

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**APLICAÇÃO DE CLEA DE β -AMILASE DE CEVADA NA PRODUÇÃO DE
MALTOSE A PARTIR DE AMIDO RESIDUAL DO BAGAÇO DE MANDIOCA
EM REATOR DE FLUXO EM VÓRTICES**

RAFAEL DE ARAUJO SILVA

São Carlos

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**APLICAÇÃO DE CLEA DE β -AMILASE DE CEVADA NA PRODUÇÃO DE
MALTOSE A PARTIR DE AMIDO RESIDUAL DO BAGAÇO DE MANDIOCA
EM REATOR DE FLUXO EM VÓRTICES**

RAFAEL DE ARAUJO SILVA

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Federal de São Carlos para
obtenção de título de Mestre em
Engenharia Química, na área concentração
de Desenvolvimento de Processos
Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo W. Tardioli.

São Carlos

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586a Silva, Rafael de Araujo
Aplicação de CLEA de beta-amilase de cevada na
produção de maltose a partir de amido residual do
bagaço de mandioca em reator de fluxo em vórtices /
Rafael de Araujo Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
100 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2015.

1. CLEA de beta-amilase de cevada. 2. Imobilização
enzimática. 3. Maltose. 4. Reator de fluxo em
vórtices. 5. Resíduos de mandioca . I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE RAFAEL DE ARAÚJO SILVA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 31 DE MARÇO DE 2015.

BANCA EXAMINADORA:



Paulo Waldir Tardjoli
Orientador, UFSCar



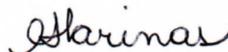
Olga Luisa Tavano
UNIFAL



Ursula Fabiola Rodríguez Zúñiga
UNIMEP



Roberto de Campos Giordano
UFSCar



Cristiane Sanchez Farinas
EMBRAPA/UFSCar

Aos meus pais, Cristina e Alex, e
a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação de mestrado é fruto da colaboração de diversas pessoas que me ajudaram ao longo dos dois anos de mestrado no PPG do DEQ – UFSCar. Algumas destas pessoas já conhecia de longa data; outras tive o prazer e enorme satisfação em conhecer ao longo destes dois anos de mestrado; existiram também pessoas com que eu tive um breve contato, mas não hesitaram em me ajudar como podiam.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, a quem considero um amigo, Paulo W. Tardioli, pela orientação e empenho comigo e meu mestrado, buscando sempre entender meus problemas e achar soluções. Seu profissionalismo e compromisso são exemplos que pretendo seguir. Muito obrigado.

Gostaria de agradecer também os professores Roberto Giordano, pelo auxílio com RFV, por aceitar participar da minha banca de defesa de mestrado e por auxiliar com o aprimoramento deste projeto, Rosineide Cruz, por ter participado da minha banca de exame de qualificação de mestrado e ter contribuído com este trabalho, Cristiane Farinas, Olga Tavano e Ursula Zúñiga, por aceitar participar da minha banca de defesa de mestrado e terem ajudado no aprimoramento deste trabalho, a Dra. Lionete Lima, pela amizade e por ter participado da minha banca de exame de qualificação de mestrado e ter contribuído com este trabalho dentro e fora do laboratório, assim como também aos professores Dilson Cardoso e Mônica Aguiar e a todos os professores do DEQ-UFSCar que contribuíram para que eu chegasse nesta etapa da minha carreira.

Agradeço também as minhas colegas e amigas de laboratório Mayerlenis Roja e Renata de Souza, pelas ajudas constantes com as caracterizações, matérias de laboratório, apresentações, e outros problemas ao longo destes dois anos. Aos meus colegas e amigos de laboratório Agnes Mafra e Willian Koop, principalmente pelo auxílio com os CLEAs. E também aos amigos Adriana Silva, Ana Bortolassi, Aurelia Oliveira, Bruna Pratto, Cleiton Dias, Cintia Sargo, Eduardo Alexandrina, Felipe Silva, Gabriel Gonçalves, Gilson Campani, Hélio Darim, Homero Sena, Jéssica Bravin, Liliane Oliveira, Luciano Corrêa, Margarita Ramos, Marília Baldoíno, Martha dos Santos, Murilo Fonseca, Vinicius Pires, Vitor Furlong entre outros, pela ajuda constante, companheirismo mútuo dentro e fora do laboratório e torcida por bons resultados.

Aos funcionários do DEQ – UFSCar, em especial Alyne, Amadeus, Marcos, Oscar, Thais e Tiago.

À CAPES e ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

À UFSCar pelos espaços e recursos.

Ao Ricardo K. Kudo, Mestre Cervejeiro de uma grande indústria de cerveja que cedeu seu tempo para responder questões técnicas sobre o processo de produção da cerveja.

Ao Eduardo Bihre da LNF por ter cedido amostras das enzimas BAN 480L e Fungamil 800L. À Maria L. G. Santos e Alexandre Baldo da Fecularia Flor de Lotus por ter nos recebido em visita técnica e cedido amostras de bagaço e casca de mandioca de sua unidade.

À fecularia Tereos Syral por ter cedido amostras de bagaço e de mandioca de sua unidade industrial.

À Fernanda Diniz da Cargill por ter arranjado a visita técnica em sua unidade industrial de produção de xarope de maltose e a Luiz Garcia, Jakeline Parreira, Cássio P. Silva e Osmar Santos por terem se disponibilizado a explicar o processo de produção do xarope de maltose.

Ao Fábio Isaias Felipe do CEPEA pelas informações cedidas.

Ao Filipe de Andrade pelos desenhos do RFV em 3D.

Agradeço os camaradas de São Paulo que sempre se preocuparam comigo mesmo em São Carlos.

Agradeço minha namorada Angélica M. de Oliveira, pelo apoio, carinho e compreensão.

Agradeço imensamente aos meus pais Cristina e Alex, pela ajuda constante e compreensão ao longo destes dois anos longe, ao meu irmão Filipe, meus avós e toda a minha família pela força dêis do começo. Sem isso, essa empreitada não seria possível.

*Se você quer mudar uma situação, não
pode seguir fazendo a mesma coisa, tem
que buscar outro caminho.*

Jose “Pepe” Mujica

RESUMO

A mandioca é cultivada em todo mundo, sendo o Brasil o quarto maior produtor. O processamento industrial da raiz no país visa principalmente à produção de farinha e fécula, gerando resíduos ricos em carboidratos (amido, celulose, hemicelulose) que poderiam gerar produtos de valor agregado por biocatálise enzimática, particularmente usando enzimas imobilizadas, por serem mais estáveis operacionalmente e poderem ser facilmente recuperadas e reutilizadas no processo. Assim, este trabalho teve como objetivo a biotransformação do amido residual dos resíduos do processamento da mandioca em maltose, usando a enzima β -amilase imobilizada em reator de fluxo em vórtices (RFV) Couette–Taylor–Poiseuille, reator este que pode promover mistura perfeita com menor tensão cisalhante no meio reacional, comparado a um reator de mistura perfeita convencional. Os resíduos bagaço e casca de mandioca de duas fecularias do interior de São Paulo foram caracterizados físico-quimicamente e apresentaram teores de amido por volta de 47% e 55% (b.s.), respectivamente. A extração do amido dos resíduos foi realizada enzimaticamente utilizando uma α -amilase, então, o amido liquefeito foi utilizado na produção de maltose catalisada pela β -amilase de cevada imobilizada. Dentre os métodos de imobilização estudados, o mais satisfatório para a imobilização de β -amilase foi a reticulação de enzimas agregadas (CLEA), utilizando albumina de soro bovino (BSA) ou proteína de soja (PS) como proteínas inertes, retendo 82,67% e 53,26% da atividade oferecida, respectivamente. Os CLEAs apresentaram estabilidades ao pH ligeiramente maiores que a β -amilase livre em seus respectivos valores de pH mais estáveis. Além disso, os CLEAs foram muito estáveis a 40°C, retendo mais de 80% da atividade inicial após 12 horas de encubação. A conversão do amido em maltose foi realizada em um RFV, com a finalidade de estudar seu comportamento frente aos CLEAs de β -amilase (neste estudo CLEA de β -amilase preparado na presença de proteína de soja, aqui nomeado CLEA- β -PS). A conversão de amido em maltose foi de aproximadamente 70% em curto tempo de reação (4 horas), demonstrando a viabilidade do uso de amido residual como matéria-prima para a produção de maltose catalisada por CLEA de β -amilase em reator de fluxo em vórtices de Couette–Taylor–Poiseuille.

Palavras chave: resíduos de mandioca, amido, maltose, beta-amilase de cevada, imobilização enzimática, CLEA, reator de fluxo em vórtices.

ABSTRACT

Cassava is cultivated worldwide, being Brazil the fourth largest producer. The root industrial processing in the country, aiming to obtain mainly flour and starch, generates carbohydrate-rich residues (e.g., starch, cellulose, and hemicellulose), which could be used to produce value-added products by enzymatic route, mainly using immobilized enzymes that are more operationally stable, allowing to be easily recovered and reused in the process. Thus, this work aimed the biotransformation of residual starch from cassava processing in maltose, using immobilized β -amylase in a Couette–Taylor–Poiseuille vortex flow reactor, which can promote perfect mixture under lower shear stress in the reactional medium compared to the conventional stirred-tank reactor. Cassava bagasse and peel of two starch-processing industries from São Paulo State were physical-chemically characterized and showed about 47% and 55% (dry mass) of residual starch, respectively. The starch was enzymatically extracted from the residues using a α -amylase, followed by maltose production catalyzed by immobilized barley β -amylase. Among the immobilization methods studied in this work, the best one for β -amylase was protein aggregation using bovine serum albumin (BSA) or soybean protein (PS) as protein feeder, followed by cross-linking with glutaraldehyde (CLEA technique). This protocol yielded immobilized β -amylase with 82.67% and 53.26% of recovered activity, respectively. Besides, the CLEAs were highly stables at 40°C, retaining more than 80% of the initial activity after 12 hours. The maltose syrup production from starch was performed using a Couette–Taylor–Poiseuille vortex flow reactor, in order to evaluate the β -amylase CLEAs (in this case CLEA of β -amylase prepared with soybean protein, here named CLEA- β -PS). It was achieved around 70% of maltose conversion in a short reaction time (4 hours), showing that is viable the use of residual starch as raw material for the production of maltose catalyzed by β -amylase CLEA in a Couette–Taylor–Poiseuille vortex flow reactor.

Keywords: Cassava residues, starch, maltose, barley beta-amylase, enzymatic immobilization, CLEA, vortex flow reactor.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição média da raiz de mandioca.....	20
Tabela 2 – Condições experimentais da imobilização de β -amilase pela técnica CLEA usando BSA como proteína inerte.....	54
Tabela 3 – Condições experimentais da imobilização de β -amilase pela técnica CLEA usando PS como proteína inerte	54
Tabela 4 – Composição dos resíduos industriais (% , massa seca)	59
Tabela 5 – Composição dos resíduos industriais após extração enzimática do amido (% , massa seca).....	60
Tabela 6 – Dados referentes aos padrões proteicos do gel de SDS-PAGE.....	61
Tabela 7 – Massas moleculares de cada banda presente no gel de SDS-PAGE da Figura 14.	61
Tabela 8 – Rendimento de imobilização (R_i) e atividade recuperada (A_r) para os diferentes métodos de imobilização utilizando géis de quitosana	65
Tabela 9 – Atividade recuperada (A_r) de β -amilase imobilizada pela técnica CLEA na presença de BSA como proteína inerte.....	67
Tabela 10 – Atividade recuperada (A_r) de β -amilase imobilizada pela técnica CLEA na presença de PS como proteína inerte	68
Tabela 11 – Composição da PS em relação ao tamanho das proteínas	69
Tabela 12 – Comparativo dos melhores resultados para a β -amilase livre, imobilizada em CLEA-BSA e CLEA-PS	74
Tabela 13 – Produtividades e produtividades específicas de produção de xarope de maltose a partir de amido em RFV catalisada por β -amilase livre ou imobilizada (CLEA- β -PS-2)	77
Tempos de retenção dos polímeros de glicose e do tampão fosfato de sódio.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas da amilose (a) e amilopectina (b)	21
Figura 2 – Representação da curva de gelatinização do grânulo de amido–viscosidade vs. temperatura.....	22
Figura 3 – Estrutura química da molécula de maltose.....	25
Figura 4 – Interação das enzimas α -amilases, β -amilases e pululanases com a cadeia de amilopectina	25
Figura 5 – Influência da temperatura na velocidade de uma reação catalisada por enzimas...	29
Figura 6 – Estruturas da α -amilase de <i>Aspergillus oryzae</i> (a) e β -amilase de soja (b)	31
Figura 7 – Métodos de imobilização enzimática	33
Figura 8 – Reticulação de enzimas em ausência de suportes.....	36
Figura 9 – Polímeros de a) quitina e b) quitosana	38
Figura 10 – Regime de Couette laminar (a), regime de Taylor laminar (b), ondulatório (c) e turbulento (d).....	41
Figura 11 – Esquema das dimensões de um reator de fluxo em vórtices de Taylor–Poiseuille.....	42
Figura 12 – Relações entre os componentes para a formação dos CLEAs.....	54
Figura 13 – Sistema para a formação das esferas de alginato de cálcio	55
Figura 14 – SDS-PAGE de β -amilase de cevada comercial nas concentrações de 1, 2, 4 e 5 mg _{proteína} /mL.....	60
Figura 15 – Perfil de atividade de β -amilase de cevada a 20°C em diferentes valores de pH.	62
Figura 16 – Perfil de atividade de β -amilase de cevada em pH 4,8 em função da temperatura.....	63
Figura 17 – Atividades residuais de β -amilase após 12 horas de encubação em diferentes valores de pH a 25°C.....	64
Figura 18 – Atividades residuais de β -amilase após 12 horas de encubação em diferentes valores de temperatura em tampão fosfato 16 mM pH 7,0.....	64
Figura 19 – Perfis de atividade de β -amilase livre, CLEA- β -BSA-4 e CLEA- β -OS-2 em função do pH	70
Figura 20 – Perfis de atividade de β -amilase livre, CLEA- β -BSA-4 e CLEA- β -PS-2 em função da temperatura.....	71
Figura 21 – Atividades residuais de β -amilase após 12 horas de encubação em diferentes valores de pH a 25°C.....	72

Figura 22 – Atividades residuais de β -amilase livre e imobilizada após 12 horas de encubação em diferentes valores de temperatura e pH 6,0 (CLEA- β -BSA-4) e pH 7,0 (β -amilase solúvel e CLEA- β -PS-2).	73
Figura 23 – Conversão de amido comercial em maltose em RFV (900 rpm) utilizando β -amilase livre (45°C e pH 7,0) e CLEA- β -PS-2 (40°C e pH 7,0), solução de amido comercial 30 g/L e 1,2 U/g de amido.....	75
Figura 24 – Conversão de amido em maltose em RFV (900 rpm) utilizando CLEA- β -PS-2 (1,2 U/g de amido) a 40°C, pH 7,0.	76
Figura 25 – Ensaio de reuso do CLEA- β -PS-2 na produção de maltose a partir de amido extraído do bagaço de mandioca em RFV a 40°C, pH 7, em ciclos de 12 horas.....	78
Cromatograma de padrões de polímeros de glicose com ligação α -1,4 solubilizados em tampão fosfato de sódio	98
Cromatograma de amostras de hidrólise de amido comercial 30 g/L catalisada por β -amilase livre (1,2 U/g de amido) em RFV a 45°C, pH 7,0.	99
Cromatograma de amostras de hidrólise de amido comercial 30 g/L catalisada por CLEA- β -PS-2 (1,2 U/g de amido) em RFV a 40°C, pH 7,0.....	99
Cromatograma de amostras de hidrólise de amido residual de bagaço da Ind. 1 13,6 g/L catalisada por CLEA- β -PS-2 (2,65 U/g de amido) em RFV a 40°C, pH 7,0.	100
Cromatograma de amostras de hidrólise de amido residual de bagaço da Ind. 1 30 g/L catalisada por CLEA- β -PS-2 (1,2 U/g de amido) em RFV a 40°C, pH 7,0.	100

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Mandioca e produtos de interesse	20
2.1.1	Amido	21
2.1.2	Resíduos	23
2.1.3	Maltose	24
2.2	Enzimas	26
2.2.1	Atividade enzimática	28
2.2.2	α – Amilase	30
2.2.3	β – Amilase	31
2.2.4	Pululanase	32
2.3	Imobilização enzimática	32
2.3.1	Imobilização por ligação covalente	33
2.3.2	Imobilização por adsorção	34
2.3.3	Imobilização por confinamento	35
2.3.4	Reticulação	35
2.3.5	Quitosana	37
2.3.6	Imobilização de β -amilases de diferentes origens	39
2.4	Fluxo em vórtices de Taylor–Poiseuille	40
2.4.1	Reator de fluxo em vórtices de Taylor–Poiseuille	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1	Materiais	44
3.1.1	Fontes amiláceas	44
3.1.2	Enzimas	44
3.1.3	Suportes de imobilização e proteínas inertes	44
3.1.4	Padrões e outros reagentes	44
3.2	Métodos	45
3.2.1	Caracterização dos resíduos	45
3.2.2	Caracterização da β -amilase de cevada livre e imobilizada	48
3.2.3	Imobilização enzimática	50
3.2.4	Produção de maltose a partir de amido comercial e residual	56
3.2.5	Ensaio de reuso da β -amilase imobilizada	57

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1	Composição dos resíduos de mandioca	59
4.2	Características da β-amilase	60
4.2.1	Análise eletroforética SDS-PAGE	60
4.2.2	pH e temperatura ótimos	61
4.2.3	Estabilidade ao pH e a temperatura	63
4.3	Resultado das imobilizações	65
4.3.1	Imobilização em géis de quitosana	65
4.3.2	Imobilização pela técnica CLEA	66
4.4	Influência da temperatura e pH nos CLEA-β-BSAs e CLEA-β-PSs	69
4.5	Produção de maltose a partir de amido	73
4.6	Ensaio de reuso do CLEA-β-PS-2	77
5	CONCLUSÕES	79
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
	BIBLIOGRAFIA	82
	APÊNDICE I – Dimensões do Reator de Fluxo em Vórtices tipo batelada	94
	APÊNDICE II – Cromatogramas obtidos por HPLC	97

1 INTRODUÇÃO

Em 2012 foram produzidas mundialmente cerca de 268,4 milhões de toneladas de mandioca. O continente africano foi onde mais se produziu a raiz naquele ano, responsável por 55,7% da produção mundial. A Nigéria destacou-se como o maior produtor no continente e no mundo, alcançando o valor de 54,0 milhões de toneladas produzidas. Os continentes asiático e sul-americano contribuíram com 32,9% e 11,4%, respectivamente. O Brasil produziu cerca de 23 milhões de toneladas, sendo o quarto maior produtor da raiz no ano de 2012 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014). A cotação média da raiz no mercado interno atingiu valor recorde em maio de 2013, chegando às cifras de R\$ 346,17/tonelada (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA, 2013a), fato atribuído principalmente à queda da produção no início do ano devido à falta de chuvas em algumas regiões produtoras (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013). A demanda do mercado pelo produto e seus derivados é sempre crescente (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA, 2013a).

Para muitos países, a mandiocultura é uma questão de segurança alimentar, ajudando no combate a fome. Além do consumo *in natura*, a raiz apresenta como principais produtos a farinha, as raspas, a fécula (amido de mandioca) e o álcool, sendo a produção no continente asiático voltada principalmente para fabricação de etanol e fécula (e seus derivados feculosos, podendo ser amido modificado, maltose e glicose), no continente africano voltada para farinha, raspas, e álcool, e no Brasil a indústria converge seus investimentos para produzir farinha, raspas, fécula e derivados amiláceos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2012; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013).

A fécula é base para diversos produtos em diferentes setores industriais, tendo-se produzido no Brasil no ano de 2012 aproximadamente 520 mil toneladas. Embora essa produção seja menos expressiva comparada, por exemplo, com a Tailândia, que em 2012 chegou a exportar 2,23 milhões de toneladas de fécula, o seu valor de comercialização da fécula no Brasil chegou a valer aproximadamente o dobro ao daquele país, para o primeiro semestre de 2013 (US\$ 925,72/tonelada contra US\$ 485,07/tonelada, sendo estes valores médias para o período de 6 meses) (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013).

O processamento da mandioca para o beneficiamento em farinha e amido possuem etapas iniciais idênticas, a lavagem e o descascamento, gerando quantidades semelhantes de resíduos em ambos os processos (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2009; VIEIRA et al., 2002). Estima-se que durante a fabricação de farinha de mandioca, 10% da massa descartada sejam provenientes da casca e outros 3 a 5% da raiz sejam perdidos na forma de farinha de varredura (material sujo proveniente da limpeza do chão e do maquinário das farinheiras) (CALDAS NETO et al., 2000). O valor mais recente sobre a produção de farinha de mandioca no Brasil é de um levantamento do censo agropecuário de 2006, quando foram produzidos 1,33 milhões de toneladas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012). Devido à informalidade e outras características do mercado, o monitoramento constante desta atividade é inviável.¹ Para a fabricação de fécula, de cada 100 kg de raiz processados são gerados apenas 25 kg de amido, os outros 75 kg são resíduos gerados pelo processo. Em 2012 foram processadas 2,04 milhões de toneladas de mandioca para produzir 519,67 mil toneladas de amido, atingindo um rendimento industrial de 25,47% (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA, 2013b). Os resíduos gerados no processamento da mandioca, sendo eles a casca, as folhas, as hastes, a farinha de varredura e o bagaço, em geral são utilizados para enriquecer a dieta de animais de corte, ou são transformados em adubos (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013; FREITAS et al., 2008; PRADO et al., 2000; SRIROTH et al., 2000). Os resíduos gerados pelas fecularias quando não são doados, são vendidos a preços irrisórios, na faixa de centavos a tonelada.² Como alternativa é possível transformar os resíduos em produtos diversos, como por exemplo, ácidos orgânicos, aromas, compostos aromáticos, substratos para cultivo de cogumelos, amido, açúcares, etanol ou energia elétrica (PANDEY et al, 2000; SILVA; SILVA; ROCHA, 2002; SRIROTH et al., 2000).

Uma aplicação viável para a casca e bagaço de mandioca, que possuem grande quantidade de amido (50 a 60%), seria a produção de xarope de maltose, de grande utilização na indústria alimentícia, em especial na indústria cervejeira, agregando-se assim valor econômico a esses resíduos (CALDAS NETO et al., 2000; PANDEY et al., 2000; PRADO et al., 2000; SRIROTH et al., 2000).

¹ Informação enviada por e-mail por Fábio Isaias Felipe, analista do setor de mandioca do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - ESALQ/USP no dia 03 de outubro de 2014.

² Informação verbal cedida por Maria Luiza Gonçalves Santos, responsável pelo controle de qualidade da fecularia Flor de Lotus, no dia 24 de outubro de 2013.

A utilização exclusiva de enzimas α -amilases pode gerar produtos com até 60% de maltose (DP2)³ e elevados teores de glicose (DP1)³. Para maiores porcentagens de DP2 e menores de DP1 é aplicada uma α -amilase maltogênica ou β -amilases para a hidrólise do amido. A utilização de enzima pululanase aumenta ainda mais o teor de DP2 no xarope (NOVOZYMES, 2005). Uma planta de grande porte chega a gerar cerca de 850 toneladas de xarope de maltose por dia⁴.

A conversão do amido em xarope de maltose geralmente é conduzida em reatores de mistura perfeita encamisados por trocadores de calor em processo batelada com enzimas solúveis. Ao final da hidrólise, as enzimas são carregadas juntamente com o produto para fora do reator, necessitando para um novo processo novas enzimas⁴. A imobilização enzimática é uma alternativa para se diminuir os custos do processo relacionados com as enzimas, uma vez que as tornam insolúveis no meio, possibilitando sua separação, e pode ainda melhorar sua estabilidade operacional. Uma configuração de reator que se tem mostrado adequada em reações enzimáticas e cultivos celulares é o reator de fluxo em vórtices (RFV). Este reator é uma opção de menor consumo energético e menor força cisalhante no sistema reacional, em comparação com outros reatores enzimáticos convencionais (GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C., 2006, p. 321).

A utilização mais comum do xarope de maltose é na produção de cerveja (CARGILL, 2013), para corrigir o teor de açúcares do mosto fermentativo (AQUARONE et al., 2001). No ano de 2012 foram produzidos 13,7 bilhões de litros de cerveja no Brasil (SISTEMA DE CONTROLE DE PRODUÇÃO DE BEBIDAS, 2013). A legislação brasileira de 2009 para bebidas permite a adição de açúcares de origem vegetal distinta da cevada ao mosto fermentativo, nas porcentagens de 10% para a cerveja clara, 50% para a cerveja escura e 10% na cerveja extra, em relação ao extrato primitivo (BRASIL, 2009). Na indústria cervejeira, o rendimento em relação à matéria-prima: cevada, lúpulo, levedura e adjuntos (sem considerar a água adicionada ao processo para preparação do mosto), chega a valores próximos a 79% em massa, devido à existência do crescimento da população de leveduras, limites na extração de açúcares da cevada, entre outros fatores que levam a diminuição da rentabilidade da matéria-prima. As perdas de produção entre o fim da fermentação e a saída de produtos envasados das fábricas ficam em torno de 7% em volume devido ao processo de brassagem e outras perdas consequentes da fabricação, como retirada de amostras, retenção de produto em equipamentos entre outros fatores. Em geral são utilizados 10 litros de água para cada quilograma (kg) de

³ DP refere-se ao grau de polimerização da cadeia polisacarídica (*Dextrose Polymerization*).

⁴ Informação obtida durante visita técnica à indústria do setor.

matéria-prima.⁵ Foi estimado com base na quantidade de cerveja produzida no ano de 2012, que por lei, poderiam ter sido utilizados no mínimo 187 mil toneladas de açúcares de origem vegetal (como o xarope de maltose) pela indústria brasileira cervejeira naquele ano (RECEITA FEDERAL, 2013).

Ao longo da introdução deste trabalho foi apresentado que os resíduos do processamento da mandioca possuem alto teor amiláceo e baixo, ou até mesmo nenhum, valor agregado. Estes resíduos podem ser processados para gerar produtos diversos com melhor valor comercial. Um dos produtos destacados foi o xarope de maltose, utilizado principalmente na indústria cervejeira no Brasil, responsável por produção e receita de grandes proporções. Para se atingir altos teores de maltose, é preciso empregar a enzima β -amilase na degradação do amido. Para se evitar perda de enzima ao final do processo e possibilitar a sua reutilização, reduzindo custos com esse insumo, uma estratégia atraente é a imobilização enzimática. Dentre os diversos reatores disponíveis que permitem o uso de enzimas imobilizadas, o RFV parece ser uma opção mais econômica, por ser energeticamente mais eficiente, e impactar menos negativamente na estrutura da enzima imobilizada, por exercer menor força cisalhante no biocatalisador.

Assim, este trabalho teve por objetivos: caracterizar os resíduos industriais do processamento de amido de mandioca; determinar o melhor método de imobilização da enzima β -amilase de cevada; e avaliar a utilização de amido recuperado de resíduos amiláceos do processamento da mandioca para a obtenção de xarope de maltose, utilizando β -amilase imobilizada em um reator de fluxo em vórtices.

⁵ Informação verbal cedida por Ricardo Kenzo Kudo, Mestre Cervejeiro pós-graduado na Universidade Alcalá de Henares, Madrid, Espanha, no dia 23 de outubro de 2013, por telefone.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mandioca e produtos de interesse

A mandioca é uma raiz tuberosa, de fácil plantio e de baixo custo de cultivo, resistente a adversidades climáticas e de origem sul-americana (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2012). Por ser uma cultura resistente e versátil, atualmente é encontrada em diversas regiões do planeta, sendo um dos principais alimentos no combate mundial à fome (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2012). Possui ampla variedade de subespécies, sendo classificadas como doces ou “de mesas”, quando adequadas ao consumo humano ou animal na forma *in natura*, comumente chamadas de mandioca mansa, aipim ou macaxeira; e amargas ou bravas, quando impróprias para o consumo sem nenhum tratamento prévio. A mandioca possui ácido cianídrico (HCN), venenoso para humanos em grandes concentrações. Raízes com até 100 mg de HCN por kg de polpa crua podem ser consumidas *in natura*. A quantidade de HCN presente na planta depende do tipo, ambiente em que foi cultivada e seu estado fisiológico (FUKUDA; OTSUBO, 2003). As variedades de mandioca apresentam basicamente três colorações de córtex, branca, amarela (contendo maior teor de betacaroteno) e rosada (apresentando maiores concentrações de licopeno) (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2012) e são compostas principalmente por água e amido, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Composição média da raiz de mandioca

Água	65%
Amido	25%
Proteína	3%
Celulose	2%
Outros	5%

Fonte: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2009

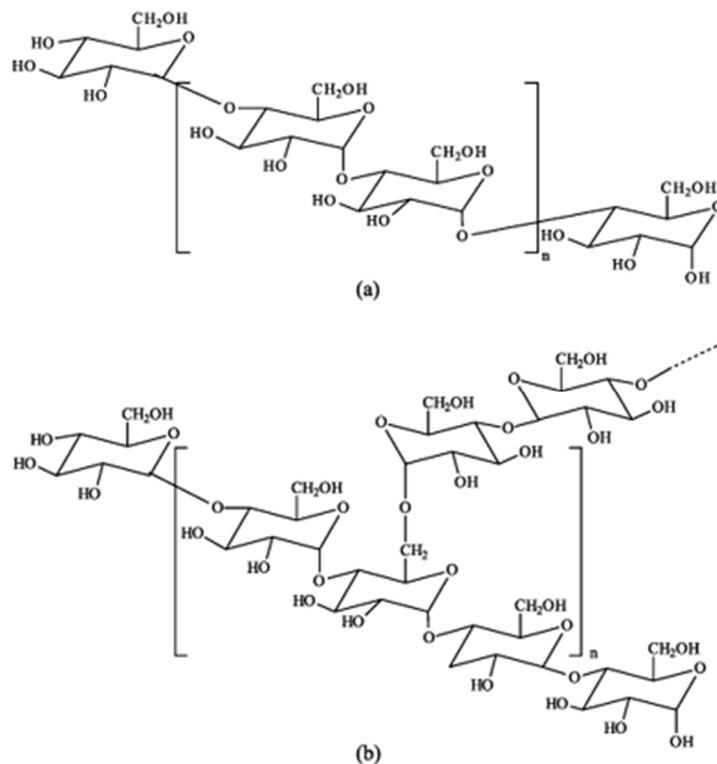
A raiz é comercializada *in natura* com ou sem casca, em pedaços, raspas e lascas, pellets, chips ou triturada em farinha. Dela, é possível extrair amido e gerar produtos diversos,

ou ser utilizada como fonte para fermentação alcoólica (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013).

2.1.1 Amido

O amido é a principal fonte de armazenamento de energia para as plantas superiores, o qual é constituído principalmente por dois tipos de polissacarídeos (polímeros de glicose) de elevada massa molecular, a amilose e amilopectina (Figura 1). Na amilose as unidades de glicose se ligam através de ligações α -1,4, o que a torna um polissacárido linear. Já a amilopectina possui cadeia ramificada através de ligações α -1,4 e α -1,6 (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Figura 1 – Estruturas da amilose (a) e amilopectina (b)

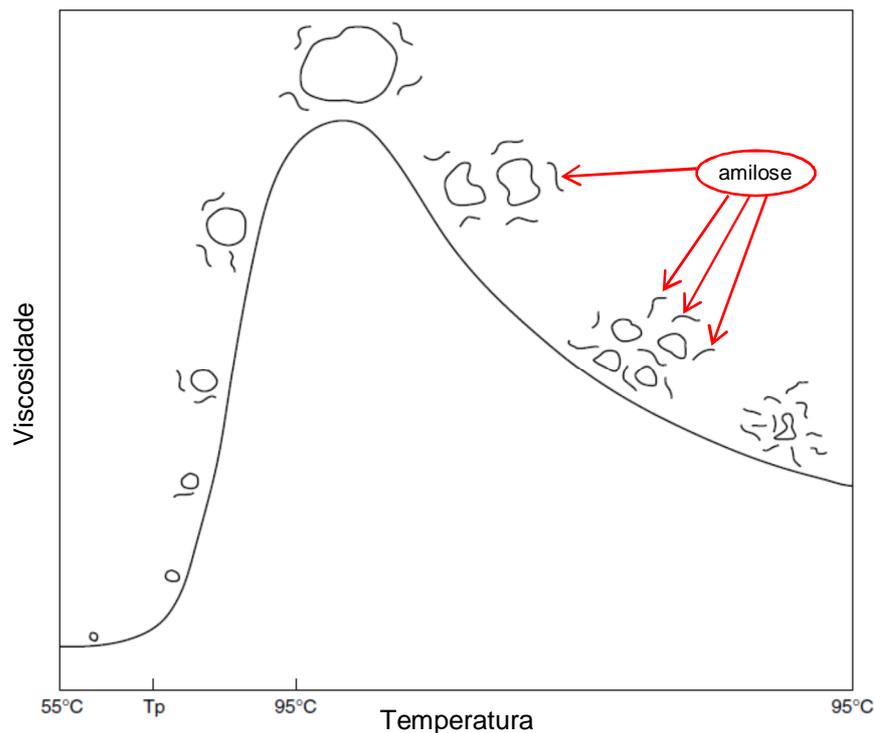


Fonte: Corradini et al., 2005

Os grânulos de amido possuem regiões cristalinas e não cristalinas dispostas em camadas alternadas (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010). Os grânulos são classificados como tipo A, com diâmetro entre 10 a 30 μ m, lentiformes, encontrados em cereais; tipo B, com diâmetro de 2 a 10 μ m, globulosos, presentes em tubérculos; e tipo C, uma mistura dos dois anteriores, de ocorrência em vagens (CORRADINI et al., 2005). A

condensação das cadeias de amilose e amilopectina dificulta muito a ação de enzimas nos grânulos, sendo necessário gelatinizá-los para um melhor ataque enzimático (SNOW; O'DEA, 1981), sendo para isso usado um agente plastificante, como água ou glicerol, e calor (CORRADINI et al., 2005). O aumento da temperatura favorece o inchamento reversível dos grânulos de amido até certo valor de temperatura. Ultrapassado esse valor, começa ocorrer lixiviação das moléculas de amilose dos grânulos de amido (início da gelatinização do amido/formação da pasta de amido) e o inchamento se torna irreversível, como exemplificado na Figura 2. Com o aumento adicional da temperatura, os grânulos incham e perdem mais moléculas de amilose, até sua ruptura. Ao final do processo de gelatinização, o material possui aspecto de uma goma viscosa, composta por amilose e amilopectina solubilizada e fragmentos de grânulos. Com a diminuição da temperatura, começa a ocorrer o processo de retrogradação do amido, onde ocorre a reassociação parcial de algumas moléculas de amilose e amilopectina (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

Figura 2 – Representação da curva de gelatinização do grânulo de amido – viscosidade vs. temperatura.



T_p: temperatura de pasta – temperatura onde se inicia o processo de gelatinização do amido

Fonte: Fennema, Damodaran, Parkin, 2010.

O amido presente na mandioca possui grânulos que variam de 4 a 35 µm de diâmetro, sendo constituídos por aproximadamente 17% de amilose e temperatura de gelatinização na faixa de 52° a 65°C (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

A extração do amido pode ocorrer por via mecânica, enzimática ou ácida (AMARAL et al., 2007), sendo no Brasil majoritariamente extraído por via mecânica. Em escala industrial, as raízes são transportadas aos lavadores através de roscas sem fim ou correias transportadoras, onde ocorrem lavagem e descascamento das raízes simultaneamente. As raízes limpas e descascadas são trituradas em lascas de poucos centímetros e desintegradas em um cilindro rotativo operado a alta velocidade (cevadeira) e equipado com lâminas dentadas na superfície, promovendo o rompimento celular e, conseqüentemente, liberando o amido. O material ralado (massa) é bombeado para peneiras cônicas rotativas alimentadas com água em contracorrente para promover a separação do amido das fibras. O leite de amido, obtido após a extração, é purificado com a adição de água (separação dos amidos solúveis e impurezas), concentrado em centrífugas de pratos e bicos e desidratado até uma umidade de 45% em um filtro a vácuo. O amido úmido é seco até uma umidade entre 12 a 13% em secador pneumático do tipo “*spray dryer*” e recuperado em ciclones, gerando amido em pó (SUPERINTENDÊNCIA DA ZONA FRANCA DE MANAUS, 2003).

2.1.2 Resíduos

A mandioca e seus produtos geram resíduos diversos. Durante a colheita da raiz, descartam-se as cepas, hastes, folhas e outros resíduos que não podem ser comercializados devido a algum tipo de contaminação ou degradação. Em geral, estes resíduos são utilizados para adubação, manutenção da qualidade do solo e para alimentação animal (cepas e folhas) (SILVA; SILVA; ROCHA, 2002). As cepas e hastes possuem elevado teor de amido, em média 60 e 70% (massa seca), respectivamente; as folhas chegam a conter até 30% de proteínas (massa seca) (CARVALHO; CEREDA, 2005).

A fabricação da farinha e da fécula de mandioca geram efluentes com alta carga orgânica, tais como, manipueira e água de processo, resultante principalmente da etapa de decantação do amido ou da secagem, quando realizada em equipamentos como o secador de tambor rotativo. A manipueira, líquido obtido na etapa de prensagem na produção da farinha, é um efluente com quantidade considerável de amido, sendo comercializado como molho para pratos diversos, após tratamento para reduzir a concentração de HCN, ou como pesticida para controle de pragas e infestações. Também são gerados resíduos sólidos como a casca e a

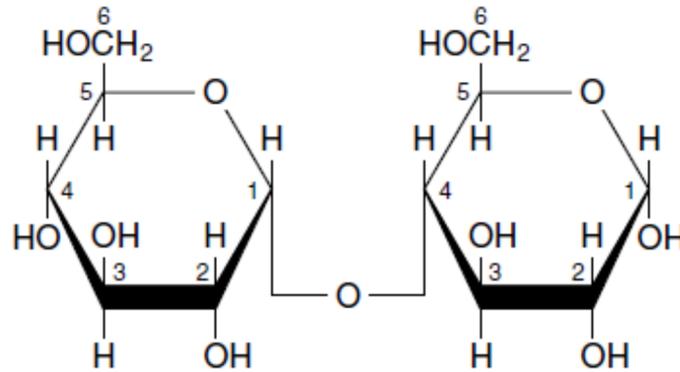
entrecasca, a farinha de varredura e o bagaço de mandioca. Esses resíduos sólidos são normalmente aplicados na adubação orgânica, compostagem, ou para alimentação animal (CARVALHO; CEREDA, 2005; SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2009; SILVA; SILVA; ROCHA, 2002; PANDEY, A. et al., 2000; SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2014). A mistura de casca e entrecasca da mandioca contém em média 60% de amido, em base seca (b.s.) (CALDAS NETO et al., 2000; PRADO et al., 2000), a farinha de varredura 80% (CALDAS NETO et al., 2000) e o bagaço de 50 a 70% (dependendo de parâmetros de processo e da variedade de mandioca utilizada) (CEREDA, 1994 apud PANDEY et al., 2000; STERZ, 1997 apud PANDEY et al., 2000; VANDENBERGHE et al., 1998b apud PANDEY et al., 2000; SRIROTH et al., 2000).

Como exemplificado na introdução do trabalho, existem diversos estudos para se empregar os resíduos gerados em toda a cadeia produtiva da mandioca e seus derivados na produção de inúmeros produtos, que podem ser comercializados em diferentes setores industriais, não importando se os resíduos são gerados em pequenas quantidades em agriculturas familiares mais rudimentares ou em grandes quantidades por grandes complexos industriais.

2.1.3 Maltose

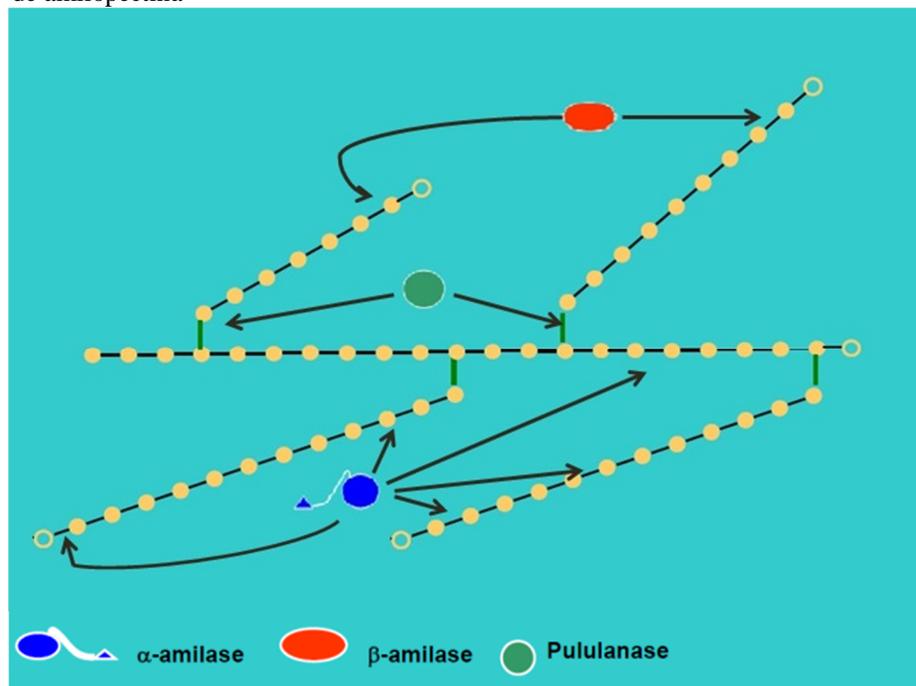
A maltose é um dissacarídeo ligado por ligação α 1-4 (Figura 3), sendo obtido através da hidrólise ácida ou enzimática da cadeia de amido. A hidrólise enzimática pode ser catalisada pela enzima α -amilase, que pode gerar polímeros de glicose de tamanhos diversos, ou pela enzima β -amilase, que quebra a cadeia de amido somente em moléculas de maltose, podendo ainda ser utilizada a enzima pululanase, quando se deseja atingir maiores valores de conversão do amido em maltose. A Figura 4 ilustra o ataque enzimático à cadeia de amilopectina (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010; POLAINA; MACCABE, 2007).

Figura 3 – Estrutura química da molécula de maltose



Fonte: Murray et al., 2003.

Figura 4 – Interação das enzimas α -amilases, β -amilases e pululanases com a cadeia de amilopectina



Fonte: adaptado de Dias, 2012

Geralmente, a maltose é comercializada na forma de xarope com concentrações que variam de 30 a 90%, contendo quantidades significativas de glicose (DP1) e maltotriose (DP3), quantidades menos expressivas de maltotetraose (DP4) e traços de maltodextrinas de cadeia com mais de dez moléculas de glicose. Também é possível encontrar maltose comercializada como um pó branco de alta pureza.

O xarope de maltose é amplamente empregado na indústria cervejeira, porém, também é utilizado na produção de rebuçados, confeitos, sobremesas congeladas, pães e bolos, maltitol (adoçante) e refrigerantes, conforme mostra o Quadro 1 (CARGILL, 2013; FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010; NOVOZYMES, 2005).

Quadro 1 – Diferentes tipos de xarope de maltose e suas aplicações

Xarope de maltose	Porcentagem de maltose	Aplicação
Low	até 50%	Cervejas e confeitos
High	50 - 55%	Cervejas, rebuçados, sobremesas congeladas, pães e bolos
Very high	65 - 72%	Cervejas, maltitol, confeitos gelatinosos e refrigerantes
Ultra high	mais de 80%	Maltitol

Fonte: NOVOZYMES, 2005

A produção industrial do xarope de maltose consiste na liquefação de amido em suspensão aquosa, utilizando uma enzima α -amilase termoestável livre e vapor, em “Jet Cooker” a uma temperatura próxima de 110°C, gerando um líquido de viscosidade alta. Em seguida, ocorre a hidrólise enzimática catalisada por uma maltogenase livre (uma α -amilase maltogênica), com auxílio da enzima pululanase livre quando se deseja atingir maiores teores de maltose. A conversão do amido em maltose ocorre em reator batelada (tanque agitado por pás) por até 12 horas. Ao final da hidrólise, a solução viscosa passa por coluna de carvão ativado, filtração e evaporação para se atingir a umidade desejada e segue para um tanque de armazenamento.⁶

2.2 Enzimas

As enzimas são em grande maioria cadeias proteicas constituídas por aminoácidos, que possuem capacidade catalítica para diversos tipos de reação. Existem também as ribozimas, moléculas de ácido ribonucleico (RNA) compostas por cadeia de carboidrato, formada pelo monossacarídeo ribose, que também catalisam algumas reações fundamentais para os seres vivos (KRUGER et al., 1982).

As proteínas são sintetizadas pelos ribossomos a partir da tradução do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) através da leitura de três nucleotídeos correspondentes a um aminoácido específico. Grande parte da longa cadeia de aminoácidos não possui função catalítica, mas é fundamental para o funcionamento correto da enzima. Somente alguns pontos específicos das enzimas são responsáveis por seu funcionamento, como o sítio ativo e sítio alostérico. O sítio ativo da molécula é responsável pela catálise das reações enzimáticas,

⁶ Informação obtida durante visita técnica à indústria do setor.

podendo ser necessário o auxílio de cofatores ou coenzimas para o seu correto funcionamento. As enzimas podem ser monoméricas (única cadeia polipeptídica) ou multiméricas (mais de um polipeptídio em sua estrutura) e possuem alta especificidade pelo substrato, fato atribuído à complexidade da estrutura molecular do sítio ativo. Distorções causadas na estrutura da enzima podem distorcer o sítio ativo da enzima, ocasionando em perda de atividade catalítica. Junto à cadeia enzimática podem estar associados lipídios, carboidratos, íons metálicos e outras moléculas orgânicas (BORZANI et al., 2001; MURRAY et al., 2003).

As condições de temperatura e pH que as enzimas operam costumam ser em temperaturas muito inferiores e pHs menos severos em relação às reações catalisadas por outros catalisadores. Grande parte das reações enzimáticas ocorre em água, podendo, entretanto, ocorrer também na presença de solventes orgânicos. Devido à alta seletividade das enzimas, as reações enzimáticas podem produzir menos produtos secundários. Assim, a utilização de enzimas pode reduzir os gastos operacionais de energia e tratamento/descarte de resíduos, atendendo-se assim aos princípios da Química Verde (BORZANI et al., 2001; SILVA; LACERDA; JONES Jr., 2005).

As enzimas são classificadas conforme as classes de reações que catalisam, de acordo com a Comissão de Enzimas através de seu número EC (Enzyme Commission number), composto por quatro números separados por pontos (exemplo: EC 1.14.99.7), sendo o primeiro referente à sua classe e os demais referentes a subclasses (NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2015). O Quadro 2 relaciona as classes EC com os tipos de reações catalíticas.

Quadro 2 – Classificação EC de acordo com a classe de cada reação enzimática

Classe	Tipo de reação
1 – Oxidorredutases	Oxidorredução $A^- + B \leftrightarrow A + B^-$
2 – Transferases	Transferência de grupos $A-X + B \leftrightarrow A + B-X$
3 – Hidrolases	Hidrólise $A-B + H_2O \leftrightarrow A-H + B-OH$
4 – Liases	Adição de grupos em dupla ligação ou remoção de grupos resultando em dupla ligação $\begin{array}{c} A-B \\ \diagup \quad \diagdown \\ P \quad Q \end{array} \leftrightarrow A=B + P-Q$
5 – Isomerases	Rearranjo intramolecular $\begin{array}{c} A-B \\ \diagup \quad \diagdown \\ P \quad Q \end{array} \leftrightarrow \begin{array}{c} A-B \\ \diagdown \quad \diagup \\ Q \quad P \end{array}$
6 – Ligases	Condensação $A + B \leftrightarrow A-B$

Fonte: Borzani et al., 2001.

2.2.1 Atividade enzimática

A atividade enzimática é a propriedade referente à velocidade com que a enzima transforma o substrato em produto, sendo influenciada pela temperatura, pH e força iônica no meio, relação entre concentração de enzima e substrato, ação de inibidores ou promovedores no sítio ativo ou sítio alostérico da proteína, presença e tipo de solvente orgânico, pressão hidrostática e força cisalhante. Estes fatores têm impactos diversos no meio reacional, alterando aspectos como difusividade das substâncias, energia para promover as reações e equilíbrio químico. Nas enzimas, estes fatores perturbam as conformações estruturais enzimáticas, forças de ligação entre os segmentos da proteína e nos sítios ativos, podendo causar desnaturação reversível ou irreversível na molécula (BORZANI et al., 2001; FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

2.2.1.1 Influência da temperatura

O aumento da temperatura tem sempre influência positiva na constante de velocidade (k) de qualquer reação química, pois toda transformação química obedece à lei de Arrhenius (Equação 1), onde A é a constante de Arrhenius, E_a a energia de ativação, R é a constante dos gases ideais e T a temperatura absoluta do sistema (BORZANI et al., 2001):

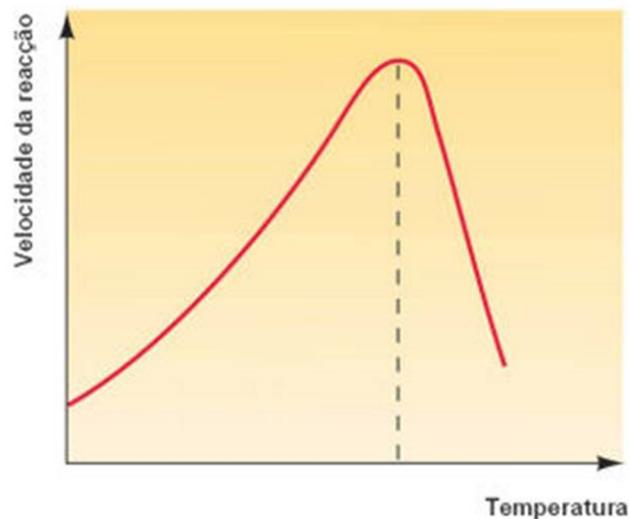
$$k = A \cdot e^{-E_a/RT} \quad (1)$$

Porém, as enzimas são termolábeis, ocorrendo desta forma maior velocidade de inativação térmica com o aumento da temperatura, que também segue a lei de Arrhenius (Equação 2), onde k_d é a constante de velocidade de desativação, A_d é a constante de Arrhenius para a desativação da enzima e E_d a energia de ativação para desativar a enzima (BORZANI et al., 2001).

$$k_d = A_d \cdot e^{-E_d/RT} \quad (2)$$

A influência destas duas constantes de velocidades, k e k_d , resulta em um ponto de temperatura de maior atividade enzimática para uma reação catalisada por uma enzima. A Figura 5 exemplifica a influência da temperatura na velocidade de uma reação enzimática (BORZANI et al., 2001).

Figura 5 – Influência da temperatura na velocidade de uma reação catalisada por enzimas



Fonte: Correia, 2010

O mecanismo de desativação térmica da enzima ocorre pela instabilidade conformacional causada pelo aumento da temperatura. Com a elevação da temperatura, a estabilidade de ligações intramoleculares não covalentes de caráter exotérmico diminui.

Existe também o aumento da entropia conformacional com a elevação da temperatura, contribuindo para um estado mais desordenado da molécula (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

2.2.1.2 Influência do pH

A atividade enzimática também depende do estado de ionização em que se encontra a enzima. O pH do meio influencia nas interações intramoleculares da proteína através de geração de forças de repulsão eletrostáticas e nos grupos ionizáveis dos sítios ativos impedindo a ligação do substrato. As proteínas possuem maior estabilidade em seu ponto isoelétrico (pI), que na maioria dos casos é um valor de pH levemente ácido, poucas vezes em valores levemente básicos e raramente em valores de pH mais extremos. Assim, muitas enzimas são estáveis em meios com pH neutro, pois a energia eletrostática líquida é baixa comparada com as forças de interação favoráveis à estabilidade conformacional. De forma geral, em pHs mais extremos, as forças eletrostáticas agindo na enzima são maiores, deformando significativamente a molécula, podendo até mesmo causar sua desnaturação irreversível (BORZANI et al., 2001; FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010; NELSON; COX, 2011).

2.2.1.3 Força cisalhante

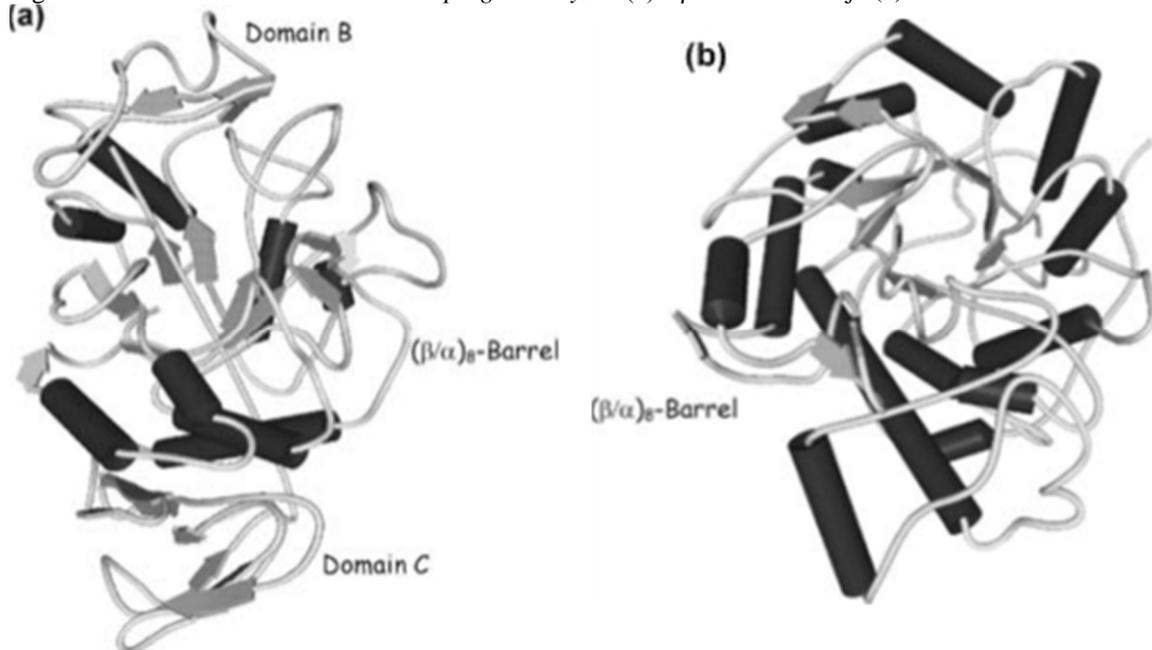
A movimentação do fluido provoca o choque mecânico das moléculas enzimáticas no meio e promove força de cisalhamento na solução. Esta força atua nas fronteiras da enzima alterando sua conformação, podendo desnaturar a proteína irreversivelmente e causar sua precipitação. Enzimas mais flexíveis desnaturam-se mais facilmente do que enzimas menos flexíveis quando este parâmetro é aplicável (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

2.2.2 α – Amilase

Presentes em animais, vegetais, fungos e bactérias, as α -amilases pertencem à família das hidrolases glicosídicas GH13 e atuam randomicamente sobre as ligações α 1-4 no interior da cadeia glicosídica, como ilustrado na Figura 4. O sítio ativo das α -amilases possui a forma tridimensional de barril- $(\beta/\alpha)_8$ (TIM-barril), que consiste de oito segmentos de β -folhas e oito de α -hélices que se alternam ao longo da cadeia polipeptídica (Figura 6a). Nessas enzimas,

um resíduo aspartato (da folha β 4) atua como base (nucleófilo) e um resíduo glutamato (da folha β 5) atua como doador de prótons (catálise ácido/base) com o auxílio de um terceiro resíduo (aspartato da folha β 7), essencial para a ligação do substrato (ARRUDA; SANTANA, 2000; POLAINA; MACCABE, 2007; RIOS et al., 1997).

Figura 6 – Estruturas da α -amilase de *Aspergillus oryzae* (a) e β -amilase de soja (b)



Fonte: adaptado de Polaina e Maccabe, 2007

A cevada possui duas enzimas α -amilases, AMY1 e AMY2. Ambas possuem massa molecular de 45 kDa e 80% de semelhança na sequência de aminoácidos (AJANDOUZ et al. 1992). Uma diferença característica entre as duas α -amilases são os seus valores do pI; a AMY1 apresenta pI entre 4,7 e 5,2 e a AMY2 apresenta pI entre 5,9 e 6,1 (SVENSSON et al., 1985).

2.2.3 β – Amilase

Presente em vegetais superiores ou microrganismos, as β -amilases, pertencentes à família das hidrolases glicosídicas GH14, são exoenzimas que hidrolisam ligações glicosídicas α -1,4, liberando unidades de maltose a partir da extremidade não redutora de cadeias polissacarídicas (ilustração na Figura 4). Também são formadas por estrutura barril-TIM e sítio ativo com forma de barril- $(\beta/\alpha)_8$, porém possuem algumas diferenças estruturais, como por exemplo, apresentar um único domínio (Figura 6b), com ausência dos domínios B e C presentes nas α -amilases. Dois resíduos glutamato (Glu186 e Glu380 na β -amilase de soja)

são responsáveis pela catálise, os quais estão posicionados próximos do lado C-terminal das folhas β_4 e β_7 do domínio barril- $(\beta/\alpha)_8$, além da importância dos resíduos Asp101 e Leu383. Podem apresentar uma ou mais subunidades, dependendo de sua origem. (ARRUDA; SANTANA, 2000; FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010; MIKAMI; YOON; YOSHIGI, 1999; NODA et al., 2001; POLAINA; MACCABE, 2007).

A β -amilase de cevada possui estrutura monomérica, semelhante à da soja (MIKAMI; YOON; YOSHIGI, 1999). Suas principais características são massa molecular entre 56 e 60 kDa (MA et al., 2000), pI de 5,1 (EGLINTON; LANGRIDGE; EVANS, 1998; EVANS et al., 1997; MA et al., 2000), alta atividade entre pHs de 4,0 a 7,0, pH ótimo em 4,35 (BAKER; SMILEY, 1985), temperatura ótima em 55°C e baixa estabilidade térmica em temperaturas acima de 55°C (YOSHIGI et al., 1995).

2.2.4 Pululanase

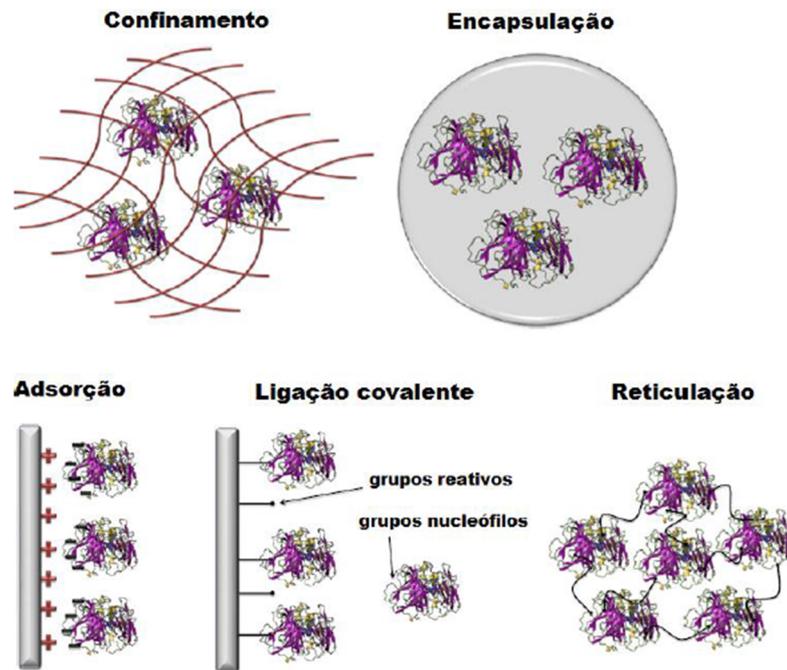
Encontradas em vegetais e bactérias, as pululanases atuam exclusivamente nas ligações α 1-6 das moléculas de amilopectina, auxiliando na quebra mais completa destas moléculas (Figura 4). Possui estrutura similar a das α -amilases e também pertencem à família GH13 (POLAINA; MACCABE, 2007).

2.3 Imobilização enzimática

Por serem frágeis, as enzimas podem perder facilmente sua atividade. Como foi descrito anteriormente, fatores de processo afetam a atividade das enzimas através de mudanças conformacionais ou interações com os centros ativos das macromoléculas.

Para que as enzimas possam se tornar mais estáveis frente aos parâmetros de processo que são submetidas, é possível utilizar técnicas como o uso de aditivos, promover alterações químicas em sua estrutura, manipular geneticamente um organismo produtor, imobilizar a enzima em suportes ou submeter a enzima à agentes bifuncionais, conferindo maior rigidez a estrutura enzimática. É comum o uso de mais de uma técnica para se obter um resultado satisfatório (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; GUISAN, 2006). Na Figura 7 é possível observar algumas técnicas de imobilização em suporte e a imobilização por reticulação de enzimas com uso de agente bifuncional.

Figura 7 – Métodos de imobilização enzimática



Fonte: Fernández-Fernández; Sanromán; Moldes, 2012 adaptado por Veríssimo, 2012

A imobilização de enzimas em suportes sólidos refere-se à retenção do material enzimático em um suporte, de caráter orgânico ou inorgânico, natural ou sintético. Tem como finalidade facilitar a separação e reutilização das enzimas no processo, conferir maior estabilidade e robustez às moléculas frente aos fatores desnaturantes por que passam durante seu uso ou frente aos elementos que possam degradá-las durante seu armazenamento, e auxiliar no controle do processo, cessando a reação pela simples separação das fases (separação do biocatalisador sólido do meio reacional líquido) (SCHMIDEL et al., 2001). A enzima imobilizada pode apresentar menor atividade em relação à molécula livre por conta de problemas de difusão do substrato no interior do suporte (HOMAEI, 2013).

2.3.1 Imobilização por ligação covalente

A imobilização por ligação covalente consiste basicamente em ligar uma enzima por ligação covalente a um suporte orgânico ou inorgânico previamente ativado. Este método de imobilização utiliza grupos funcionais de aminoácidos que constituem a estrutura enzimática para aderir a enzima ao suporte. A ligação ocorre através de grupamentos amino, carboxílico, fenólico, sulfídrico, hidroxílico, de imidazol e de indol que interagem com espaçadores reativos inseridos e ativados de um suporte (KENNEDY, 1987; SCHMIDEL, 2001).

Muitos suportes são inertes e precisam passar por tratamento para serem ativados e utilizados na imobilização covalente. São introduzidos espaçadores (ou braços) aos suportes com a finalidade de evitar o impedimento estérico na interação enzima-substrato. Estes braços podem ser introduzidos já ativados aos suportes ou serem incorporados e posteriormente ativados (KENNEDY, 1987).

A imobilização por ligação covalente, se bem projetada (suporte com grande área superficial e grupos reativos moderadamente afastados de sua superfície), pode prover altíssima rigidez e estabilidade às enzimas, evitando alterações conformacionais muito grandes. Porém, podem ocorrer alguns eventos adversos, impactando na diminuição da atividade enzimática. A posição como a enzima é imobilizada pode dificultar ou até mesmo impedir o acesso do substrato ao sítio ativo. Também pode ocorrer a ligação de grupos funcionais de resíduos de aminoácidos do sítio ativo da molécula com o suporte, além de rigidez excessiva da molécula, impedindo seu desdobramento (para enzimas que precisam de conformações diferentes para executar suas ações), resultando na perda da função enzimática (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; GUIBAN, 2006).

É possível também executar o entrecruzamento nas enzimas ligadas covalentemente, criando ligações entre as cadeias polipeptídicas, visando estabilizar enzimas multiméricas, ou criar microambientes para as proteínas suportadas, coimobilizando-as junto de polímeros hidrofílicos (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; GUIBAN, 2006; KENNEDY, 1987).

2.3.2 Imobilização por adsorção

Consiste num método de adsorção física ou iônica das enzimas. Através de interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas (por pontes salinas), as moléculas enzimáticas interagem com o suporte e são adsorvidas. Essa adsorção pode ser revertida mudando condições como pH, temperatura, força iônica e polaridade do solvente do meio. Para dificultar a dessorção das proteínas é possível modificar quimicamente a estrutura do suporte a fim de se aumentar as interações não covalentes, efetuar a reticulação das moléculas no suporte após sua adsorção ou reduzir o tamanho dos poros (por tratamento químico) (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; GUIBAN, 2006; HE et al., 2006).

A imobilização por adsorção é um procedimento simples, barato, realizado em condições suaves e tem pouco impacto na estrutura conformacional da enzima, pois esta se orienta em posição preferencial e energeticamente favorável (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; GUIBAN, 2006; KENNEDY, 1987).

2.3.3 Imobilização por confinamento

A imobilização enzimática por confinamento ocorre através da polimerização *in situ* do suporte ao redor das moléculas de enzima, resultando em um material poroso que retém a enzima, porém, existe livre circulação de substrato e produto. À medida que a formação do suporte ocorre ao redor das proteínas, as partículas proteicas são presas na matriz polimérica formada. A polimerização da matriz acontece através da agregação de partículas coloidais resultando em gel coloidal, ou através de polimerização de cadeias poliméricas longas, formando géis poliméricos (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; GUIBAN, 2006; KENNEDY, 1987).

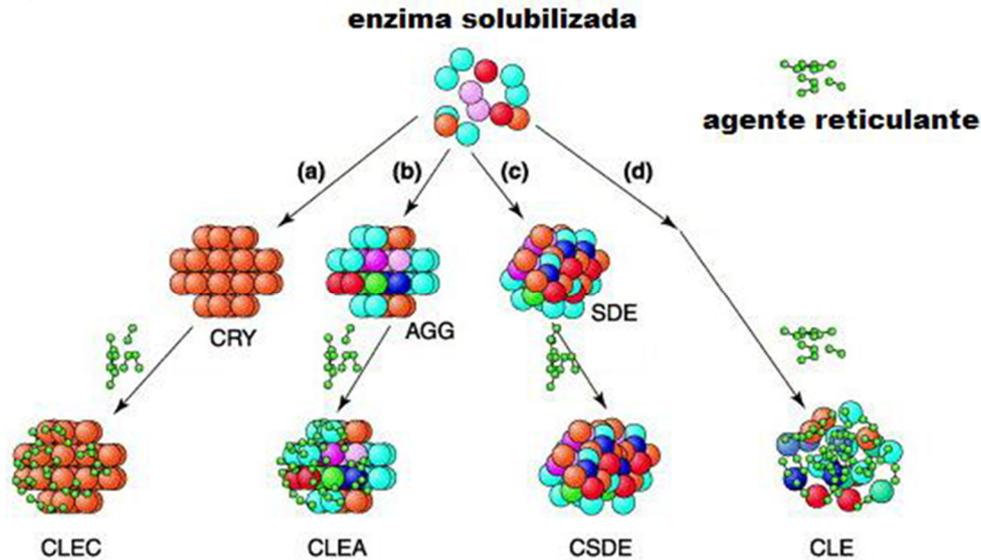
Este método de imobilização diminui o contato direto da enzima com o meio e não altera a conformação da enzima. Contudo, podem ocorrer problemas difusionais devido ao tamanho dos poros formados, encolhimento da matriz devido ao tempo, processos de condensação ou secagem. A diminuição do tamanho dos poros pode resultar também na desativação ou lixiviação das proteínas. As condições de polimerização do suporte podem também resultar na desativação das proteínas (BRENA; BATISTA-VIERA, 2006; GUIBAN, 2006; KENNEDY, 1987).

2.3.4 Reticulação

A técnica de reticulação consiste em agregar e precipitar enzimas (utilizando um agente precipitante) com a finalidade de reticular por ligações cruzadas (com uso de um agente bifuncional) os agregados formados, visando torná-los permanentemente insolúveis no meio reacional. Este método não utiliza um suporte, somente proteínas, podendo conter ou não proteínas inertes junto às enzimas de interesse. A agregação e precipitação ocorrem principalmente pelo uso de sulfato de amônio (o mais utilizado), polietilenoglicol ou um solvente orgânico, agregando as moléculas através de interações não covalentes. O agente reticulador mais utilizado é o glutaraldeído que interage principalmente com grupos amino (NH_2) presentes nas enzimas, fazendo com que os agregados não se dispersem quando inseridos em meio aquoso. Nos casos em que a enzima de interesse possua poucos grupos NH_2 disponíveis para o entrecruzamento, é possível adicionar uma proteína inerte com alta densidade de grupos NH_2 para facilitar a reticulação (SHELDON; SCHOEVAART; VAN LANGEN, 2006; SHELDON 2011; TALEKAR et al., 2013).

É possível realizar a reticulação das enzimas por quatro maneiras diferentes, como ilustradas na Figura 8 (CAO; VAN LANGEN; SHELDON, 2003; MAFRA et al., 2014; SHELDON; SCHOEVAART; VAN LANGEN, 2006):

Figura 8 – Reticulação de enzimas em ausência de suportes



(a) cristalização, (b) agregação; (c) secagem por atomização; (d) reticulação direta. CRY: cristais de enzima; AGG: agregados enzimáticos; SDE: enzima atomizada. CLEC: cristais de enzima reticulados; CLEA: agregados enzimáticos reticulados; CSDE: enzimas atomizadas reticuladas; CLE: enzimas solubilizadas reticuladas.

Fonte: Cao, van Langen e Sheldon 2003 adaptado por Veríssimo, 2012

- CLE (cross-linked enzyme): se procede com a reticulação das enzimas sem sua agregação e precipitação. Gera um material muito frágil e de baixa atividade (Figura 8d).
- CSDE (cross-linked spray-dried enzyme): a agregação das proteínas ocorre através de atomizador em spray, com posterior reticulação (Figura 8c).
- CLEC (cross-linked enzyme crystal): após purificação da enzima de interesse, adiciona-se agente precipitante formando cristais de alta pureza, que posteriormente são reticulados com agente bifuncional (Figura 8a). É possível realizar a precipitação controlada focando somente a enzima de interesse. O processo de purificação ou precipitação controlada é muito caro, tornando este método muitas vezes economicamente inviável em escala industrial.
- CLEA (cross-linked enzyme aggregate): com o auxílio de agentes precipitantes, as moléculas proteicas em solução são agregadas e precipitadas. Depois é utilizado um agente bifuncional para reticular os aglomerados (Figura 8b). Também é possível inserir proteínas inertes no meio para serem aglutinadas junto à enzima com a finalidade de auxiliar na

formação de CLEAs e garantir que as proteínas não se solubilizem no meio. É um método fácil e relativamente barato.

Com exceção do CLE, a reticulação produz sólidos com alta atividade específica, diminuindo o volume ocupado pela molécula imobilizada no meio reacional. O tamanho dos CLEAs pode variar de 1 a 100 μm . As enzimas imobilizadas pelas técnicas de CLEC e CLEA apresentam seletividade similar às enzimas livres e podem ter a atividade e enantiosseletividade aprimoradas variando-se as condições de cristalização ou agregação. A técnica de CLEA é mais simples de ser realizada e demanda menos tempo do que muitas outras técnicas de imobilização utilizando suportes sólidos, que muitas vezes necessitam ser ativados ou polimerizados. (CAO; VAN LANGEN; SHELDON, 2003).

2.3.4.1 Proteínas inertes

Como descrito anteriormente, a adição de proteína inerte auxilia na obtenção de CLEAs de enzimas com poucos grupos NH_2 disponíveis. A proteína albumina de soro bovino (BSA) é rica em grupos NH_2 , facilitando o processo de entrecruzamento, e possui alta massa molecular ($\text{MM} \approx 66 \text{ kDa}$) (TALEKAR et al., 2013).

A BSA é uma proteína de alto valor comercial. Visando buscar opções de proteína inerte com valores mais acessíveis, foi levantada a possibilidade de se utilizar a proteína isolada de soja (PS), que é gerada como subproduto da extração do óleo de soja, sendo comercializada como suplemento alimentar. A PS chega a ser 250 vezes mais barata que a BSA (valores consultadas em março de 2015) (PERKINS, 1995).

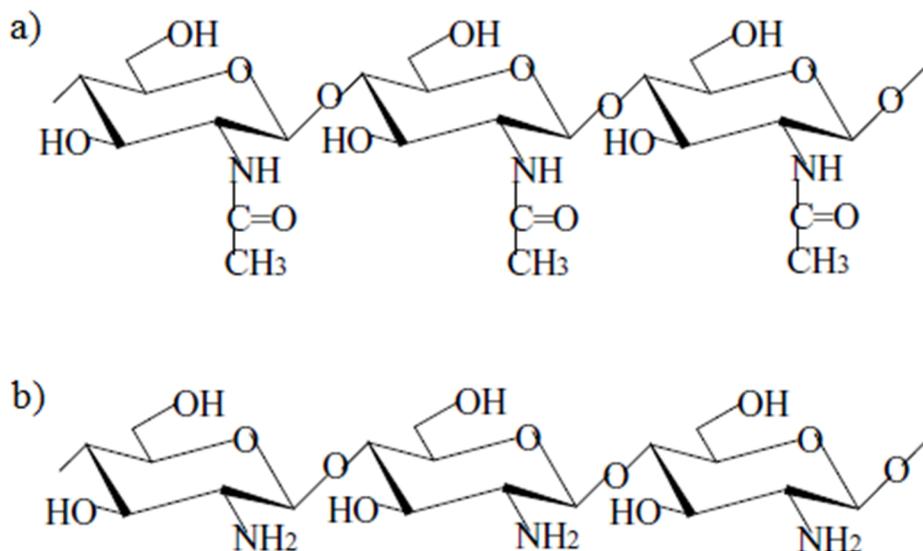
2.3.5 Quitosana

A escolha de um suporte deve se basear no custo do material, condições de processo, assim como o meio em que será utilizado, afinidade das proteínas, grupos funcionais disponíveis para interagir com a enzima ou para modificações químicas, fácil preparação, estabilidade mecânica e rigidez, fácil manipulação conformacional, regenerabilidade, hidrofiliabilidade, toxicidade, biocompatibilidade e degradabilidade. Uma opção que atende grande parte dos requisitos mencionados é a quitosana (KRAJEWSKA, 2004).

A quitosana é proveniente do tratamento básico da quitina. A quitina (Figura 9a) é um polímero natural com grande disponibilidade na natureza, geralmente obtido como subproduto do processamento de crustáceos. Por ser um subproduto e de grande disponibilidade, possui

baixo custo. A quitosana (Figura 9b) possui muitas das qualidades mencionadas no parágrafo anterior, como baixo custo, afinidade às proteínas, possui grupos aminos e hidroxilas disponíveis, insolúvel em água (solúvel em soluções com pH abaixo de 6,5), é atóxica, biocompatível, fisiologicamente inerte, fungistática e biodegradável. Os grupos NH_2 são de pK_a próximo de 6,5, o que torna a quitosana um polieletrólito catiônico, possibilitando a interação da matriz de quitosana com grupos funcionais aniônicos presentes em enzimas ou com agentes bifuncionais como o glutaraldeído, formaldeído, glioxal, entre outros, tornando possível usar a quitosana como suporte para diversas técnicas de imobilização, como por adsorção, adsorção seguida de reticulação, ligação covalente com ativadores ou inclusão (KRAJEWSKA, 2004).

Figura 9 – Polímeros de a) quitina e b) quitosana



Fonte: Krajewska, 2004.

Por ser estável, não tóxico e relativamente barato quando comparado com outros polímeros, a quitosana pode ser utilizada como suporte para imobilização de diversas enzimas de interesse dos setores farmacêutico e alimentício. Além de suporte enzimático, a quitosana é empregada como adsorvente para inúmeras finalidades, sendo aplicada tanto em escala industrial como laboratorial (ARRUDA e SANTANA, 2000; ROY; GUPTA, 2006; KRAJEWSKA, 2004).

2.3.6 Imobilização de β -amilases de diferentes origens

Diversos trabalhos reportam a imobilização de β -amilases de diferentes fontes biológicas para a produção de maltose a partir de fontes amiláceas.

Srivastava, Roy e Kayastha (2015) imobilizaram β -amilase de fenacho (feno-grego) em copolímero de quitosana e polivinilpirrolidona (PVP), e em esferas de cloreto de polivinil (PVC) tratadas com quitosana e ativadas com glutaraldeído, obtendo 85,2% e 81,0% de atividade recuperada, respectivamente, em condições ótimas de operação. A adsorção da enzima em suporte com quitosana-PVP durou 48 horas. O suporte de quitosana-PVC levou dias para ser preparado, 4 horas para ser ativado e a imobilização enzimática demorou uma noite para ser realizada.

Poddar e Jana (2011) utilizaram gelatina nas concentrações de 10% e 5% para imobilizar β -amilase de *Bacillus subtilis*, entrecruzando a enzima com 0,8% e 1,0% de glutaraldeído, respectivamente. As atividades recuperadas, em relação à inicialmente oferecida, foram de 66,6% e 63,2%, respectivamente. O período de preparo das gelatinas com enzimas imobilizadas foi de uma noite.

β -amilase de batata-doce foi imobilizada por adsorção simples em suporte de sílica Celite-545[®] por Khan, Khan e Husain (2011), onde foram disponibilizadas 1232 U/g_{suporte} de enzima livre, das quais foram adsorvidas 292 U/g_{suporte} (23,7% de atividade imobilizada) pela Celite-545[®], que apresentou atividade recuperada de 244 U/g_{suporte} (19,8% em relação à atividade inicialmente disponível e 83% em relação à atividade adsorvida). A adsorção da enzima foi realizada pelo período de uma noite.

Tavano e colaboradores (2013) imobilizaram β -amilase de batata-doce em agarose ativada com grupos glioxil (aldeídos alifáticos), monoaminoetil-N-aminoetil (MANAE) e glutaraldeído, imobilizando 42,2%, 100% e 100% da atividade disponibilizada para cada método, respectivamente. As atividades recuperadas foram de 20,6%, 7,3% e 16,6%, respectivamente para cada método de ativação. A baixa atividade recuperada foi atribuída a problemas difusionais do substrato, que possui estrutura molecular muito grande, além de problemas de impedimento estérico relacionados ao posicionamento da enzima e a relação entre o pequeno tamanho dos espaçadores e ao grande volume da β -amilase, interações entre ligantes e resíduos de aminoácidos de sítios ativos e a fragilidade da enzima quadrimérica.

Noda e colaboradores (2001) conseguiram recuperar somente 7,1% de atividade adsorvendo β -amilase de batata-doce em esferas de quitosana Chitopearl BCW 3505. A adsorção da enzima em suporte ocorreu por apenas uma hora. A baixa atividade aparente foi

atribuída à dificuldade difusional do substrato devido ao seu grande tamanho. A enzima imobilizada mostrou-se estável frente à temperatura e o pH: a temperatura ótima da enzima aumentou de 50°C (livre) para 70°C (imobilizada), houve um aumento de 10°C na estabilidade térmica, e retenção de 70,9% de atividade até o 14º dia de uso em reator rotatório de coluna horizontal em pH 6,0 e 60°C.

Vretblad e Axen (1973) imobilizaram β -amilase de cevada por ligação covalente em Sepharose (matriz de agarose) ativada com 4,4'-metilenodianilina, recuperando 35% de atividade. Houve aumentos significantes na estabilidade da enzima em condições de operação a 45°C e condições de armazenamento.

Martensson (1974) imobilizou β -amilase de cevada por adsorção em copolímero de acrílico-acrilamida seguida de entrecruzamento com CMDI recuperando 23%, 20% e 19% de atividade, utilizando solução contendo proteínas somente de β -amilase de cevada, solução contendo proteínas de β -amilase e glutatona reduzida, e solução contendo proteínas de β -amilase e a albumina de soro bovino (BSA), respectivamente. A adsorção da enzima (com ou sem os aditivos) no copolímero durou 30 minutos, sendo introduzido em seguida o CMDI, que reagiu por 18 horas. As enzimas imobilizadas na presença dos aditivos obtiveram maior estabilidade operacional do que a enzima livre ou imobilizada sem os aditivos.

É possível observar que a imobilização da enzima β -amilase pode trazer benefícios como aumento significativo da estabilidade da enzima frente a parâmetros de processo e maior estabilidade para o armazenamento da enzima. Muitas das técnicas de imobilização citadas neste item demandam tempo excessivo de preparo dos biocatalisadores imobilizados. As imobilizações de β -amilase de cevada observadas anteriormente apresentaram baixa atividade recuperada.

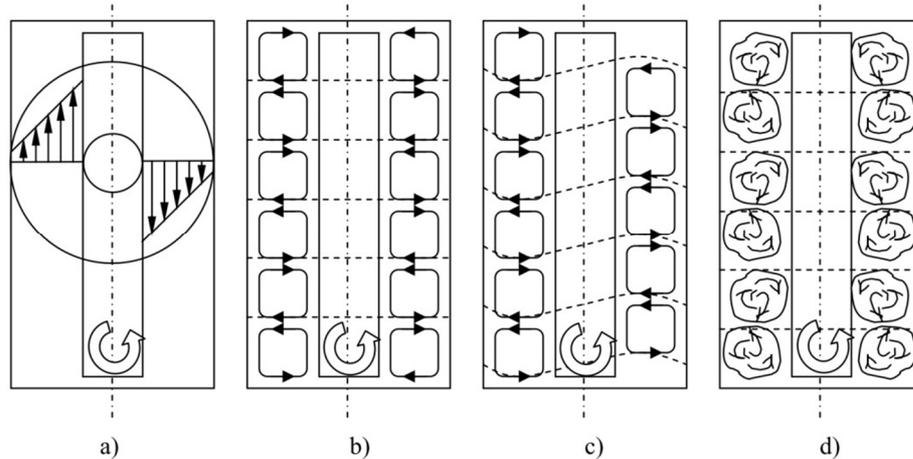
2.4 Fluxo em vórtices de Taylor–Poiseuille

Os vórtices de Taylor ocorrem em fluidos contidos em seções anulares quando submetidos à rotação de um ou dos dois cilindros. Os vórtices toroidais surgem a partir de um valor rotacional suficiente para criar instabilidade no sistema linear do regime Couette, passando de um escoamento tangencial (regime de Couette descrito na Figura 10a) para um escoamento com movimentos tangenciais e axiais (vórtices de Taylor descrito na Figura 10b). A movimentação axial do fluido, promovida pelo regime de Taylor, auxilia na fluidização e suspensão de partículas. O número de Reynolds crítico (Re_{0c}) para que essa condição seja atingida é dado pela equação obtida por Esser e Grossman (1996).

$$\text{Re}_{\theta c} = \frac{1}{\alpha^2} \frac{(1+\eta)^2}{2\eta\sqrt{(1-\eta)(3+\eta)}} \quad (3)$$

onde η é razão de raios ($\eta = R_{\text{in}}/R_{\text{ex}}$) e α um fator de valor igual a 0,1556. Superado o regime de Couette, os vórtices de Taylor se apresentam de forma laminar, ondulatória ou turbulenta, conforme ilustrado na Figura 10 (GIORDANO et al., 1998; GIORDANO et al., 2000; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C., 2006, p. 321; RESENDE, 2002).

Figura 10 – Regime de Couette laminar (a), regime de Taylor laminar (b), ondulatório (c) e turbulento (d)

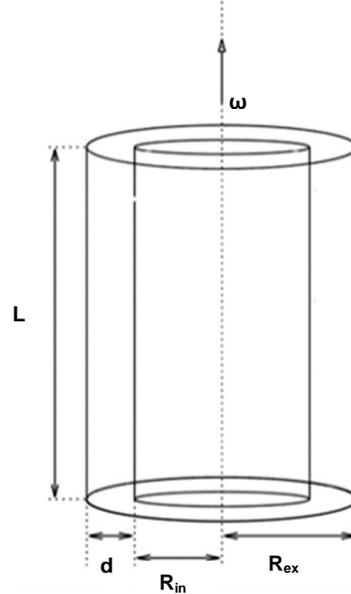


Fonte: ilustração obtida no site <https://www.tvt.kit.edu/21_1899.php>.

2.4.1 Reator de fluxo em vórtices de Taylor–Poiseuille

O reator de fluxo em vórtices de Taylor–Poiseuille (RFV) é constituído basicamente por dois cilindros de diâmetros diferentes, sendo o de menor diâmetro centralizado no interior de um cilindro de maior diâmetro, com distância mínima entre o fundo dos dois cilindros, evitando contato e atrito entre as partes e a maceração de partículas suspensas no meio. O cilindro interno é submetido a movimento rotacional e o cilindro externo se mantém fixo (GIORDANO et al., 1998; GIORDANO et al., 2000; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C., 2006, p. 321; RESENDE, 2002). É possível visualizar um esquema contendo as dimensões de um RFV na Figura 11.

Figura 11 – Esquema das dimensões de um reator de fluxo em vórtices de Taylor–Poiseuille



Fonte: Fonte: SALHI et al., 2012.

É possível operar o RFV em regime batelada, semi-contínuo ou contínuo, controlando diversos parâmetros operacionais, como: temperatura, pressão, pH e agitação. Quando operando de forma contínua, o RFV pode se comportar de forma similar a um reator tubular ou de mistura, apenas variando a rotação do cilindro interno, conseqüentemente, variando os regimes de vórtices de Taylor–Poiseuille de laminar para turbulento. O RFV apresenta agitação eficiente para baixos valores de cisalhamento no meio reacional, sendo vantajoso quando empregado para cultivos de células frágeis ou com partículas sensíveis, como matrizes gelatinosas de enzimas imobilizadas, em reações ou separações bioquímicas. Quando comparado a um reator do tipo STR, o RFV é energeticamente mais eficiente para um mesmo valor de rotação, porém o cilindro interno pode ocupar um volume muito grande do reator (COHEN; MARON, 1983; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C., 2006, p. 321; MOORE, 1994; RESENDE, 2002; FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – FUNDAÇÃO UFSCar, 2002; FUNDAÇÃO UFSCar, 2008).

As dimensões do RFV geralmente compreendem razão de raios de $0,1 \leq \eta \leq 0,9$ e razão de aspecto ($\Gamma = L/d$) de $0,5 \leq \Gamma \leq 100$, sendo L a altura do cilindro interno e d a seção anelar ($d = R_{ex} - R_{in}$) entre os dois cilindros. O regime de fluxo de Taylor turbulento promove a melhor homogeneização do meio, garantindo trocas térmica e mássica mais eficientes (RESENDE, 2002). Em valores de $Re_{\theta}/Re_{\theta c} = 25$ ($\eta = 0,875$), o sistema se encontra em

regime turbulento (DI PRIMA; SWINNEY, 1985). Para se determinar a rotação do cilindro interno (ω) é utilizada a equação adimensional para o número de Reynolds.

$$\text{Re}_\theta = \frac{\omega d R_{in}}{\nu} \quad (4)$$

onde ν é a viscosidade cinemática do fluido.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Fontes amiláceas

Neste trabalho foram utilizados casca e bagaço residuais da manufatura de amido de mandioca doados por duas unidades industriais do interior do Estado de São Paulo, a Tereos Syral de Palmital (Ind. 1) e a Fecularia Flor de Lotus de Cândido Mota (Ind. 2), e amido solúvel grau P.A. da Sigma-Aldrich.

3.1.2 Enzimas

A enzima α -amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* (Termamyl 120L) foi utilizada para a caracterização dos resíduos amiláceos industriais. Para a extração enzimática do amido dos resíduos amiláceos e conversão do amido em maltose foram empregadas, respectivamente, α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (BAN 480 LS) da LNF Latino Americana e β -amilase de cevada Tipo II-B (A7130-10KU e A7130-50KU) da Sigma-Aldrich.

3.1.3 Suportes de imobilização e proteínas inertes

Foram utilizados quitosana em pó da Polymar (Fortaleza, Brasil), alginato de sódio grau P. A. da Dinâmica Química Contemporânea, albumina de soro bovino (BSA) 96% da Sigma-Aldrich e proteína de soja (PS) 90% (com 7% de carboidratos) da Doremus Ingredientes.

3.1.4 Padrões e outros reagentes

Foram utilizados glutaraldeído 25% da Vetec Química, padrão de proteína Novex SeeBlue Plus2 da Life Technologies, gel de SDS-PAGE Amersham ECL Gel 10% e tampão de corrida Amersham Running Buffer 10x da General Electrics Healthcare Life Science. Todos os outros reagentes empregados eram de grau analítico.

3.2 Métodos

Todos os ensaios foram realizados no mínimo em duplicata e os que apresentaram resultados mais significativos foram refeitos no mínimo em triplicatas. Duplicatas de ensaios com desvio médio superiores a 10% foram refeitos em duplicatas.

3.2.1 Caracterização dos resíduos

3.2.1.1 Quantificação do teor de amido dos resíduos industriais

Amido foi extraído dos resíduos industriais por método enzimático, consistindo na suspensão de 1 g de resíduo amiláceo, base seca (b.s.) (umidade determinada em balança Marte modelo ID50, com aquecimento elétrico à temperatura de 105°C), em 50 mL de água e 0,625 mL de Termamyl 120 L. A suspensão foi mantida em reator termostaticado a 90°C sob agitação de 540 rpm por 2 horas. Após filtração, a solução de amido foi submetida à hidrólise ácida em autoclave por 30 minutos, utilizando 1 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 72% (v/v) para 22,5 mL de solução de amido. Os produtos da hidrólise (glicose) e degradação (hidroximetilfurfural) foram quantificados por cromatografia líquida.

Glicose foi quantificada em cromatógrafo Shimadzu equipado com bomba LC-10AD VP (vazão de 0,6 mL/min), degaseificador de membrana DGU-20A 5R, válvula seletora FCV-10AL VP, forno CTO-20A, injetor automático SIL-10AD VP, detector RID-10A (a 45°C) e controladora CBM SCL-10A VP, utilizando uma coluna Biorad Aminex HPX 87H (7,8 x 300 mm) a 45°C com solução de H₂SO₄ 5 mM como fase móvel, sendo injetados 20 µL de amostra.

Hidroximetilfurfural (HMF) foi quantificado em cromatógrafo Shimadzu equipado com bomba LC-6AD (vazão de 0,8 mL/min), degaseificador de membrana DGU-20A 5R, forno CTO-10A VP, injetor automático SIL-10AF VP, detector UV SPD-10AV VP (comprimento de onda de 274 nm) e controladora CBM SCL-10A VP, utilizando uma coluna Sunfire C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm) a 35°C com acetonitrila e água Milli-Q (razão volumétrica 1:8, contendo 1% de ácido acético) como fase móvel, sendo injetados 20 µL de amostra.

O percentual de amido (X_A) nos resíduos amiláceos foi determinado a partir da Equação (5):

$$X_A (\%) = \frac{0,90m_{gli} + 1,20m_{hmf}}{m_a} \quad (5)$$

onde m_{gli} é a massa de glicose, m_{hmf} a massa de hidroximetilfurfural e m_a a massa de amostra (b.s.), expressas em gramas.

3.2.1.2 Determinação de celulose, hemicelulose, lignina solúvel, lignina insolúvel e cinzas

O ensaio seguiu o método de caracterização para bagaço de cana-de-açúcar de Gouveia et al. (2009), sendo utilizadas as amostras dos resíduos industriais após a extração do amido residual. Após secagem por 1 dia do material sólido residual da extração de amido, 1 g de amostra (b.s.) foi pré-digerida com 10 mL de solução H_2SO_4 72% (v/v) em banho à 45°C por 10 minutos sob agitação e maceração em béquer de 100 mL. A suspensão contendo a amostra foi transferida para um Erlenmeyer de 500 mL, sendo adicionados 225 mL de água destilada e o Erlenmeyer foi autoclavado por 30 minutos para realizar a hidrólise ácida dos compostos lignocelulósicos. Depois, o meio foi filtrado em um filtro previamente tarado para um balão volumétrico de 500 mL, retendo lignina insolúvel no filtro. A lignina insolúvel no filtro foi lavada com 1,5 L de água destilada. O conteúdo do balão de 500 mL foi utilizado para determinar as concentrações de glicose, xilose, arabinose, celobiose, ácido acético, ácido fórmico e ácido glucurônico por HPLC em coluna Biorad Aminex HPX 87H, da mesma forma que no item 3.2.1.1, e as concentrações de furfural e HMF foram quantificadas em coluna Sunfire C18, também descrito no item 3.2.1.1. Foram transferidos 5 mL da solução contida no balão de 500 mL para um balão volumétrico de 100 mL, sendo adicionados 40 gotas de solução hidróxido de sódio (NaOH) 6,5 M e o volume de 100 mL completados com água destilada, para quantificação de lignina solúvel em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 2000, em cubeta de polietileno de 1,5 mL e caminho ótico de 10 mm) no comprimento de onda de 280 nm.

As concentrações de celulose (C_C) e hemicelulose (C_{HC}) no balão volumétrico de 500 mL foram calculadas de acordo com as Equações (6) e (7):

$$C_C (\text{g/L}) = 0,90C_{gli} + 0,95C_{celo} + 1,20C_{hmf} + 3,09C_{ác.for} \quad (6)$$

$$C_{HC} (\text{g/L}) = 0,88C_{xil} + 0,88C_{arab} + 0,72C_{ác.acet} + 1,37C_{fur} \quad (7)$$

onde C_{gli} é a concentração de glicose, C_{celo} a concentração de celobiose, C_{hmf} a concentração de hidroximetilfurfural, $C_{ác.for}$ a concentração de ácido fórmico, C_{xil} a concentração de xilose, C_{arab} a concentração de arabinose, $C_{ác.acet}$ a concentração de ácido acético e C_{fur} a concentração de furfural, sendo todas as concentrações expressas em g/L. As porcentagens de

celulose (X_C) e de hemicelulose (X_{HC}) nas amostras foram determinadas a partir das Equações (8) e (9):

$$X_C (\%) = 100 \cdot \frac{0,5C_C}{m_a} \quad (8)$$

$$X_{HC} (\%) = 100 \cdot \frac{0,5C_{HC}}{m_a} \quad (9)$$

onde m_a é a massa da amostra (b.s.) isenta de amido, expressa em gramas.

A concentração de lignina solúvel ($C_{lig.sol}$) contida no balão volumétrico de 100 mL foi quantificada a partir das Equações (10) e (11):

$$C_{lig.sol} (\text{g/L}) = 4,187 \cdot 10^{-2} (A_T - A_{pd}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad (10)$$

$$A_{pd} = C_1 \cdot \varepsilon_1 + C_2 \cdot \varepsilon_2 \quad (11)$$

onde, A_T é a absorvância medida em 280 nm da amostra do balão de 100 mL, A_{pd} é a absorvância medida em 280 nm dos produtos da degradação dos açúcares, C_1 e C_2 são respectivamente as concentrações de furfural e HMF medidas do balão de 100 mL por HPLC e ε_1 e ε_2 absorvidade de furfural (146,85 L/g.cm) e HMF (114,00 L/g.cm).

A porcentagem de lignina solúvel na amostra ($X_{lig.sol}$) foi calculada a partir da Equação (12):

$$X_{lig.sol} (\%) = 100 \cdot \frac{20 \cdot 0,5 \cdot C_{lig.sol}}{m_a} \quad (12)$$

O filtro previamente tarado contendo lignina insolúvel foi seco a temperatura ambiente por 12 horas, sendo posteriormente colocado em pesa-filtro e mantido em estufa à 105°C até a massa ($m_{lig.in}$) permanecer constante. Depois o material foi calcinado em cadinho previamente tarado para se determinar massa de cinzas residual (m_C). O cadinho contendo a amostra foi submetido respectivamente às temperaturas de 400°C por 30 minutos e 800°C por 1 hora em mufla EDG 7000 (com controlador EDG 3P-S). A porcentagem de lignina insolúvel ($X_{lig.in}$) e de cinzas (X_{ci}) foram calculadas pelas Equações (13) e (14):

$$X_{lig.in} (\%) = 100 \cdot \frac{m_{lig.in} - m_{ci}}{m_a} \quad (13)$$

$$X_{ci} (\%) = 100 \cdot \frac{m_{ci}}{m_a} \quad (14)$$

A porcentagem de lignina total na amostra corresponde à soma de $X_{lig.sol}$ e $X_{lig.in}$.

3.2.1.3 Determinação de teor de proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl, descrito por Association of Official Analytical Chemistry (2002). Para este ensaio foram utilizados 0,2 g de amostra de

resíduo de bagaço ou de casca (b.s.), 1 g de mistura catalítica sólida de sulfato de cobre (CuSO_4) e sulfato de potássio (K_2SO_4) na razão de 1:10 (m:m) e 10 mL de H_2SO_4 concentrado em tubo digestor que foi submetido a bloco digestor (Büchi 435) por 2 horas e meia à 250°C . Após esfriar até temperatura ambiente, o tubo digestor foi colocado em destilador de nitrogênio (Tecnal TE-0363), sendo adicionada solução NaOH 10 M até mudança de coloração do meio para preta. O conteúdo do tubo foi destilado por 8 minutos para um Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de solução de ácido bórico 20 g/L e 3 gotas de indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol). O conteúdo do Erlenmeyer foi titulado com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,01 M até mudança de coloração para rosa-avermelhado. A quantidade de proteína presente em amostra foi calculada através das Equações (15) e (16):

$$C_N = \frac{(V_{\text{HCl}} - V_b) \cdot C_{\text{HCl}} \cdot 14}{1000 \cdot m_a} \quad (15)$$

$$\%P = C_N \cdot 6,25 \cdot 100 \quad (16)$$

onde C_N é a concentração de nitrogênio em amostra (g/g), V_{HCl} o volume de HCl utilizado na titulação (mL), V_b o volume da titulação em branco, C_{HCl} a concentração do HCl (M), 14 a massa molecular do nitrogênio, m_a a massa de amostra (g, b.s.), %P a porcentagem de proteína em amostra (m/m) e 6,25 é o fator de conversão do nitrogênio total para nitrogênio proteico.

3.2.2 Caracterização da β -amilase de cevada livre e imobilizada

Os ensaios de estabilidades ao pH e térmica foram realizados com β -amilase de cevada imobilizadas armazenadas por no máximo 5 dias em geladeira. Os demais ensaios utilizando enzimas imobilizadas foram realizados com enzimas imobilizadas no mesmo dia.

3.2.2.1 Atividade enzimática

As atividades enzimáticas de β -amilase livre ou imobilizada foram determinadas de acordo com Bernfeld (1955) e Sigma-Aldrich (2014). β -amilase livre ou imobilizada foi adicionada em 5,0 mL de solução de amido solúvel 1% (m/v), preparada em tampão acetato de sódio 16 mM, pH 4,8, a 20°C sob agitação. A reação de hidrólise foi monitorada por 12 minutos retirando-se alíquotas de 0,15 mL em intervalos regulares para a quantificação de

maltose por medida de ART (açúcares redutores totais) pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS – MILLER, 1959), usando uma curva construída com maltose padrão. A quantidade de enzima (livre ou imobilizada) usada na medida de atividade era suficiente para obter-se uma relação linear entre ART (equivalente em maltose) vs. tempo. Uma Unidade enzimática de β -amilase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mg de maltose por minuto nas condições do ensaio.

3.2.2.2 Teor de proteína solúvel

A quantidade de proteína solúvel foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando BSA como proteína padrão em diferentes concentrações para a construção da curva padrão. A leitura das absorbâncias das amostras foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

3.2.2.3 Eletroforese SDS-PAGE

Eletroforese SDS-PAGE foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido em GE Healthcare - Life Sciences (2011), utilizando tampão de corrida Amersham Running Buffer 10x, gel SDS-acrilamida Amersham ECL Gel 10% em cuba de corrida eletroforética Amersham ECL Gel Box da GE Healthcare com voltagem de 160 V por 60 minutos. Foi utilizado reagente de Laemmli (LAEMMLI, 1970) para o tratamento das amostras. O gel foi revelado com solução reveladora de Coomassie Brilliant Blue. Para se determinar o tamanho das moléculas, foi construída uma curva padrão de mobilidade eletroforética relativa (U_{rel} , Equação 17) pelo logaritmo das massas moleculares ($\log MM$) das proteínas padrões, permitindo-se assim a determinação da massa molecular de uma proteína de interesse (SILVA JÚNIOR, 2001).

$$U_{rel} = \frac{\text{distancia percorrida pela proteína}}{\text{distancia percorrida pelo corante}} \quad (17)$$

3.2.2.4 Potencial hidrogeniônico ótimo

O ensaio de pH ótimo (pH_o) foi realizado de forma semelhante ao item 3.2.2.1, porém variando a condição de pH do meio. Os tampões utilizados para cada valor de pH foram os

mesmos utilizados por Baker e Smiley (1985). Para a faixa de pH de 3,0 a 5,0 foi utilizado tampão acetato de sódio; de 6,0 a 8,0, tampão fosfato de sódio; para pH 9,0 foi utilizado tampão carbonato de sódio.

3.2.2.5 Temperatura ótima

A temperatura ótima (T_o) da enzima foi determinada de maneira semelhante ao item 3.2.2.1, variando somente a temperatura de 30° a 60°C.

3.2.2.6 Estabilidade ao pH

A β -amilase, solúvel ou imobilizada, foi incubada em pHs de 4,0 a 8,0 na temperatura de 25°C sob agitação de 200 rpm em shaker por 12 horas⁷, sendo determinada as atividades inicial e final (residual). Os biocatalisadores foram encubados nos mesmos tipos de tampões do item 3.2.2.4, respeitando as mesmas faixas de pH.

3.2.2.7 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica de β -amilase, solúvel ou imobilizada, foi avaliada no pH de maior estabilidade para cada caso, com temperaturas de 40° a 60°C em shaker sob agitação de 200 rpm por 12 horas⁷, medindo as atividades iniciais e finais (residual) de cada condição.

3.2.3 Imobilização enzimática

A imobilização enzimática foi realizada utilizando técnicas com ou sem suportes. Foram realizadas imobilizações com suporte de quitosana através dos métodos por ligação covalente, adsorção física (simples e com entrecruzamento) e encapsulamento, imobilizações sem suporte pelo método de CLEA e também através do encapsulamento de CLEA em suporte alginato de cálcio. As imobilizações foram avaliadas com base nos parâmetros rendimento de imobilização (R_i) e atividade recuperada (A_r), calculados de acordo com as Equações (18) e (19).

⁷ O período de 12 horas foi adotado para o teste por ser similar ao período de conversão de amido em maltose utilizado pela indústria de xarope de maltose. Informação obtida durante visita técnica à indústria do setor.

$$R_i (\%) = 100 \cdot \frac{\text{atividade inicial da solução enzimática} - \text{atividade final da solução enzimática, (U/mL)}}{\text{atividade inicial da solução enzimática (U/mL)}} \quad (18)$$

$$A_r (\%) = 100 \cdot \frac{\text{atividade total medida na enzima imobilizada (U)}}{\text{atividade total oferecida para imobilização (U)}} \quad (19)$$

3.2.3.1 Imobilização em quitosana

Os métodos de imobilização utilizando quitosana foram baseados em Vieira et al. (2013), sendo realizadas as imobilizações em quitosana por ligação covalente (ativada com glutaraldeído), por adsorção simples, por adsorção e entrecruzamento (utilizando glutaraldeído como agente entrecruzante), e por encapsulamento. Para todos os ensaios foram disponibilizados 0,526 mg de proteínas do extrato bruto de β -amilase de cevada por grama de suporte.

3.2.3.1.1 Ligação covalente com glutaraldeído

A imobilização da β -amilase em quitosana ativada com glutaraldeído (por ligação covalente) foi feita em 3 etapas: coagulação e formação dos flocos de quitosana 2%; ativação dos flocos por glutaraldeído; e imobilização da enzima em suporte.

Quitosana em pó foi solubilizada em solução de ácido acético (HAc) 2% (v/v) para uma concentração final de 2% (m/m), seguida de coagulação em solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,5M (razão volumétrica 2:3 – solução de quitosana:solução de KOH) à temperatura de 50°C sob agitação moderada por 30 minutos. A ativação dos flocos foi realizada adicionando glutaraldeído suficiente para se atingir uma concentração de 0,8% (v/v) no meio, mantendo-se suave agitação por 30 min. Ao final, os flocos de quitosana 2% ativados foram filtrados, lavados com água Milli-Q e tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. A imobilização da enzima foi realizada adicionando-se os flocos de quitosana 2% ativados à solução enzimática em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 na razão sólido/líquido de 1:5, sendo disponibilizado 0,526 mg de proteína do extrato bruto de β -amilase por grama de suporte. A suspensão foi mantida à 25°C sob agitação de 100 rpm em shaker. A imobilização foi acompanhada por medidas de atividade da suspensão, sobrenadante do meio de imobilização e solução enzimática sem suporte (controle para monitor desativação da enzima livre nas condições de imobilização). Ao final da imobilização enzimática (atividade do

sobrenadante constante), a enzima imobilizada era recuperada por filtração e lavada com água destilada para medida de atividade enzimática e cálculo de A_r .

3.2.3.1.2 Adsorção simples e adsorção com entrecruzamento

Os flocos de quitosana 2% para a imobilização por adsorção simples foram preparados como descrito no item 3.2.3.1.1, exceto pela ativação com glutaraldeído. A imobilização da enzima em suporte por adsorção simples foi realizada como descrito no item 3.2.3.1.1, exceto pela concentração da solução tampão fosfato de sódio pH 7,0 que foi reduzida para 5 mM. Ao fim da imobilização, a enzima imobilizada foi recuperada por filtração e lavada com água destilada e solução fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 para medida de atividade enzimática e cálculo de A_r .

O entrecruzamento com glutaraldeído da enzima adsorvida em quitosana foi realizado ressuspendendo a enzima imobilizada em tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 na razão sólido/líquido (m/v) de 1:20. Com a suspensão mantida suavemente agitada, glutaraldeído foi adicionado em quantidade suficiente para uma concentração final de 0,15% (v/v). Após 1 h de suave agitação mecânica à temperatura ambiente, a enzima imobilizada foi recuperada por filtração e lavada com água Milli-Q e com tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 para medida de atividade enzimática e cálculo de A_r .

3.2.3.1.3 Encapsulamento

β -amilase foi encapsulada em quitosana 1% e reticulada com glutaraldeído. Quitosana em pó foi solubilizada em solução de ácido acético (HAc) 2% (v/v) para uma concentração de 1% (m/m), seguida de homogeneização à temperatura ambiente por 1 h. Após esse período de tempo, o pH foi ajustado para 4,35, β -amilase foi adicionada em quantidade suficiente para se atingir a concentração proteica de 0,0526% (m/m) e a atividade da solução foi determinada. A solução de quitosana 1% contendo a enzima foi lentamente adicionada, com monitoramento do pH, em solução tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 na razão volumétrica solução enzimática/tampão de 1:10 sob suave agitação em banho de gelo por 30 min. Depois, a suspensão foi retirada do banho de gelo e após atingir a temperatura ambiente foi adicionado glutaraldeído suficiente para se obter concentração final de 0,1% (v/v). Após 2 h de agitação suave à temperatura ambiente, a enzima imobilizada foi recuperada por filtração e lavada com

água destilada e tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 para medida de atividade e cálculo de A_r .

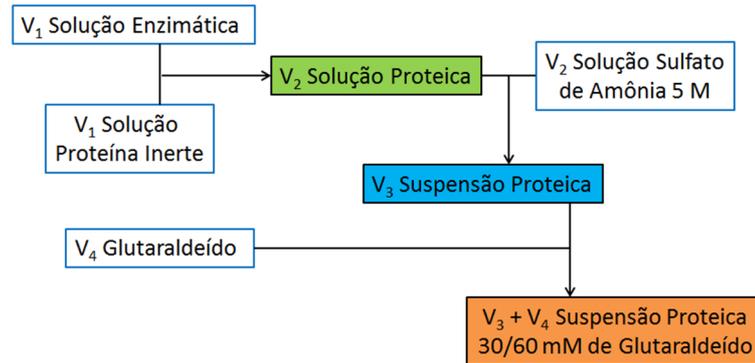
3.2.3.2 Reticulação de proteínas agregadas (CLEA)

A priori foram definidos os reagentes e suas quantidades necessárias para a imobilização de β -amilase por CLEA, bem como tempo, temperatura e agitação para a realização do ensaio. Com base em Mafra et al. (2014) e Sheldon (2011), a princípio foi estabelecido o uso de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 para solubilizar a enzima, BSA como proteína inerte, sulfato de amônio 5 M como agente precipitante e glutaraldeído como agente reticulador. Posteriormente, proteína de soja (PS) foi avaliada como proteína inerte.

O ensaio para determinar as melhores condições para a produção de CLEAs de β -amilase (CLEA- β) baseou-se no procedimento descrito por Mafra et al. (2014). A solução proteica (solução contendo enzima e proteína inerte) foi preparada de acordo com a Figura 12, onde foram misturados volumes iguais (1:1, v:v) de solução enzimática (2 mg/mL de proteínas do extrato bruto de β -amilase solubilizadas em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0) e de solução aquosa de BSA ou PS com concentração variável. Após a mistura, a solução proteica continha 1 mg/mL de proteínas do extrato bruto de β -amilase e a força iônica do tampão era de 50 mM. Sulfato de amônio 5 M foi adicionado na razão 1:1 (v:v) à solução proteica para promover a precipitação das proteínas. Depois, foi acrescentada quantidade suficiente de glutaraldeído para se atingir as concentrações de 30 ou 60 mM na suspensão proteica. As relações de concentração de BSA em solução proteica, concentração de glutaraldeído em suspensão proteica e quantidade de glutaraldeído por massa de proteínas estão descritas na Tabela 2. As mesmas relações para PS são descritas na Tabela 3.

As suspensões proteicas foram colocadas em shaker à temperatura de 4°C e rotação de 200 rpm por 3 horas para a formação dos CLEAs. Após isto, as suspensões foram centrifugadas a 14.800 min^{-1} e 4°C para separação dos CLEAs, que foram lavados com solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. Os CLEAs foram ressuspensos em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 para medida de atividade enzimática e cálculo de A_r .

Figura 12 – Relações entre os componentes para a formação dos CLEAs



Fonte: Autor

Tabela 2 – Condições experimentais da imobilização de β -amilase pela técnica CLEA usando BSA como proteína inerte.

Ensaio	Conc. de BSA em sol. proteica ^a (mg/mL)	Conc. de glutaraldeído susp. proteica ^b (mM)	Conc. de glutaraldeído por massa de proteína (mM/mg)
1	0	30	60,0
2	80	30	0,74
3	60	30	0,98
4	40	30	1,46
5	30	30	1,93
6	20	30	2,86
7	0	60	120,0
8	60	60	1,97
9	40	60	2,93
10	20	60	5,71

^a sol. proteica contendo 1 mg/mL de proteína de extrato bruto de β -amilase em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0.

^b susp. proteica composta por 1:1 (v:v) de sol. proteica e sol. sulfato de amônio 5 M.

Fonte: Autor

Tabela 3 – Condições experimentais da imobilização de β -amilase pela técnica CLEA usando PS como proteína inerte

Ensaio	Conc. de PS em sol. proteica ^a (mg/mL)	Conc. de glutaraldeído susp. proteica ^b (mM)	Conc. de glutaraldeído por massa de proteína (mM/mg)
1	40	30	1,46
2	30	30	1,93
3	20	30	2,86
4	15	30	3,75
5	10	30	5,45
6	30	60	3,87
7	20	60	5,71
8	15	60	7,50
9	10	60	10,91

^a sol. proteica contendo 1 mg/mL proteína de extrato bruto de β -amilase em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0.

^b susp. proteica composta por 1:1 (v:v) de sol. proteica e sol. sulfato de amônio 5 M.

Fonte: Autor

3.2.3.3 Encapsulamento de CLEA de β -amilase-BSA em alginato

Os CLEAs de β -amilase-BSA (CLEA- β -BSA) formados eram muito pequenos, dificultando sua recuperação e manipulação. Visando facilitar o manuseio desses CLEAs, encapsularam-se os mesmos em alginato. Para isso, CLEA- β -BSA preparado a partir de 1 mg de proteínas do extrato bruto de β -amilase nas melhores condições avaliadas neste trabalho foi ressuspenso em 1 mL de solução tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,35 ou solução tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,00. A essa suspensão, adicionou-se alginato de sódio suficiente para se atingir a concentração de 1% (m/m). Essa suspensão foi homogeneizada e gotejada em excesso de solução de cloreto de cálcio 250 mM com o auxílio de um sistema constituído de agulha de ponta fina e soprador, mantida sob agitação suave pelo próprio soprador, como demonstrado na Figura 13. As esferas de alginato de cálcio formadas foram mantidas nessa mesma solução por 20 minutos para cura. O meio foi filtrado, o CLEA- β -BSA encapsulado em alginato foi lavado com água destilada para medida de atividade enzimática e cálculo de A_r . O material foi armazenado a 4°C em água destilada.

Figura 13 – Sistema para a formação das esferas de alginato de cálcio



Fonte: Autor

3.2.3.4 Caracterização do tamanho das proteínas presentes em PS

A distribuição dos tamanhos (em kDa) das proteínas que constituem a PS foi determinada por SE-HPLC em cromatógrafo Shimadzu com coluna BioSep-SEC-s3000

(Phenomenex) a 25°C, detector UV modelo SPD 10AVvp com detecção em comprimento de onda de 214 nm, utilizando tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,8 na vazão de 1,0 mL/min como fase móvel. A amostra de PS foi tratada com solução de SDS 2% e 3,0 g/L de DTT.

3.2.4 Produção de maltose a partir de amido comercial e residual

Amido comercial e amido residual do bagaço de mandioca da Ind. 1 e da casca de mandioca, após extração enzimática com BAN 480 LS, foram utilizados como substrato para a produção de maltose. A dextrose equivalente (DE) foi determinada utilizando a Equação (20):

$$DE=100 \cdot \left(\frac{\text{quantidade de açúcares redutores equivalente em massa de glicose}}{\text{massa seca de sólidos}} \right) \quad (20)$$

onde a quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método de DNS (MILLER, 1959) e quantificada a partir de curva padrão de glicose. A DE é uma forma de analisar o grau de hidrólise da molécula de amido, onde os valores próximos de zero indicam cadeias com altas massas moleculares (grandes polímeros de glicose e, conseqüentemente, poucas pontas reductoras); com o aumento do valor da DE a massa molecular média da solução diminui, indicando que as grandes cadeias de amido foram hidrolisadas em cadeias menores, acarretando no aumento de pontas reductoras; os valores próximos de 100 indicam que o amido foi totalmente hidrolisado à glicose (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2010).

3.2.4.1 Extração do amido residual

O amido residual do bagaço da Ind. 1 ou da casca foi gelatinizado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, utilizando 28,0 g de amido por L em banho fervente sob agitação por 10 minutos. Após ajuste da temperatura para 60°C e do pH para 6,0 com solução de HCl, 12,6 µL de BAN 480 LS por kg de amido foram adicionados para a extração do amido, sendo interrompida a reação após 5 minutos pela adição de HCl 50% (v/v) na razão volumétrica de HCl 50%/meio reacional de 1:333⁸. O meio foi filtrado a quente, a concentração de amido em solução foi quantificada e caso necessário era diluído ou concentrado (em rota-evaporador Heidolph Laborota 4000) até se atingir a concentração desejada.

⁸ Metodologia desenvolvida por Mayerlenis Jimenez Rojas durante seu doutorado.

3.2.4.2 Produção de maltose em RFV

Em 50 mL de solução de amido comercial ou amido residual do bagaço ou casca de mandioca (13,6; 30,0 e 45,7 g/L) foram adicionadas 36,0 U/L de β -amilase livre ou imobilizada. A reação foi conduzida em condições de pH e temperatura de maior estabilidade da enzima em um RFV (dimensões do reator no Anexo I) com razão de raios (η) de 0,24, razão de aspecto (Γ) de 6,32 e rotação do cilindro interno de 900 rpm. A conversão do amido em maltose (fator de conversão igual a $0,957 \frac{\text{g}_{\text{amido}}}{\text{g}_{\text{maltose}}}$) foi acompanhada com o tempo quantificando-se maltose por HPLC. Para isso, amostras do meio reacional eram tratadas com HCL 1 M (razão 50:3, v:v) para interrupção da reação e as concentrações de maltose e glicose eram quantificadas por cromatografia líquida usando uma coluna Biorad Aminex HPX 87H (metodologia descrita na seção 3.2.1.1). Algumas amostras também foram analisadas pelo método de DNS para o acompanhamento da reação em tempo real.

A produtividade (p) e a produtividade específica (q) foram calculadas de acordo com as equações 21 e 22.

$$p = \frac{p_f - p_i}{t} \quad (21)$$

$$q = p \frac{V}{A_t} \quad (22)$$

onde p_f é a concentração final de maltose, p_i é a concentração inicial de maltose, t é o tempo de reação necessário para se obter conversão constante, V é o volume reacional e A_t é a atividade enzimática total disponibilizada para a reação.

3.2.5 Ensaios de reuso da β -amilase imobilizada

O ensaio de reuso de β -amilase imobilizada visou verificar a perda de atividade e o decréscimo na conversão a cada batelada. As condições do ensaio foram as mesmas descritas na seção 3.2.4.2, utilizando solução de amido extraído do bagaço da Ind. 1 nas concentrações de 8,2 e 13,2 g/L, fixando o tempo de batelada em 12 horas (período de conversão similar ao utilizado pela indústria do setor) e a carga enzimática no reator de 36,0 U/L. No início de cada batelada foi determinada a atividade da β -amilase imobilizada pelo método de DNS. Ao final de cada batelada, uma amostra do meio reacional foi submetida a tratamento ácido (HCL 1 M, razão volumétrica 50:3) para quantificação da concentração de maltose por HPLC (coluna Biorad Aminex HPX 87H) e cálculo da conversão do amido em maltose. A separação da

enzima imobilizada foi realizada de duas maneiras diferentes, por centrifugação e decantação, para verificar a melhor maneira de se separar a enzima imobilizada do meio reacional.

3.2.5.1 Separação do biocatalisador por centrifugação

Ao final de cada batelada, após a retirada de amostra para análise de maltose por HPLC, o meio era cuidadosamente transferido para um frasco de centrífuga, o reator era lavado com água destilada (visando remover todo material sólido do reator), sendo esta água de limpeza colocada junto com o meio no frasco de centrífuga. O frasco era colocado em uma centrífuga e submetido à rotação de 12.000 rpm a 4°C por 10 minutos. Depois, a fase líquida era descartada, os sólidos eram ressuspendidos em água destilada para lavagem e submetidos à centrifugação novamente. Após a lavagem, o líquido era descartado, os sólidos eram ressuspendidos em 50 µL de água destilada e adicionados ao RFV contendo 50 mL de solução de amido (sendo o frasco de centrífuga lavado com 5 mL de solução de amido do RFV), dando início a uma nova batelada.

3.2.5.2 Separação do biocatalisador por sedimentação

Ao final de cada batelada, após a retirada de amostra para análise de maltose por HPLC, os sólidos sedimentavam por 10 minutos e a fase líquida era retirada do RFV com o auxílio de uma pipeta automática. Os sólidos eram lavados com água destilada sob rotação por 2 minutos, sedimentavam por mais 10 minutos e a água de lavagem era drenada. 50 mL de solução de amido sob as condições de ensaio eram adicionados ao RFV, dando início a uma nova batelada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição dos resíduos de mandioca

O teor de amido dos resíduos de mandioca que foram utilizados neste trabalho se mostraram dentro dos limites reportados nos trabalhos de Caldas Neto et al. (2000), Pandey et al. (2000), Prado et al. (2000) e Sriroth et al. (2000). Na Tabela 4 é possível visualizar que os teores de amido foram superiores a 45% para todos os resíduos. A composição dos bagaços das duas indústrias se mostraram semelhantes. Os altos teores de amido dos bagaços da produção industrial de fécula de mandioca por via mecânica indicaram que o processo de extração mecânica é muito limitado. Sriroth et al. (2000) cita que a limitação na extração mecânica do amido de mandioca pode ser devido ao alto conteúdo fibroso da raiz, retendo os grânulos de amido em sua estrutura. Com base na alta quantidade de amido presente ainda nos resíduos é possível utilizá-los para a produção de diversos produtos de interesse comercial, dentre eles o xarope de maltose, objeto de estudo nesse trabalho. A umidade dos resíduos mostrou-se alta, acima de 80% para os bagaços e próximo de 60% para a casca.

Tabela 4 – Composição dos resíduos industriais (% , massa seca)

Parâmetros	Bagaço Ind. 1	Bagaço Ind. 2	Casca
Amido	45,69 ± 0,82	48,86 ± 2,43	55,3 ± 1,4
Celulose	22,47 ± 0,98	21,74 ± 0,49	17,70 ± 0,12
Hemicelulose	14,16 ± 0,42	13,16 ± 0,85	2,89 ± 0,02
Lignina	2,31 ± 0,12	1,79 ± 0,06	0,88 ± 0,32
Proteína	0,27 ± 0,04	0,36 ± 0,08	2,76 ± 0,04
Cinzas	0,08 ± 0,02	0,110 ± 0,01	0,23 ± 0,01
Umidade*	87,02 ± 1,23	82,51 ± 0,75	61,66 ± 2,17

* massa úmida (MU)

Fonte: Autor

Após a extração enzimática do amido, os resíduos apresentaram alto teor de material lignocelulósico e baixa umidade, como mostrado na Tabela 5. As amostras de bagaço e casca apresentaram por volta de 40% de celulose, 26% e 6% (bagaço e casca, respectivamente) de hemicelulose, menos de 5% de lignina e umidade inferior a 12%. Este material ainda poderia ser utilizado para a produção de outros produtos, como álcool de segunda geração ou ser utilizado para a geração de energia através da queima direta em caldeiras ou gaseificação do material e posterior queima dos gases em caldeiras (CHAVES, 2007; CHEMMÉS et al., 2013)

Tabela 5 – Composição dos resíduos industriais após extração enzimática do amido (% , massa seca)

Parâmetros	Bagaço Ind. 1	Bagaço Ind. 2	Casca
Celulose	41,37 ± 1,80	42,51 ± 0,96	39,60 ± 0,30
Hemicelulose	26,07 ± 0,78	25,73 ± 1,67	6,46 ± 0,03
Lignina	4,26 ± 0,22	3,50 ± 0,11	1,97 ± 0,71
Proteína	0,52 ± 0,08	0,62 ± 0,15	6,18 ± 0,08
Cinzas	0,14 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,51 ± 0,02
Umidade*	11,26 ± 1,11	10,64 ± 0,56	8,37 ± 0,10

* massa úmida (MU)

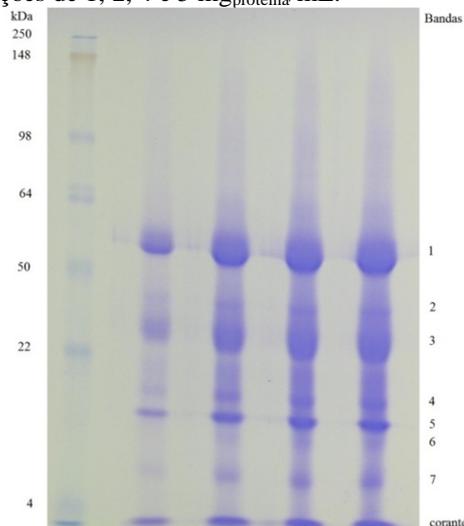
Fonte: Autor

4.2 Características da β -amilase

Neste trabalho foram utilizados dois lotes de β -amilase comercial. A análise de proteína solúvel pelo método de Bradford (1976) indicou variações nos teores proteicos desses lotes, 0,5259 mg_{proteína}/mg_{extrato bruto} e 0,3280 mg_{proteína}/mg_{extrato bruto}. A atividade específica, determinada pelo método de Bernfeld (1955), variou de 11,5 U/mg_{proteína} para 7,8 U/mg_{proteína}, respectivamente.

4.2.1 Análise eletroforética SDS-PAGE

A eletroforese desnaturante da β -amilase de cevada, Figura 14, apresentou 7 bandas proteicas, além de uma banda referente à frente de corante (usada nos cálculos de distância relativa).

Figura 14 – SDS-PAGE de β -amilase de cevada comercial nas concentrações de 1, 2, 4 e 5 mg_{proteína}/mL.

Fonte: Autor

Com os cálculos de distância relativa (U_{rel}) e o logaritmo das massas moleculares ($\log MM$) dos padrões proteicos (Tabela 6), foi possível construir um gráfico U_{rel} vs. $\log MM$ para calcular as massas moleculares de cada banda, listadas na Tabela 7.

Tabela 6 – Dados referentes aos padrões proteicos do gel de SDS-PAGE.

U_{rel}	$\log MM$
0,05042	2,3979
0,08824	2,1703
0,24790	1,9912
0,36975	1,8062
0,49160	1,6990
0,66387	1,3424
0,97059	0,6021

Fonte: Autor

Tabela 7 – Massas moleculares de cada banda presente no gel de SDS-PAGE da

Figura 14.

Bandas	MM (kDa)
1	56,23
2	38,90
3	27,54
4	14,45
5	10,96
6	9,12
7	6,31

Fonte: Autor

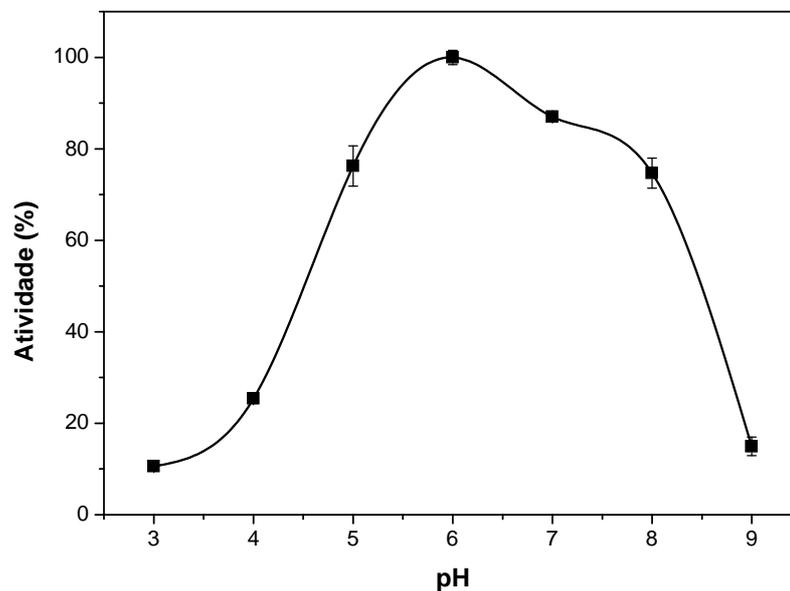
Com base na massa molecular de β -amilases reportadas na literatura, a banda 1 (56,23 kDa) corresponde à enzima β -amilase de cevada. As demais bandas são outras proteínas menores que compõem o extrato bruto.

4.2.2 pH e temperatura ótimos

Este ensaio teve como objetivo determinar as condições de maior atividade catalítica da enzima livre. Esta atividade foi relativizada em função da maior atividade obtida, sendo expressa em porcentagem.

No perfil de atividade catalítica relativa em função do pH, mostrado na Figura 15, é possível observar que valor de pH onde se obteve maior atividade catalítica da enzima livre (seu pH_o) foi em 6,00, diferente do valor reportado por Baker e Smiley (1985) para a β -amilase de cevada purificada (pH 4,35). Esses autores reportaram que a utilização de 5 $\mu\text{mol/mL}$ de cisteína alterou o pH_o da β -amilase de cevada purificada de 4,35 para 7,0 e, ainda, que a enzima com este aditivo apresentava 93% de atividade em pH 8,0 e 14% em pH 9,0 contra 56% e 0%, respectivamente, para a enzima sem aditivos. Baker e Smiley (1985) também reportam que na presença de EDTA 1 mM a enzima apresentava maior atividade em pH 7,0 do que em pH 4,35. Assim, a presença de certos aditivos na preparação enzimática pode alterar o perfil da curva pH -atividade. A enzima utilizada neste trabalho é um extrato bruto comercial de β -amilase de cevada, o qual possui outras proteínas contaminantes de menor massa molecular, as quais poderiam ter contribuído para o aumento de atividade em pH 6,0. Além disso, o extrato comercial pode conter aditivos para aumentar o seu tempo de armazenagem.

Figura 15 – Perfil de atividade de β -amilase de cevada a 20°C em diferentes valores de pH.

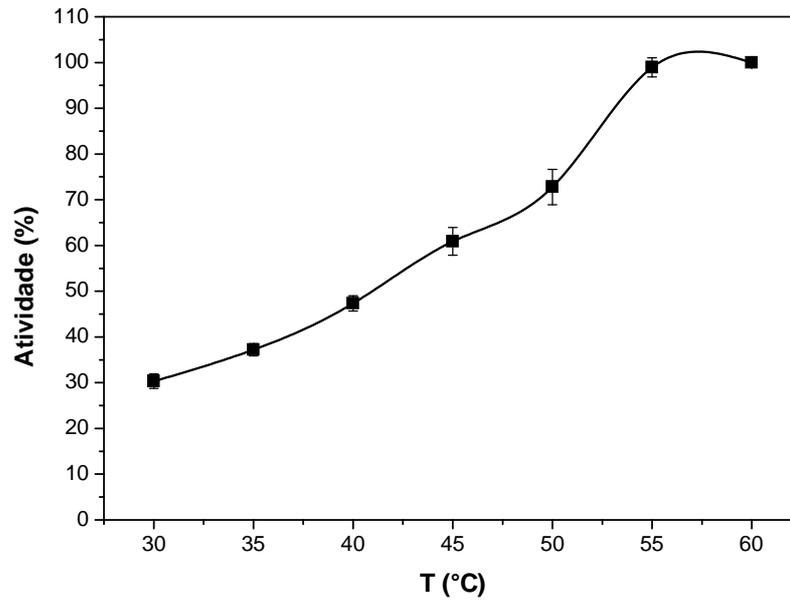


Ensaio realizado com solução de amido solúvel 1% (m/v), preparado em tampão 16 mM.

Fonte: Autor

O perfil de atividade relativa em função da temperatura, ilustrado na Figura 16, mostra que a T_o encontrada foi de 57°C, valor bem próximo dos 55°C reportados por Yoshigi et al. (1995) para a enzima pura.

Figura 16 – Perfil de atividade de β -amilase de cevada em pH 4,8 em função da temperatura.



Ensaio realizado com amido 1% (m/v), preparado em tampão acetato de sódio 16 mM pH 4,8.

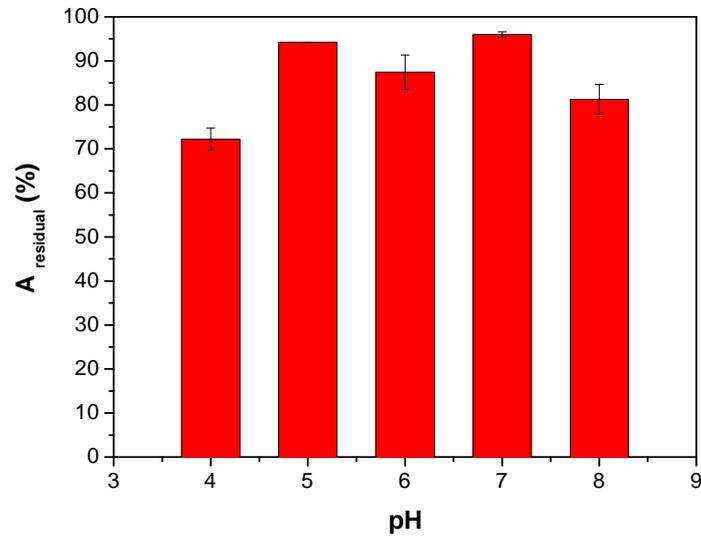
Fonte: Autor

4.2.3 Estabilidade ao pH e a temperatura

Este ensaio teve como objetivo verificar a estabilidade da β -amilase livre em diferentes valores de pH e temperatura após o período de 12 horas. Primeiramente, determinou-se o pH de maior estabilidade, o qual foi usado nos ensaios de estabilidade térmica.

O teste de estabilidade ao pH (Figura 17) revelou alta estabilidade da enzima livre na faixa de pH testada. Nos pHs de 5,0 e 7,0 a enzima apresentou após 12 horas atividades residuais de 94% e 96%, respectivamente.

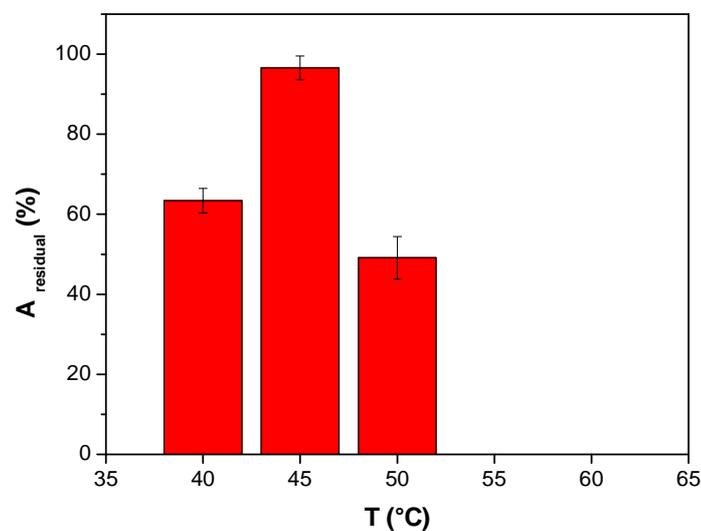
Figura 17 – Atividades residuais de β -amilase após 12 horas de encubação em diferentes valores de pH a 25°C



Fonte: Autor

O pH de 7,0 foi adotado para a realização do teste de estabilidade térmica por ter apresentado a maior atividade residual após 12 horas de encubação. Na Figura 18 não foi detectada atividade enzimática nas amostras encubadas em temperaturas de 55° e 60°C após o período de 12 horas. A temperatura de maior estabilidade da β -amilase de cevada foi em 45°C.

Figura 18 – Atividades residuais de β -amilase após 12 horas de encubação em diferentes valores de temperatura em tampão fosfato 16 mM pH 7,0



Fonte: Autor

4.3 Resultado das imobilizações

4.3.1 Imobilização em géis de quitosana

Os valores de atividade recuperada (A_r) obtidos pelos métodos de imobilização utilizando quitosana não foram satisfatórios, como listados na Tabela 8.

Tabela 8 – Rendimento de imobilização (R_i) e atividade recuperada (A_r) para os diferentes métodos de imobilização utilizando géis de quitosana

Métodos de imobilização	R_i (%)	A_r (%)
Ligação covalente	100,0 ± 0,0	6,69 ± 0,75
Adsorção simples	21,44 ± 3,36	23,34 ± 3,77
Adsorção entrecruzamento	–	0,00
Encapsulamento	–	1,06 ± 0,47

Fonte: Autor

A imobilização da β -amilase por ligação covalente em quitosana-glutaraldeído obteve R_i de 100% em 1 hora. Porém, a enzima imobilizada apresentou somente 6,69 ± 0,75% de A_r . Tavano e colaboradores (2013) também reportam baixa atividade recuperada (em torno de 17%) para β -amilase de batata-doce imobilizada em agarose ativada com glutaraldeído. Problemas difusionais do substrato macromolecular, impedimento estérico associado ao método de imobilização e mudança conformacional da estrutura tridimensional da proteína podem estar associados à baixa recuperação de atividade.

A adsorção em gel de quitosana 2% foi lenta, sendo necessário um tempo entre 5,5 a 6,75 h para se atingir o equilíbrio, com um baixo R_i (21,44 ± 3,36% da atividade oferecida). O pH de reação (pH 7,0) deveria ser favorável à adsorção de β -amilase em gel de quitosana, pois o pI da enzima é de 5,1 (EGLINTON; LANGRIDGE; EVANS, 1998; EVANS et al., 1997; MA et al., 2000) e em pH 7,0 a enzima apresenta carga líquida negativa. Além disso, em pH 7,0 os grupos aminos da quitosana (pKa entre 6,3 e 7,2, de acordo com Gonsalves et al. [2011]) estão parcialmente protonados. Assim, a interação entre grupos carboxílicos de resíduos Glu e Asp da enzima e grupos aminos da quitosana deveriam ser favoráveis. Portanto, o que poderia explicar o baixo rendimento de adsorção seria a glicosilação da β -amilase, na qual oligossacarídeos se ligam a proteínas, formando glicoproteínas. A glicosilação pode ser N-ligada (açúcares ligados ao NH_2 de resíduos de asparagina) ou O-

ligada (açúcares ligados ao OH de resíduos de serina ou treonina) (NELSON; COX, 2011). Esses oligossacarídeos (muitas vezes grandes) poderiam impedir estericamente o acoplamento amino(quitosana)-carboxil(proteína). A atividade recuperada (A_r) foi de $23,34 \pm 3,07\%$, o que mostra que toda enzima imobilizada manteve-se ativa. Entretanto, após a β -amilase adsorvida em quitosana ser submetida à reticulação com o glutaraldeído houve inativação total da atividade enzimática.

O encapsulamento da β -amilase em quitosana 1% apresentou A_r de apenas $1,06 \pm 0,75\%$. Esse baixo valor de A_r pode ter sido em parte devido à fragilidade do gel de quitosana, pois durante a filtração e lavagem do gel observou-se deformação do mesmo, o que poderia ter acarretado em lixiviação da enzima das cápsulas de gel. Entretanto, novos ensaios precisariam ser realizados a fim de se confirmar essa hipótese. Além disso, podemos atribuir parte da perda de atividade a problemas difusionais do substrato macromolecular nos poros do gel.

4.3.2 Imobilização pela técnica CLEA

Como alternativa aos métodos utilizando suporte de quitosana, que apresentaram baixas atividades recuperadas, foram realizadas imobilizações pela técnica CLEA, primeiramente utilizando BSA como proteína inerte e, posteriormente, PS para a mesma finalidade.

4.3.2.1 CLEA utilizando BSA como proteína inerte

Grande parte dos CLEA- β -BSA apresentaram atividade maior do que os métodos de imobilização utilizando quitosana. Na Tabela 9 é possível notar que a condição utilizada no ensaio 4 (solução proteica contendo 40 mg/mL de BSA e suspensão proteica com 30 mM de glutaraldeído) gerou um CLEA- β -BSA mais ativo, denominado daqui em diante de CLEA- β -BSA-4. A atividade do CLEA- β -BSA-4 foi em torno de 3,5 vezes maior do que a obtida pela imobilização por adsorção simples em quitosana, observada na Tabela 8, e tão alta quanto à obtida por Srivastava, Roy e Kayastha (2015), porém levando muito menos tempo para ser realizada. Todos os CLEAs formados nos ensaios de 1 a 10, apresentados na Tabela 9, eram de difícil manipulação e separação por centrifugação devido ao seu tamanho micrométrico.

Tabela 9 – Atividade recuperada (A_r) de β -amilase imobilizada pela técnica CLEA na presença de BSA como proteína inerte.

Ensaio	A_r (%)	Desvio (%)
1	34,19	3,33
2	54,53	0,86
3	43,24	0,38
4	82,67	5,82
5	53,12	0,08
6	33,61	0,48
7	25,75	1,20
8	0	0
9	0	0
10	0	0

Condições de imobilização: sol. proteica contendo 1 mg/mL de proteína de extrato bruto de β -amilase em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; susp. proteica composta por 1:1 (v:v) de sol. proteica e sol. sulfato de amônio 5 M. A concentração dos demais reagentes se encontra na Tabela 2. Reação em shaker a 4°C e 200 rpm por 3 horas.

Fonte: Autor

Visando melhorar as características relacionadas à manipulação e separação, foi realizado o encapsulamento das partículas de CLEA- β -BSA em alginato de cálcio. Essa técnica poderia facilitar a separação do biocatalisador por filtração, além de proteger estruturalmente as partículas de CLEA- β -BSA contra forças de cisalhamento. Entretanto, a A_r para esta combinação de técnicas foi muito baixa. O encapsulamento a partir de uma suspensão CLEA- β -BSA-4 e alginato de sódio 1% em tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,35 rendeu A_r de 13,9% e o mesmo procedimento realizado em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0 rendeu A_r de 19,4%.

Como β -amilase possui boa estabilidade na faixa de pH de 4,0 a 8,0 (Figura 14), o que poderia ter contribuído para a redução na atividade do biocatalisador é um provável problema difusional do amido (substrato macromolecular) na membrana constituída pelo polímero de alginato de cálcio, pois essa permite que somente substratos de baixa massa molecular atinjam as moléculas de enzima encapsuladas (WEETALL, 1975).

4.3.2.2 CLEA utilizando PS como proteína inerte

Como os resultados obtidos através da utilização do método CLEA para imobilizar a β -amilase de cevada foram muito satisfatórios do ponto de vista da atividade recuperada (A_r), foi proposto o uso de PS como proteína inerte em alternativa ao uso da BSA.

Na Tabela 10 são apresentados os valores de A_r da imobilização pelo método de CLEA de β -amilase na presença de PS (CLEA- β -PS), onde se observa que a condição utilizada no ensaio 2 (solução proteica contendo 30 mg/mL de PS e suspensão proteica com 30 mM de glutaraldeído) rendeu CLEA- β -PS mais ativo, denominado daqui em diante de CLEA- β -PS-2.

Tabela 10 – Atividade recuperada (A_r) de β -amilase imobilizada pela técnica CLEA na presença de PS como proteína inerte

Ensaio	A_r (%)	Desvio (%)
1	45,24	2,12
2	53,26	2,42
3	47,97	2,31
4	47,48	1,54
5	38,18	5,22
6	31,00	1,82
7	28,44	2,91
8	24,44	0,46
9	28,61	0

Condições de imobilização: sol. proteica contendo 1 mg/mL de proteína de extrato bruto de β -amilase em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0; susp. proteica composta por 1:1 (v:v) de sol. proteica e sol. sulfato de amônio 5 M. A concentração dos demais reagentes se encontra na Tabela 3. Reação em shaker a 4°C e 200 rpm por 3 horas.

Fonte: Autor

A PS apresentou limite de solubilidade quando misturada em água (solução aquosa de proteína inerte) e em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 (solução proteica), permanecendo parte do material insolúvel nas soluções. A PS é composta por mistura de proteínas com diferentes tamanhos, como demonstrado na Tabela 11, e diferentes padrões de solubilidade, sendo as albuminas solúveis em água e as globulinas solúveis em solução salina. As principais proteínas que constituem a PS são a β -conglucina (35% do total, massa molecular variando de 140 a 350 kDa, dependendo da força iônica do meio, pI de 4,64) e a glicina (25-35% do total, massa molecular média de 350 kDa, pI dos polipeptídeos ácidos 4,75-5,4 e pI dos polipeptídeos básicos 8,0-8,5). A maior parte das proteínas que compõe PS é insolúvel em água no seu ponto isoelétrico (MIRANDA, 2012). Ao contrário, a BSA (massa molecular de 66,5 kDa e pI de 4,7, segundo Peng, Hidajat, Uddin [2005]) foi totalmente solúvel em água.

Tabela 11 – Composição da PS em relação ao tamanho das proteínas

Faixa de tamanho das proteínas (kDa)	< 0,57	0,57 a 12,40	12,4 a 29,0	29,0 a 66,0	66,0 a 200	200 a 669	> 669
Distribuição dos tamanhos (%)	23,83	5,98	19,68	33,19	14,97	0	2,36

Fonte: Análise realizada por técnicos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos

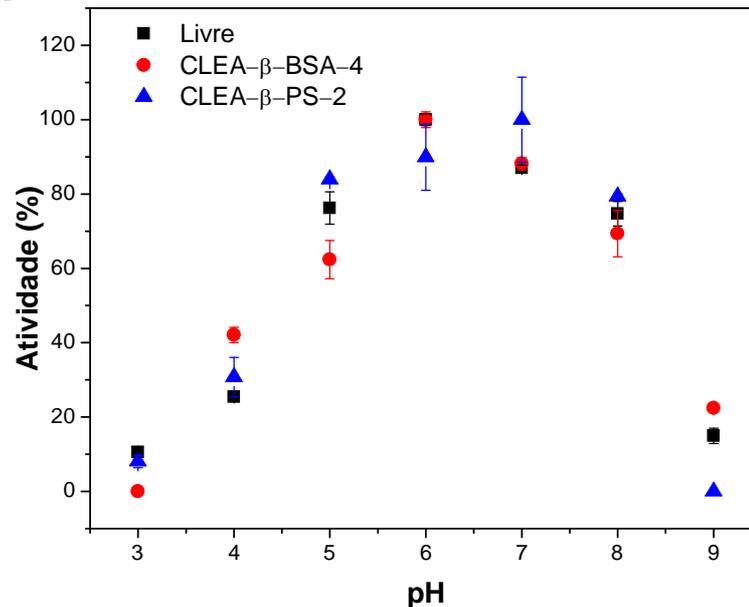
Embora o CLEA- β -PS-2 tenha apresentado atividade recuperada 1,6 vezes menor comparado ao CLEA- β -BSA-4, todos os CLEAs preparados com PS eram mais facilmente manipulados do que aqueles preparados com BSA. Os CLEA- β -PSs possuíam aspecto gelatinoso e eram visivelmente maiores que os CLEA- β -BSAs. Além disso, sedimentavam em alguns minutos e quando submetidos à centrifugação, agregavam-se facilmente em uma única unidade, sendo o mesmo não observado para os CLEA- β -BSAs.

4.4 Influência da temperatura e pH nos CLEA- β -BSAs e CLEA- β -PSs

Por apresentarem as melhores atividades recuperadas (A_r), decidiu-se estudar as influências do pH e da temperatura na atividade catalítica e na estabilidade do CLEA- β -BSA-4 e do CLEA- β -PS-2.

Os perfis de atividade enzimática dos CLEAs de β -amilase em função do pH foram similares ao perfil da enzima livre, como mostra a Figura 19. Os valores de pH_o do CLEA- β -BSA-4 e CLEA- β -PS-2 foram respectivamente 6,0 e 7,0. O leve deslocamento do pH_o de 6,0 (referente à enzima livre) para 7,0 no CLEA- β -PS-2 pode ter ocorrido devido a uma alteração do microambiente próximo à enzima imobilizada, promovida pela PS (por ser uma mistura heterogênea que contém proteínas de diferentes tipos e tamanhos), de forma que a concentração de íons H^+ nesse microambiente fosse diferente da concentração no seio da solução ou no macroambiente (efeitos eletrostáticos ou de partição). Se o microambiente da enzima imobilizada é carregado negativamente, a concentração de íons H^+ será maior que a do macroambiente, deslocando o perfil pH-atividade para valores mais alcalinos (BLANCH; CLARK, 1997). Entretanto, os perfis de pH e as barras de erros mostrados na Figura 19 sugerem estudos adicionais para a comprovação deste fenômeno, pois, outros trabalhos, Srivastava, Roy e Kayastha (2015) e Tavano et al. (2013), também reportam deslocamento de pH_o para β -amilases imobilizadas.

Figura 19 – Perfis de atividade de β -amilase livre, CLEA- β -BSA-4 e CLEA- β -PS-2 em função do pH

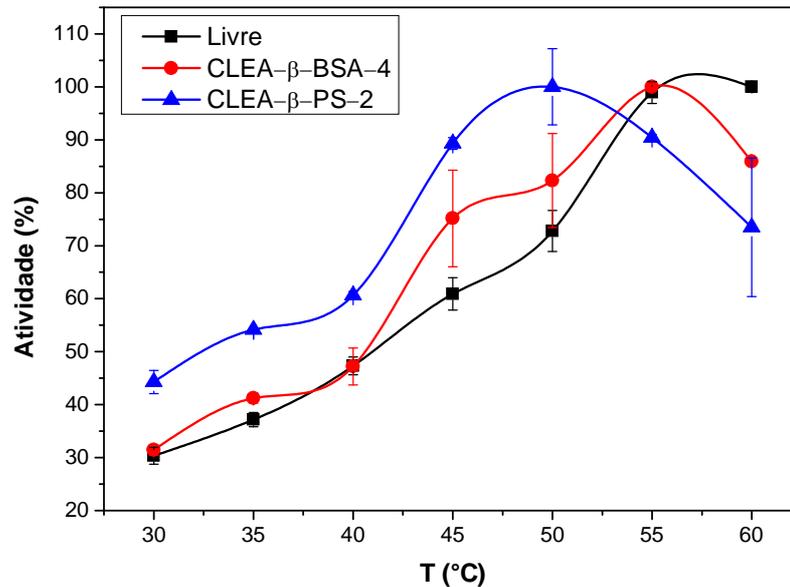


Ensaio realizado com solução de amido solúvel 1% (m/v), preparado em tampões de concentração igual a 16 mM a 20°C.

Fonte: Autor.

A temperatura ótima (T_o) dos CLEAs foi inferior a da enzima livre, como apresentado na Figura 20. Os valores de T_o para o CLEA- β -BSA-4 e o CLEA- β -PS-2 foram respectivamente 55° e 50°C. A diferença entre os valores de T_o dos CLEAs em relação à enzima solúvel poderia ser atribuída aos diferentes microambientes das enzimas imobilizadas, pois nesses o pH deve ser diferente ao pH da solução (pH 4,8) no qual a enzima solúvel foi avaliada (ELDIN et al., 1999; SOMERO, 1978). Outros motivos para a diminuição da T_o em relação à enzima livre serão discutidos mais adiante, depois de serem analisados os comportamentos dos CLEAs em relação à estabilidade ao pH e térmica.

Figura 20 – Perfis de atividade de β -amilase livre, CLEA- β -BSA-4 e CLEA- β -PS-2 em função da temperatura.

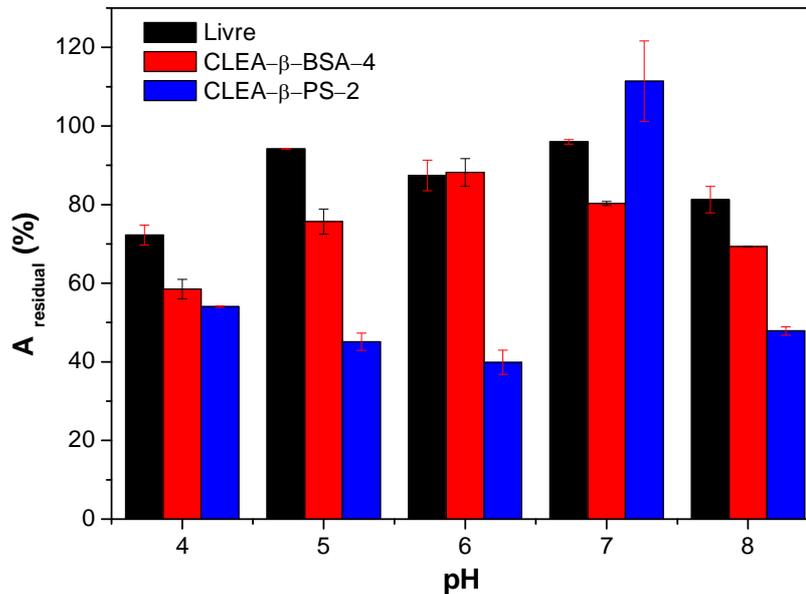


Ensaio realizado com solução tampão acetato de sódio 16 mM pH 4,8 contendo 1% (m/v) de amido solúvel.

Fonte: Autor

Após 12 horas de incubação, o CLEA- β -BSA-4 mostrou maior estabilidade ao pH no valor de pH 6,0 e apresentou perfil similar ao da β -amilase livre (Figura 21). O CLEA- β -PS-2 apresentou alta estabilidade em pH 7,0. Fora de seus valores de pH mais estáveis, os CLEAs apresentaram estabilidade ao pH inferior ao da enzima livre. Este fato pode ser também consequência da perda de cofatores ou/e coenzimas contidas no extrato bruto da β -amilase de cevada, que auxiliavam na estabilidade da enzima, possivelmente causada durante a etapa de lavagem do processo de obtenção dos CLEAs. É possível notar também que no valor de pH 5,0 a estabilidade da enzima livre (94,2%) é maior que a do CLEA- β -BSA-4 (75,7%), que é maior que a do CLEA- β -PS-2 (45,1%), o que pode ter contribuído para os valores de T_0 apresentados na Figura 20, já que o ensaio foi realizado em pH 4,8 (valor muito próximo do pH de 5,0 do ensaio de estabilidade ao pH).

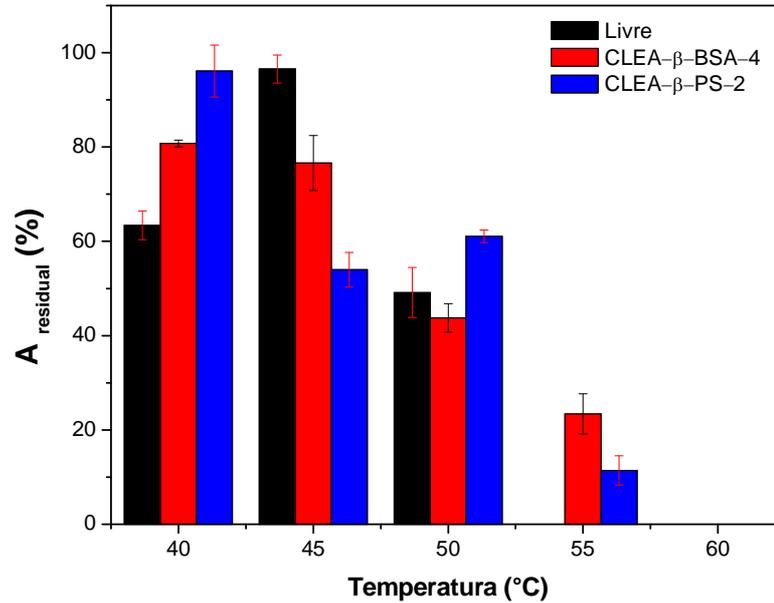
Figura 21 – Atividades residuais de β -amilase após 12 horas de encubação em diferentes valores de pH a 25°C



Fonte: Autor

Para o ensaio de estabilidade térmica, cujos resultados se encontram na Figura 22, o CLEA- β -BSA-4 foi encubado em tampão fosfato de sódio pH 6,0 e o CLEA- β -PS-2 foi encubado em tampão fosfato de sódio pH 7,0, ambos por 12 horas em shaker a 200 rpm. Assim como observado na comparação dos perfis de temperatura da Figura 20, onde a enzima livre teve T_0 maior que os CLEAs, a temperatura de maior estabilidade térmica da enzima livre também foi maior que a temperatura dos CLEAs. O CLEA- β -BSA-4 apresentou maior valor de atividade recuperada (80,7%) na temperatura de 40°C, assim como o CLEA- β -PS-2 (96,1%). Na temperatura de 55°C é possível perceber um aumento na estabilidade térmica promovida pela técnica de CLEA (SHELDON, 2011), já que a enzima livre se encontrava completamente inativada nesta temperatura. Este fato pode ser atribuído a uma rigidificação supramolecular das cadeias proteicas da β -amilase e da proteína inerte empregada (BSA ou PS), causada pela reticulação com o glutaraldeído.

Figura 22 – Atividades residuais de β -amilase livre e imobilizada após 12 horas de incubação em diferentes valores de temperatura e pH 6,0 (CLEA- β -BSA-4) e pH 7,0 (β -amilase solúvel e CLEA- β -PS-2).



Fonte: Autor

4.5 Produção de maltose a partir de amido

A produção de maltose a partir de amido foi catalisada por β -amilase livre e imobilizada (36 U/L) em reator de fluxo em vórtices (RFV) operando em regime turbulento (agitação de 900 rpm do cilindro interno, suficiente para que ocorresse a suspensão total das partículas de CLEA) e em condições ótimas de temperatura e pH.

A escolha do CLEA para essa etapa teve como base os resultados de atividade recuperada, os testes de influência do pH e temperatura no biocatalisador (dados resumidos e apresentados na Tabela 12), e sua facilidade de manipulação. A atividade recuperada de imobilização (A_r) do CLEA- β -BSA-4 foi maior que a do CLEA- β -PS-2. Entretanto, comparando os valores de atividade residual apresentados pelos CLEAs nos testes de estabilidade, é possível visualizar maior estabilidade ao pH e térmica do CLEA- β -PS-2. Além disso, o CLEA- β -PS-2 era de mais fácil manipulação e separação do que o CLEA- β -BSA-4, como comentado no item 4.3.2.2. Assim, foi escolhido o CLEA- β -PS-2 para ser utilizado na produção de xarope de maltose a partir de amido catalisada por β -amilase imobilizada.

Tabela 12 – Comparativo dos melhores resultados para a β -amilase livre, imobilizada em CLEA-BSA e CLEA-PS

	Livre	CLEA- β -BSA-4	CLEA- β -PS-2
Atividade imobilizada (%)	–	82,67 \pm 5,82	53,26 \pm 2,42
pH ótimo	6,0	6,0	7,0
Temperatura ótima (°C)	57	55	50
pH mais estável	5,0 e 7,0	6,0	7,0
Atividade após encubação por 12h em pH mais estável (%)	94,19 \pm 0,02 e 95,99 \pm 0,60	88,18 \pm 3,54	111,41 \pm 10,23
Temperatura mais estável (°C)	45	40	40
Atividade após encubação por 12h em temperatura mais estável (%)	96,47 \pm 2,97	80,75 \pm 0,75	96,12 \pm 5,50

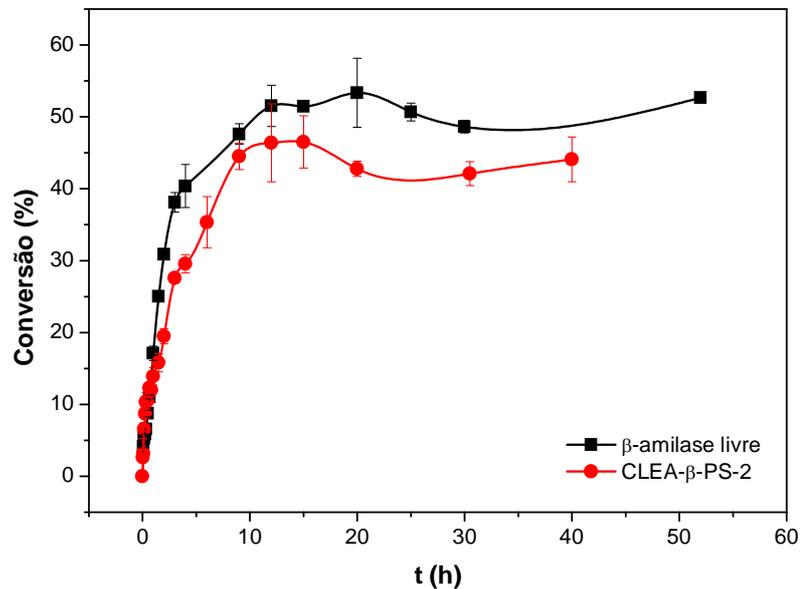
Fonte: Autor

As condições de pH e temperatura para a reação de hidrólise do amido catalisada por β -amilase livre foram pH 7,0 e temperatura de 45°C. A hidrólise catalisada pelo CLEA- β -PS-2 foi realizada em pH 7,0 e 40°C. Para a condição de pH 7,0 foi utilizado tampão fosfato de sódio 50 mM. Foram realizados ensaios de hidrólise utilizando como substrato amido solúvel comercial, amido residual do bagaço da Ind. 1 e amido residual da casca da mandioca. As conversões foram calculadas com base na concentração de maltose, quantificada por HPLC (exemplos de cromatogramas são mostrados no Apêndice II).

Inicialmente, o desempenho do biocatalisador CLEA- β -PS-2 foi comparado ao da enzima livre na produção de maltose a partir de amido comercial solúvel (30 g/L), com carga enzimática no reator de 1,2 U/g de amido. A Figura 23 mostra que os perfis de hidrólise foram similares, atingindo conversões máximas após 12 h de 51,5 \pm 2,9% e 46,4 \pm 5,4%, respectivamente para β -amilase solúvel e imobilizada. Yoshigi e colaboradores (1994) reportam conversão de amido solúvel (solução 5,0 g/L em tampão acetato 50 mM, pH 5,5 e 37°C) em maltose de 57,7% utilizando β -amilase de cevada (335 U⁹/g de amido).

⁹ Uma Unidade (U) foi definida por Yoshigi e colaboradores (1994) como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de 2,4-diclorofenol por minuto a partir de 2,4-diclorofenil- β -maltopentosídeo.

Figura 23 – Conversão de amido comercial em maltose em RFV (900 rpm) utilizando β -amilase livre (45°C e pH 7,0) e CLEA- β -PS-2 (40°C e pH 7,0), solução de amido comercial 30 g/L e 1,2 U/g de amido.



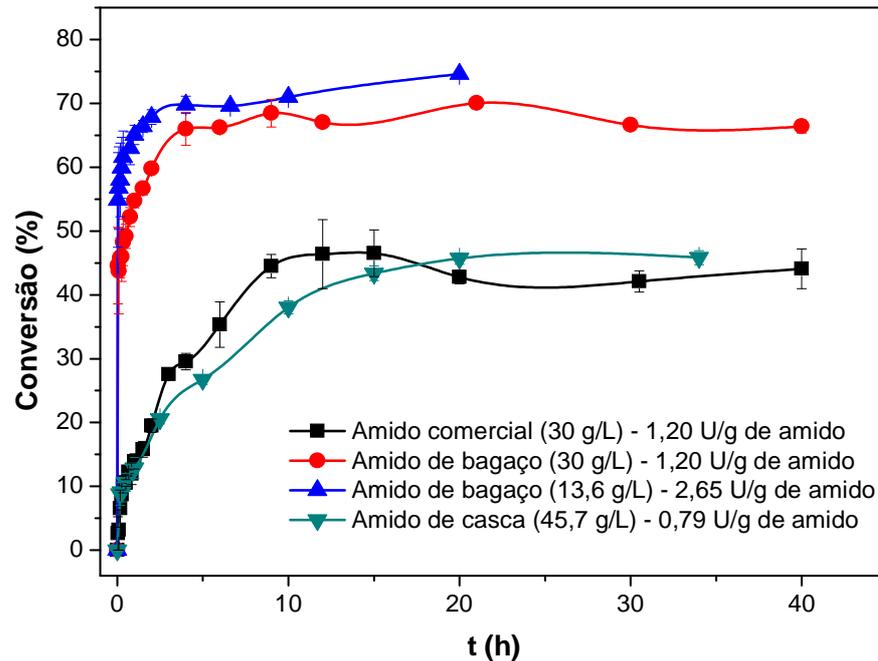
Fonte: Autor

As conversões de amido de bagaço da Ind.1 extraído por via enzimática (amido hidrolisado por α -amilase) foram superiores às obtidas com amido solúvel comercial, ou seja, 67% e 46,4% em 12 h, respectivamente (Figura 24) ou num curto período de tempo (4 h) 66% e 29,5%, respectivamente. Esse melhor desempenho pode ser explicado pela dextrose equivalente (DE) de cada substrato. O amido solúvel comercial possui DE muito baixa, próxima de zero, indicando cadeias polissacarídicas de alta massa molecular, enquanto a DE do amido extraído por via enzimática era de 15,88 (valor calculado de acordo com a Equação 20), indicando cadeias polissacarídicas de menor massa molecular e, portanto, mais disponíveis para a atuação da enzima β -amilase.

Utilizando amido hidrolisado com menor concentração (13,6 g/L, DE de 15,88) e maior carga enzimática (2,65 U/g de amido), conversão de aproximadamente 70% foi obtida em 4 h de reação, valor muito próximo ao obtido com amido hidrolisado 30 g/L.

Esses resultados mostram o potencial de aplicação do biocatalisador CLEA- β -PS-2 na produção de xarope de maltose a partir de amido residual do bagaço de mandioca.

Figura 24 – Conversão de amido em maltose em RFV (900 rpm) utilizando CLEA- β -PS-2 a 40°C, pH 7,0.



Fonte: Autor

Foi realizado também um ensaio de produção de maltose utilizando amido residual da casca de mandioca na concentração de 45,7 g/L (DE de 7,07) e CLEA- β -PS-2, sendo observada uma conversão de 45,7% de amido em maltose em 20 horas. A menor conversão comparada à obtida com amido extraído do bagaço deve-se, provavelmente, a menor DE do amido extraído da casca de soja e a menor carga enzimática por grama de amido (0,79 U/g). Esses resultados evidenciam a importância em se avaliar a DE do substrato, bem como a relação enzima/substrato (U/g de amido), na produção de xarope de maltose, pois as maiores produtividades de maltose (2,5 a 5,2 kg/m³·h, Tabela 13) foram obtidas com amido extraído de bagaço de mandioca, que possuíam valores mais altos de DE (15,88).

Em todos os ensaios realizados com β -amilase (livre ou imobilizada) não se detectou liberação de glicose (como é possível observar nos cromatogramas de HPLC apresentados no Apêndice II), confirmando a alta especificidade da enzima na produção de xarope de maltose de alta qualidade.

Tabela 13 – Produtividades e produtividades específicas de produção de xarope de maltose a partir de amido em RFV catalisada por β -amilase livre ou imobilizada (CLEA- β -PS-2)

Enzima e substrato	Conversão considerada (%)	Tempo de conversão considerado (h)	Produtividade de (kg/m ³ .h)	Produtividade específica (kg/U.h)
β -amilase livre e amido comercial 30 g/L (DE \approx 0)	51,54	12	1,35	$3,74 \times 10^{-5}$
CLEA- β -PS-2 e amido comercial 30 g/L (DE \approx 0)	46,38	12	1,21	$3,37 \times 10^{-5}$
CLEA- β -PS-2 e amido bagaço 30 g/L (DE = 15,88)	66,00	4	5,17	$14,37 \times 10^{-5}$
CLEA- β -PS-2 e amido bagaço 13,6 g/L (DE = 15,88)	69,77	4	2,49	$6,91 \times 10^{-5}$
CLEA- β -PS-2 e amido casca 45,7 g/L (DE = 7,07)	45,69	20	1,09	$3,03 \times 10^{-5}$

Fonte: Autor

4.6 Ensaios de reuso do CLEA- β -PS-2

Para os ensaios de reuso do biocatalisador, foram realizados ciclos de 12 horas em RFV usando amido extraído do bagaço de mandioca da Ind. 1 nas concentrações de 8,2 e 13,2 g/L, usando cargas enzimáticas de 4,39 e 2,73 U/g de amido, respectivamente. A recuperação do biocatalisador foi realizada de duas formas, centrifugação e sedimentação, respectivamente para os ensaios com amido nas concentrações de 8,2 e 13,2 g/L.

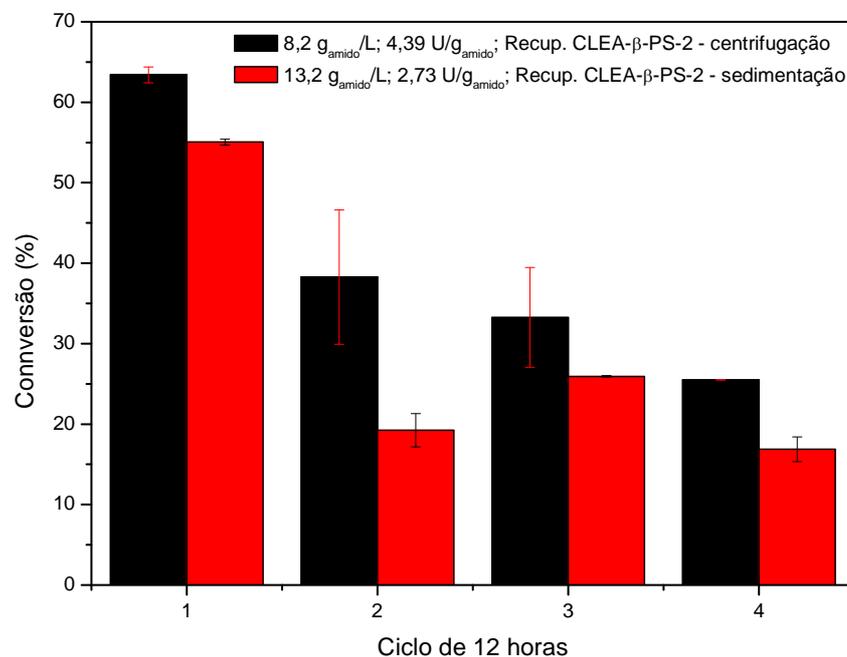
A Figura 25 mostra as conversões de amido em maltose para cada reuso do CLEA- β -PS-2, onde se observa uma redução significativa da conversão da primeira para a segunda batelada. Parte dessa redução pode estar associada à perda de biocatalisador entre as bateladas, pois com a recuperação por centrifugação observou-se redução em torno de 40% na conversão da primeira para a segunda batelada, e com a recuperação por sedimentação observou-se redução em torno de 65% na conversão. Fica evidente, que a melhor forma de recuperação dos CLEAs de β -amilase é por centrifugação, pois a sedimentação, no tempo considerado (10 minutos) pode levar a perda de biocatalisador, principalmente as partículas de menor tamanho. Entretanto, aumentando-se o tempo de sedimentação pode-se reduzir perda de biocatalisador.

Para as demais bateladas, as conversões se mantiveram aproximadamente constantes, particularmente para recuperação do biocatalisador por sedimentação (conversão em média de 20%), na qual as partículas menores poderiam ter sido perdidas na primeira etapa de recuperação do biocatalisador, preservando somente as partículas maiores, mais facilmente sedimentáveis no tempo de 10 minutos. De fato, observou-se que entre as bateladas,

recuperando o biocatalisador por sedimentação, a quantidade de sólidos no reator se mantinha aparentemente constante. Com a recuperação do biocatalisador por centrifugação, a conversão para as demais bateladas sofreu uma redução gradativa, atingindo aproximadamente 38, 33 e 26% para a segunda, terceira e quarta bateladas, respectivamente. Neste caso, observou-se que a centrifugação removia, além do biocatalisador, outras partículas suspensas no meio reacional, ocasionando um pequeno acúmulo de material insolúvel no reator.

Além dos problemas reportados anteriormente, outra possível causa para a redução da conversão com o reuso do biocatalisador deve-se, eventualmente, a lixiviação de moléculas de enzima do CLEA para o meio reacional. Esse problema, se existente, poderá ser corrigido otimizando a etapa de entrecruzamento com glutaraldeído na preparação do CLEA- β -PS-2 para evitar perda de enzima por lixiviação. Entretanto, independentemente dos problemas levantados acima, esse trabalho mostrou que a técnica de CLEA é muito eficiente para a imobilização de β -amilase, apresentando alta eficiência na produção de xarope de maltose a partir de amido residual de bagaço de mandioca.

Figura 25 – Ensaio de reuso do CLEA- β -PS-2 na produção de maltose a partir de amido extraído do bagaço de mandioca em RFV a 40°C, pH 7, em ciclos de 12 horas.



Recuperação do biocatalisador por centrifugação ou sedimentação.

Fonte: Autor

5 CONCLUSÕES

Os bagaços e a casca de mandioca utilizados neste trabalho exibiram elevado teor de amido (respectivamente, 46-49 e 55%, massa seca), o qual pode ser extraído por via enzimática e transformado em produtos com alto valor agregado. Além disso, após a extração do amido, os resíduos sólidos gerados ainda apresentavam potencial de aplicação industrial devido ao elevado teor de material lignocelulósico. Dessa forma, os resíduos da extração mecânica de amido da mandioca poderiam ter outras aplicações além das atuais, que são o uso como fonte amilácea em rações animais, fertilizantes naturais ou compostagem em aterros sanitários.

A enzima selecionada para este trabalho (β -amilase de cevada), na forma de extrato bruto, apresentou massa molecular de 56,23 kDa, temperatura em 57°C, pH ótimo de 6,0 e boa estabilidade em uma faixa de pH de 4,0 a 8,0 (25°C) e na temperatura de 45°C (pH 7,0).

Dentre os métodos de imobilização estudados, a técnica de CLEA mostrou-se mais promissora para a imobilização de β -amilase de cevada. Variando-se a concentração de proteína inerte (BSA ou PS) e a concentração de glutaraldeído, pode-se obter β -amilases imobilizadas com atividades recuperadas de aproximadamente 83% e 53% (usando BSA e PS, respectivamente).

Os biocatalisadores CLEA- β -BSA-4 e CLEA- β -PS-2 apresentaram perfis de pH-atividade similares ao da enzima solúvel, com pH ótimo ao redor de 6,0 e 7,0. Os CLEAs apresentaram valores de temperatura ótima inferiores ao da enzima livre, 55 e 50°C, respectivamente. Os CLEAs foram mais sensíveis à variação de pH, mostrando-se mais estáveis em pH 6,0 (CLEA- β -BSA-4) e pH 7,0 (CLEA- β -PS-2). Quanto à temperatura, os CLEAs mostraram-se mais estáveis do que a enzima livre, apresentando atividade à 55°C após encubação de 12 horas, enquanto a enzima livre era totalmente inativada. Comparando as duas condições estudadas de síntese de CLEAs, o CLEA- β -BSA-4 obteve melhor atividade recuperada de imobilização (A_r) e maior valor de temperatura ótima, já o CLEA- β -PS-2 perdeu menos atividade nos seus valores de temperatura e pH mais estáveis, e possuía características físicas que facilitavam sua manipulação e separação, sendo escolhido para os ensaios de produção de maltose a partir de amido residual do processamento de mandioca.

CLEA- β -PS-2 e β -amilase livre apresentaram desempenho similar na conversão de amido comercial em maltose, mostrando que a enzima imobilizada não apresentava (ou muito pouco) limitação difusional intrapartícula. A produção de maltose a partir de amido residual do bagaço em reator de fluxo em vórtices (RFV), catalisada por CLEA- β -PS-2, atingiu altos

valores de conversão (até 70% em 4 horas) e elevada produtividade (5,2 kg/m³.h). Além do bagaço, a casca de mandioca mostrou-se um substrato em potencial para a produção de maltose.

Apesar de alguns problemas de separação e recuperação do biocatalisador, tanto por centrifugação como por sedimentação, os resultados desse trabalho mostraram a possibilidade de reuso do CLEA- β -PS-2 na produção de maltose a partir de amido extraído do bagaço de mandioca. Entretanto, ainda é necessário um trabalho de otimização da etapa de separação/recuperação do biocatalisador por sedimentação ou centrifugação para o seu reuso.

Neste trabalho foi possível mostrar que o emprego de um reator de fluxo em vórtices (RFV), a utilização do bagaço e casca de mandioca como fonte amilácea e o uso de CLEA- β -PS-2 como biocatalizador na produção de maltose são alternativas altamente viáveis.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ainda existem questões que não puderam ser abordadas neste trabalho e poderiam ser estudadas em futuros trabalhos, dentre eles:

- a) Determinação dos parâmetros de temperatura e pH ótimos da β -amilase purificada;
- b) Determinação dos parâmetros cinéticos dos CLEAs de β -amilase e da enzima livre;
- c) Determinação do tamanho e da porosidade dos CLEAs de β -amilase, preparados com e sem proteína inerte (BSA e/ou proteína de soja);
- d) Estudo da influencia na atividade imobilizada do CLEA- β -PS das diferentes proteínas contidas na proteína isolada de soja variando as faixas de tamanho de proteínas usadas para compor os CLEA- β -PSs;
- e) Estudo da influência da técnica de CLEA em camada utilizado BSA e proteína isolada de soja na atividade imobilizada, nos parâmetros de temperatura, pH e cinéticos da enzima imobilizada;
- f) Comparação do uso do reator de fluxo em vórtices com o uso de reator batelada convencional frente à conversão do amido em maltose e a diminuição do tamanho dos CLEA- β -PS antes e depois da operação;
- g) Estudo do desempenho do reator de fluxo em vórtices operando de forma contínua na conversão do amido catalisada por CLEA- β -PS.

BIBLIOGRAFIA

- AJANDOUZ, E. H. et al. Barley malt- α -amylase. Purification, action pattern, and subsite mapping of isozyme 1 and two members of the isozyme 2 subfamily using p-nitrophenylated maltooligosaccharide substrates. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1159, n. 2, p. 193-202, 1992. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167483892900259>>. Acesso em: 07 mai. 2015.
- AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia industrial: Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 2001. 4 v.
- AMARAL, L. I. V. et al. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Biodiversity Heritage Library**, v. 34, n.4, p. 425-431. 2007. Disponível em: <<http://www.biodiversitylibrary.org/part/110619>>. Acesso em: 04 mar. 2015.
- ARRUDA, E. J.; SANTANA, C. C. Resinas macroporosas de afinidade para adsorção de beta-amilase a partir de soro de soja. In. ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ADSORÇÃO, 2., mai. 1998, Florianópolis, Santa Catarina, **Anais de trabalhos apresentados**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. Disponível em: <http://enq.ufsc.br/eventos/eba98/Anais_sumario3.html>. Acesso em: 04 dez. 2013.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17. ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2002. v. 1.
- BAKER, W. L.; SMILEY, K. L. Beta-amylasesulphydryl and disulphide group reactions. Additional aspects on enzyme inhibition by ascorbic acid. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 91, n. 1, p. 25-30, jan./fev. 1985. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.1985.tb04300.x/pdf>>. Acesso em: 04 mai. 2014.
- BERNFELD, P. Amylases, α and β . **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 149-154, 1955.
- BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical engineering**. New York: Marcel Dekker Inc., 1997.
- BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. São Paulo: Blücher, 2001. 1 v.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**,

v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>>. Acesso em: 18 nov. 2014.

BRASIL. Decreto-Lei nº 6.871 de 4 de junho de 2009. Regulamenta a lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, p. 20, 5 de jun. 2009.

Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm>. Acesso em: 24 set. 2013.

BRENA, B. M.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes. In: GUIBAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**, 2ª ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2006.

CALDAS NETO, S. F. et al. Mandioca e resíduos das farinheiras na alimentação de ruminantes: digestibilidade total e parcial. **Revista brasileira de zootecnia**, v. 29, n. 7, p. 2099-2108, 2000. Disponível em:

<<http://www.revistasbz.org.br/scripts/revista/sbz1/Artigos/2873.pdf>>. Acesso em: 17 set. 2013.

CAO L.; VAN LANGENY L.; SHELDON R. A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 387-394, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095816690300096X>>. Acesso em: 13 out. 2013.

CARGILL. **Xaropes de alta maltose**. Disponível em:

<<http://www.cargillfoods.com/lat/pt/produtos/xaropes-de-alta-maltose/index.jsp>>. Acesso em: 15 nov. 2013.

CARVALHO, J. O. M.; CEREDA, M. P. **Subprodutos da mandioca** - composição dos resíduos sólidos. Porto Velho, RO, dez. 2005. Disponível em:

<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/24804/1/folder-mandioca.pdf>>. Acesso em: 07 out. 2014.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA (CEPEA). **Safra atual de mandioca deve ser a menor em 10 anos**. Piracicaba, jul. 2013a. Disponível em:

<<http://cepea.esalq.usp.br/imprensa/?page=339>>. Acesso em: 11 set. 2013.

_____. **Produção de fécula fica estagnada e margem diminui em 2012**. Piracicaba, abr.

2013b. Disponível em: <http://cepea.esalq.usp.br/pdf/Cepea_CensoFecula2013.pdf>. Acesso em: 11 set. 2013.

CHAVES, M. D. **Gaseificação de materiais lignocelulósicos para geração de energia elétrica**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/handle/1/3473>>. Acesso em: 20 nov. 2014.

CHEMMÉS, C. S. et al. Estudo de métodos físico-químicos no pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração. In: SEMINÁRIO ESTUDANTIL DE PRODUÇÃO ACADÊMICA, 12., 2013, Salvador, **Anais eletrônicos...** Disponível em: <<http://www.revistas.unifacs.br/index.php/sepa/article/view/2816>>. Acesso em: 20 nov. 2014.

COHEN, S.; MARON, D. M. Experimental and theoretical study of a rotating annular flow reactor. **The Chemical Engineering Journal**, v. 27, n. 2, p. 87-97, 1983. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0300946783800550>>. Acesso em: 19 mai. 2015.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Prospectiva para a agropecuária**: Volume 1 – Safra 2013-2014. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 17 set. 2013.

CORRADINI, E. et al. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 268-273, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282005000400011>>. Acesso em: 03 set. 2014.

CORREIA, J. **Atividade enzimática**. 03 mar. 2010. Disponível em: <<http://essenciadavidajulianacorreia.blogspot.com.br/2010/05/atividade-enzimatica.html>>. Acesso em: 09 out. 2014.

DI PRIMA, R. C.; SWINNEY, H. L. Instabilities and transition in flow between concentric rotating cylinders. In: SWINNEY, H. L.; GOLLUB, J. P. **Hydrodynamic Instabilities and the Transition to Turbulence**, 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin, 1985. p. 139-180.

DIAS, B. **Amilases**. Disponível em: <<http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Enzimol%20Grad/aula9.pdf>>. Acesso em: 18 out. 2013

EGLINTON, J. K. ; LANGRIDGE, P.; EVANS, D. E. Thermostability Variation in Alleles of Barley Beta-Amylase. **Journal of Cereal Science**, v. 28, n. 3, p. 301-309, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521098900108>>. Acesso em: 13 mai. 2014.

ELDIN, M. M. S. et al. Influence of the microenvironment on the activity of enzymes immobilized on Teflon membranes grafted by g-radiation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 7, n. 5, p. 251-261, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00044-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00044-2)>. Acesso em: 21 mar. 2015.

ESSER, A.; GROSSMAN, S. Analytic expression for Taylor-Couette stability boundary. **Physics Fluids**, v. 8, n. 7, p. 1814-1818, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1063/1.868963>>. Acesso em: 28 abr. 2015.

EVANS, D. E. et al. Measurement of Beta-amylase in Malting Barley (*Hordeum vulgare* L.). I. Development of a Quantitative ELISA for Beta-amylase. **Journal of Cereal Science**, v. 26, n. 2, p. 229-239, 1997. Disponível em: <[http://www.sciencedirect-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0733521097901193#](http://www.sciencedirect.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0733521097901193#)>. Acesso em: 13 mai. 2014.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) – Trade Market Division. **Food Outlook: Global Market Analysis**. Novembro, 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/giews/english/fo/index.htm>>. Acesso em: 02 set. 2013.

_____. **Food Outlook: biannual report on global food markets**. Outubro, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/giews/english/fo/index.htm>>. Acesso em: 21 mar. 2015.

FREITAS, C. R. G. et al. Inclusão da farinha de varredura de mandioca em rações de frangos de corte, **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 155-163, 2008. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303126492004>>. Acesso em: 17 set. 2013.

FUKUDA, C.; OTSUBO, A. A. Cultivo da mandioca na região centro sul do Brasil. **Embrapa Mandioca e Fruticultura: Sistemas de Produção**, 7, jan. 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mandioca/mandioca_centrosul/cultivares.htm>. Acesso em: 02 set. 2014.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (São Carlos, SP). Roberto de Campos Giordano, Raquel de Lima Camargo Giordano, Andrea Lopes de Oliveira Ferreira. **Process for manufacturing an insoluble biocatalyst**. US n. 7648831 B2, 29 nov. 2002, 19 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.google.tl/patents/US7648831>>. Acesso em: 19 mai. 2015.

_____. Claudio Alberto Torres Suazo, Roberto de Campos Giordano, Patricia Aparecida Santiago. **Taylor Vortex Flow Bioreactor for Cell Culture**. US n. 20110117639 A1, 5 jun. 2008, 19 maio 2011. Disponível em: <<http://www.google.com.ar/patents/US20110117639>>. Acesso em: 19 mai. 2015.

GE HEALTHCARE - LIFE SCIENCES. **Amersham™ ECL™ gel box**: user manual. 2011. Disponível em: <https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1334667780708/litdoc28994333_20120420104502.pdf>. Acesso em: 27 out. 2014.

GIORDANO, R. C. et al. Analysis of a Taylor-Poiseuille vortex flow reactor I: flow patterns and mass transfer characteristics. **Chemical Engineering Science**, vol. 53, n. 20, p. 3635-3652, out. 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0009250998001791>>. Acesso em: 04 dez. 2013.

GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Taylor-Couette Vortex Flow in Enzymatic Reactors. In: GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**, 2ª ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2006.

GIORDANO, R. L. C. et al. Analysis of a Taylor-Poiseuille vortex flow reactor II: reactor modeling and performance assessment using glucose-fructose isomerization as test reaction. **Chemical Engineering Science**, vol. 55, n. 18, p. 3611-3626, out. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000925090000052X>>. Acesso em: 04 dez. 2013.

GONSALVES, A. A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000700021>. Acesso em: 19 out. 2014.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n.6, p. 1500-1503, jul. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000600026&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 04 dez. 2013.

GUISAN, J. M. Immobilization of Enzymes as the 21st Century Begins. In: _____. **Immobilization of enzymes and cells**, 2ª ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2006.

HE, J.; SONG, Z.; MA, H.; YANG, L.; GUO, C. Formation of a mesoporous bioreactor based on SBA-15 and porcine pancreatic lipase by chemical modification following the uptake of enzymes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, n. 44, p. 4307-4315, 2006. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/En/content/articlelanding/2006/jm/b606481g>>. Acesso em: 08 mar. 2015.

HOMAEI, A. A. et al. Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, n. 4, p. 185-205, ago. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12154-013-0102-9>>. Acesso em: 12 out. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo Agropecuário 2006**: Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação; Segunda apuração. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006_segunda_a_puracao/default.shtm>. Acesso em: 06 out. 2014.

KENNEDY, J. F. Enzyme technology. In: REHM, H. J.; REED, G. (Eds.). **Biotechnology: a comprehensive treatise**. Weinheim: Verlag Chemie, 1987. v. 7a.

KHAN, M. J.; KHAN, F. H.; HUSAIN, Q. Application of immobilized *Ipomoea batata* β amylase in the saccharification of starch. **Journal of Applied Biological Science**, v. 5, n. 2, p. 33-39, 2011. Disponível em: <<http://www.nobel.gen.tr/Makaleler/JABS-Issue%202-82-2011.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2014.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35 n.2-3, p. 126-139, aug. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022904001231#>>. Acesso em: 27 abr. 2014.

KRUGER et al. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. **Cell**, v. 31, n. 1, p. 147-157, nov. 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6297745>>. Acesso em: 05 mar. 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v227/n5259/pdf/227680a0.pdf>>. Acesso em: 27 jun. 2014.

MA, Y. F. et al. Comparative enzyme kinetics of two allelic forms of barley (*Hordeum vulgare* L.) beta-amylase. **Journal of Cereal Science**, v. 31, n. 3, p. 335-344, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1006/jcrs.2000.0303>>. Acesso em: 23 mar. 2014.

MAFRA, A. C. O. et al. Cross-linked enzyme aggregates of catalase from bovine liver. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20., 2014, Florianópolis, **Anais eletrônicos...** Disponível em: <http://proceedings.galoa.com.br/cobeq-2014/trabalhos/cross-linked_enzyme_aggregates_of_catalase_from_bovine_liver>. Acesso em: 20 nov. 2014.

MARTENSSON, K. Preparation of an Immobilized Two-Enzyme System, p-Amylase-Pullulanase, to an Acrylic Copolymer for the Conversion of Starch to Maltose. I. Preparation and Stability of Immobilized β -Amylase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 16, n. 5, p. 567-577, 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4857359>>. Acesso em: 27 fev. 2015.

MIKAMI B.; YOON H. J.; YOSHIGI N. The crystal structure of the sevenfold mutant of barley β -amylase with increased thermostability at 2.5 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, n. 3, p. 1235-1243, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283698923798>>. Acesso em: 28 out. 2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em: 18 nov. 2014.

MIRANDA, L. C. **Obtenção e caracterização de hidrolisados enzimáticos de proteínas do farelo de soja**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012. Disponível em: <http://www.bdtf.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=5403>. Acesso em: 20 nov. 2014.

MOORE, C. M. V. **Characterization of a Taylor-Couette vortex flow reactor**. 1994. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Instituto Tecnológico de Massachusetts, Cambridge, 1994. Disponível em: <<http://dspace.mit.edu/handle/1721.1/11654>>. Acesso em: 19 mai. 2015.

MURRAY, R. K et al. **Harper's Illustrated Biochemistry**. 26. ed. Estados Unidos da América: McGraw-Hill, 2003. 693 p.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NODA, T.; FURUTA, S.; SUDA, I. Sweet potato α -amylase immobilized on chitosan beads and its application in the semi-continuous production of maltose. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 3, p. 189-195, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861700002265>>. Acesso em: 27 abr. 2014.

NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. **Enzyme Nomenclature: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse**. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 06 mar. 2015.

NOVOZYMES. **Starch, Application Sheet**: production of maltose syrups. Dinamarca [s.n.], 2005.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 81-87, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0960-8524\(99\)00143-1](http://dx.doi.org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0960-8524(99)00143-1)>. Acesso em: 26 set. 2013.

PENG, Z. G., HIDAJAT, K., UDDIN, M. S. Selective and sequential adsorption of bovine serum albumin and lysozyme from a binary mixture on nanosized magnetic particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 282, n. 1, p. 11-17, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979704007994>>. Acesso em: 20 nov. 2014.

PERKINS, E.G. Composition of soybean and soybean products. In: ERICKSON, D. R. **Practical Handbook of soybean Processing and Utilization**. St. Louis: AOCS PRESS and United Soybean Board, 1995.

PODDAR, A.; JANA, S. C. Immobilization of hyperthermostable β amylase from *Bacillus subtilis* DJ5 into gelatin film by glutaraldehyde crosslinking. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 4, p. B77-B86, 2011. Disponível em: <http://www.ijpbs.net/vol-2_issue-4/bio_science/08.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2014.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial Enzymes: structure, function and applications**. Países Baixos: Springer, 2007.

PRADO, I. N. et al. Desempenho de novilhas alimentadas com rações contendo milho ou casca de mandioca como fonte energética e farelo de algodão ou levedura como fonte

protéica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 278-287, 2000. Disponível em: <<http://www.revista.sbz.org.br/artigo/visualizar.php?artigo=2541>>. Acesso em: 17 set. 2013.

RECEITA FEDERAL. **Produção cervejas e refrigerantes** – mensal. Disponível em: <http://gerencialpublico.cmb.gov.br/PROD_BEBIDAS_MENSAL.pdf>. Acesso em: 24 set. 2013.

RESENDE, M. R. **Proteólise enzimática de soro de queijo em reator de Taylor-Couette-Poiseuille**. 2002. 233 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 18 jul. 2002.

RIOS, G. M. et al. Enzymatic hydrolysis of cassava starch into maltose syrup in a continuous membrane reactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, França, v. 69, n. 3, p. 367-375, 1997. Disponível em: <[http://onlinelibrary-wiley-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199707\)69:3%3C367::AID-JCTB721%3E3.0.CO;2-P/pdf](http://onlinelibrary-wiley-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1002/(SICI)1097-4660(199707)69:3%3C367::AID-JCTB721%3E3.0.CO;2-P/pdf)>. Acesso em: 04 dez. 2013.

ROY, I; GUPTA, M. N. Design of Smart Biocatalysts. In: GUIBAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**, 2ª ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2006.

SALHI, Y. et al. Numerical Investigations of Passive Scalar Transport in Turbulent Taylor-Couette Flows: Large Eddy Simulation Versus Direct Numerical Simulations. **Journal of Fluids Engineering**, v. 134, n. 4, 2012. Disponível em: <doi:10.1115/1.4006467>. Acesso em: 26 mar. 2015.

SCHMIDEL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**: Engenharia bioquímica. São Paulo: Blücher, 2001. 2 v.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). **Como usar corretamente a manipueira**. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/Como-usar-corretamente-a-manipueira>>. Acesso em: 07 out. 2014.

_____. **Informações de mercado sobre mandioca**: farinha e fécula. Brasília [s.n.], 2012. Disponível em:

<[http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/5936f2d444ba1079c3aca02800150259/\\$File/4247.pdf](http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/5936f2d444ba1079c3aca02800150259/$File/4247.pdf)>. Acesso em: 04 dez. 2013.

_____. **Mandiocultura derivados da mandioca**. Salvador [s.n.], 2009. Disponível em:

<[http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/FAE92C370E44479B8325766300576F62/\\$File/NT00042B7E.pdf](http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/FAE92C370E44479B8325766300576F62/$File/NT00042B7E.pdf)>. Acesso em: 04 dez. 2013.

SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. **Organic Process Research and Development**, v.15, n. 1, p. 213-223, 2011. Disponível em: <[doi:10.1021/op100289f](https://doi.org/10.1021/op100289f)>. Acesso em: 04 mar. 2015.

SHELDON, R. A; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. M. Cross-Linked Enzyme Aggregates. In: GUIBAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**, 2ª ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 2006.

SIGMA-ALDRICH. **Enzymatic Assay of β -AMYLASE** (EC 3.2.1.2). Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-beta-amylase.html>>. Acesso em: 20 fev. 2014.

SILVA, F. M.; LACERDA, P. S.; JONES Jr., J. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 103-110, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000100019>>. Acesso em: 07 mar. 2015.

SILVA, I. T.; SILVA, I. M. O.; ROCHA, B. R. P. Geração de energia a partir de resíduos de mandioca para agricultura familiar no Estado do Pará.. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 4., 2002, Campinas. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC000000002200200200005&lng=en&nrm=abn>. Acesso em: 07 out. 2014.

SILVA JÚNIOR, J. G. **Eletroforese de proteínas**: guia teórico-prático. Rio de Janeiro: Interciência, 2001.

SISTEMA DE CONTROLE DE PRODUÇÃO DE BEBIDAS (SICOBE). **Produção Cervejas e Refrigerantes**: Mensal. Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/pessoajuridica/bebidas/SistContrProdSicobe.htm>>. Acesso em: 24 set. 2013.

SNOW, P; O'DEA, K. Factors affecting the rate of hydrolysis of starch in food. **American Society for Clinical Nutrition**, v.34, n. 12, p. 2721-2727, 1981. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6172034>>. Acesso em: 04 mar. 2015.

SOMERO, G. N. Temperature Adaptation of Enzymes: Biological Optimization Through Structure-Function Compromises. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 9, p 1-29, 1978. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2096741>>. Acesso em: 21 mar. 2015.

SRIROTH, K. et al. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 1, p. 63-69, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0960-8524\(99\)00051-6](http://dx.doi.org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0960-8524(99)00051-6)>. Acesso em: 26 set. 2013.

SRIVASTAVA, G.; ROY, S.; KAYASTHA, A. M. Immobilisation of Fenugreek β -amylase on chitosan/PVP blend and chitosan coated PVC beads: a comparative study. **Food Chemistry**, v. 172, n. 1, p. 844-851, 2015. Disponível em: <[doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.145](http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.145)>. Acesso em: 18 nov. 2014.

SUPERINTENDÊNCIA DA ZONA FRANCA DE MANAUS. **Projeto potencialidades regionais** - Estudo de viabilidade econômica: amido de mandioca. Manaus, 2003 Disponível em: <http://www.suframa.gov.br/suframa_publicacoes_projpotregionais.cfm>. Acesso em: 05 mar. 2015.

SVENSSON, B. et al. Partial amino acid sequences of α -amylase isozymes from barley malt. **Carlsberg Research Communications**, v. 50, n. 1, p. 15-22, 1985. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF02910534>>. Acesso em: 07 mai. 2015.

TALEKAR, S.; JOSHI, A.; JOSHI, G.; KAMAT, P.; HARIPURKAR, R.; KAMBLE, S. Parameters in preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs). **RSC Advances**, n. 3, p. 12485-12511, 2013. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/ra/c3ra40818c#!divAbstract>>. Acesso em: 08 mar. 2015.

TAVANO, O. L. et al. Optimization of the immobilization of sweet potato amylase using glutaraldehyde-agarose support. Characterization of the immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1054-1058, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.05.009>>. Acesso em: 14 mar. 2014.

VIEIRA, D. C. et al. Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 54-64, dec. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X13002775>>. Acesso em: 04 mai. 2014.

VIEIRA, L. M. et al. **Fatores que afetam a competitividade das farinheiras e polvilheiras na agricultura familiar catarinense**. Santa Catarina [s.n.], 2002. Disponível em: <<http://www.aimsc.com.br//index.php?codpagina=00038157>>. Acesso em: 01 out. 2014.

VERÍSSIMO, L. A. A. **Métodos de imobilização de enzimas e ativação de suportes**. 2012. Disponível em :

<[http://www.researchgate.net/publication/256202459 Mtdos de imobilizao de enzimas e ativao de suportes](http://www.researchgate.net/publication/256202459_Mtdos_de_imobilizao_de_enzimas_e_ativao_de_suportes)>. Acesso em: 04 mai. 2014.

VRETBLAD, P; AXEN, R. Preparation and Properties of an Immobilized Barley β -Amylase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 4, p. 783-794, 1973. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.260150410/>>. Acesso em: 27 fev. 2015.

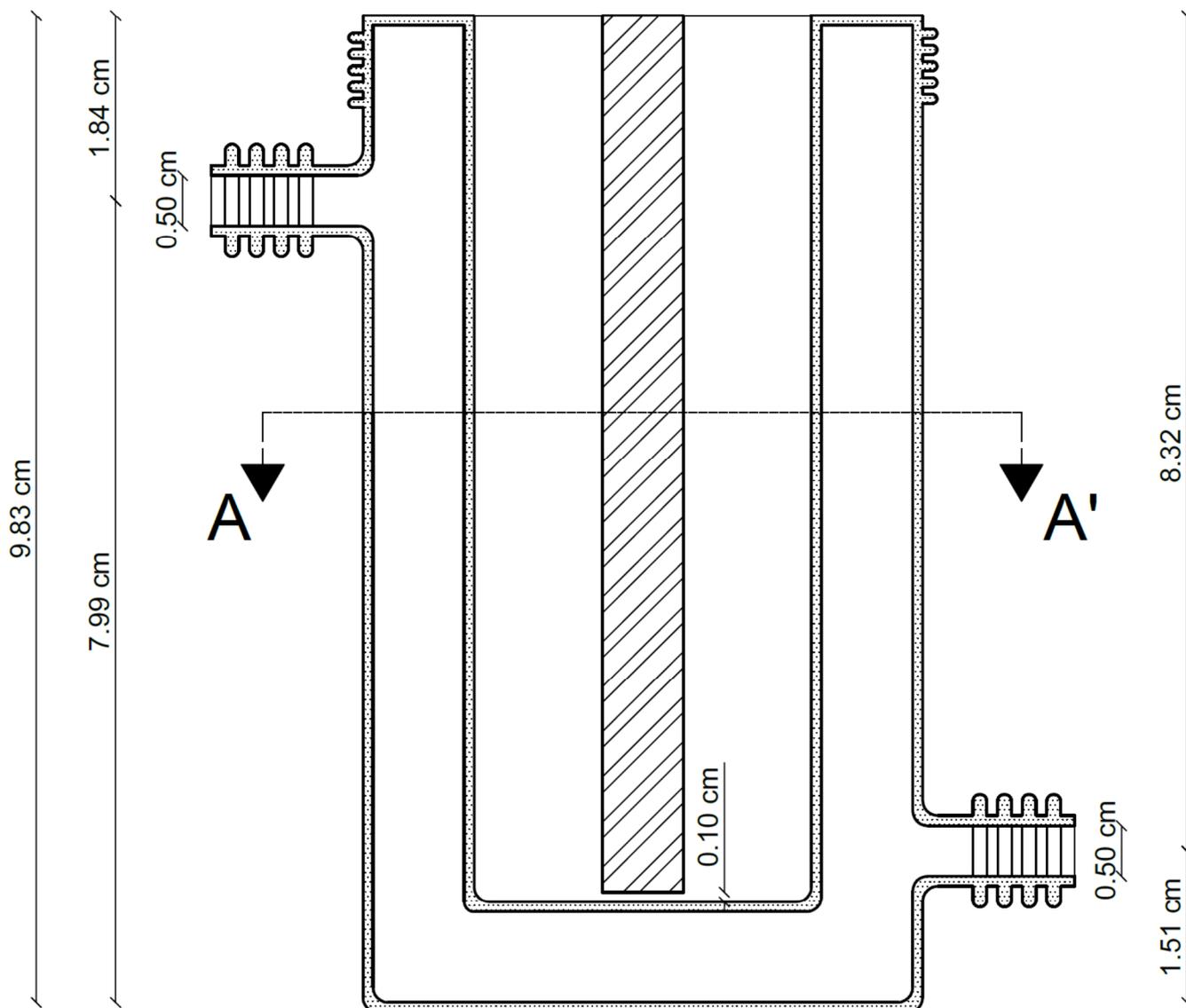
WEETALL, H. H. Immobilization by covalent attachment and by entrapment. In MESSING, R. A. (Ed.) **Immobilized Enzymes for Industrial Reactors**. New York: Academic Press Inc., 1975.

YOSHIGI, N. et al. Construction of a Plasmid Used for the Expression of a Sevenfold-Mutant Barley β -Amylase with Increased Thermostability in Escherichia coli and Properties of the Sevenfold-Mutant β -Amylase. **The Journal of Biochemistry**, v. 118, n. 3, p. 562-567, 1995. Disponível em : <<http://jb.oxfordjournals.org/content/118/3/562.short>>. Acesso em: 07 mar. 2015.

_____. Expression in Escherichia coli of cDNA encoding barley beta-amylase and properties of recombinant beta-amylase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 58, n. 6, p. 1080-1086, 1994. Disponível em : <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1271/bbb.58.1080>>. Acesso em: 07 mar. 2015.

APÊNDICE I – Dimensões do Reator de Fluxo em Vórtices tipo batelada

Projeto: Rafael de Araujo Silva
Desenho: Angélica M. de Oliveira
Escala 15:1



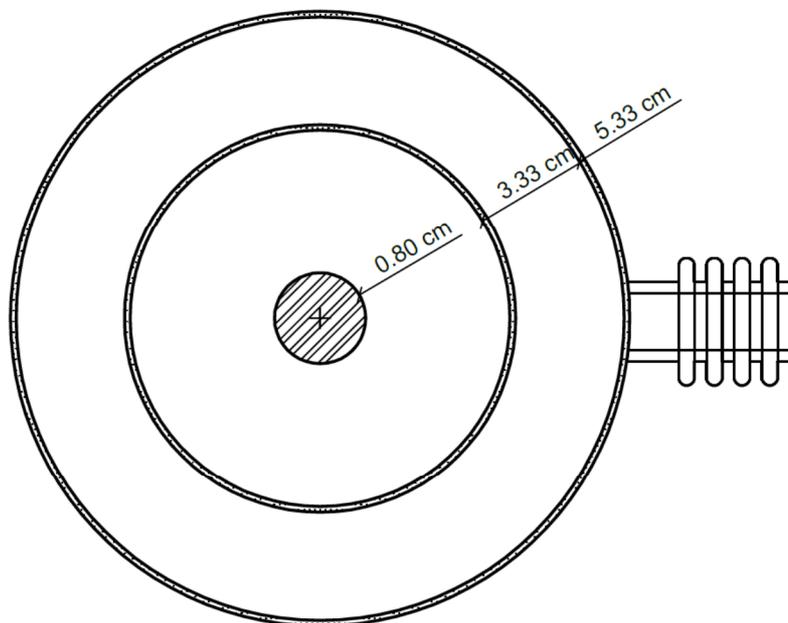
CORTE A-A'



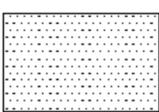
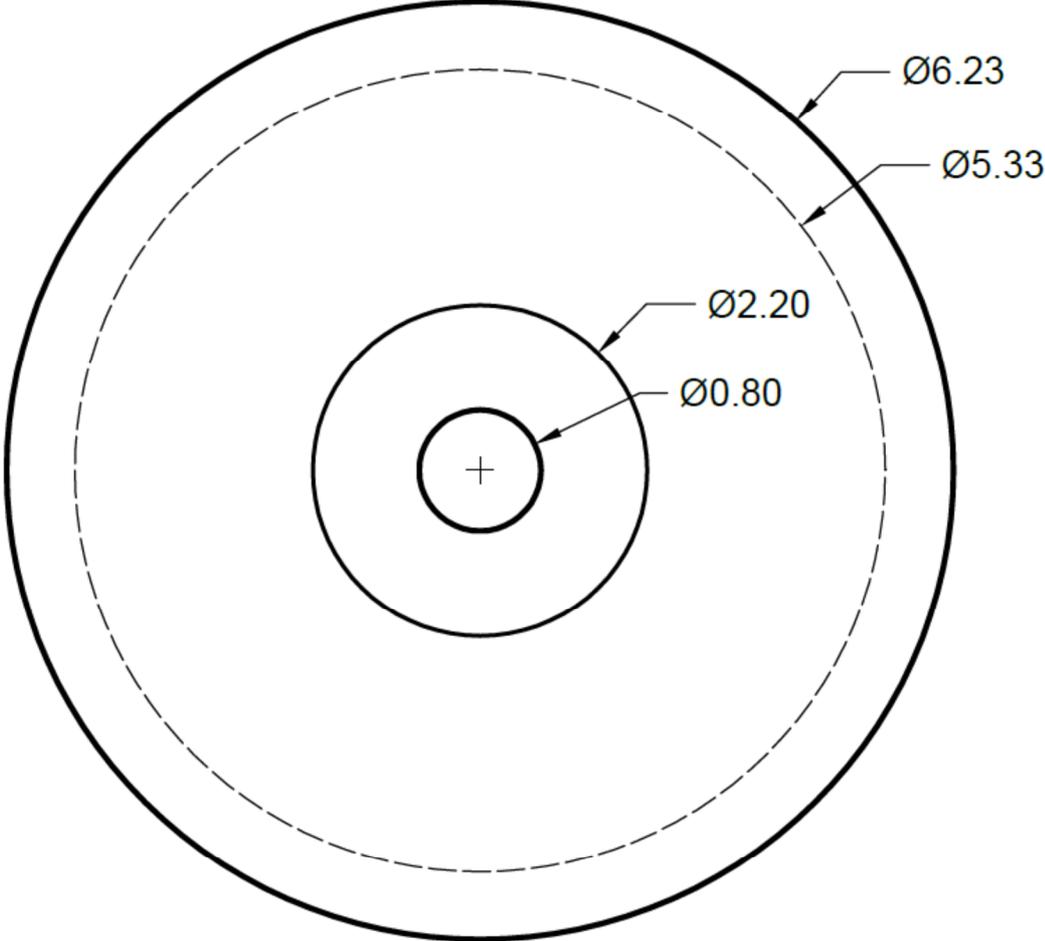
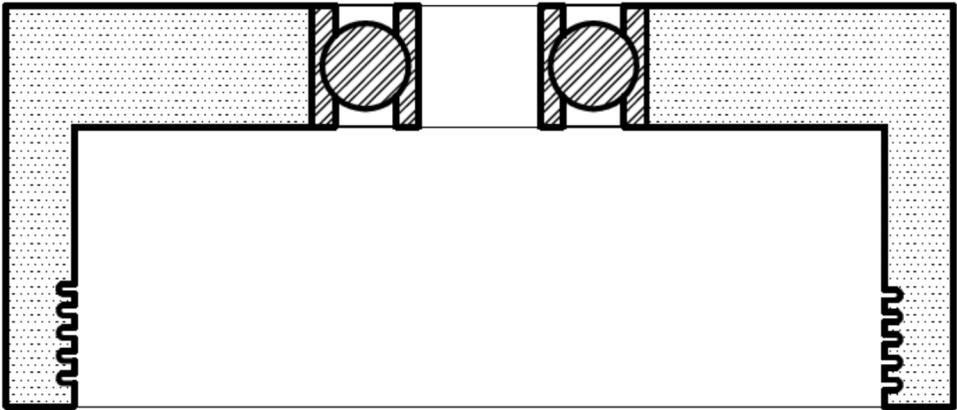
Acrílico



Aço



Projeto: Rafael de Araujo Silva
Desenho: Angélica M. de Oliveira
Escala 20:1



Plástico

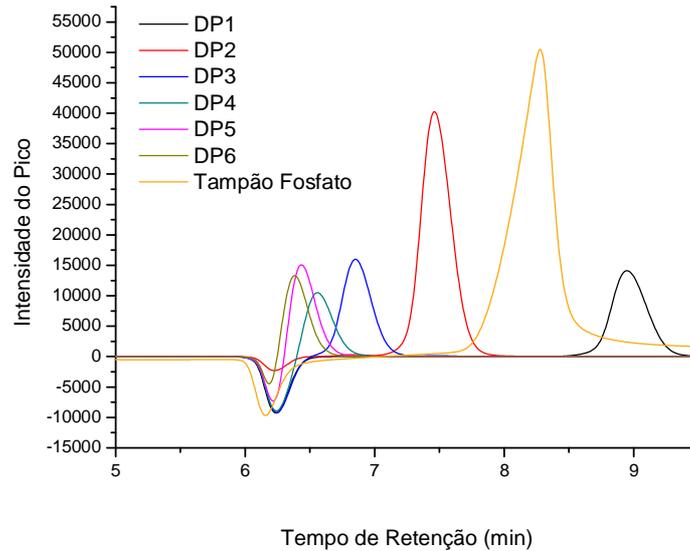


Aço

APÊNDICE II – Cromatogramas obtidos por HPLC

Os cromatogramas deste apêndice foram obtidos com o uso de coluna Biorad Aminex HPX 87H (7,8 x 300 mm) a 45°C com solução de H₂SO₄ 5 mM como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min.

Cromatograma de padrões de polímeros de glicose com ligação α -1,4 solubilizados em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0



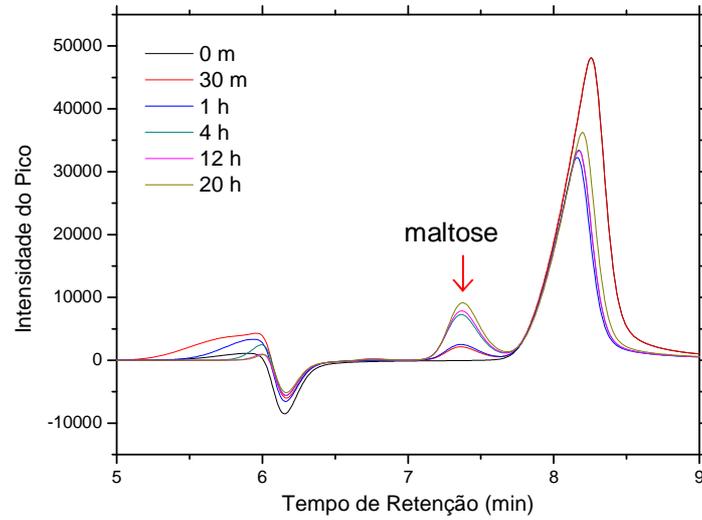
DP1 – glicose; DP2 – maltose; DP3 – maltotriose; DP4 – maltotetraose;
DP5 – maltopentose; DP6 – maltohexaose.
Fonte: Autor

Tempos de retenção dos polímeros de glicose e do tampão fosfato de sódio

Composto	Tempo de Retenção (min)
Glicose (DP1)	8,939
Maltose (DP2)	7,457
Maltotriose (DP3)	6,848
Maltotetraose (DP4)	6,554
Maltopentose (DP5)	6,430
Maltohexaose (DP6)	6,378
Tampão Fosfato	8,274

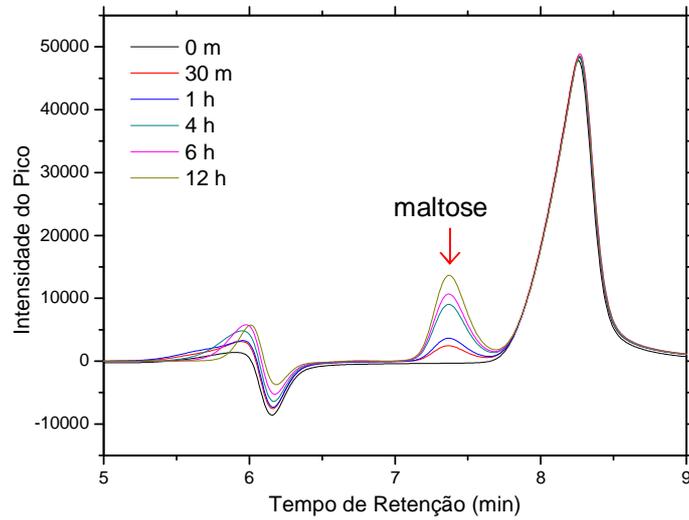
Fonte: Autor

Cromatograma de amostras de hidrólise de amido comercial 30 g/L catalisada por β -amilase livre (1,2 U/g de amido) em RFV a 45°C, pH 7,0.



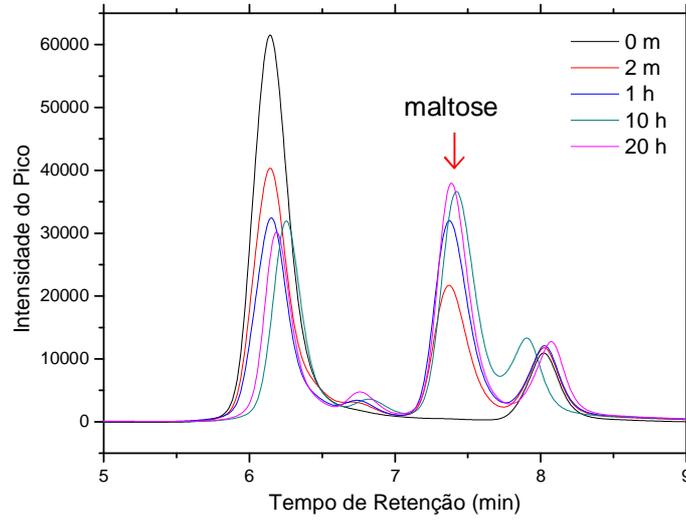
Fonte: Autor

Cromatograma de amostras de hidrólise de amido comercial 30 g/L catalisada por CLEA- β -PS-2 (1,2 U/g de amido) em RFV a 40°C, pH 7,0.



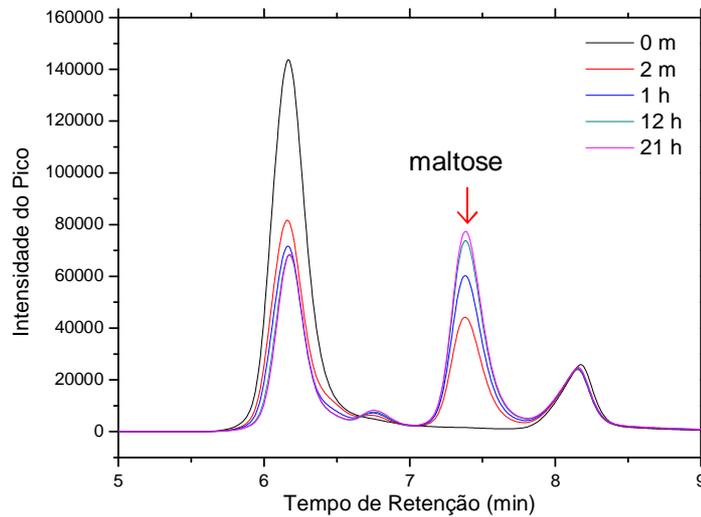
Fonte: Autor

Cromatograma de amostras de hidrólise de amido residual de bagaço da Ind. 1 13,6 g/L catalisada por CLEA- β -PS-2 (2,65 U/g de amido) em RFV a 40°C, pH 7,0.



Fonte: Autor

Cromatograma de amostras de hidrólise de amido residual de bagaço da Ind. 1 30 g/L catalisada por CLEA- β -PS-2 (1,2 U/g de amido) em RFV a 40°C, pH 7,0.



Fonte: Autor