fosfórico 10% (v/v) e coomassie 0,02 % (p/v)).

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tabelas 1, 2 e 3 estão mostrados os resultados da recuperação das amilases sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410, usando como fluidizador o tampão fosfato nos pHs 5, 6 e 7, respectivamente. Como o malte de milho é uma solução instável, a atividade do material bruto foi medida a cada dia antes dos ensaios. Estas tabelas mostram que os tampões fosfato foram bons meios para promover a adsorção das amilases, devido a sua baixa interação com a resina. A capacidade de ligação da resina de troca iônica Amberlite IRA 410 cresceu com a expansão com relação ao leito fixo e foi maior a 8 cm de altura do leito expandido (grau de expansão 2), mostrando que este é o melhor sistema para recuperação de amilases por adsorção em leito expandido em resina de troca iônica Amberlite IRA 410.

Tabela 1. Recuperação das amilases do malte de milho (*Zea mays*) por ALE sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410 a pH 5.

Leito	H _i (cm)	Amostras	Atividade ^a (U/mL)	Proteína ^a (mg/L)	AE ^a (U/mg)	RA ^a (%)	FP ^a
Fixo	4.2	Malte	1,456	154,5	9,424	100,0	1,000
		Purificado	0,6856	3,528	194,3	47,08	20,62
Expandido	8	Malte	0,3113	119,1	2,614	100,0	1,000
		Purificado	0,9103	0,8518	1069	292,4	409,0
	12	Malte	0,1046	81,98	1,276	100,0	1,000
		Purificado	0,4104	2,4758	165,8	392,4	129,9
	16	Malte	0,6123	112,8	5,428	100,0	1,000
		Purificado	0,6875	1,065	645,5	112,3	118,9

^aOs resultados são apresentados como uma média de vários ensaios.

Onde: AE é a atividade específica e H_i é a altura do leito, AR é a recuperação da atividade e FP é o fator de purificação.

Houve uma redução do fator de purificação com o grau de expansão no qual seu valor se equiparou ao leito fixo a 4,2 cm. A recuperação da atividade enzimática ficou de acima dos 89% da atividade do malte de milho (material bruto) mostrando que a Amberlite

IRA 410 teve boa afinidade com as amilases do malte de milho. No meio original (malte de milho) contém produtos de hidrólise do amido, estes são inibidores das amilases e não são capturados pela resina, deste modo a recuperação da atividade alcançou valor acima dos 100% e o fator de purificação foi elevado [1, 7, 16, 24, 25].

Tabela 2. Recuperação das amilases do malte de milho (*Zea mays*) por ALE sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410 a pH 6.

Leito	H _i (cm)	Amostras	Atividade ^a (U/mL)	Proteína ^a (mg/L)	AE ^a (U/mg)	RA ^a (%)	FP ^a
Fixo	4,2	Malte	0,8785	128,2	6,852	100,0	1,000
		Purificado	0,6444	1,117	576,9	73,35	84,19
Expandido	8	Malte	2,492	170,0	14,66	100,0	1,000
		Purificado	1,429	0,5040	2835	36,23	193,4
	12	Malte	0,8601	132,3	6,501	100,0	1,000
		Purificado	0,8609	1,406	612,3	88,08	94,18
	16	Malte	0,8601	141,5	6,078	100,0	1,000
		Purificado	0,5185	2,953	175,6	60,28	28,89

Tabela 3 - Recuperação das amilases do malte de milho (*Zea mays*) por ALE sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410 a pH 7.

Leito	H _i (cm)	Amostras	Atividade ^a (U/mL)	Proteína ^a (mg/L)	AE ^a (U/mg)	RA ^a (%)	FP ^a
Fixo	4,2	Malte	0,4174	177,1	2,357	100,0	1,000
		Purificado	0,2458	1,744	141,0	58,88	59,82
Expandido	8	Malte	0,3789	178,6	2,122	100	1,000
		Purificado	0,6883	0,6530	1054	181,6	496,7
	12	Malte	0,0073	166,5	0,0438	100,0	1,000
		Purificado	0,0115	3,626	3,172	157,5	72,42
	16	Malte	0,0073	166,5	0,0438	100,0	1,000
		Purificado	0,0080	3,311	2,416	109,6	55,16

Os fatores de purificação das α e β -amilases obtidos neste trabalho foram maiores que os apresentados por Santana [2], Nirmala and Muralikrishna [3], Demirkan *et al.* [5], Nguyen *et al.* [8], Aguilar *et al.* [9], Amritkar *et al.* [12] e Zhi *et al.* [23]. A resolução da adsorção em leito expandido usando a resina de troca iônica Amberlite IRA pode ser comparada à resolução de cromatografia de afinidade [10, 12, 25, 26].

A Tabela 4 mostra o planejamento experimental usado para avaliar os efeitos do pH e grau de expansão sobre o fator de recuperação (*FP*) das enzimas α e β -amilases do malte de milho (*Zea mays*) por adsorção em leito expandido sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410, usando como fluidizador o tampão fosfato.

Tabela 4. Planejamento experimental usado para purificação das amilases do malte de milho (*Zea mays*) por adsorção em leito expandido sobre a resina de troca iônica Amberlite IRA 410.

Ensaio	x_1	x_2	pH	H/H_0	<i>FP</i>	($\pm$)
1	-1	-1	5	2	409,0	35,00
2	1	-1	7	2	496,7	56,77
3	-1	1	5	4	118,9	107,7
4	1	1	7	4	55,16	7,184
5	0	0	6	3	116,2 ^a	48,58
6	0	0	6	3	99,52 ^a	16,65
7	0	0	6	3	66,83 ^a	27,73
8	-1	0	5	3	129,9	105,1
9	1	0	7	3	72,33	7,853
10	0	-1	6	2	193,4	76,51
11	0	1	6	4	28,89	31,14

^aSão valores médios de experimentos diferentes no ponto central
FP é o fator de purificação obtido experimental.

De acordo com Barros Neto *et al.* [20], quanto maior que 1 forem os valores do primeiro (F_{calc}/F_{tab}) e segundo testes F (F_{tab}/F_{calc}) mais significativo estatisticamente e preditivo é o modelo obtido; além destes, o coeficiente de correlação (*R*) e variância explicável devem ser próximos de 1,0 e 100, respectivamente. A Tabela 5 lista os parâmetros estatísticos mais significantes e os testes estatísticos para o modelo ajustado.

Assim, os testes F , a variância explicável e o valor de R apresentados na Tabela 5 indicam que o modelo é significativo e apresenta uma boa correlação entre os dados preditos pelo modelo com os dados experimentais [20, 21, 22, 23]. A Equação 6 é o modelo que mais se ajustou aos valores dos dados experimentais de FP (Y) sobre a influência do pH (x_1) e grau de expansão (x_2).

Tabela 5. Avaliação d ajuste do modelo por análise da variância (ANOVA) a 95% de nível de confiança.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	192218,078	4	48054,519	
Resíduos	36609,016	6	6101,503	7,876
Falta de Ajuste	35347,598	4	8836,899	
Erro Puro	1261,418	2	630,709	14,011
Total	228827,057	10		
% máxima variância explicável =			99,45	
Coeficiente de Correlação (R)			0,9165	

$F_{tab} (95\%, 4,63) = 5,14$ e $F_{tab} (95\%, 4, 2) = 19,25$.

$$Y = 62,25 - 5,633.x_1 - 149.3.x_2 + 86.82.x_1^2 + 96.80.x_2^2$$

$$(\pm 9,972) (\pm 7,936) (\pm 7,936) (\pm 12,21) (\pm 12,21)$$
(6)

A Figura 2 mostra um comportamento quadrático do fator de purificação com relação ao efeito do pH. No ponto central (pH 6) o FP mostrou-se menor que nos pH dos pontos axiais (pH 5 ou 7), nestes pH ele foi alto. O efeito do grau de expansão (H_i/H_0) sobre o fator de purificação foi maior que o do pH e ao se aumentar a expansão reduzia-se o fator de purificação. O FP das α e β -amilases de malte de milho foi máximo quando o processo ocorreu a pH 7 e com o grau de expansão 2.

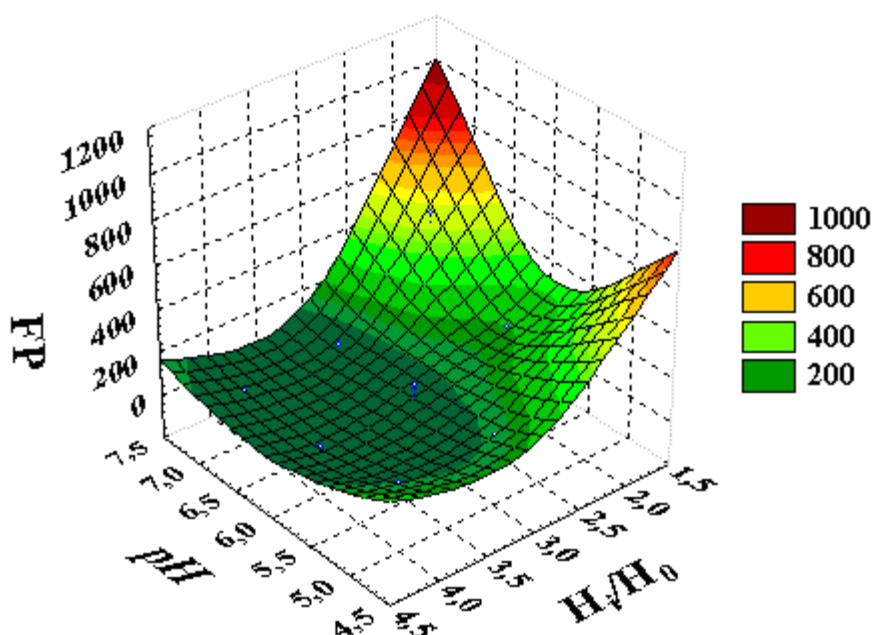


Figura 2. Avaliação RSM das influencias do pH e do grau de expansão (H/H_0) sobre o fator de purificação (FP).

A Figura 3 é a análise da pureza da amostras purificada por ALE a grau de expansão 2 e pH 7 por eletroforese via SDS-PAGE e ela mostra que apenas duas proteínas adsorveram sobre a resina. Isto indica que o material está puro e de acordo com a Tabela 3 (no ensaio a pH 7 e grau de expansão 2) estas proteínas possuem boa atividade amilásica. O que mostra que o trabalho conseguiu purificar as amilases do malte de milho.

Ainda da Figura 3, tem-se que estas proteínas possuem massas molares iguais a 69,4 kDa e 45,6 kDa, respectivamente. Provavelmente estas massas molares estejam associadas a α e β -amilases, pois Biazus *et al.* [1], Santana [2], Nirmala and Muralikrishna [3], Dixon and Webb [6], Wiseman [7] e Aguilar *et al.* [9] citaram que a massa molar da primeira destas enzimas está compreendida entre 50-230 kDa e da segunda entre 20-50 kDa.

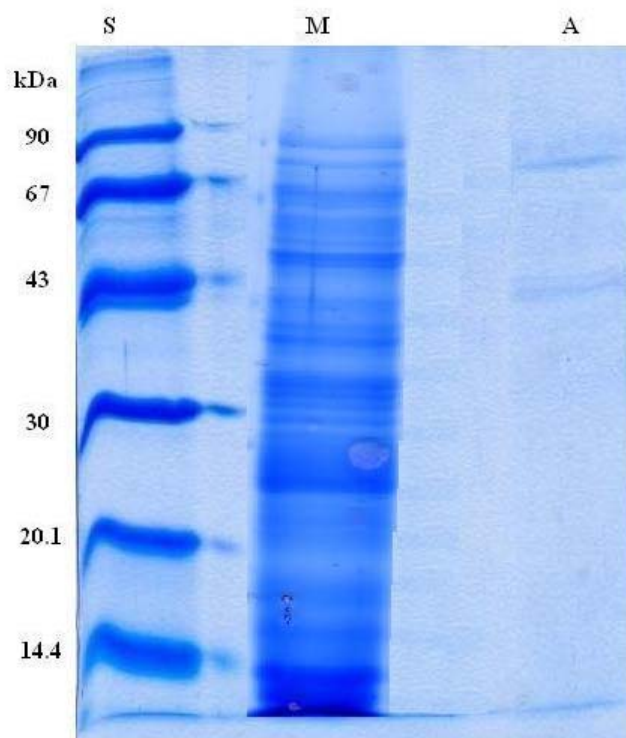


Figura 3. Determinação das massas molares das amostras por eletroforese via SDS-PAGE. *S* é o padrão de massa molar, composto das seguintes proteínas: fosforilase b (94kDa), albumina de soro bovino (67kDa), albumina de ovo (43kDa), carbonihidrase (30kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lacto albumina (14,4 kDa). *M* é a amostra de malte e *A* é a amostra purificada por ALE no ensaio a pH 7 e grau de expansão 2, da Tabela 3.

4 - CONCLUSÕES

O modelo quadrático foi o que mais se ajustou ao comportamento do fator de purificação sob influências do pH e grau de expansão do leito. A análise RSM mostrou que a capacidade de adsorção das amilases sobre a resina reduziu com o grau de expansão e aumentou nos pHs extremos deste trabalho (5 e 7). A eletroforese por SDS-PAGE mostrou que as α e β -amilases do malte de milho purificadas possuem massas molares de 69,4 kDa e 45,6 kDa, respectivamente. O tampão fosfato 0,05 M promoveu uma boa afinidade entre as amilases e a resina. A 8 cm de leito expandido e a pH 7 se obteve a melhor condição de recuperação das amilases do malte de milho em resinas de troca iônica Amberlite IRA 410. Este trabalho mostrou como se podem obter amilases de malte de milho com boa atividade e alto grau de pureza a baixo preço de custo.

5 - REFERENCIAS

- [1] Biazus, J. P. M., Souza, A. G.; Santana, J. C. C.; Souza, R. R. Tambourgi, E. B. Optimization of drying process of *Zea mays* malt to use as alternative source of amylolytic enzymes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2005, **48**: 185-190.
- [2] Santana, J. C. C. *Recuperação das enzimas α e β -amilases em sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl_2 para uso como biocatalizador amiláceos*. MSc Thesis, School of Chemical Engineering, Campinas, SP, Brazil, 2003.
- [3] Nirmala, M. and Muralikrishna, G. Three α -amylase from malted finger millet (Ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15) - Purification and partial characterization. *Phytochemistry* **62**, 21-23, 2003.
- [4] Sigma Chemical Co., Catalog. *Biochemicals organic compounds and diagnostic reagents*, 1996.
- [5] Demirkan, E. S.; Mikami, B.; Adachi, M.; Higasa, T.; Utsumi, S. α -Amylase from *B. amyloliquefacies*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. *Process Biochemistry* 2005, **40**, 2629-2636.
- [6] Dixon M. and Webb, E. *Enzymes*. 2^a ed., 6^a impression, by Spottiswood, Ballantyne co. Ltd, London and Colchester ed., Longmans and co. Ltd, London, Great Britain, 1971.
- [7] Wiseman, A. *Handbook of Enzyme Biotechnology*. 2^a ed., John Wiley Sons, New York, EUA, 1987.
- [8] Nguyen, Q. D.; Rezessy-Szabó, J. M.; Claeysens, M.; Stals, I.; Hoschke, A. Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology* 2002, **31**: 345-352.
- [9] Aguilar, G.; Morlon-Guyot, J. Trejo-Aguilar, B.; Guyot, J. P. Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 406-413, 2000.

- [10] Amersham Pharmacia Biotech. EBA Handbook: Principles and Methods. Uppsala, IBSN 91-630-5519-8, 1997.
- [11] Santos, E. S. Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção em leito expandido. PhD thesis, State of University of Campinas, SP, Brazil, 2001.
- [12] Amritkar, N. Kamat, M.; Lali, A. Expanded bed affinity purification of bacterial α -amylase and cellulose on composite substrate analogue-cellulose matrices. *Process Biochemistry* 2004, **39**, 565-570.
- [13] Roy, I.; Pai, A.; Lali, A. and Gupta, M. N. Comparison of batch, packed bed and expanded bed purification of *A. niger* cellulase using cellulose beads. *Bioseparation* 1999, **8**, 317-326.
- [14] Fernandez-Lahore, H. M.; Lin, D.-Q.; Hubbuch, J. J.; Kula, M.-R. and Thommes, J. The use of ion-selective electrodes for evaluating residence time distributions in expanded bed adsorption systems. *Biotechnology Progress* 2001, **17**, 1128-1136.
- [15] Dainiak, M. B.; Galaev, I. Y. and Matiasson, B. Directed capture of product from fermentation broth using a cell-repelling ion exchanger. *Journal of Chromatography A* 2002, **942**, 123-131.
- [16] Biazus, J. P. M.; Severo Jr., J.B.; Santana, J.C.C.; Souza, R.R.; Tambourgi, E.B. Study of amylases recovery from maize malt by ion-exchange expanded bed chromatography. *Process Biochemistry* 2006, 1-6. (In press)
- [17] Malavasi, U. C. and Malavasi, M. M. Dormancy breaking and germination of *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) morongo seed. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2004, **47**:6, 851-854.
- [18] Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959, **31**:3, 426-428.
- [19] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, **72**, 248-254.

- [20] Barros Neto, B.; Scarminio, I. S. e Bruns, R. E. *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. v.1, 1^a ed., EDUNICAMP, Campinas, SP, Brazil, 2001.
- [21] Djekrif-Dakhmouche, S.; Gheribi-Aoulmi, Z.; Meraihi, Z.; Bennamoun, L. Application of statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering* 2006, **73**:2, 190-197.
- [22] Tanyildizi, S. M.; Özer, D.; Elibol, M. Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. Using response surface methodology. *Process Biotechnology* 2005, **40**, 2291-2296.
- [23] Zhi, W.; Song, J. Ouyang, F.; Bi, J. Application of response surface methodology to the modeling of α -amylase purification by aqueous two-phase systems. *Journal of Biotechnology* 2005, **106**, 157-165.
- [24] Laemmle, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of *Bacteriophage* T4. *Nature* 1970, **227**:5259, 680-685.
- [25] Kalil, S. J. Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido. PhD thesis, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil, 2000.
- [26] Lanckriet, H. and Middelberg, A. P. J. Continuous chromatographic protein refolding. *Journal of Chromatography A* 2004, **1022**, 103-113.

6 - AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Brasil) pelas bolsas concedidas.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSÕES

E

SUGESTÕES

1 – CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- Durante a germinação das sementes de milho (*Zea mays*) há uma condição ótima de se obter o malte com boa atividade enzimática observando o gráfico obtido pela plotagem dos dados de tempo em dias e atividade enzimática em SKB, que gera numa curva em forma de pico, onde a máxima atividade das sementes foi observada no quarto dia de germinação e observamos que até a formação do pico a atividade enzimática (AE) é uma função exponencial do tempo (t), do tipo: $AE = A_0 e^{\mu t}$, onde AE_0 é a atividade da semente 'in natura' e μ é a taxa de crescimento da atividade enzimática da semente característica de cada variedade, análogo ao crescimento de microrganismos. Definindo-se assim, o quarto dia de germinação como sendo o tempo ótimo para se obter a máxima atividade enzimática no malte de milho e a partir da atividade inicial do milho utilizando-se do modelo, pode-se prever que atividade se encontrará o milho no quarto dia de germinação.

Observou-se que o potencial de hidrólise de amido pelo malte de milho diminui com o tempo de armazenagem a temperatura ambiente, sendo seu valor inicial foi o maior e alcançou 27 % de rendimento, reduzindo-se a menos da metade após 6 semanas de conservação na temperatura $10 \pm 1^\circ\text{C}$.

- A análise dos resultados permite afirmar que a faixa de pH e temperaturas ótimos das amilases de malte de milho se encontra entre 4,3-6 e $50-80^\circ\text{C}$, respectivamente. A constante K_m teve valor próximo a $7,69 \cdot 10^{-2}$ g/L, com V_{max} de $7,69 \cdot 10^2$ g/L.min e k_{cat} de $1,32 \cdot 10^5$ min⁻¹. Como a velocidade máxima das amilases de malte de milho foi muito maior que as amilases de outros cereais, pode-se afirmar que o malte de milho possui um alto potencial para ser empregado nos diversos ramos industriais.

- Os dados do processo de secagem mostraram que a umidade retirada do malte de milho ficou acima dos 40 % do peso total das sementes, sendo que seus maiores valores se encontraram na temperatura de 76 °C. As isotermas de secagem apresentaram comportamento assintótico com o eixo do tempo, como descrito na literatura e sua taxa se tornou constante a partir da terceira ou quarta hora de processo, mostrando que a partir desta faixa de tempo o produto já está seco e pronto para ser armazenado.

- Os modelos estudados não descreveram bem o comportamento experimental da isoterma de secagem do malte de milho, sendo que segundo a metodologia ANOVA os modelos apresentados por Henderson & Henderson (1968) e o de Wang e Singh (1978) foram os mais significativos dentre os utilizados neste trabalho.

- A otimização da secagem pela metodologia RSM mostrou que a dependência da atividade enzimática com o tempo e temperatura de secagem se dão na forma quadrática para os fatores e a atividade na forma logarítmica. A análise das superfícies de resposta mostrou uma influência maior da temperatura que a do tempo de secagem sobre a atividade enzimática no malte de milho e indicou como a melhor região para se processar a secagem do malte de milho (*Zea mays*), como sendo aquela que se encontra a 54°C de temperatura e 5,18 a 6 h de secagem.

- Durante os estudos de Hidrodinâmica da Coluna de adsorção em leito expandido, pode se observar que o modelo de Richardson-Zaki manteve um bom ajuste quando se plotava a velocidade linear do fluido versus a porosidade do meio (ambos na forma de logaritmo natural), o que mostra que este modelo ainda é válido para se prever o comportamento da fluidização em leito expandidos. O estudo da distribuição do tempo de residência mostrou que há uma elevação da altura equivalente dos numero de pratos teóricos (HEPT), da dispersão axial (D_{axial}) e do número de Prandtl (Pe) com a expansão e porosidade do leito e com a velocidade linear do fluido.

- Na purificação das amilases de malte de milho por adsorção em leito expandido utilizando a resina de troca iônica Amberlite IRA 410, observou-se que o tampão fosfato é um meio melhor para promover a adsorção das amilases sobre a resina que o tampão TRIS/HCl. A expansão do leito promoveu uma elevação no fator de purificação das enzimas, mas o melhor grau de expansão para se trabalhar foi aquela que apresentava o leito expandido até duas vezes a mais que a altura inicial do leito. E dentre os pHs estudados, o pH 7 é o melhor para se purificar estas enzimas, no qual o fator de purificação conseguiu alcançar cerca de 500 vezes mais atividade específica com relação a atividade específica da enzima bruta.

- Esta tendência da elevação do fator de purificação com a expansão do leito e pH do meio fluidizante foi observada via RSM e mostrou-se como uma parábola que indicava os extremos de pH e a menor expansão do leito como ótimos. A análise da eletroforese do malte purificado após a ALE mostrou que as α e β -amilases possuem 69,4 kDa e 45,6 kDa, respectivamente.

Assim, este trabalho proporcionou condições ótimas de se obter as amilases de malte de milho com valores elevados de atividade enzimática e mostrou que é possível a sua purificação utilizando a adsorção em leito expandido com a resina de troca iônica Amberlite IRA 410 com boa atividade enzimática, podendo-se aplicá-las em indústrias têxteis, de biscoitos, de cerveja e de fármacos, dentre outras.

2 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a germinação do milho com outras variedades para comprovar a validade da equação exponencial para estes, como foi comprovado para o milho comum;

- Aumentar as variáveis de processo (como a umidade relativa e a velocidade do ar) durante a secagem do malte e estudar seus efeitos sobre a atividade enzimática, além de ampliar a faixa de temperatura (para as menores temperaturas);

- Fazer um estudo a diversas temperaturas de trabalho ampliando tanto a faixa de pH como a altura do leito expandido;

- Aplicar o método de purificação utilizado na purificação de enzimas como a bromelina, a papaína, a celulase, etc.;

- Empregar outras resinas de troca iônica do tipo Amberlite, como as catiônicas ou outras aniônicas;

- Utilizar o tampão acetato como meio fluidizante;

- Estudar a purificação das amilases de malte de milho com outras resinas em meio fluidizado ou não;

- Fazer a imobilização e cristalização das amilases de malte de milho e comparar o potencial de hidrólise destas formas;

- Empregar as amilases na diferentes formas (malte, purificadas, imobilizada, cristalizadas, etc.) na hidrolise de amido de fontes diferentes (batata, mandioca, inhame, etc.) para um posterior emprego do seu xarope na produção de álcool e/ou bebidas.

ANEXOS



Study of amylases recovery from maize malt by ion-exchange expanded bed chromatography

Joana Paula M. Biasus^a, J.B. Severo Jr.^a, J.C.C. Santana^b, R.R. Souza^{a,*}, E.B. Tambourgi^b

^a Department of Chemical Engineering, Federal University of Sergipe, University City, Prof. José Aloísio de Campos, Av. Marechal Rondon, S/N, Rosa Elze, CEP 49.100-000, São Cristóvão, SE, Brazil

^b School of Chemical Engineering, State University of Campinas, CP 6066, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brazil

Received 24 November 2005; received in revised form 15 March 2006; accepted 24 March 2006

Abstract

In the present work, the effect of bed expansion and buffer type on the adsorption of amylases from maize malt on Amberlite 410 ion-exchange resin was studied. The hydrodynamic behavior of an expanded bed adsorption column was studied to obtain the optimal conditions of amylases recovery on ion-exchange resin. Residence time distribution showed that HEPT, axial dispersion and the Prandtl number increased with bed height, bed voidage and linear velocity. The adsorption capacity of amylases on the resin increased with bed height and the phosphate buffer shows the best recovering of amylases from maize malt on the Amberlite IRA 410 ion-exchange resin.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Amylase; Maize malt; Expanded bed adsorption; Amberlite IRA 410 ion-exchange resin; Richardson–Zaki coefficient

1. Introduction

Expanded bed adsorption (EBA) is a downstream process developed from protein chromatography. This technique permits crude feeding into the chromatographic column without an initial treatment to eliminate the biological material suspension, and as the bed expands, it increases adsorbent surface contact, making interaction with the targeted molecule more effective [1–3]. Several research on expanded bed adsorption behaviors are making to achieve a better understanding of the effects of adsorbent type and size [4,5], bed height, linear velocity [6], fluidization and elution solutions on residence time distribution (RTD) [3,7] for application in the recovery of important biomolecules.

Dainiak et al. [5] proposed a new technique for treatment of anion exchangers for adsorption of the fermentation product shikimic acid, directly from the fermentation broth. Amberlite 401 and 458 anionic exchange resins were treated with

hydrophilic polymer, poly(acrylic acid) (PAA), to form PAA-Amberlite 401 and PAA-Amberlite-458. The binding capacity of pure shikimic acid was about 81 mg for mL of adsorbent for both cross-linked PAA-Amberlite and native Amberlite in the fluidized phase. Binding capacity dropped to 17 and 15 mg/mL, respectively, when using filtrate fermentation broth and to about 10 mg/mL for cross-linked PAA-Amberlite when using the fermentation broth containing cells directly. Native Amberlite cannot be used for the direct adsorption of shikimic acid due to the immediate clogging of the column and the collapse of the expanded bed.

Human serum albumin (HSA) from very dense *Saccharomyces cerevisiae* suspensions was recovered by expanded bed adsorption [6]. Expanded bed hydrodynamics were studied as a function of bed expansion using DRT studies with sodium nitrite as a tracer. The authors showed that the protein binding capacity at 5% breakthrough decreased from 22 mg HSA/mL settled bed void volume for 20 g DCW/L yeast to 15 mg HSA/mL settled bed void volume for 40 g DCW/mL yeast and remained unchanged for the higher yeast concentrations (60–100 g DCW/L). However, the equilibrium binding capacity decreased monotonically, as a function of yeast concentration (20–100 g DCW/L) and the binding capacity at 100 g DCW/L yeast was five times lower than that at 20 g DCW/L yeast. The lower equilibrium capacity at the

* Corresponding author.

E-mail addresses: joana_biasus@yahoo.com.br (J.P.M. Biasus), jb_ufs@yahoo.com.br (J.B. Severo Jr.), jccurvelo@yahoo.com.br (J.C.C. Santana), rrsouza@ufs.br (R.R. Souza), eliamtam@feq.unicamp.br (E.B. Tambourgi).

high cell concentrations resulted from the adsorption of cells on the particle surfaces, restricting access of HSA to the intraparticle surface area. To remove the adsorbed HSA and yeast from zirconia particles, 1500–2000 column volumes of 0.25 M NaOH were required. No significant effect on chromatographic performance was observed after this treatment, according to Mullick and Flickinger [6].

Fernandez-Lahore et al. [3] examined the suitability of ion-selective electrodes (ISE) for the determination of RTD in turbid, cell-containing fluids. The enhanced feedstock compatibility of IES is better than that of other tracer sensing devices and allows a better study of bed system hydrodynamics under relevant operating conditions. Within the linear range of the corresponding ISE-tracer pair, both rate and pH are normally measured during expanded bed adsorption (EBA) of proteins. Analyzing the DRT obtained after perfect ion-tracer pulse in terms of the PDE (PDE, axial dispersion, plug-flow exchange of mass with stagnant zones) gave a quantitative description of the underlying hydrodynamic situation during EBA processing. The data provided a powerful tool for predicting the overall process of adsorption with a defined feedstock type and composition. The best results were obtained using intact yeast cell suspensions at different biomass contents (up to 7.5% wet weight) and buffer conductivities (5–12 mS) in an EBA column filled with the adsorbent Streamline Q XL as fluidized phase.

Richardson and Zaki [8] studied several materials and obtained Eq. (1) for the relationship between fluid velocity (U) and end velocity of the particle (U_T) with the bed voidage (ϵ), which is given as:

$$\frac{U}{U_T} = \epsilon^n \quad (1)$$

while n is the Richardson–Zaki index or expansion index and it is a function of the terminal Reynolds number (Re_t)

$$Re_t = \frac{d_p \rho_L U_T}{\mu} \quad (2)$$

For the Stokes region, $Re_p < 0.1$, the terminal velocity of an isolated particle (U_T) is given as:

$$U_T = \frac{g d_p^2 (\rho_p - \rho_L)}{18 \mu} \quad (3)$$

and Re_p is given as:

$$Re_p = \frac{d_p \rho_L U}{\mu} \quad (4)$$

With the linearization of Eq. (1), it is possible to obtain the n experimentally, with Eq. (5) [9].

$$\ln U = \ln U_T + n \ln \epsilon \quad (5)$$

Downstream processes are being applied in the purification of biological material, mainly the proteins and enzymes of interest commercial. The α and β -amylases detach their among the commercial enzymes, for diversity application in industries process, essentially in the starch hydrolyses for this they are used in food, pharmaceutical and textile industries [9,10]. The

maize (*Zea mays*) is an agricultural product very diffused in Brazil, it is commercialized in *nature* form or minimal processed to cheaply cost price. So the obtaining of the pure α and β -amylases from maize malt will go aggregate price to the maize culture [9].

In the present work, the effect of bed expansion and buffer type on the adsorption of amylases from maize malt on Amberlite 410 ion-exchange resin was studied. The hydrodynamic behavior of an expanded bed adsorption column on effects of the biomolecules and salt concentration and salt type were studied in order to obtain the optimal conditions the amylases recovery on ion-exchange resin.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Reagents

An Amberlite IRA 410 ion-exchange resin from VETEC (São Paulo, Brazil) was used. Maize seeds were proved by EMBRAPA, Aracaju, Sergipe, Brazil. Di-nitric salicylic acid (DNS), cupric sulfate and, potassium sodium tartrate were proved by VETEC (São Paulo, Brazil). Potassium hydrogen phosphate, disodium hydrogen phosphate, TRIS and chlorine acid were proved by MERK (Germany).

2.1.2. Fluidizers and particles

Distilled water (H_2O), 0.07 M phosphate buffer at pH 7, 0.07 M Tris/HCl at pH 7 and maize malt at 2% in 0.07 M phosphate and in 0.07 M Tris/HCl buffers at pH 7 were used. In Table 1, the physical properties of fluidizers and adsorbent particles are shown. Water properties were found in the literature [11] and properties of the other fluids were measured by viscosimetry and by the changed weight of 1 mL of fluid volume. These properties are used to calculus of U_T by substitution into Eq. (3).

2.1.3. EBA column

Fig. 1 shows a scheme of the EBA column used in the present work is shown. The glass column is 1 cm $\times$ 30 cm, with an adjustable piston and feed flow inlet at the bottom of the column and a product flow outlet at the top. Sixty mesh plates at the feed inlet and at the product outlet were used to avoid loss of adsorbents particles. A ruler was placed at the side of the column for measurement of bed height.

2.1.4. Enzyme obtaining from maize malt

Maize seeds were selected, weighed and washed. These seeds absorbed between 40 and 45% of the moisture and germinated in the laboratory at room temperature and pressure (27 °C and 1 atm). The maize malt was dried at 54 °C

Table 1
Fluidizers and particles properties

Fluidizer	Properties	
	ρ_L (kg/m ³)	μ (kg/m ²)
H ₂ O ^a	997.5	9.384×10^{-4}
Phosphate buffer	1011	9.870×10^{-4}
Phosphate + Malt	1004	9.872×10^{-4}
Tris HCl	1007	1.037×10^{-3}
Tris HCl + Malt	996.5	1.051×10^{-3}
Particles		
	ρ_p (kg/m ³)	d_p (m)
Amberlite IRA 410 resin	1120	4.4×10^{-4}

While d_p is the particle diameter, ρ_L and ρ_p are liquid and particle specific mass, respectively, and μ is the dynamic viscosity.

^a Source: Streeter [11].

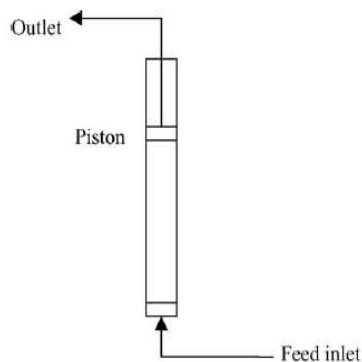


Fig. 1. Scheme of the EBA column.

for 5 h and stored at 5 °C [9,10]. A 20 g/L (or 2%, weight/volume) of maize malt solution were prepared with 0.07 M phosphate and 0.07 M Tris/HCl buffers at pH 7.0 [9].

2.1.5. Tracer

Five milliliters of the glucose solution at 5 mg/L was used as the tracer [3]. The glucose concentration was determined by the Milles method. At 1 mL of samples containing glucose is added 1 mL of water distiller and 3 mL DNS reagent and this mixture is carried out to the boiling point for 5 min. After cooling of the mixture, the absorbance analysis is making to 540 nm [12].

2.2. Methods

2.2.1. Hydrodynamic study

Two grams of Amberlite IR 410 ion-exchange resin was used in all assays; it given a bed height of about 4 cm. The fluidizer was fed in the bottom of the column. Liner velocity was between 0.0002 and 0.008 m/s and bed height was property measured. The Richardson–Zaki index and experimental end velocity (U_{Texp}) were obtained with Eq. (5) and the calculated end velocity (U_{Tcalc}) was obtained with Eq. (3) [3,7,8,13].

2.2.2. Determination of bed voidage (ε)

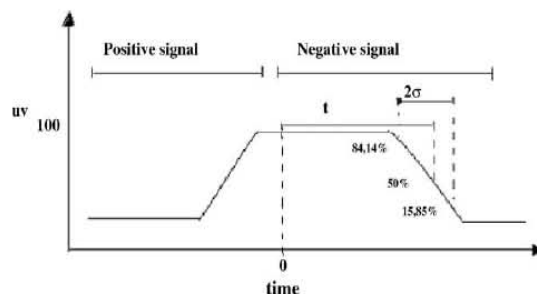
Bed voidage was obtained by substitution of data on specific mass (ρ_p) and mass (m_p) of the adsorbent particles, area of the cross-section of the column (A_T) and bed height (H), in the following equation:

$$\varepsilon = 1 - \frac{V_p}{V_L} = 1 - \frac{V_p}{A_T H} = 1 - \frac{m_p}{\rho_p A_T H} \quad (6)$$

where V_p is particle volume.

2.2.3. Study of residence time distribution (RTD)

Phosphate and Tris/HCl buffers at a 0.07 M concentration and at pH 7.0 were used as fluidizers; the particle bed was fluidized until bed height of the

Fig. 2. Scheme of determination RTD [1]. σ is the standard deviation.

study was achieved (approximately two, three and four times the initial bed height). Five milliliters of the tracer (glucose solution) was injected at the bottom of the column (below the particle bed). Glucose concentration was measured in all samples by Milles method [12]. The RTD curves were obtained by the pulse method. In Fig. 2, it is shown how to DRT was determined experimentally. The mean residence time (t) and the standard deviation (σ) are substituted in to Eq. (7), to obtain the height equivalent of the theoretical plates (HETP).

$$\text{HETP} = \frac{t^2}{\sigma^2} H \quad (7)$$

Axial dispersion (D_{axial}) was calculated with Eq. (8), as follows:

$$\text{HETP} = \frac{UH}{2\sigma D_{axial}} \quad (8)$$

The Peclet number (Pe) was obtained with Eq. (9) [3,4,7]:

$$Pe = \frac{HU}{D_{axial}} \quad (9)$$

2.2.4. Enzymes assays

Amylase was assayed according to Milles laboratory method [10,12,15]. Twenty milliliters of 2% soluble starch at pH 4.8 (0.1 M acetate buffer) were hydrolyzed by 500 μ L of enzyme sample in 10 min at 30 ± 2 °C. Total protein concentration was determined according to method of Bradford [14] with BSA as protein standard. One unit of enzyme activity was defined as μ mol of glucose released per min under the assay conditions. The specific activity was calculated as activity for mg protein.

2.2.5. Amylases purification

Batch and expanded bed adsorption were carried out at 22 °C and pH 7. Adsorbent bed was pre-equilibrated in the height of working (see Table 2), with 0.07 M phosphate or 0.07 M Tris/HCl buffer at pH 7. Five milliliters of 2% maize malt solution in phosphate or Tris/HCl buffers at pH 7 was loaded in column bottom for promoting the adsorption of enzymes on Amberlite IRA 410 ion-exchange resin. The elution was profiled with 0.25 M NaCl at 14 mL/min in

Table 2

Experimental parameters obtained by RTD curves

Fluidizer	Bed	H (cm)	ε	U (m/s)	HEPT	D_{axial} (cm ² /s)	Pe
Phosphate	Fluidized	15.4	0.848	0.0058	33	2.477	3.628
		11.6	0.797	0.0045	25	1.536	3.411
		8.5	0.724	0.0030	18	0.835	3.097
	Fixed	4.2	0.440	0.0004	9	0.0887	1.885
Tris/HCl	Fluidized	15.9	0.852	0.0048	34	2.105	3.653
		11.5	0.796	0.0038	25	1.265	3.411
		8.11	0.710	0.0023	17	0.6104	3.044
	Fixed	4.2	0.440	0.0002	9	0.0005	1.886

While D_{axial} is the axial dispersion of fluid into column, H the bed height, HEPT the height equivalent to the plate numbers, ε the bed voidage, Pe the Peclet number and U is the linear velocity of fluid.

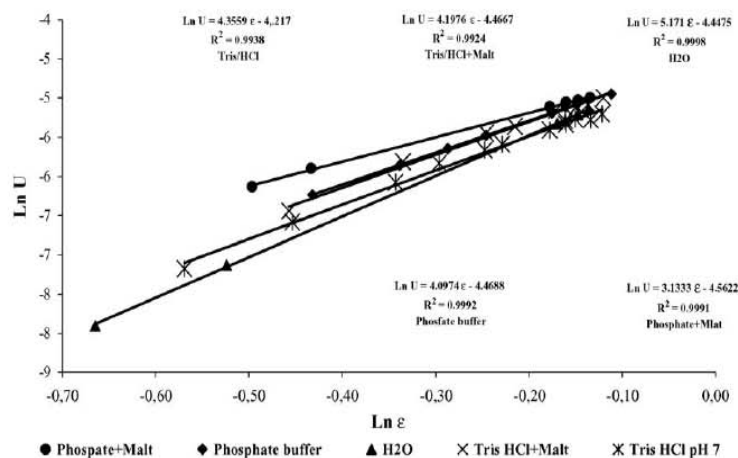


Fig. 3. Richardson-Zaki models.

descendent flux. The activity and the protein content were measured of time to time during the adsorption, washing and elution periods [7,10,14–17].

3. Results and discussion

Fig. 3 shows the curves of $\ln U$ versus $\ln \varepsilon$. It can be observed that the multiple correlations are optimal (about 1.0), suggesting that the Richardson–Zaki equation is the best empirical model for predicting to particles fluidization. There was a reduction in the value of n when salt (phosphate or Tris) and biological material (maize malt) were added to the distilled water systems. It shows that there is a stronger of resistance of resin bed in order water > Tris/HCl > Tris/HCl + Maize malt > Phosphate buffer > Phosphate + Maize malt. For the fluidizer contained maize malt and salts there was a large effect of friction on degree of expansion for the particle–particle, particle–liquid and particle–biomolecule interactions, it provoked to increase in the linear velocity of the fluidizer to maintain the bed voidage at the same level as that in the salt system [3,6–8].

Table 3 shows the comparison between the experimental (U_{TExp}) and calculated (U_{TCalc}) particle end velocities for fluidizers and temperatures studied. It can be observed that the errors between the velocities are lower and they are associated with experimental measurement viscosity and specific mass and the reliability the data in the table. The low error suggests that the Richardson–Zaki equation is the best empirical model to predict the hydrodynamic behavior of adsorbent particles in expanded bed systems, even when the fluidizer contains a larger amount of

biological material in suspension [1,6–8]. The fluidized particle end velocity decreased as the salt and biological materials were added. The specific mass (ρ) and the viscosity (μ) of the fluidizers are greater than those of the water fluidizer.

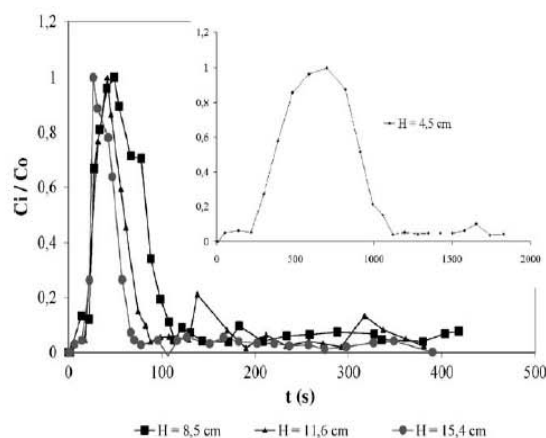


Fig. 4. RTD curves for 0.07 M phosphate buffer at pH 7 and 295.15 K. C_0 and C_i is the initial and in i time glucose concentration, respectively, and t is operation time.

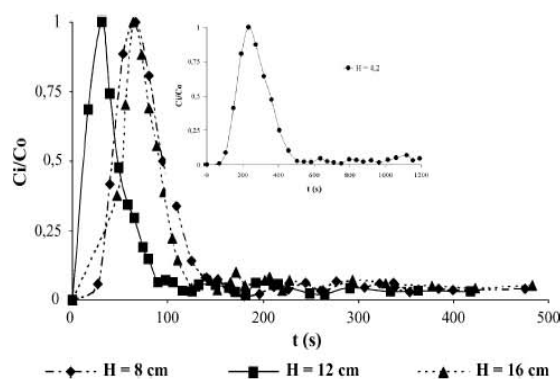


Fig. 5. DRT curves 0.07 M Tris/HCl buffer at pH 7 and 295.15 K.

Table 3
Comparison between experimental and calculated particles end velocities

Fluid	U_T (m/s)		Error (%)
	Experimental (U_{TExp})	Calculated (U_{TCalc})	
H ₂ O	0.0134	0.0135	−0.74
Phosphate buffer	0.0115	0.0114	+0.88
Phosphate+Malt	0.0104	0.0121	−14.05
Tris HCl	0.0104	0.0112	−7.21
Tris HC + Malt	0.0115	0.0121	−5.19

1790

J.P.M. Biazus et al. / Process Biochemistry 41 (2006) 1786–1791

Table 4

Recovery of amylases from maize malt (*Zea mays*) in expanded bed adsorption on Amberlite IRA 410 ion-exchange resin with the phosphate buffer at pH 7 as fluidizer

Bed	<i>H</i> (cm)	Sample	Activity (U)	Protein (μg)	AE (U/mg)	Activity recovery	Purification factor
Fixed	4.2	Malt	2087.0	885.43	2357.0	100	1
		Eluted	1229.0	8.7175	140980	58.89	59.81
Expanded	8	Malt	1894.5	893.28	2120.8	100	1
		Eluted	3905.5	3.2650	1196144	206.1	564.0
	12	Malt	36.500	832.49	43.844	100	1
		Eluted	38.500	18.128	2117.7	105.5	48.30
	16	Malt	36.500	832.49	43.844	100	1
		Eluted	32.500	16.658	1951.0	89.04	44.50

While AE is the specific activity and *H* is the bed height.

Table 5

Recovery of amylases from maize malt (*Zea mays*) in expanded bed adsorption on Amberlite IRA 410 ion-exchange resin with the Tris/HCl buffer at pH 7 as fluidizer

Bed	<i>H</i> (cm)	Sample	Activity (U)	Protein (μg)	Specific activity (U/mg)	Activity recovery	Purification factor
Fixed	4.2	Malt	12.3844	739.11	16.7558	100	1
		Eluid	0	0	0	0	0
Expanded	8	Malt	36.3237	739.11	49.1452	100	1
		Eluid	0	0	0	0	0
	12	Malt	16.4509	662.49	26.4274	100	1
		Eluid	0	0	0	0	0
	16	Malt	20.1058	622.25	32.2988	100	1
		Eluid	0	0	0	0	0

The adsorption of proteins was on mixed-mode fluoride-modified zirconia (FmZr) particles (38–75 μm, surface area of 29 m²/g and density of 2.8 g/cm³). Because of the porosity of zirconia particles, HSA (4 mg/mL) can be adsorbed in a FmZr bed expanded at three time its height. The expanded bed adsorption of any protein from a suspension containing more than 50 g DCW/L cells had not been previously reported. The FmZr bed expansion characteristics were well represented by the Richardson–Zaki correlation with a particle terminal velocity of 3.1 mm/s and a bed expansion index of 5.4 [6].

Figs. 4 and 5 show RTD curves for glucose tracer as it passed into the column bed. They have peaks that show the glucose variation when it pass into column bed, illustrating that the glucose solution may be used as tracer and the RTD parameter can be determined [1,3,4].

Table 2 shows the RTD results after substitution of the data into Eqs. (6)–(9) according to the methodology used by Fernandez-Lahore et al. [3], Santos [7] and Yamamoto et al. [4]. In the table, we can see that the liquid axial dispersion increased with height and bed voidage and linear velocity. There was a 10-fold increase when the initial bed height doubled and a 30-fold increase when the initial bed height quadrupled. This facilitates the flow of biological material into the particle bed and increases the contact between biological material and adsorbent particles, so that it is possible to feed the crude material into the fermented tank directly, thereby avoiding fouling and reducing the costs of pretreatment and prepurification, which are the main chromatographic problems [1,3]. The Peclet number (*Pe*) increased with bed height, doubling with

the maximum bed height, and it facilitated mass transfer in the system. HETP changed with all the parameters studied.

Tables 4 and 5 show the results of amylases recovery on Amberlite IRA 410 ion-exchange resin, using phosphate and Tris/HCl buffers as fluidizers, respectively. As the maize malt solution is instable, the activity of material crude was measured day after day, before the assays. That the Tris/HCl are not a good meddle for promotion of amylase adsorption due the resin be selective to chlorine ion (from HCl) and it decreased the binding capacity of Amberlite IRA 410 ion-exchange resin. Phosphate buffer promoted a good affinity between amylase and resin, and that at 8 cm of bed height (two expansion degree) is the best system for amylase recovery by the expanded bed chromatography in Amberlite IRA 410 ion-exchange resin. There is a decrease of purification factor with expansion degree while its amount was similar to fixed bed height of 4.2 cm. The activity recoveries were above to 89% of maize malt activity (crude material) showed that Amberlite IRA 410 have good affinity to amylases from maize malt. In the original meddle (maize malt) have starch and products of starch hydrolysis, they are amylase inhibitors and these inhibitors are not captured by resin, for the way the activity recovery were more than 100% and the factor was higher [9,15,16].

4. Conclusions

The Richardson and Zack model showed a good fit with the experimental data, showing lower relative error. Studying RTD showed that HEPT, axial dispersion and the Prandtl number increased with bed height, bed voidage and linear velocity.

Tris/HCl was not a good meddle for promotion of amylase adsorption for chlorine ion interaction with resin, however, phosphate buffer was promoted a good affinity between amylase and resin, and that at 8 cm of bed height is the best system for amylase recovery by the expanded bed chromatography in Amberlite IRA 410 ion-exchange resin.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge the financial support received from CNPq (Brazil).

References

- [1] Amersham Pharmacia Biotech. EBA Handbook: Principles and Methods. Uppsala, IBSN 91-630-5519-8, (1997). pp. 160.
- [2] Roy I, Pai A, Lali A, Gupta MN. Comparison of batch, packed bed and expanded bed purification of *A. niger* cellulase using cellulose beads. *Bioseparation* 1999;8:317–26.
- [3] Fernandez-Lahore HM, Lin D-Q, Hubbuch JJ, Kula M-R, Thommes J. The use of ion-selective electrodes for evaluating residence time distributions in expanded bed adsorption systems. *Biotechnol Progr* 2001;17:1128–36.
- [4] Yamamoto S, Okamoto A, Watler P. Effects of adsorbent properties on zone spreading in expanded bed chromatography. *Bioseparation* 2001;10: 1–6.
- [5] Dainiak MB, Galaev IY, Matiasson B. Directed capture of product from fermentation broth using a cell-repelling ion exchanger. *J Chromatogr A* 2002;942:123–31.
- [6] Mullick A, Flickinger MC. Expanded bed adsorption of human serum albumin from very dense *Saccharomyces cerevisiae* suspensions on fluoride-modified zirconia. *Biotechnol Bioeng* 1999;65(65):282–90.
- [7] Santos ES. Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção em leito expandido. PhD thesis, State of University of Campinas, SP, Brazil, 2001.
- [8] Richardson JF, Zaki WN. Sedimentation fluidization: Part I. *Trans Inst Chem Eng* 1954;32:35–53.
- [9] Biazus JPM, Souza AG, Santana JCC, Souza RR, Tambourgi EB. Optimization of drying process of *Zea mays* malt to use as alternative source of amylolytic enzymes. *Braz Arch Biol Technol* 2005;48:185–90. special.
- [10] Nirmala M, Muralikrishna G. Three α -amylase from malted finger millet (*Ragi*, *Eleusine coracana*, Indaf-15)—purification and partial characterization. *Phytochemistry* 2003;62:21–3.
- [11] Streeter VL. *Mecânica dos fluidos*. Celso da Silva Muniz. et al., trans. São Paulo: Mcgraw Hill, 1977. pp. 736.
- [12] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959;31(3):426–8.
- [13] Chang YK, McCreath GE, Chase HA. Purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenate using expanded bed adsorption (EBA) with Streamline™ red H-E7B. In: Galindo E, Ramirez OT, editors. *Advances in bioprocess engineering*. Netherlands: Kluwer Academic Publisher; 1994. p. 519–25.
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [15] Aguilar G, Morlon-Guyot M, Trejo-Aguilar B, Guyot JP. Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme Microbial Technol* 2000;27:406–13.
- [16] Kalil SJ. Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido. PhD thesis, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil, 2000.
- [17] Lanckriet H, Middelberg APJ. Continuous chromatographic protein refolding. *J Chromatogr A* 2004;1022:103–13.

Optimization of Drying Process of *Zea Mays* Malt to Use as Alternative Source of Amylolytic Enzymes

Joana Paula Menezes Biazus¹, Anderson Gomes Souza¹, José Carlos Curvelo Santana², Roberto Rodrigues de Souza^{1*} and Elias Basile Tambougi²

¹Departamento de Engenharia Química; Universidade Federal de Sergipe; Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, s/n; Rosa Elze; 49100-000; rrsouza@ufs.br; São Cristóvão - Sergipe - Brazil. ²DESQ; Universidade Estadual de Campinas; Cidade Universitária Prof. Zeferino Vaz; Barão Geraldo, Campinas - SP - Brazil

ABSTRACT

*This work aimed to study the drying process optimization of maize (*Zea Mays*) malt for obtaining maize malt, without affecting enzymatic activity of α and β -amylases from maize malt. Results showed that dryer operation must occur in zone at 54°C and 5.18-6 h process time. The maize malt obtained had good enzymatic properties.*

Key words: α and β -amylases enzymes, maize (*Zea mays*) malt; drying process, optimization

INTRODUCTION

Drying process is used with the aims to keep the enzymatic activity of agricultural products. It involves removal of volatile substances (commonly, but not exclusively, water) from a solid product, or it is a process in which the water activity of a product is decreased due to removal of water by vaporization. Thus, the drying process is the conjunct of science and technology that needs of experiments on several phenomenons that occur in this process (Jesus, 2002). Some considerations about the initial and moisture content of product are used to justify the drying phenomenon. These considerations are the form of the water transport into solid structure and in the solid surface (Brod, 2003).

In 1998, a transporter type dryer straw mat was made by Freire and Sartori with aim to analyze its behavior in the drying process of the *Brachiaria brizantha* grass seeds. They evaluated the drying

kinetics and the process effect on the seed quality (germination power). They concluded that the dryer was viable and the quality test showed that the grass seeds dried at temperatures more or equal to 48.5 °C had low germination power.

Of late, the use of enzymes in feeding, pharmaceuticals, textile and others industries is increased for being economically viable. They are also used in the manufacture of alcoholic drinks, detergent, biosensors, diagnostic kits and in the management of environment pollutants (Jesus, 2002). The α and β - amylases are commercial enzymes used in many applications, mainly in the starch hydrolyses (Fogarty and Kelly, 1979; Wiseman, 1987). They are obtained commonly from barley malt or microorganisms.

α -amylase (EC 3.3.1.1; α -1,4 glucan, 4 - glucanhydroxylase) is extracellular enzyme that hydrolyses of the α -1,4 bonds, of the amylose, amylopectin, glycogen and dextrin molecules, but can not hydrolyses α -1,6 bonds. It has molecular

* Author for correspondence

weight about 50 kDa, with isoelectric point 5.4, very good enzymatic activity about pH 4.7 and 75 °C (properties enzymes depend from source) (Reguly, 1996; Wiseman, 1987).

β -amylase (EC 3.2.1.1, α -1,4, glucanmaltase) is an extracellular enzyme that hydrolyses of amylopectin and glycogen, breaking each second α -1,4 bond. It has molecular weight about 50 kDa, with isoelectric point 5.4, very good enzymatic activity about pH 4.5-6.5 and 55-57 °C, it inactivated after temperatures above of 60 °C (Reguly, 1996; Wiseman, 1987).

Maize (*Zea mays*) is an agricultural product very popular in Brazil that has low cost price. Thus, the maize malt obtaining will go aggregate value to maize culture. This work aimed study the drying process optimization of maize malt obtaining by response surface methodology (RSM).

MATERIALS AND METHODS

Maize malt obtaining

The maize seeds were selected, their weight was measured, washed, the seeds were carried to water absorption until 40- 45 % (w/w) and germinated in laboratory. The germination time was between 4-5 days. The maize malt was dried as show in Table 2 and stored at 5 °C (Santana, 2003).

Drying process methodology

Convective dryer with air circulation was used in maize malt drying process. Dryer was operated in constants conditions of temperature, relative moisture ($64 \pm 1\%$) and air flux. Three drying temperatures were utilized 54, 64 e 76°C. The germinated seeds (malt) were placed in watch glass (previously dried and its weight measured). The initial weight (X_0) were measured and they were dried for 12 h into dryer. Dry weight (X_i) were measured after each hour. The moisture content (U) is given to equation 1 and experimental weight (X_{exp}) is given to equation 2 (Freire e Sartori, 1998; Jesus, 2002), both are shown at following:

$$U = \left(\frac{X_0 - X_i}{X_0} \right) * 100 \quad (1)$$

$$X_{exp} = \frac{X_i}{X_0} \quad (2)$$

Determination of protein total concentration

Protein concentration in samples was measured by Bradford method (Bradford, 1976).

Enzymatic activity analysis

In maize malt samples the enzymatic activity was determined by Wohlguth method, modified by Sandstedt, Kneen and Blish (1959), showed of according to Reguly (1996). A SKB is among of starch content dextrinized for one hour and one gram of amylase.

Drying process optimization

The influence of the time (t) and temperature (T) on drying process on the enzymatic activity (AE) of the maize malt was studied by 2^2 experimental planning with hexagon design (showed in Table 2) and response surface methodology (RSM) for optimization of drying process. The enzymatic activity was shown in $\ln AE$ form in the models. Linear, hyperbolic and square models were tested. The least square were used to estimate the model parameters and the model fitting were made by analysis of variance methodology (ANOVA), all showed in Barros Neto et al., 1995 and 2001). The following variables codifications were used:

$$x_1 = \frac{t_i - 8}{2} \quad (3)$$

$$x_2 = \frac{T_i - 65}{11} \quad (4)$$

RESULTS AND DISCUSSION

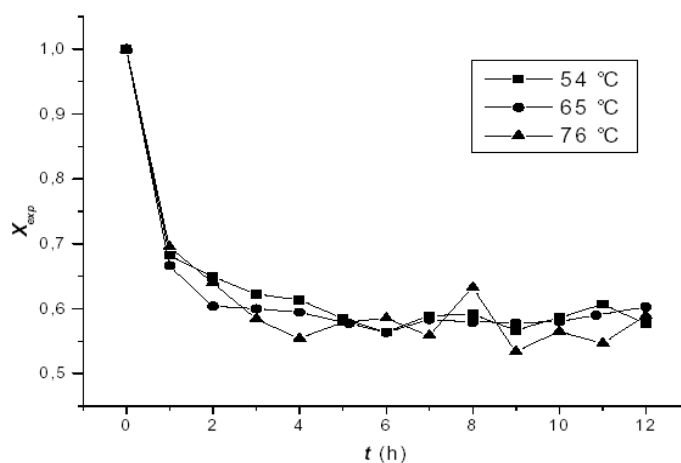
Drying process

Table 1 showed the experimental weight of the malted seed at different drying time and temperatures. Results showed that the moisture content was between 40 at 43 % (w/w), and more high moisture desorption rate was shown at 75°C.

Drying isotherms showed in the Fig. 1 were obtained with the data of Table 1. Dry weight began to become constant between 3-4 hours. In this moment, the drying curves showed parallels to the time axis (Brod, 2003; Freire e Sartori, 1998; Jesus, 2002).

Table 1 -Experimentals data of drying process of maize malt.

Assays	Drying temperature					
	54°C		65°C		76°C	
	t (h)	X_{exp}	t (h)	X_{exp}	t (h)	X_{exp}
	0	1	0	1	0	1
1		0.6822	1	0.6663	1	0.6950
2		0.6493	2	0.6037	2	0.6408
3		0.6227	3	0.6000	3	0.5844
4		0.6136	4	0.5946	4	0.554
5		0.5854	5.15	0.5775	5	0.5789
6		0.5638	6	0.5635	6	0.5854
7		0.5891	7	0.5833	7	0.5586
8		0.5915	8	0.5796	8	0.6322
9		0.5667	8	0.5787	9	0.5338
10	1	0.5860	8	0.5802	10	0.5648
11	1	0.6067	9	0.5781	11	0.5469
12	1	0.5773	10	0.5802	12	0.5888
13			10.85	0.5900		
14			12	0.6027		

**Figure 1** - Drying isotherms of the maize malt.**Table 2** -Planning matrix of drying process optimization of the maize malt.

Assays	t (h)	T (°C)	x_1	x_2	AE
1	6	54	-1	-1	6.684
2	10	54	+1	-1	1.710
3	6	76	-1	+1	0.1292
4	10	76	+1	+1	0.2656
5	8	65	0	0	0.4822
6	8	65	0	0	0.4522
7	8	65	0	0	0.5851
8	5.18	65	-1.41	0	0.2571
9	10.8	65	+1.41	0	0.3097

Table 3 -Variance analysis (ANOVA) of the fitting model.

Souce of variance	Square sum	Free degree	Medium square sum	F _{calc}	F _{tab}
Regression	10.981	5	2.196		
Residual	0.211	3	0.070	31.269	9.01
Fitting fault	0.175	1	0.175		
Erro Puro	0.036	2	0.018	9.718	18.51
Total	11.118	8			
% explicated variance =				98.763	
% maximum explicated variance =				99.677	
Determination coefficient (R ²) =				0.9876	

Drying process optimization

Table 2 showed the assays, the factors in the normal (t and T) and coded form (x_1 and x_2) and the response (AE). These data were used for obtaining models parameters by least square and for fitting model by ANOVA methodology (Barros Neto et al., 1995).

The fitting model is shown in the equation 3, that one introduces a square dependence of enzymatic activity (in $\ln AE$ form) with the drying time and temperature. There is a low influence of linear time and negative high of linear temperature, but all parameters have statistical significant.

$$\ln AE = -0.6886 + 0.0476t_1 - 1.4522T_2 - 0.2910t_1^2 + 0.7437T_2^2 + 0.5209t_1T_2 \quad (5)$$

Table 3 shown the resulties of variance analysis (ANOVA) for the fitting model. According to Barros Neto et al. (1995 and 2001) R^2 must have valor about 1.0 and the variances must have valores about 100. Resulties ANOVA for the variances and R^2 , showed that there was low error quantity added to the fitting model due to regression and due to the employ of the analytical methods.

Resulties of the F test, whole the first test (F_{calc}/F_{tab}) indicated that the model was statistical significant and the predict data were approaching the experimental data. The second test (F_{tab}/F_{calc}) indicated that the data were fitting and they were statiscal representing the response surface. For the F tests are statistical considerate the rate much be igual or more that 4 (Barros Neto et al., 1995). According to Barros Neto et al. (1995) bout F teste must be ≥ 4 for the model is statistical significant and predictive. Resulties showed that the model was statistical significant, but it was not full predictive for optimize of the drying process of maize malt, in the studied condicions (Barros Neto et al., 1995 e 2001).

Figs. 2 and 3 show the 2D and 3D response surfaces for the drying process optimization. Enzymatic activity (on $\ln AE$ form) increased with reduction of the drying time and temperature. If the time factor was fixed in the minor valores (-1 at -1.41 or 5.18 at 6 h) and the temperature factor was augmented to the maximum value (+1 or 76 °C), there was a high reduction in the enzymatic activity, however, if the temperature in the minimum value (-1 or 54°C) and time was changed of minimum value (-1,41 or 5,18 h) until the maximum value (+1,41 or 10,8 h), the enzymatic activity was little loss, which shown that temperature effect was critical for the drying process of maize malt. This temperature effect on the enzymatic activity occurs due to previous inactivation the β -amylases after it exposes above 54°C. Thus, for response surface analysis may be indicated optimal operation condition for maize malt drying process was 54°C and 5.18-6 h of drying time.

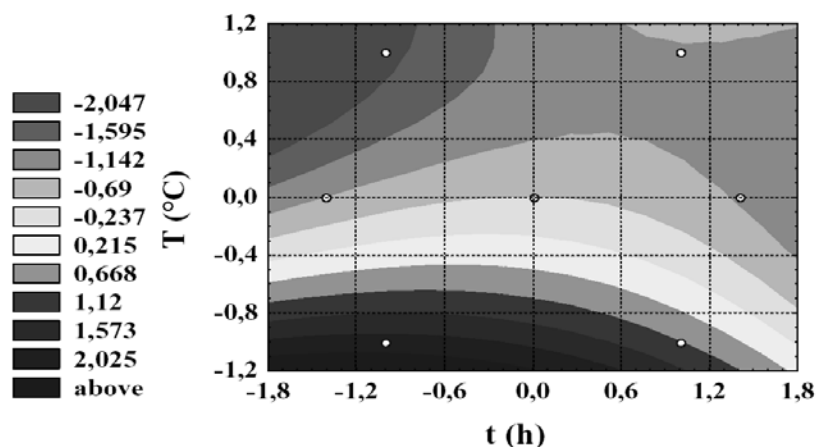


Figure 2 - 2 D response surface for understanding the enzymatic activity dependency with the time and temperature in the drying process of maize malt.

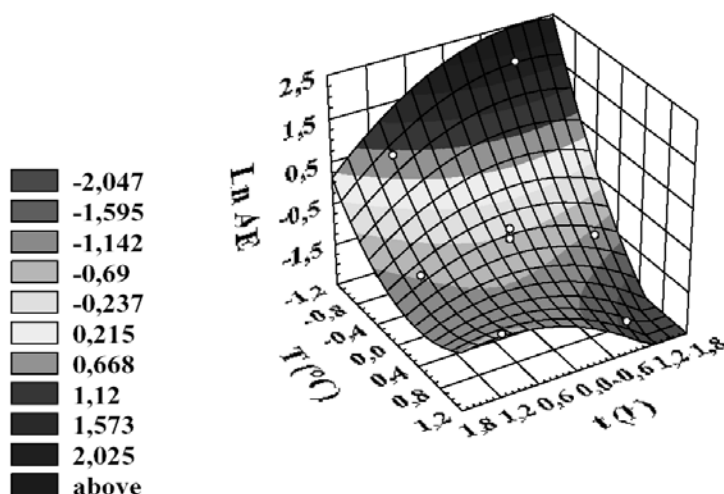


Figure 3 - 3D response surface for understanding the enzymatic activity dependency with the time and temperature in the drying process of maize malt.

CONCLUSIONS

The analysis of the results carried the following conclusions:

Drying process data showed that moisture removal from maize malt was above 40 % (w/w).

The drying isotherms were shown that moisture desorption rate was fixed after 3-4 h of drying process.

The variance analysis (ANOVA) showed that the best fitting model was the that having to square dependency of the enzymatic activity, in $\ln AE$

form, with the drying time (t) and the temperature (T).

The response surface analysis showed that influence of drying temperature on enzymatic

activity was more than drying time and the best operation condition was 54°C and 5.18-6 h for the maize malt drying process.

NOMENCLATURE

AE	Enzimatic Activity (SKB/mg of protein)
F_{Calc}	Calculated F test.
F_{Tab}	Tabled F test.
i	Level of factors
T	Drying temperature (°C)
t	Drying time (h)
U	Moisture content (% w/w)
X	Drying weight (dimensionless)
x_1 e x_2	Coded factors

ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully acknowledge CNPq and PIBIC/ CNPq-UFS for financial support.

RESUMO

Este trabalho objetivou a otimização da secagem do malte de milho (*Zea Mays*) para obter um malte sem afetar a atividade das enzimas presentes neste, α e β -amilases. Os resultados mostraram que a operação do secador deve ser feita a 54°C e entre 5,18-6 h de processo. O malte obtido possuiu boas propriedades enzimáticas.

REFERENCES

- Ascar, J. M. (1995), *Alimentos: Aspectos Bromatológicos e Legais*. Analise Percentual. São Leopoldo : UNISINOS Editora. v. 1. pp. 243-252.
- Barros Neto, B.; Scarminio, I. S. and Bruns, R. E. (2001), *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. Campinas: EDUNICAMP. pp. 406. (Coleção Livros - Textos; 1).
- Barros Neto, B.; Scarminio, I. S. and Bruns, R. E. (1995), *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Campinas : EDUNICAMP. pp. 302. (Série Manuais).
- Bradford, M. M. (1976), A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein. Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brod, F. P. R. (2003), *Avaliação de um Secador Vibro-Fluidizado*. MSc Thesis, Campinas -SP: Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas. pp. 20-37.
- Forgaty, W. M. and Kelly, C. T. (1979), *Topics in Enzyme and Fermentation*. Biotechnolog. J. Wiley and Sons. v. 3.
- Freire, J. T and Sartori, D. J. M. (1998), Secador - Transportador Tipo Esteira. Processo de Secagem e Qualidade do Produto. In: Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, 25., São Carlos - SP. *Anais...* São Carlos. pp. 475-479.
- Jesus, S. S. (2002), *Desenvolvimento e Análise do Processo de Secagem de α -amilase por Microondas à Vácuo*. MSc Thesis, Campinas -SP: FEQ/ UNICAMP. pp. 13-15.
- Reguly, J. C. (1996), *Biotecnologia dos Processos Fermentativos*. EDUFPEL. v. 1.
- Santana, J. C. C. (2003), *Recuperação das Enzimas α e β -amilases em Sistema Bifásico Aquoso PEG/ $CaCl_2$ para Uso como Biocatalizador de Amiláceos*. MSc Thesis, Campinas -SP, FEQ/ UNICAMP. pp. 232.
- Sigma Chemical Company Catalogue. (1996), *Biochemicals Organic Compounds and Diagnostic Reagents*. pp. 116-117.
- Wiseman, A. (1987), *Handbook of Enzyme Biotechnology*. 2. ed. New York, EUA : John Wiley Sons.

Received: September 29, 2004;

Revised: February 25, 2005;

Accepted: March 25, 2005.