

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*

Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

CHRISTIANE TREVISAN SLIVINSKI

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE GLUCOAMILASE DE *Aspergillus niger* OBTIDA
POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

PONTA GROSSA

2007

CHRISTIANE TREVISAN SLIVINSKI

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE GLUCOAMILASE DE *Aspergillus niger* OBTIDA
POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa,
Área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mareci Mendes de Almeida
Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Iulek

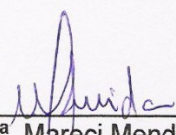
PONTA GROSSA
2007

TERMO DE APROVAÇÃO

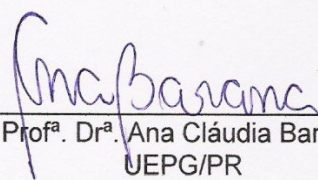
CHRISTIANE TREVISAN SLIVINSKI

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA
DE GLUCOAMILASE DE *Aspergillus niger* OBTIDA POR FERMENTAÇÃO
EM ESTADO SÓLIDO

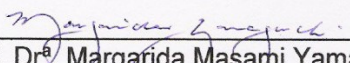
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em 29 de agosto de 2007, pela seguinte Banca Examinadora:



Profª. Drª. Mareci Mendes de Almeida
UEPG/PR



Profª. Drª. Ana Cláudia Barana
UEPG/PR



Profª. Drª. Margarida Masami Yamaguchi
UTFPR/PR

Ponta Grossa
2007

“Este trabalho é dedicado a todos aqueles que não se amedrontam diante das dificuldades, respiram fundo, erguem a cabeça e enfrentam todos os obstáculos que a vida lhes impõe, carregando consigo a certeza de que o conhecimento é o único bem que ninguém pode lhes tirar.”

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª. Dra^a. Mareci Mendes de Almeida,
pela confiança e pela maneira como orientou meus passos, contribuindo para o meu
crescimento pessoal e intelectual.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Jorge Iulek,
por estar sempre me ensinando a seguir o caminho correto, por ter sido o responsável pelos
meus passos iniciais no mundo da pesquisa durante o período de Iniciação Científica, por ter
permitido que eu utilizasse o Laboratório de Purificação de Proteínas para a realização dos
meus experimentos e por todos os anos de amizade.

Ao estagiário Alex Vinícius Lopes Machado, meu anjo da guarda,
pelo esmero e dedicação com que conduziu todas as tarefas que lhe foram confiadas, pela
paciência e sabedoria em me acompanhar nos momentos mais difíceis e pelo interesse em
estar sempre aprendendo coisas novas.

Ao meu pai, Pedro,
por sempre me apoiar e incentivar a ir em busca dos meus ideais, por acreditar e confiar em
mim e por ser meu exemplo de dedicação, responsabilidade e busca incessante de
conhecimento.

À minha mãe, Deise,
por seu exemplo de força, coragem, amor e dedicação, meu porto seguro, me amparando nas
dificuldades e dando suporte para que eu continuasse em frente, razão maior da minha
conquista.

À Luciana, João Alexandre, Nathalia e Maria Luysa,
pela compreensão durante os momentos de ausência em função da pesquisa e por estarem
sempre ao meu lado nos momentos de dificuldade.

Ao meu amor, Rogério,
que chegou em minha vida no momento mais crítico, conquistou seu espaço, arregaçou as
mangas e me ajudou em tudo que estava ao seu alcance. Quando lhe faltava conhecimento
técnico, sobrava muita paciência e amor.

À minha amiga Viviane,
pelo incentivo para que eu realizasse o mestrado, pela paciência comigo durante os momentos
difíceis, pelas conversas no laboratório quando tudo parecia que não ia dar certo e pelos anos
de amizade.

Às laboratoristas Denise e Danianni,
pela dedicação com que realizam seus trabalhos e pelo carinho com que me auxiliaram na
parte técnica.

À Rita,
por estar sempre disposta a nos auxiliar, tornando o laboratório nossa segunda casa.

À Caroline Mantovani,
por me acompanhar nas etapas iniciais do projeto, ensinando-me a trabalhar com o fungo.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antônio Ayub,
por permitir a utilização dos equipamentos dos laboratórios sob sua responsabilidade.

Aos amigos e colegas de mestrado Danianni, Leila, Cristiane, Marina, Ana Mery, Mary,
Débora, Kika, Simone, Isabel, Rosa, Lúcia, Hanna, Paula e Audie,
pela amizade e cumplicidade de todas as horas.

Aos colegas do CIPP Geisa, Fran, Sayonara, Jociane, Carol, Rodrigo, Dani, Rosana,
pela ajuda, apoio e convivência durante todo o período experimental.

Aos professores do Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos,
pelo conhecimento transmitido e as valiosas colaborações para o enriquecimento do trabalho.

A todos os meus alunos,
pela compreensão durante as muitas vezes em que eu precisei me ausentar das aulas para a
realização de experimentos que não podiam ocorrer em outros horários.

À Vapza Alimentos, pela colaboração.

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente com este projeto.

A Deus, força maior, grande responsável por permitir que tudo isso fosse possível.

RESUMO

A glucoamilase, enzima normalmente produzida por fungos filamentosos, é uma das principais responsáveis pela hidrólise do amido para a formação de xarope de glucose, matéria-prima utilizada pela indústria de alimentos na produção de refrigerantes, sorvetes, molhos, pães e como fonte de carbono em fermentações. No presente trabalho, a glucoamilase foi produzida por *Aspergillus niger* através de fermentação em estado sólido, utilizando como substrato resíduo de uma indústria de processamento de batata, por um período de 48 horas a 32 °C. A caracterização bioquímica da preparação enzimática bruta mostrou como faixa de *pH* ótimo para atuação, valores próximos a 5,0 e temperatura ótima 60 °C, com atividade média de 11,87 U/mL. Ensaio de estabilidade térmica indicaram que após 26 horas de incubação a glucoamilase manteve 58,75 % (9,70 U/mL) e 60,33 % (9,96 U/mL) de sua atividade a 35 °C e 60 °C respectivamente. Ensaio de *pH* mostraram como o de maior estabilidade 4,6, no qual após 28 horas obteve-se 72,87 % (8,88 U/mL) de atividade residual. Os parâmetros cinéticos para a hidrólise do amido solúvel foram $K_m = 1,68$ mg/mL e $V_{máx} = 41,15$ U/mL. A enzima foi parcialmente purificada através de i) precipitação com sulfato de amônio entre 60-85 % de saturação, ii) cromatografia de troca aniônica em Q-Sepharose e iii) cromatografia de filtração em gel em Sephadex G-100 com um fator de purificação de 109,23 vezes e rendimento de 11,71 %. As análises eletroforéticas estimaram a massa molecular da glucoamilase estudada em torno de 130,88 kDa. Após ser submetida às etapas de purificação, a enzima manteve as condições ótimas de *pH* entre 4,5 e 5,0 e de temperatura 60 °C, com atividade média de 152,85 U/mL. Com relação à estabilidade, após 4 horas de incubação em *pH* 5,0, a glucoamilase apresentou 83 % (124,99 U/mL) de atividade enzimática residual e após 8 horas no mesmo *pH* apenas 22,72 % (34,22 U/mL). Foram testadas e encontradas como temperaturas de estabilidade 15 e 35 °C, remanescendo após 24 horas de incubação 85 % (127,77 U/mL) e 87 % (131,14 U/mL) da capacidade catalítica, respectivamente. Os valores de K_m e $V_{máx}$ para a glucoamilase parcialmente purificada foram 0,049 mg/mL e 163,93 U/mL.

Palavras-chave: glucoamilase, *Aspergillus niger*, fermentação em estado sólido, caracterização bioquímica, purificação.

ABSTRACT

Glucoamylase is one of main enzymes responsible for the hydrolysis of starch to form the glucose syrup, raw material used by the food industry for the production of cool drinks, ice creams, sauces, breads and as carbon source in fermentations. The enzyme is normally produced by filamentous fungi. In the present work glucoamylase was produced by *Aspergillus niger* through solid-state fermentation, using the industrial waste of potato processing, during a period of 48 h at 32 °C. The biochemical characterization of the crude enzymatic preparation showed as the optimum performance *pH* band near 5,0 and as the optimum temperature 60 °C, with an average activity of 11,87 U/mL. After 26 hours of incubation of this preparation, the glucoamylase kept 58,75 % (9,70 U/mL) and 60,33 % (9,96 U/mL) of its activity at 35 and 60 °C respectively; after 28 hours of incubation in *pH* 4,6, it kept 72,87 % (8,88 U/mL) of residual activity. The kinetic parameters for the hydrolysis of soluble starch were $K_m = 1,68$ mg/mL and $V_{max} = 41,15$ U/mL. The enzyme was partially purified through i) precipitation with ammonium sulphate between 60-85 % of saturation ii) anion-exchange chromatography in Q-Sepharose and iii) gel filtration chromatography in Sephadex G-100, with a purification factor of 109,23 fold and a yield of 11,71 %. The electrophoretic analyses demonstrated that the studied glucoamylase presents molar mass around 130,88 kDa. After submitted to the purification steps, the enzyme kept the same optimum conditions of *pH* and temperature of the raw preparation, with 152,85 U/mL of average activity. With regard to stability, after 4 hours of incubation in *pH* 5,0, the glucoamylase presented 83 % (124,99 U/mL) of residual enzymatic activity, whereas after 8 hours only 22,72 % (34,22 U/mL) remained. Concerning temperatures, greater stability was observed at 35 and 15 °C, in which after 24 hours of incubation 87 % (131,14 U/mL) and 85 % (127,77 U/mL) of the catalytic capacity remained, respectively. The values of K_m and V_{max} for the partially purified glucoamylase were 0,049 mg/mL and 163,93 U/mL.

Key-words: glucoamylase, *Aspergillus niger*, solid-state fermentation, biochemical characterization, purification.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– Micrografia eletrônica de <i>Aspergillus niger</i>	33
FIGURA 2	– Desenho representativo da molécula de amilose e amilopectina do amido	37
FIGURA 3	– Fluxograma do processamento da batata	51
FIGURA 4	– Foto do sistema de fermentação para produção de glucoamilase	53
FIGURA 5	– Diagrama de blocos das etapas do estudo cinético de produção da glucoamilase.....	66
FIGURA 6	– Diagrama de blocos das etapas de produção da glucoamilase	67
FIGURA 7	– Diagrama de blocos das etapas de caracterização bioquímica e purificação da glucoamilase	68
FIGURA 8	– Resultados das cinéticas de produção de glucoamilase	71
FIGURA 9	– Fotos dos fermentadores	73
FIGURA 10	– Resultado da suplementação de nutrientes no resíduo de batata	74
FIGURA 11	– Estabilidade térmica da glucoamilase	78
FIGURA 12	– Estabilidade da glucoamilase em relação ao <i>pH</i>	81
FIGURA 13	– Efeito da concentração de amido sobre a velocidade inicial da reação catalisada pela glucoamilase	82
FIGURA 14	– Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk	82
FIGURA 15	– Perfil eletroforético em SDS-PAGE das etapas de saturação com sulfato de amônio	85
FIGURA 16	– Cromatograma da troca aniônica em Q-Sepharose	86
FIGURA 17	– Perfil eletroforético em SDS-PAGE dos picos obtidos na cromatografia em Q-Sepharose	87
FIGURA 18	– Cromatograma da troca catiônica em SP-Sepharose	88
FIGURA 19	– Perfil eletroforético em SDS-PAGE dos picos obtidos na cromatografia em SP-Sepharose	89

FIGURA 20	– Cromatograma da filtração em gel em Sephadex G-100	90
FIGURA 21	– Perfil eletroforético em SDS-PAGE dos picos obtidos na cromatografia em Sephadex G-100	91
FIGURA 22	– Perfil eletroforético em SDS-PAGE de todas as etapas de purificação da glucoamilase	92
FIGURA 23	– Linha de tendência e equação da reta do padrão de massa molecular em SDS-PAGE	93
FIGURA 24	– <i>pH</i> ótimo da glucoamilase parcialmente purificada	94
FIGURA 25	– Temperatura ótima da glucoamilase parcialmente purificada	95
FIGURA 26	– Superfície de resposta mostrando o efeito do <i>pH</i> e temperatura na atividade da glucoamilase de <i>Aspergillus niger</i> parcialmente purificada	96
FIGURA 27	– Estabilidade da glucoamilase parcialmente purificada em relação ao <i>pH</i>	98
FIGURA 28	– Temperatura de estabilidade da glucoamilase parcialmente purificada	99
FIGURA 29	– Efeito da concentração de amido sobre a velocidade inicial da reação catalisada pela glucoamilase	101
FIGURA 30	– Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para a glucoamilase parcialmente purificada	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– Enzimas amilolíticas permitidas para uso em alimentos conforme a Resolução RDC nº 205 da ANVISA	36
TABELA 2	– Uso dos produtos da hidrólise do amido	40
TABELA 3	– Etapas da conversão enzimática do amido	42
TABELA 4	– Enzimas utilizadas na obtenção dos produtos da hidrólise do amido ..	42
TABELA 5	– Valores encontrados para o <i>pH</i> e temperatura ótimos e de estabilidade da glucoamilase	45
TABELA 6	– Métodos utilizados na caracterização físico-química do resíduo de batata	52
TABELA 7	– Matriz dos experimentos analisando a suplementação de nutrientes...	56
TABELA 8	– Fatores e níveis estudados no planejamento experimental fatorial de 2 níveis para <i>pH</i> e temperatura ótimos de atividade	56
TABELA 9	– Composição dos géis de separação e empilhamento utilizados nas análises por SDS-PAGE	62
TABELA 10	– Composição do tampão de amostra para SDS-PAGE	62
TABELA 11	– Composição do tampão de corrida para SDS-PAGE	62
TABELA 12	– Fatores e níveis estudados no planejamento experimental fatorial de 2 níveis para <i>pH</i> e temperatura ótimos de atividade da glucoamilase parcialmente purificada	64
TABELA 13	– Caracterização físico-química do resíduo de batata	69
TABELA 14	– Atividade da glucoamilase e concentração de glucose livre medidas durante as etapas das cinéticas de produção da enzima	70
TABELA 15	– Atividade da glucoamilase com suplementação de nutrientes no meio de cultura	73
TABELA 16	– Matriz de planejamento fatorial dos experimentos com dois níveis, variando <i>pH</i> e temperatura e resultado a atividade da glucoamilase ...	76
TABELA 17	– Efeito do <i>pH</i> e temperatura na ação da glucoamilase	76
TABELA 18	– Análise de variância (ANOVA) para <i>pH</i> e temperatura ótima de atividade.....	77

TABELA 19	–	Atividade da glucoamilase durante os ensaios de determinação da estabilidade térmica	78
TABELA 20	–	Atividade relativa da glucoamilase durante a determinação da estabilidade térmica	78
TABELA 21	–	Atividade da glucoamilase durante os ensaios de determinação da estabilidade em relação ao <i>pH</i>	80
TABELA 22	–	Atividade relativa da glucoamilase durante a determinação da estabilidade em relação ao <i>pH</i>	80
TABELA 23	–	Efeito da variação da concentração do substrato na atividade enzimática da glucoamilase	82
TABELA 24	–	Perfil das frações obtidas na precipitação com sulfato de amônio	84
TABELA 25	–	Atividade enzimática dos pools preparados, cromatografia em Q-Sepharose	86
TABELA 26	–	Atividade enzimática dos pools preparados, cromatografia em SP-Sepharose	88
TABELA 27	–	Atividade enzimática dos pools preparados, cromatografia em Sephadex G-100	90
TABELA 28	–	Fator de purificação e % de recuperação da glucoamilase	92
TABELA 29	–	Atividade da glucoamilase parcialmente purificada para determinação de <i>pH</i> ótimo	94
TABELA 30	–	Atividade da glucoamilase parcialmente purificada para determinação de temperatura ótima	94
TABELA 31	–	Matriz de planejamento fatorial dos experimentos com dois níveis, variáveis <i>pH</i> e temperatura e resultado a atividade da glucoamilase parcialmente purificada	95
TABELA 32	–	Efeito do <i>pH</i> e temperatura na determinação da atividade da glucoamilase parcialmente purificada	95
TABELA 33	–	Análise de variância (ANOVA) para <i>pH</i> e temperatura ótima de atividade da glucoamilase parcialmente purificada	97
TABELA 34	–	Atividade da glucoamilase parcialmente purificada durante os ensaios de determinação da estabilidade em relação ao <i>pH</i>	97
TABELA 35	–	Atividade relativa da glucoamilase parcialmente purificada durante a determinação da estabilidade em relação ao <i>pH</i>	97

TABELA 36	–	Atividade da glucoamilase parcialmente purificada durante os ensaios de determinação da estabilidade térmica	99
TABELA 37	–	Atividade relativa da glucoamilase parcialmente purificada durante a determinação da estabilidade térmica	99
TABELA 38	–	Efeito da variação da concentração do substrato na atividade enzimática da glucoamilase parcialmente purificada	101

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>aw</i>	Atividade de água
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CIPP	Centro Interdisciplinar de Pesquisa e Pós-graduação
Cl ⁻	Íon cloreto
C/N	Relação carbono/nitrogênio
CoA	Coenzima A
CTA	Centro de Tecnologia de Alimentos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ES	Complexo enzima-substrato
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FES	Fermentação em estado sólido
GA	Glucoamilase
H ⁺	Hidrogênio na forma iônica
HFCS	Xarope com alto teor de frutose
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis-Menten
N	Nitrogênio
Na ⁺	Íon sódio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PDA	Potato Dextrose Agar
P	Fósforo
<i>pH</i>	Potencial hidrogenionico
<i>pI</i>	ponto isoelétrico
Q	Aminoetil quaternário
RNA	Ácido ribonucléico
[S]	Concentração de substrato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SP	Sulfopropil
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilietilenodiamina
U	Unidade enzimática
<i>V_o</i>	Velocidade inicial
VC	Volume de coluna
<i>V_{máx}</i>	Velocidade máxima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1	BIOTECNOLOGIA	22
3.2	PROCESSOS FERMENTATIVOS	23
3.3	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)	24
3.3.1	Matérias-primas empregadas na FES	25
3.3.1.1	Resíduo de indústria de processamento de batata	27
3.3.1.2	Suplementação do meio de cultura com nitrogênio e fósforo.....	28
3.3.2	Aplicações da FES	29
3.4	MICRORGANISMOS EMPREGADOS NA FES	30
3.4.1	Fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	32
3.5	PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS	34
3.5.1	Legislação sobre o uso de enzimas em produtos alimentícios	35
3.6	AMIDO E ENZIMAS AMIOLÍTICAS	36
3.6.1	Uso de enzimas na modificação do amido	40
3.6.1.1	Liquefação	41
3.6.1.2	Sacarificação	41
3.7	GLUCOAMILASE	43
3.8	FATORES QUE INTERFEREM NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	46
3.8.1	Atividade enzimática	46
3.8.2	<i>pH</i>	46
3.8.3	Temperatura	47
3.8.4	Concentração de substrato	47
3.9	PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS	48

4	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	MATERIAIS	50
4.2	MÉTODOS	50
4.2.1	Obtenção do resíduo da indústria de processamento de batata	50
4.2.2	Caracterização físico-química do resíduo	52
4.2.3	Produção de glucoamilase por FES	52
4.2.3.1	Preparação do meio de cultura	52
4.2.3.2	Manutenção do microrganismo <i>Aspergillus niger</i>	53
4.2.3.3	Preparo da suspensão de esporos e inoculação	53
4.2.3.4	Recuperação da glucoamilase	54
4.2.3.5	Determinação de atividade da glucoamilase	54
4.2.4	Estudo cinético de produção da glucoamilase	55
4.2.5	Suplementação do meio de cultura com fontes de nitrogênio e fósforo.....	55
4.2.6	Caracterização bioquímica	56
4.2.6.1	Determinação da temperatura e pH ótimos de ação catalítica	56
4.2.6.2	Determinação da estabilidade térmica da glucoamilase	57
4.2.6.3	Determinação da estabilidade da glucoamilase em relação ao <i>pH</i>	57
4.2.6.4	Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$)	57
4.2.7	Purificação da glucoamilase	58
4.2.7.1	Precipitação fracionada com sulfato de amônio – $(NH_4)_2SO_4$	58
4.2.7.2	Cromatografia de troca aniônica	59
4.2.7.3	Cromatografia de troca catiônica	60
4.2.7.4	Cromatografia em filtração em gel.....	60
4.2.8	Métodos analíticos	61
4.2.8.1	Eletroforese em SDS-PAGE	61
4.2.8.2	Ensaio de atividade enzimática	62
4.2.8.3	Dosagem protéica	63
4.2.9	Caracterização bioquímica da glucoamilase parcialmente purificada	63
4.2.9.1	Determinação do pH ótimo de ação catalítica da glucoamilase parcialmente purificada	63
4.2.9.2	Determinação da temperatura ótima para a ação catalítica da glucoamilase parcialmente purificada	64

4.2.9.3	Determinação da temperatura e <i>pH</i> ótimos por planejamento fatorial completo (2 ²) para a glucoamilase parcialmente purificada	64
4.2.9.4	Determinação da estabilidade da glucoamilase parcialmente purificada em relação ao <i>pH</i>	64
4.2.9.5	Determinação da estabilidade térmica da glucoamilase parcialmente purificada	65
4.2.9.6	Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$)	65
4.2.9.7	Diagrama de blocos	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO RESÍDUO DE BATATA	69
5.2	ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DA GLUCOAMILASE	70
5.3	PRODUÇÃO DE GLUCOAMILASE	72
5.4	SUPLEMENTAÇÃO COM FONTES DE NITROGÊNIO E FÓSFORO	73
5.5	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	76
5.5.1	Determinação da temperatura e <i>pH</i> ótimos de ação catalítica	76
5.5.2	Determinação da estabilidade térmica da glucoamilase	78
5.5.3	Determinação da estabilidade da glucoamilase em relação ao <i>pH</i>	80
5.5.4	Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$)	81
5.6	PURIFICAÇÃO DA GLUCOAMILASE	83
5.6.1	Precipitação fracionada com sulfato de amônio	84
5.6.2	Cromatografia em Q-Sepharose	85
5.6.3	Cromatografia em SP-Sepharose	87
5.6.4	Cromatografia em Sephadex G-100	89
5.6.5	Perfis das etapas de purificação	92
5.7	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA GLUCOAMILASE PARCIALMENTE PURIFICADA	93
5.7.1	Determinação do <i>pH</i> e temperatura ótimos da glucoamilase parcialmente purificada	93
5.7.2	Determinação da estabilidade da glucoamilase parcialmente purificada em relação ao <i>pH</i>	97
5.7.3	Determinação da estabilidade térmica da glucoamilase parcialmente purificada	99

5.7.4	Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$) para a glucoamilase parcialmente purificada	100
6	CONCLUSÕES	103
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	105
	REFERÊNCIAS	106
	ANEXO A - Resolução – RDC nº 205, de 14 de novembro de 2006	119

1 INTRODUÇÃO

Processos fermentativos são há muito tempo utilizados pela humanidade para a produção de bebidas alcoólicas, pães, vinagre, iogurte, queijos, entre outros, mas somente a partir do século XIX é que se descobriu que os responsáveis pela fermentação eram microrganismos, o que deu início à ciência denominada Biotecnologia, que envolve diversas áreas como Química, Biologia, Genética, Engenharia e Bioquímica, entre outras. A fermentação é uma ferramenta muito utilizada nos processos industriais e apresenta importância crescente em diversos setores da economia. Muitas empresas por todo o mundo produzem e comercializam produtos obtidos através de processos fermentativos, tais como: ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas, biopolímeros, solventes, enzimas, bebidas alcoólicas, alimentos, entre outros (BORZANI, 2001).

Os processos fermentativos podem ser realizados utilizando-se bactérias, fungos ou leveduras, dependendo do tipo de produto que se deseja obter. Para a produção de enzimas há preferência na utilização de fungos filamentosos (GOMES et al., 2007), pois estes apresentam maior habilidade de secretar grandes quantidades de proteína em meios de cultura (GOUKA et al., 1997), sólidos ou submersos (KOUTINAS et al., 2003). A escolha de um substrato adequado é de extrema importância para a viabilidade do processo; é fundamental que ele favoreça altos níveis de produtividade, pouca repressão catabólica e aumento na estabilidade da enzima secretada. Há preferência para os substratos de baixo custo, desde que ofereça condições adequadas para o microrganismo realizar a conversão pretendida (SCHMIDELL, 2001).

Após a fermentação, as enzimas são recuperadas do meio por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou pela combinação desses e de outros métodos. O grau de pureza necessário depende de sua aplicação final e será determinado pelas características físico-químicas, propriedades

biológicas, fonte da qual a enzima está sendo purificada e tecnologia de purificação disponível. As etapas de purificação são as responsáveis pela maior parte dos custos dos processos biotecnológicos (KILIKIAN; PESSOA JR., 2001).

Entre as enzimas produzidas por técnicas biotecnológicas, aquelas com atividade amilolítica apresentam um papel importante na indústria de alimentos, pois a maioria dos processamentos industriais do amido envolve a hidrólise desse polímero, que passa então a ser convertido em xaropes de glucose, maltose, frutose, maltotetrose, dextrinas e ciclodextrinas. Cada tipo de xarope requer diferentes tipos de enzimas amilolíticas. O processamento enzimático do amido ocorre em altas temperaturas e envolve dois passos importantes, a liquefação e a sacarificação. As condições de *pH* e temperatura para as fases de liquefação e sacarificação são determinadas de modo a evitar subprodutos indesejáveis e, principalmente, levar em consideração as condições ótimas de atividade e estabilidade da enzima. Enzimas sacarificantes mais termoestáveis são desejáveis nesse processo, pois evitariam o passo de resfriamento e, conseqüentemente, levariam à redução de custos (GOMES et al., 2007).

A glucoamilase (E.C. 3.2.1.3) é uma enzima amilolítica responsável pela hidrólise de unidades de β -D-glucose de extremidades não-redutoras da amilose, da amilopectina e de outros oligossacarídeos relacionados. Também pode romper as ligações α -1,6 de pontos de ramificação de amilopectina, promovendo a hidrólise quase completa do amido em glucose (SELVAKUMAR et al., 1996); sua principal utilização está na indústria de processamento de alimentos produzindo xaropes com 96 a 98 % de glucose (AIYER, 2005; GUZMÁN-MALDONADO; PAREDES-LÓPES, 1995). A glucoamilase é adicionada à pasta de amido durante a etapa de sacarificação que ocorre por volta de 60 °C, sendo que a enzima necessita apresentar estabilidade térmica neste temperatura por um longo período de tempo. Os hidrolisados são utilizados como fonte de carbono em fermentações e em inúmeros produtos como refrigerantes, sorvetes, molhos, frutas enlatadas, pães etc (AIYER, 2005). A maior parte

da glucoamilase industrial é produzida por linhagens dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*, sendo a de *Aspergillus niger* a mais termoestável (NOROUZIAN et al., 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Produzir, caracterizar e purificar a glucoamilase de *Aspergillus niger*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir glucoamilase por *Aspergillus niger* em resíduo de indústria de processamento de batata;
- Acompanhar a cinética de produção da enzima para verificar o período no qual é obtido maior rendimento;
- Recuperar a glucoamilase do meio e identificá-la através de sua atividade catalítica;
- Caracterizar bioquimicamente a enzima quanto ao *pH* e temperatura ótimos e de estabilidade;
- Determinar os parâmetros cinéticos relacionados à concentração de substrato e velocidade de reação;
- Purificar a glucoamilase através de etapas de purificação de proteínas como: precipitação com sulfato de amônio, diálise e cromatografia em coluna de troca iônica e filtração em gel;
- Avaliar o perfil eletroforético por SDS-PAGE da fração enzimática em cada etapa de purificação;
- Determinar a temperatura e pH ótimos e de estabilidade para a ação catalítica da glucoamilase parcialmente purificada.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 BIOTECNOLOGIA

Processos biológicos têm sido utilizados para obtenção de vários produtos, principalmente alimentos, muito antes do início da era cristã, confundindo-se com a própria história da humanidade. O preparo de bebidas fermentadas a partir de cereais era prática comum na Babilônia e no Egito (8.000 a 6.000 anos a.C.), a produção de cerveja e pão utilizando fermentos já era realizada no Egito (4.000 anos a.C.) e a produção de vinhos na Grécia (2.000 a.C.). Outras aplicações são na produção de vinagre, iogurte e queijos, há muito tempo realizadas pelo ser humano (BORZANI et al., 2001). De alguma maneira, a Biotecnologia sempre esteve integrada à vida humana, porém, foi somente no final do século XIX que Louis Pasteur demonstrou o papel dos microrganismos nos chamados processos fermentativos, derrubando a teoria de que a fermentação era puramente química. Pasteur também provou que cada tipo de fermentação era realizado por um microrganismo específico e que este podia viver e se reproduzir na ausência de ar, porém, foi somente na década de 50 que o termo biotecnologia passou a ser difundido juntamente com o advento da Engenharia Genética (VILLEN, 2007).

Uma das definições que melhor explica o que vem a ser Biotecnologia foi formulada por Antonio Paes de Carvalho (1993), como o conjunto de conhecimentos, técnicas e métodos, de base científica e prática, que permitem a utilização de seres vivos como parte integrante e ativa do processo de produção industrial de bens e serviços. É uma ciência multidisciplinar integrando profissionais de diversas áreas como Química, Biologia Molecular, Bioquímica, Microbiologia e Engenharia, entre outras (BORZANI et al., 2001).

Na indústria de alimentos essa integração de conhecimentos é de fundamental importância, tornando possível a melhoria da produção e da qualidade do produto final, através da modificação das características intrínsecas das matérias primas na partida e/ou em

outro nível do processamento, o que garante ao consumidor uma ampla variedade de alimentos industrializados (VITOLLO, 2001).

3.2 PROCESSOS FERMENTATIVOS

A fermentação do ponto de vista bioquímico é um termo geral que denota a degradação anaeróbia da glicose ou de outros nutrientes orgânicos em vários produtos (característicos para diferentes organismos) para obter energia na forma de ATP (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002). É um processo comumente desenvolvido por microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) cujo desempenho depende muito da composição do meio de cultura onde são colocados (SCHMIDELL, 2001), pois cada ser vivo responde de maneira única ao ambiente, usando mecanismos físicos ou químicos para a formação do produto desejado (COONEY, 1981).

O meio de cultivo deve atender à demanda nutricional do microrganismo produtor, aos objetivos do processo e à escala de operação. Sua seleção depende, para a maioria dos processos em larga escala, do custo, disponibilidade e características dos seus componentes (MORAES, 2001).

Os substratos que compõem os meios devem conter fontes de carbono e energia, fontes de nitrogênio, substâncias minerais e fatores de crescimento como vitamina B, aminoácidos, nucleotídeos e ácidos graxos (SANT'ANA JR, 2001). As fontes de carbono, especialmente carboidratos, podem ser: glucose (pura ou de amido hidrolisado), lactose (pura, soro de leite ou de queijo), amido ou fécula de cevada, centeio, trigo, aveia, farinhas e farelos diversos, soja, amendoim, algodão, batata, batata-doce, mandioca, sorgo e sacarose (melaço de cana, de beterraba ou açúcar refinado). As fontes nitrogenadas podem ser: cevada, melaço de beterraba, água de maceração de milho, farinha de aveia, farinha de centeio, farelo de soja e soro de leite. Os traços de metais necessários geralmente estão presentes na água corrente ou

na maioria das matérias-primas. Sais minerais são adicionados, especialmente como fontes suplementares de nitrogênio, fósforo, enxofre ou cálcio. A maioria dos fatores de crescimento necessários pertence ao grupo de vitaminas do complexo B, certos aminoácidos ou ácidos graxos (MORAES, 2001).

Os meios de cultivo podem ser divididos em sintéticos e naturais. Os sintéticos apresentam composição química bem conhecida, já os naturais apresentam composição química complexa, geralmente desconhecida, sendo todavia normalmente preferidos pelo menor custo (SCHMIDELL, 2001).

Os processos fermentativos para obtenção de um dado produto a partir de um dado microrganismo podem ser bem variados; dependem do tipo de reator utilizado, do estado da fermentação (submersa ou sólida) e de outras características como ser descontínuo, descontínuo alimentado, semicontínuo ou contínuo (SCHMIDELL; FACCIOITI, 2001).

3.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

Fermentação em estado sólido pode apresentar várias definições: como uma fermentação na qual o substrato não é líquido (HESSELTINE, 1977); como um processo onde os microrganismos utilizam materiais insolúveis para seu crescimento e metabolismo (MOO-YOUNG; MOREIRA; TENGERTDY, 1983); todo processo fermentativo que ocorre em substrato ou suporte sólido nutricionalmente inerte (AIDOO; HENDRY; WOOD, 1982) ou simplesmente, como um processo fermentativo que permite o crescimento de microrganismos em muitos materiais sólidos na ausência do fluxo de água livre (HESSELTINE, 1976; ROUSSOS, 1995; PANDEY et al., 1999; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; DEL BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001).

Embora a produção de enzimas em escala industrial seja principalmente realizada por fermentação submersa, nos países orientais há uma tradição estabelecida de utilização da FES

(PRIEST, 1984). Avanços tecnológicos estão sendo gradualmente incorporados ao processo em estado sólido, podendo torná-lo viável para países que dispõem de resíduos agroindustriais de baixo custo (SANT'ANA JR, 2001). O interesse em FES vem da sua simplicidade e proximidade das condições de crescimento natural de muitos microrganismos, especialmente fungos (SELVAKUMAR; ASHAKUMARY; PANDEY, 1997; DEL BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001), do consumo reduzido de energia, e da ausência de equipamentos complexos e sistema de controle sofisticado. Devido à ausência de água livre, pequenos fermentadores são necessários e os processos de recuperação do produto são feitos com maior facilidade (ROBINSON; SINGH; NIGAM, 2001; DEL BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001). As vantagens da FES para a produção de enzimas ainda incluem maiores níveis de produtividade, baixo nível de repressão catabólica e aumento na estabilidade de enzimas excretadas (LONSANE; RAMESH, 1990; PANDEY et al., 1999; LOERA; AGUIRRE; VINIEGRA-GONZÁLEZ, 1999; AGUILAR et al., 2001; DIAZ-GODINEZ et al., 2001; ASTHER et al., 2002; DEL BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001).

Além disso, vários fungos produzem em FES, rendimentos de enzimas compatíveis com a fermentação submersa e em alguns casos produzem enzimas e isozimas que não são produzidas em meio líquido (HOLKER; HOFER; LENZ, 2004). Entretanto, em escala industrial, apenas um número pequeno de produtos por FES tem sido obtidos com sucesso, devido à dificuldade na remoção de calor do sistema e dificuldade de controle das condições de crescimento (MITCHELL et al., 2000).

3.3.1 Matérias-primas empregadas na FES

A seleção adequada de substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. O substrato pode estar tanto na forma natural quanto na forma sintética, dependendo do processo que se deseja realizar, da facilidade de se obter matérias-

primas ou dos resultados que se quer conseguir. Porém, de forma geral, os materiais utilizados são provenientes de matérias-primas, produtos e ou resíduos agroindustriais (DEL BIANCHI; MORAES; COPALBO, 2001), devido ao baixo ou nenhum valor comercial. Entre estes, destacam-se bagaço de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de café, maçã, farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de milho, casca de arroz, palha de trigo, farinha de trigo, farinha de mandioca, farinha de arroz e amido (DE PAULA; AZEVEDO, 1996; PANDEY et al., 2000; JECU, 2000).

Os substratos, às vezes, necessitam de um pré-tratamento, a fim de fornecer novas características físicas, principalmente o aumento da porosidade e da capacidade de retenção de água adequando as condições necessárias ao crescimento e a produção de metabólitos pelo microrganismo (DEL BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001).

Os resíduos agroindustriais são geralmente considerados os melhores substratos para os processos em meio sólido, não havendo exceções para o uso da FES na produção de enzimas (PANDEY et al., 1999).

Trabalhos conduzidos por Pandey et al. (2000) utilizaram bagaço de mandioca como substrato para processos microbianos por FES para a produção de ácidos orgânicos, flavor e compostos de aroma, pelo fato do bagaço de mandioca ser um resíduo da indústria de processamento da farinha de mandioca, rico em material fibroso e com aproximadamente 30 a 50 % de amido em base de peso seco, apresentando uma grande quantidade de material orgânico e baixo conteúdo de cinzas. Bramorski et al. (1998) desenvolveram o processo de produção de aromas frutados, a partir do bagaço de mandioca, por FES com *Ceratocystis finbriata*. Pessoa et al. (2003) utilizaram um subproduto do refino de óleos vegetais juntamente com o microrganismo *Candida guilliermondii* DM 644 para a produção de riboflavina (vitamina B₂), para a suplementação e enriquecimento de alimentos.

3.3.1.1 Resíduo de indústria de processamento de batata

A batata (*Solanum tuberosum*) foi descoberta no Peru em 1536 e rapidamente espalhou-se pela Europa e mais tarde pelo mundo. Já foi inclusive utilizada com fins medicamentosos e atualmente cerca de 150 países cultivam batatas. Ela é o quarto alimento mais consumido depois do trigo, do arroz e do milho. Além de ser um alimento nutritivo, o amido e o álcool da batata são utilizados para outras finalidades (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA, 2006).

A batata apresenta aproximadamente 20 % de massa seca, a qual pode conter de 35 a 40 % de amido, 35 a 40 % de pectina e hemicelulose, aproximadamente 5 % de proteína, 2 % de minerais e 1 % de gordura. As proporções podem variar de acordo com o tipo de batata e dos processos de raspagem e desidratação (OLSEN, 2000; MISHRA; ARORA; LATA, 2004; BARAMPOUTI; VLYSSIDES, 2005).

A partir da última década do século XX, a indústria de processamento de batata vem ganhando espaço no cenário brasileiro, abastecendo principalmente o mercado de *fast food* (PEREIRA et al., 2005). As indústrias de fornecimento de batatas pré-preparadas para sua comercialização usam grandes volumes de água durante as operações de lavagem, pelagem e branqueamento. Os efluentes e resíduos gerados a partir destas operações são caracterizados por um alto conteúdo de matéria orgânica e suspensão de sólidos e, quando não tratados, causam altos níveis de poluição ao meio ambiente (MISHRA; ARORA; LATA; 2004; BARAMPOUTI; VLYSSIDES, 2005). Segundo dados obtidos de uma indústria de processamento de batatas na região dos Campos Gerais do Paraná, 40 % das batatas são perdidas na forma de descarte, sendo gerados cerca de 10 toneladas/dia de resíduo, passando a servir apenas para alimentação animal direta.

O uso de fungos amilolíticos para o tratamento destes resíduos pode ser uma possível opção, visto que este material de rejeito possui uma alta carga de compostos amiláceos,

podendo ser usado como um excelente substrato para multiplicação destes microrganismos e desta maneira formar produtos como proteína celular isolada e enzimas (RUBIO; MOLINA, 1989). Trabalhos conduzidos por Raimbult e Alazard (1980) demonstram a capacidade de produção de glucoamilase por *Aspergillus niger* através de processo fermentativo utilizando batata. Santos (2006) também obteve êxito na produção desta enzima em resíduo de batata utilizando *Aspergillus awamori* e Saucedo-Castañeda (1991) e Jin et al (1999) utilizaram como microrganismo *Rhizopus oligosporus* para obtenção do mesmo produto.

3.3.1.2 Suplementação do meio de cultura com nitrogênio e fósforo

O nitrogênio é utilizado pelo fungo na síntese de ácidos nucléicos, algumas vitaminas, aminoácidos, proteínas e enzimas, sendo considerado como macroelemento de fundamental importância para o seu metabolismo. Por sua vez, o íon fosfato é importante para a célula fúngica por fazer parte das moléculas de DNA e RNA, além de fosfolipídeos, NAD, FAD, CoA e de algumas vitaminas. Naturalmente, o nitrogênio é encontrado no solo na forma de nitrato ou amônio e o fósforo na forma de íon fosfato, sendo ambos absorvidos pelo fungo no momento em que são requeridos nos processos metabólicos. Porém, quando o fungo é cultivado em laboratório, se o meio de cultura *in natura* não fornecer uma quantidade necessária destes nutrientes, uma suplementação deve ser realizada. As fontes de nitrogênio podem ser inorgânicas na forma de sais de nitritos, nitratos ou amônio, ou orgânicas na forma de uréia, aminoácidos ou extratos de levedura. A escolha de um destes compostos depende do tipo de microrganismo utilizado. As fontes de fósforo são sempre na forma de sais de fosfato (PUTZKE; PUTZKE, 2002).

Alguns trabalhos realizados utilizando fermentação por fungos em resíduos de indústria de batata apresentaram algumas vantagens para este tipo de meio de cultura. Segundo Raimbault e Alazard (1980), a suplementação do meio com nitrogênio e fósforo

melhorou o crescimento de *Aspergillus niger*, porém, não apresentou nenhum efeito na redução de açúcares e no aumento da produção de glucoamilase. Estes resultados também foram confirmados por Jin et al. (1999) que estudaram glucoamilase de *Rhizopus oligosporus* e por Saucedo-Castañeda (1991), mostrando assim ser desnecessária para a produção da enzima a suplementação do meio de cultura com nutrientes, contribuindo para redução de custos e aproveitamento do resíduo *in natura*.

No entanto, vários autores desenvolveram experimentos com o objetivo de estudar a influência do nitrogênio nos meios de cultura para fermentação de fungos filamentosos. Ellaiah et al. (2002), Pessoa et al. (2003), Bertolin, Casara e Costa (2003) e Anto, Trivedi e Patel (2006) utilizaram uréia e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fontes deste nutriente, sendo que todos os autores verificaram aumento na produção das enzimas estudadas, tendo a uréia apresentado os melhores resultados.

3.3.2 Aplicações da FES

A FES é amplamente utilizada para a obtenção de vários produtos, conforme listado a seguir:

- Queijos do tipo Roquefort, produzidos por cepas de *Penicilium roqueforti*, um dos poucos fungos filamentosos que se desenvolve em condições limitadas de oxigênio, nos espaços livres no interior de leite coalhado, e queijos do tipo Camembert, produzidos por cepas de *Penicillium camemberti* e *P. caseicolun*, que se desenvolvem essencialmente na superfície do leite coalhado (RAIMBAULT; ALAZARD, 1980);
- Fungos comestíveis: o champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) é produzido a partir de grãos de cereais como centeio, cevada, trigo e milho utilizados como substrato sólido umedecidos com água e acrescidos de CaCO_3 (DELMAS, 1989).
- Alimentos orientais fermentados: tempeh, miso, shoyu, koji (WANG; HESSELTINE, 1969);

- Enzimas: fitases, amilases, pectinases, celulasas, proteases, glucoamilase.
- Enriquecimento protéico de produtos e resíduos agrícolas: uso de fungos para melhorar a digestibilidade, o gosto, a cor, o aroma, a textura.
- Metabólitos primários e secundários: ácido cítrico, ácido L(+) láctico, etanol, giberilinas antibióicos, toxinas, alcalólides, aromas, produção de esporos (DEL BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001).

3.4 MICRORGANISMOS EMPREGADOS NA FES

A seleção adequada do microrganismo é um dos mais importantes critérios quando se trata de FES (PANDEY, 1992). Eles devem apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto e permitir sua rápida liberação para o meio. Não devem produzir substâncias incompatíveis com o produto e apresentar inconstância quanto ao comportamento fisiológico, ser patogênicos, exigir condições de processo muito complexas, exigir meios de cultura dispendiosos (SCHMIDELL, 2001).

Os principais microrganismos cultivados em meio sólido são fungos filamentosos. Os meios sólidos se assemelham aos meios naturais para o crescimento desses seres vivos, suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas, que propiciam a colonização de matrizes sólidas porosas (PUTZKE; PUTZKE, 2004). A matriz porosa pode ser constituída de um substrato úmido ou de um suporte inerte capaz de absorver os nutrientes presentes em uma solução. Além disso, os fungos filamentosos podem desenvolver-se em meios com teor de umidade da ordem de 15 % e com atividade de água (a_w) de aproximadamente 0,7 (LONSANE et al., 1985).

Os fungos são organismos heterótrofos, eucarióticos, geralmente filamentosos e multicelulares (PELCZAR, 1998; PAMBOUKIAN, 1997). O talo dos fungos, em geral, é

formado por um emaranhado de filamentos, denominados hifas, ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio (PUTZKE; PUTZKE, 2004).

O crescimento é em geral apical, mas normalmente qualquer fragmento hifálico pode dar origem à outra formação micelial quando destacado e colocado em meio apropriado (PUTZKE; PUTZKE, 2004; PAMBOUKIAN, 1997). O crescimento pode ocorrer na forma de *pellets*, com as hifas emaranhadas formando pequenas esferas, ou na forma filamentosa, com as hifas dispersas pelo meio de cultura (WHITAKER; LONG, 1973). A reprodução normalmente ocorre por meio de esporos, podendo ser sexuada ou assexuada (PAMBOUKIAN, 1997).

A germinação de esporos é um estágio inicial dos processos de fermentação e sua descrição qualitativa e quantitativa é muito importante devido ao fato de que a produtividade final dos metabólitos primários e secundários está fortemente influenciada pela qualidade dos esporos e cinéticas de sua germinação (PAUL; KANT; THOMAS, 1993; BIZUKOJC; LEDKOWICZ, 2006). Este estágio de desenvolvimento marca determinadas propriedades morfológicas do microrganismo em seu futuro crescimento, existindo uma alta relação entre a morfologia e a excreção de metabólitos (PAUL; THOMAS, 1998; OSHEROV; MAY, 2001).

Como são organismos heterotróficos, os fungos necessitam retirar do meio ambiente os nutrientes necessários ao seu crescimento. Moléculas simples terão preferência na utilização, sendo então, reprimidas as formações de enzimas para moléculas mais complexas. Por exemplo, se houver glucose no meio, a qual é preferida pelo fungo, não serão formadas as enzimas para degradar polímeros, como amido e celulose e enzimas para outros açúcares como galactose, maltose e sacarose (PUTZKE; PUTZKE, 2004; BERTOLIN et al., 1996; MACEDO; FACCIOTTI; SCHMIDELL, 1999).

A temperatura para o crescimento dos fungos fica entre 0 °C e 35 °C, mas o ótimo para a maioria fica entre 20 °C e 30 °C. O *pH* em torno de 6,0 é considerado ótimo para a maioria das espécies e a *aw* ideal é próxima a 1,0 (PUTZKE; PUTZKE, 2004).

3.4.1 Fungos do gênero *Aspergillus*

Existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares muitas das quais são aplicadas na biotecnologia (WAINWRIGHT, 1995).

Dentre as espécies mais conhecidas encontram-se o *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fulmigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor*. Os *Aspergillus* spp. pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem dos Eutrotiales, família Trichocomaceae e gênero *Aspergillus*. Esses fungos se reproduzem por meio de esporos (conídias), formando micélios compostos por hifas septadas e ramificadas (PELCZAR, 1998). Suas colônias podem apresentar coloração branca, amarela, amarelo-esverdeada, amarronzada ou verde. A taxa de crescimento destes fungos é rápida a moderadamente rápida, exceto no caso de *A. nidulans* e *A. glaucus*, que crescem devagar e formam colônias de 0,5 a 1,0 cm quando incubados a 25 °C e por um período de 7 dias em meio Czapek agar, enquanto as demais espécies formam colônias de 1 a 9 cm de diâmetro (PRADO, 2002).

O *Aspergillus niger*, como sugere seu nome, é um fungo filamentosso negro comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). De acordo com Prado (2002), o *A. niger* apresenta como características particulares colônias brancas a amarelo pálido, mas rapidamente forma milhares de esporos. Os conídios (esporos) são esféricos, medem de 3 a 5 µm e tornam-se rugosos ao atingir a maturação. O *A. niger* apresenta hifas

finas, septadas e conidióforos com vesículas recobertas por conídios negros, podendo ser visualizado através de micrografia eletrônica conforme apresentado na Figura 1.

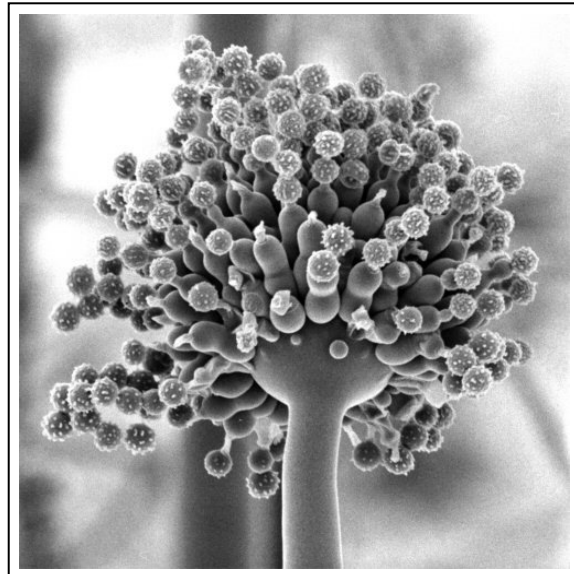


FIGURA 1 – Micrografia eletrônica de *Aspergillus niger*.

Fonte: Disponível em: <<http://129.215.156.68/Images/asexual.htm>>. Acesso em: 10 de maio de 2007.

O uso de *Aspergillus niger* em processos fermentativos apresenta algumas vantagens em relação a outros fungos, como facilidade de manipulação, habilidade em fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos (SPIER, 2005).

Por esses motivos, é um fungo filamentosso muito importante economicamente, sendo utilizado em fermentações industriais para produção de várias substâncias (PELCZAR, 1998; DE PAULA, 1996), tais como: endoglucanase a partir de farelo e palha de trigo (JECU, 2000), ácidos orgânicos, flavor e compostos de aroma a partir de bagaço de mandioca (PANDEY et al., 2000), pectinase a partir de farelo de trigo e soja, casca de laranja e maçã e borra de café (TRINDADE et al., 1996; DARTORA, 2000; RIZZATTO; GOMES; MONTE ALEGRE, 2001, DIAZ-GODINEZ et al., 2001), invertase (MONTIEL-GONZÁLEZ et al., 2004), feruloil esterase (ASTHER et al., 2002), ácido cítrico (PETER; CHIOU; CHIU, 2001; YAYKASH; DEMIREL, YASAR, 2005), protease (GOUKA; PUNT; VAN DEN HONDEL, 1997; PAPAGIANNI; MOO-YOUNG, 1893), enzimas amilolíticas tais como amilase

(BRYJAK, 2003; AIYER, 2005; HERNANDÉZ et al., 2006; JUGE et al., 2006) e glucoamilase (BRYJAK, 2003; POLAKOVIC; BRYJAC, 2004; SANJAY; SUGUNAN, 2005; SILVA; ASQUIERI; FERNANDES, 2005) e várias outras enzimas, as quais têm sido avaliadas, aceitas e regulamentadas para o consumo diário pela Organização Mundial de Saúde - OMS (WIKIPEDIA, 2006). Relatos ainda descrevem vantagens no perfil de produção de enzimas por *Aspergillus niger* em FES quando comparadas com a fermentação submersa, incluindo aumento na produtividade (AGUILAR et al., 2001; DIAZ-GODINEZ et al., 2001) bem como aumento na estabilidade das enzimas secretadas (LOERA; AGUIRRRE; VINIEGRA-GONZÁLEZ, 1999).

3.5 PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS

As enzimas são compostos orgânicos, produzidos por células vivas, que catalisam as reações químicas nos processos vitais. Uma vez sintetizada por uma célula, uma enzima poderá atuar de forma independente se condições apropriadas forem mantidas. Todas as enzimas são basicamente proteínas, embora muitas possuam um grupo prostético não protéico. Uma das principais características das enzimas é sua especificidade sobre o substrato, agindo sobre um número muito limitado de compostos e sem efeito sobre outros (SANT'ANA JR., 2001).

O mercado mundial de enzimas é grande, sendo que as mesmas são produzidas por microrganismos que foram selecionados da natureza e, geralmente, modificados geneticamente para uma produção mais eficiente e para atuar em processos que possam ser realizados em temperaturas mais elevadas ou em outras condições de estresse (SERAFINI; BARROS; AZEVEDO, 2001).

Para a produção industrial de enzimas microbianas, os microrganismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; produzirem a enzima em velocidade elevada,

constante e em curto espaço de tempo; os métodos para a recuperação devem ser simples e de baixo custo; e a preparação enzimática obtida deve apresentar estabilidade. O êxito da produção industrial de enzimas depende do grau em que a atividade dos microrganismos é alcançada e quando se reduzem custos do substrato empregado, da incubação e da recuperação da enzima (FELLOWS, 1994).

No caso de produção de enzimas indutíveis, a presença de um indutor é essencial, como: amido para amilase, uréia para urease, xilose para xilose isomerase. No caso de ocorrência de repressão catabólica, a escolha da fonte de carbono deve ser feita com cautela, evitando-se altas concentrações de açúcares facilmente assimiláveis como a glucose (SANT'ANA JR, 2001).

Após a fermentação, as enzimas são recuperadas do meio por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou pela combinação desses e de outros métodos. As enzimas intracelulares são extraídas mediante rompimento celular, sendo que neste caso a recuperação da enzima é mais difícil e seu rendimento é inferior, porque parte da enzima pode permanecer retida na massa celular, que pode ser extraída por precipitação com acetona, álcoois, sulfato de amônio ou por ultrafiltração (KILIKIAN; PESSOA JR., 2001).

3.5.1 Legislação sobre o uso de enzimas em produtos alimentícios

O Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova a utilização de enzimas na indústria de alimentos, considerando que o uso dos aditivos deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado. A ANVISA definiu que o limite de uso das enzimas deve ser em quantidade *quantum satis*, ou seja, quantidade suficiente para obter o efeito desejado no alimento. A Tabela 1 apresenta as principais enzimas amilolíticas

autorizadas para uso em alimentos. A resolução – RDC nº 205, de 14 de novembro de 2006, que aprova o regulamento técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano pode ser visualizado no Anexo A.

TABELA 1 – Enzimas amilolíticas permitidas para uso em alimentos conforme a Resolução RDC nº 205 da ANVISA

ENZIMAS DE ORIGEM ANIMAL	
ENZIMA	FONTE
α -amilase	Pâncreas de suíno e bovino
ENZIMAS DE ORIGEM VEGETAL	
ENZIMA	FONTE
α -amilase	Malte, cereais e leguminosas maltadas
β -amilase	Malte, cereais e leguminosas maltadas
ENZIMAS DE ORIGEM MICROBIANA	
ENZIMA	FONTE
Glucoamilase ou amiloglicosidase	<i>Aspergillus</i> sp e <i>Rhizopus</i> sp
α -amilase	<i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Bacillus</i> sp, <i>Rhizopus</i> sp, <i>Pseudomonas fluorescens</i>
β -amilase	<i>Bacillus</i> sp
β -glucosidase ou celobiose	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma reesei</i>
Dextranase	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Chaetomium erraticum</i> , <i>Chaetomium gracile</i>
Glucose isomerase	<i>Actinoplanes missourienses</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Microbacterium arborensens</i>
Glucose-oxidase	<i>Aspergillus niger</i>
Maltase ou α -glucosidase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Trichoderma reesei</i>
Pululanase	<i>Bacillus acidopullulyticus</i> , <i>Bacillus deramificans</i>

Fonte: ANVISA (2006)

3.6 AMIDO E ENZIMAS AMILOLÍTICAS

O amido é um polissacarídeo de armazenamento das células vegetais, encontrado em grande abundância nos tecidos de plantas como em tubérculos e no endosperma das sementes. Ocorre intracelularmente como grânulos, geralmente arredondados e irregulares, variando de 2 a 100 μm em tamanho. Tanto a forma quanto o tamanho dos grânulos são característicos de cada espécie de planta e podem ser usados para identificar sua origem. As moléculas de amido são altamente hidratadas porque têm muitos grupos hidroxila expostos e capazes de formarem ligações de hidrogênio com a água. A maioria das células vegetais tem a habilidade

de sintetizar o amido, porém, ele é essencialmente abundante nos tubérculos como a batata, e nas sementes como o milho (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002; COULTATE, 2004).

A molécula do amido consiste de dois tipos de polímeros de glucose: amilose, que é linear, e amilopectina, que é ramificada (conforme demonstrado na Figura 2), estão presentes nos grânulos na forma associada. (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

A amilose é composta por longas cadeias de α -D-glicopiranosil unidas por ligações α -1,4. Tais cadeias variam em peso molecular de uns poucos milhares até 500.000 Da. A amilopectina é uma molécula muito maior e altamente ramificada. Como na amilose, as unidades de glucose da amilopectina estão unidas por ligações glicosídicas α -1,4, porém, parte dessas unidades de glucose também estão envolvidas em ligações α -1,6 a cada 24 e 30 resíduos, criando pontos de ramificação. Devido a cada ramificação no amido terminar com uma molécula de açúcar não-redutor, uma molécula sem o carbono anomérico livre, esses polímeros têm tantas pontas não redutoras quantas ramificações, e apenas uma única ponta redutora. O número de extremidades redutoras dá uma idéia da polimerização da molécula de amido (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002; COULTATE, 2004).

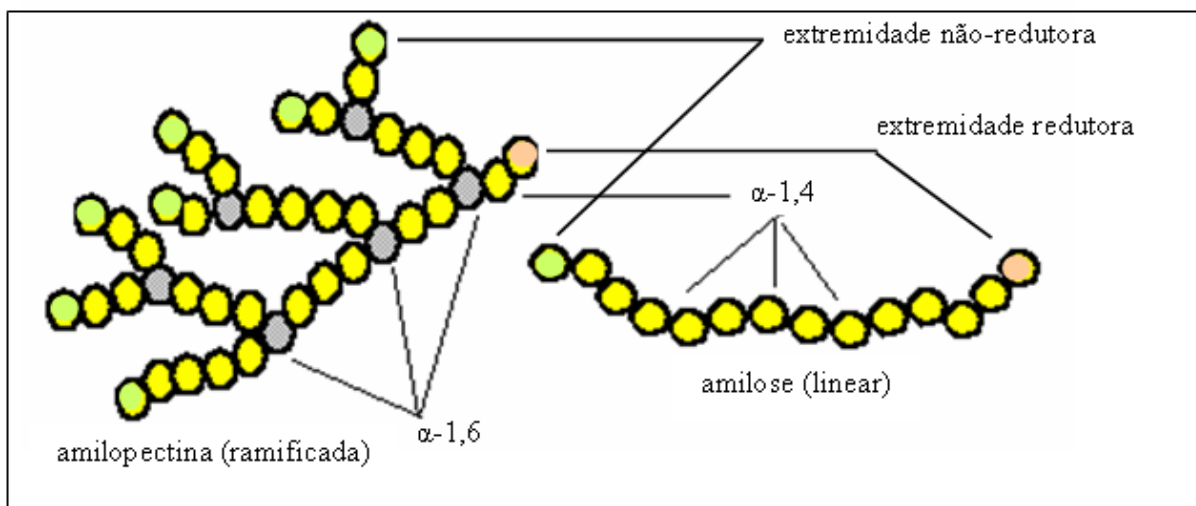


FIGURA 2 – Desenho representativo da molécula de amilose e amilopectina do amido.

Fonte: Disponível em: <www.geocities.com/.../9071/Polissac.html>. Acesso em: 10 de maio de 2007.

Para uso industrial, o amido necessita ser degradado em maltodextrinas, maltose e glucose por enzimas amilolíticas de especificidade variável (BRYJAK, 2003). A hidrólise se

dá por desdobramento total das moléculas de amilose ou amilopectina que, ao se romperem, transformam-se em dextrinas cada vez mais simples e finalmente em glucose. O amido não tem sabor, mas os produtos de uma hidrólise intensa apresentam sabor adocicado (FRANCO et al., 2001).

As enzimas amilolíticas pertencem à categoria das enzimas que catalisam as reações de hidrólises (hidrolases) e, mais particularmente, à categoria das enzimas que catalisam as reações de amido (MERCIER, 1985). Elas podem ser classificadas pela região de atuação ou pelo mecanismo de ação (ROBYT, 1984; FORGARTY, 1983).

De acordo com a região de atuação as hidrolases estão divididas em: endo-enzimas, α -amilase, CGTase e pululanase, que cortam ao acaso as ligações glicosídicas no interior da molécula; e em exo-enzimas, β -amilase, glucoamilase, que hidrolisam a molécula a partir de uma extremidade não-redutora (ROBYT, 1984).

De acordo com o mecanismo de ação as enzimas amilolíticas estão classificadas em:

- α -amilase: é uma enzima que catalisa especificamente e ao acaso (endo-enzima) a hidrólise das ligações α -1,4 do amido, mas não pode catalisar a hidrólise das ligações α -1,6. Esta enzima transforma o amido em α -dextrinas de alta massa molecular. A ação da α -amilase sobre a amilose produz apenas dextrinas. A α -amilase é considerada uma enzima liquidificante, porque reduz drasticamente a viscosidade de pastas gelificadas de amido.
- β -amilase: catalisa especificamente a hidrólise das ligações α -1,4 do amido a partir de uma extremidade não-redutora (exo-enzima) produzindo apenas maltose, açúcar composto de duas unidades de glucose unidas por ligação α -1,4 com apenas uma extremidade redutora. Glucose pode aparecer apenas se o número de unidades de glucose no amido for ímpar, de forma que ao cortar maltose, sobra uma glucose. A β -amilase é considerada uma enzima sacarificante porque produz açúcares a partir do amido. A ação conjunta de α e β -amilases sobre a amilopectina, com a impossibilidade de hidrolisar as ligações α -1,6, produz as dextrinas-

limites, designação genérica para um conjunto de dextrinas de diferentes massas moleculares, nas quais todas as extremidades possuem uma unidade de glucose ou uma unidade de maltose, ligadas por α -1,6.

- Glucoamilase é uma enzima liquidificante e sacarificante, que hidrolisa completamente o amido em glucose a partir de uma extremidade não-redutora. É a única capaz de hidrolisar ao mesmo tempo as ligações α -1,4 e α -1,6. O resultado da conversão enzimática do amido por glucoamilase é a transformação total em unidades de glucose.
- As enzimas desramificantes: incluem diversas enzimas deste tipo, como a R-enzima, pululanase, isoamilase e oligo-1,6-glucosidase. Estas enzimas são capazes de hidrolisar apenas as ligações α -1,6 do amido, elas têm características e especialidades diferentes, mas no geral removem as ramificações, transformando o amido em dextrinas retas.
- Ciclicizantes ou CGTases: diversos microrganismos produzem estas endo-enzimas capazes ao mesmo tempo, de cortar dextrinas de 7, 8 e 9 moléculas de glucose e promover sua ciclização para formar ciclodextrinas (FORGARTY, 1983).

De acordo com Pandey et al. (1999; 2005), as enzimas amilolíticas são produzidas principalmente por fungos filamentosos, sendo preferidas espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus*. Wainwright (1995) e Pandey (2005) descreveram que espécies como o *Aspergillus oryzae*, *A. awamori*, *Fusarium oxysporum*, *Humicola insolens*, *Mucor pusillus*, *Trichoderma viride* são produtoras de α -amilase, *Aspergillus fumigatus*, *A. saitri*, *A. terreus*, *A. foetidus* e *Rhizopus foetidus*, são espécies de fungos usadas para produção de glucoamilase e *Aspergillus niger* pode produzir ambas as enzimas.

As amilases têm grande importância em biotecnologia, apresentando largo campo de aplicação. Enzimas amilolíticas são utilizadas na indústria de panificação para dar a estes produtos um volume maior, melhor cor e maciez. Na produção de glucose e frutose, as enzimas são usadas para hidrolisar as moléculas de amido. Nas indústrias de papel, utilizam-

se amilases para proteção do papel contra danos mecânicos e melhoria do acabamento final. Amilases também têm sido usadas em alimentos para bebês e adicionadas aos cereais para baixar sua viscosidade e em fábricas de cerveja para produzir a cerveja clara (NOROUZIAN et al., 2006; SPIER et al., 2005).

3.6.1 Uso de enzimas na modificação do amido

O amido é o principal constituinte de muitos alimentos, sendo a principal fonte de energia e, também, um fator essencial para a estrutura, consistência e textura dos alimentos. Os amidos provenientes de fontes diferentes apresentam propriedades químicas e físicas distintas. Em consequência, surgiram várias técnicas para a conversão industrial dos materiais amiláceos em xaropes, essencialmente usados como adoçantes. Na Tabela 2, são apresentados alguns dos produtos formados a partir da hidrólise do amido e sua utilização na indústria de alimentos (VITOLO, 2001).

TABELA 2 – Uso dos produtos da hidrólise do amido

PRODUTO	USOS
Maltodextrinas	Estabilizantes, espessantes, gomas
Xaropes mistos (DE*: 42-63)	Confeitaria, refrigerantes
Xarope de maltose	Confeitaria
Xarope de glucose	Refrigerantes e balas
Xaropes com alto teor de frutose	Refrigerantes, conservas e caldas

DE* = equivalente em dextrose

Fonte: Vitolo (2001).

A partir do final da década de 80, a hidrólise do amido, que era realizada por meio ácido, passou a ser realizada através da ação de enzimas, devido ao aumento da produtividade do processo hidrolítico, à melhor qualidade do produto final e à economia de energia (SURMELY et al., 2003).

O processamento do material amiláceo é iniciado misturando-o com água, obtendo-se uma pasta contendo 25 a 40 % de amido em base seca. A pasta é aquecida acima de 60 °C para que os grânulos de amido inchem e se desagreguem, além de promover a precipitação de proteínas eventualmente aderidas ao grânulo. A temperatura de gelatinização depende da

matéria-prima empregada. Este processo provoca um aumento de viscosidade, podendo, muitas vezes, ser observado o fenômeno da retrogradação, além da hidrólise parcial do amido. A pasta de amido gelatinizada é, a seguir, submetida aos processos de liquefação e de sacarificação (VITOLLO, 2001; GOMES, et al., 2007).

3.6.1.1 Liquefação

O processo tradicional é realizado usando HCl como agente hidrolítico. A pasta de amido é acidificada (*pH* ao redor de 2,0) e aquecida a 140-155 °C por 5 ou 10 minutos. Esse tratamento é capaz de liquefazer qualquer tipo de material amiláceo, porém, provoca a formação de produtos secundários, os quais devem ser removidos do xarope obtido. Para contornar esse problema, e também do alto gasto energético do processo, passou-se a usar uma α -amilase termoestável obtida de *Bacillus subtilis*, a qual resiste à temperatura da ordem de 90 °C. Na liquefação enzimática é adicionada à pasta de amido uma certa quantidade de α -amilase bacteriana, o *pH* ajustado para 6,0-6,5 com hidróxido de sódio e a mistura aquecida a 95 °C por 2 horas, seguindo então a etapa de sacarificação (AIYER, 2005).

3.6.1.2 Sacarificação

No processo de sacarificação, que deve ser efetuada tão logo a liquefação tenha sido concluída, é utilizada a glucoamilase, em geral obtida de *Aspergillus niger* e α -amilase fúngica obtida de *Aspergillus oryzae*. O uso combinado ou não dessas enzimas permite obter uma ampla variedade de produtos, como observado na Tabela 3 (VITOLLO, 2001; GOMES et al., 2007).

TABELA 3 - Etapas da conversão enzimática do amido.

ENZIMA	TRANSFORMAÇÃO	PRODUTOS
α -amilase bacteriana	Pasta de amido dextrinizada, liquefeita e viscosidade baixa	Maltodextrinas
α -amilase fúngica e glucoamilase	Oligossacarídeos hidrolisados (sacarificação)	Xaropes de maltose, de glucose e mistos
Glucose isomerase	Isomerização da mistura sacarificada	Xaropes com alto teor em frutose
	Refino do resíduo resultante da isomerização	Oligossacarídeos residuais e glucose

Fonte: Vitolo (2001).

Para a obtenção dos xaropes de glucose, a enzima usada é a glucoamilase, que atua sobre o amido liquefeito, sendo o teor de glucose da ordem de 97% em base seca. Esse tipo de xarope tem cerca 3% de maltose e/ou isomaltose. O xarope pode ser seco em *spray drier*, e vendido sem purificação. Pode também servir de matéria-prima, tanto para obter a glucose cristalizada quanto para a produção do xarope com alto teor de frutose (HFCS). Para xarope de alta conversão, utilizam-se em conjunto a α -amilase fúngica e a glucoamilase. É um xarope estável e não cristaliza a temperatura ambiente embora, possua cerca de 83% de sólidos secos totais. É muito usado na indústria alimentícia, não só pelo teor de açúcares redutores, mas também pela cor, sabor e índice de dulçor (SURMELY et al., 2003).

O HFCS é produzido pela isomerização enzimática da glucose, pela enzima glucose isomerase e adquiriu grande importância comercial entre 1974 e 1975, quando ocorreu um aumento no preço do açúcar da cana. A composição do xarope é análoga ao açúcar invertido, com a vantagem de que o país que não possui cana ou beterraba pode produzi-lo a partir do amido (VITOLLO, 2001; AIYER, 2005). Na Tabela 4 podem ser observados os produtos formados pela hidrólise do amido e as enzimas utilizadas em cada etapa do processo.

TABELA 4 – Enzimas utilizadas na obtenção dos produtos da hidrólise do amido.

PRODUTO	LIQUEFAÇÃO	SACARIFICAÇÃO	ISOMERIZAÇÃO
Xarope de glucose	α -amilase*	glucoamilase	-
Xarope de maltose	α -amilase*	α -amilase**	-
HFCS	α -amilase*	glucoamilase	Isoamilase
Xarope rico em maltose	α -amilase*	α -amilase**	-
Xarope de alta conservação	α -amilase*	glucoamilase e α -amilase**	-

* α -amilase bacteriana termoestável e ** α -amilase fúngica

Fonte: Vitolo (2001).

3.7 GLUCOAMILASE

A glucoamilase também é conhecida como amiloglucosidase, enzima glucogênica, amido glucogenase, gama-amilase e exo-1,4- α -D-glucano glucohidrolase, EC. 3.2.1.3 conforme a “*Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry*”. Ao contrário de α -amilases, muitas glucoamilases também são hábeis em hidrolisar as ligações α -1,6 de pontos de ramificação de amilopectina, embora em uma razão menor que as ligações α -1,4, fornecendo quase a degradação completa do amido em glucose (SELVAKUMAR; ASHAKUMARY; PANDEY, 1996; RANI; DAS; SATYANARAYANA, 2000; CEPEDA; HERMOSA; BALLESTEROS, 2001). É responsável pela hidrólise de unidades de β -D-glucose de extremidades não-redutoras da amilose e amilopectina, como de outras moléculas como maltose, dextrinas e glicogênio. É uma enzima de indução, sendo importante a presença de maltose ou amido no meio para sua alta produção, porém, a hidrólise do amido à glucose ocorre mais rapidamente do que o consumo de glucose pelo microrganismo, causando inibição do crescimento e repressão na síntese da enzima devido ao acúmulo do produto da reação (SCHIMIDELL; MENEZES, 1986). A glucoamilase pode ser encontrada em meios de crescimento de bactérias e no malte de cevada; e também produzida por fungos, assumindo importância industrial devido à habilidade de formar menos produtos de reversão que a hidrólise ácida (PARK; SANTI, 1977).

A principal utilização da glucoamilase está na indústria de processamento de alimentos, para produzir açúcares solúveis do amido (MACKENZIE et al., 2000; RANI; DAS; SATYANARAYANA, 2000; PRICE; CLASSEN; PAYNE, 2001; AIYER, 2005). A glucoamilase produz xaropes com alto teor de glucose, em torno de 96 a 98% (GUZMÁN-MALDONADO; PAREDES-LÓPEZ, 1995; CEPEDA; HERMOSA; BALLESTEROS, 2001). Hansen et al. (1994) citaram o uso da glucoamilase para fabricação de sorbitol, um edulcorante utilizado por diabéticos. Labeille et al. (1997) afirmaram em seu trabalho que a

indústria de amido é a segunda maior consumidora de enzimas, movimentando milhões de dólares todos os anos, e a principal enzima consumida para conversão de amido em xaropes e etanol é a glucoamilase.

A origem da glucoamilase é essencialmente fúngica, da qual a maior parte é produzida por linhagens dos fungos *Aspergillus* e *Rhizopus*, sendo a de *Aspergillus* a mais termoestável, apresentando a máxima atividade em torno do *pH* 4,5-6,5 em temperatura de 50 a 70°C (ZANIN, 1989; NOROUZIAN et al., 2006).

A glucoamilase contém pelo menos duas isozimas eletroforeticamente distintas que diferem muito pouco em suas propriedades enzimáticas (LINEBACK; RUSSEL; RASMUSSEN, 1969; MEAGHER; NIKOLOV; REILLY, 1989). Aalbaek et al. (2002) relataram que três formas de glucoamilase têm sido encontradas com massas moleculares diferentes, a glucoamilase I (GA I) com 91kDa, a glucoamilase II (GA II) com 73 kDa e a glucoamilase III (GA III) com 59 kDa, todas produzidas por *Aspergillus niger*, e proteases presentes no meio catalisam modificações do perfil extracelular nas múltiplas formas de glucoamilase por degradação da GA I para GA II. Segundo Pazur e Kleppe (1971), as isoformas de glucoamilase de *Aspergillus niger* são codificadas a partir de um único gene com massa molecular de 112 e 99 kDa, mas existem de duas a três formas variáveis da enzima produzidas por proteólise limitada, diferentemente do que foi encontrado por Hata et al. (1997) em estudos realizados com duas formas de glucoamilase de *Aspergillus oryzae* cujas massas moleculares são 65 kDa e 63-99 kDa, respectivamente, onde eles afirmaram que as duas formas são traduzidas de diferentes genes. Outra explicação para a multiplicidade de formas de glucoamilase pode ser a deglicosilação enzimática da enzima, por glucosidases no meio de cultura ou *splincing* alternativo de diferentes RNAm para uma transcrição primária (FIEROBE et al., 1997).

As múltiplas formas extracelulares da enzima diferem na habilidade da hidrólise do amido cru a monômeros de glucose, a maior isoforma (GA I) têm grande afinidade para estes substratos, sendo a que fornece melhores resultados (AALBAEK et al., 2002).

Todas as formas da glucoamilase de *Aspergillus niger* são glicoproteínas, possuem diferentes quantidades de glicosilações (NOROUZIAN et al., 2006) e apresentam um domínio catalítico e um domínio de ligação para o substrato amido. A enzima contém uma região de carboidratos bem específica consistindo de 30 cadeias na forma de di ou trissacarídeos, principalmente manose (JAFARI-AGHDAMA et al., 2005).

As glucoamilases provenientes de diferentes fontes apresentam *pH* ótimo entre 3,0 e 5,0 (COSTA, 1996; SOCCOL, et al., 2005) apresentando maior estabilidade em *pH* 4,0-5,0 (REED, 1975). A temperatura ótima da enzima se encontra na maioria das vezes entre 50 e 60 °C (REED, 1975; COSTA, 1996). A Tabela 5 traz a relação dos valores de *pH* e temperatura ótimos e de estabilidade da glucoamilase de alguns microrganismos.

TABELA 5 – Valores encontrados para o *pH* e temperatura ótimos e de estabilidade da glucoamilase.

<i>pH</i> ÓTIMO	TEMPERATURA ÓTIMA	REFERÊNCIA
<i>Aspergillus niger</i>		
5,0	55 °C	Bahar e Çelebi (1998); Anto, Trivedi e Patel (2006)
3,0-5,5	60 °C	Silva, Asquiere e Fernandes (2005)
<i>Aspergillus fulmigatus</i>		
5,0	65 °C	Da Silva e Peralta (2006)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>		
3,8-4,0	70 °C	Thorsen et al. (2006)
<i>pH</i> DE ESTABILIDADE	TEMPERATURA DE ESTABILIDADE	REFERÊNCIA
<i>Aspergillus niger</i>		
4,5	50 °C	Bahar e Çelebi (1998)
<i>Aspergillus flavus</i>		
5,0	70 °C	Gomes et al. (2005); Taylor, Napier e Fleming (1978)

3.8 FATORES QUE INTERFEREM NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A especificidade enzimática reside no fato de que cada enzima apresenta um centro ativo formado por resíduos de aminoácidos, o que forma uma cavidade com estrutura definida, onde o substrato, que apresenta forma espacial adequada e grupos químicos capazes de estabelecer ligações precisas com os radicais do centro ativo, possa se alojar. Vários fatores podem interferir na atividade de uma enzima e devem ser cuidadosamente observados para que se tenha um melhor resultado no processo de atuação da mesma. Dentre estes fatores, os mais importantes são *pH*, temperatura e concentração de substrato (MARZZOCO; TORRES, 1999).

3.8.1 Atividade enzimática

A quantidade de uma determinada enzima presente em um meio é complexa, pois parte da enzima pode estar inativa, além da possibilidade da existência de outras enzimas no mesmo meio. O parâmetro mais importante que deve ser considerado na quantificação de uma enzima é a sua atividade (CHAPLIN; BUCKE, 1992). Essa atividade geralmente é medida como uma unidade enzimática (*U*), unidade internacional, a qual é definida como a quantidade que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato por minuto em condições definidas no ensaio como temperatura, *pH* e concentração de substrato (HENRY, 1964; SEGEL, 1976; SCOPES, 1988; CHAPLIN; BUCKE, 1992).

3.8.2 *pH*

As variações do *pH* podem exercer muitas alterações nas reações catalisadas por enzimas. Em valores distintos de um *pH* de funcionalidade, podem ocorrer mudanças na posição de equilíbrio de uma reação, se o próton H^+ aparecer como reagente ou produto na equação global, por consequência, os grupos ionizáveis da enzima (radicais de aminoácidos)

interagem com estes prótons, podendo se encontrar tanto na forma protonada quanto desprotonada de forma diferente da conformação nativa levando ao desenrolamento e conseqüente inativação da enzima, o que caracteriza perda de estabilidade (PRICE; DWEK, 1979; MARZZOCO; TORRES, 1999).

3.8.3 Temperatura

A temperatura é uma propriedade física que interfere muito na estabilidade da matéria. Dependendo da temperatura do sistema, as moléculas podem ganhar ou perder energia, alterando seu grau de agitação e muitas vezes perdendo a estabilidade. Altas temperaturas rompem ou modificam interações fracas que estabilizavam a conformação nativa da proteína (enzima), com isso, ela muda sua estrutura tridimensional, perdendo a função desejada (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

3.8.4 Concentração de substrato

O estudo da velocidade das reações químicas chama-se cinética que, no caso das enzimas, tem por objetivo a compreensão de seu mecanismo de ação e da velocidade das reações por elas catalisadas, avaliando também as alterações na velocidade de reação, em resposta a modificações de parâmetros experimentais. A concentração do substrato $[S]$ é um fator que afeta a velocidade de uma reação enzimática. Em $[S]$ pequenas, a velocidade inicial (V_o) é baixa. Em $[S]$ maiores a V_o é maior e mais estável. Finalmente, é alcançado um ponto acima do qual a $[S]$ não altera mais a V_o , chamada então de velocidade máxima (V_{max}). A velocidade da reação deve ser proporcional à concentração do complexo enzima-substrato $[ES]$. A quebra do ES é o passo limitante da velocidade (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002). Portanto, é necessário conhecer a quantidade adequada de substrato a ser utilizada para a dosagem de uma determinada enzima e esta determinação deve ser realizada quando a

enzima estiver trabalhando com velocidade máxima (HENRY, 1964; SCOPES, 1988; CHAPLIN; BUCKE, 1992; SEGEL, 1976).

3.9 PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

Para a purificação de enzimas, assim como para outros produtos biotecnológicos, não há processos de aplicação geral. Entretanto, o procedimento pode ser dividido em quatro etapas principais: separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo (clarificação); concentração e/ou purificação de baixa resolução (precipitação fracionada com adição de sais ou solventes orgânicos); purificação de alta resolução (cromatografias) e, finalmente, operações para acondicionamento final do produto (cristalização e liofilização) (KILIKIAN; PESSOA JR, 2001).

A definição das operações unitárias de um processo de purificação depende do uso da molécula alvo, suas características físico-químicas, propriedades biológicas, fonte da qual a molécula será purificada e da tecnologia de purificação disponível (KILIKIAN; PESSOA JR, 2001). Segundo Castilho, Medronho e Alves (2000) a recuperação, concentração e purificação de enzimas constituem um passo importante do processo biotecnológico para obtenção de produtos de alta pureza, sendo responsável por grande parte dos custos finais do processo. Para minimizar estes custos é importante a escolha adequada de métodos de separação e purificação.

Muitos trabalhos têm sido conduzidos com o objetivo de purificar a glucoamilase, sendo esta destinada a diversas finalidades como uso industrial, caracterização química e bioquímica, conhecimento de estrutura etc. A literatura traz várias metodologias diferentes para atingir este objetivo, utilizando técnicas de precipitação com sais, cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão em gel, extração em sistema bifásico etc.

Tanuja et al. (1997) e Minami e Kilikian (1998) realizaram a extração da glucoamilase em sistema bifásico utilizando polietilenoglicol (PEG) e fosfato de potássio, variando as concentrações de PEG e os valores de *pH*. A extração foi realizada em duas etapas, a primeira para remoção de pigmentos e contaminantes e a segunda para separação da enzima.

Nos trabalhos conduzidos por Wallis et al. (2001) foi utilizada cromatografia em Q-Sepharose equilibrada com tampão Tris-HCl, 0,005 mol/L, *pH* 7,5 e AQ Neobar equilibrada com o mesmo tampão em FPLC. Hata et al. (1997) utilizaram DEAE-cellulofine equilibrada com tampão acetato, 0,01 mol/L, *pH* 5,0 e Resouce Q equilibrada com o mesmo tampão. Thorsen et al. (2006) utilizaram Q-Sepharose equilibrada com tampão imidazol, 0,05 mol/L, *pH* 7,0, Sephacryl S-200 (HPLC) equilibrada com o mesmo tampão e Fenil-Sepharose (HPLC) também equilibrada com tampão imidazol. Bhatti et al. (2007) utilizaram Q-Sepharose equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05 mol/L, *pH* 7,5, Fenil Sepharose equilibrada com tampão fosfato 0,05 mol/L, *pH* 7,0 e Mono-Q equilibrada com tampão Tris/HCl 0,05 mol/L, *pH* 7,5.

Belshaw e Williamson (1990) purificaram um domínio de glucoamilase de *Aspergillus niger* produzido por digestão proteolítica, através de cromatografia de troca aniônica em mono Q equilibrada com tampão Tris/HCl, 0,002 mol/L, *pH* 7,0 e cromatografia de exclusão em gel em Sephacryl S-200 equilibrada com tampão acetato de sódio, 0,05mol/L, *pH* 5,0. O peptídeo obtido apresentou massa molecular de 25,1 kDa e aproximadamente 38% de carboidratos e correspondendo aos resíduos 471-616 do C-terminal da GA I.

Harsa e Furusaki (2001) purificaram a glucoamilase por cromatografia de afinidade utilizando matriz de β -ciclodextrina quitosano em duas etapas, com uma recuperação de 72%.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A produção, caracterização bioquímica e purificação parcial da glucoamilase foram realizadas nos laboratórios do CTA – Centro de Tecnologia de Alimentos e nos laboratórios de Biotecnologia do CIPP – Centro Interdisciplinar de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.1 MATERIAIS

Para a realização da pesquisa foi utilizada uma linhagem de *Aspergillus niger*, mantida em PDA acidificado (Potato Dextrose Agar) a 4°C, cedida gentilmente pela Profa. Dra. Tânia Bonfim, do Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal do Paraná. Para o crescimento celular foi utilizado como substrato resíduo do processamento de batata, cedido pela Vapza Alimentos S.A., localizada no município de Castro no estado do Paraná. Os reagentes utilizados foram de grau analítico. As proteínas utilizadas como padrão de massa molecular foram: fosforilase b (97 kDa); albumina (66 kDa); ovoalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa) adquiridos da Amersham Biosciences.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção do resíduo da indústria de processamento de batata

A indústria doadora do resíduo comercializa a batata descascada, embalada à vácuo e cozida o que garante maior vida de prateleira ao produto. O processo de descascamento ocorre com a submissão da batata a uma certa pressão de vapor o que causa o desprendimento da casca, junto com esta, uma pequena porção da polpa também é eliminada totalmente gomificada (gelatinizada). Esta mistura de casca e polpa (resíduo) rica em amido, proveniente

de um único lote, foi utilizada como meio de cultura para fermentação em estado sólido de *Aspergillus niger*.

Na Figura 3 podem ser observadas as etapas realizadas para o processamento da batata comercializada pela empresa fornecedora do resíduo. O material utilizado nesta pesquisa aparece em destaque.

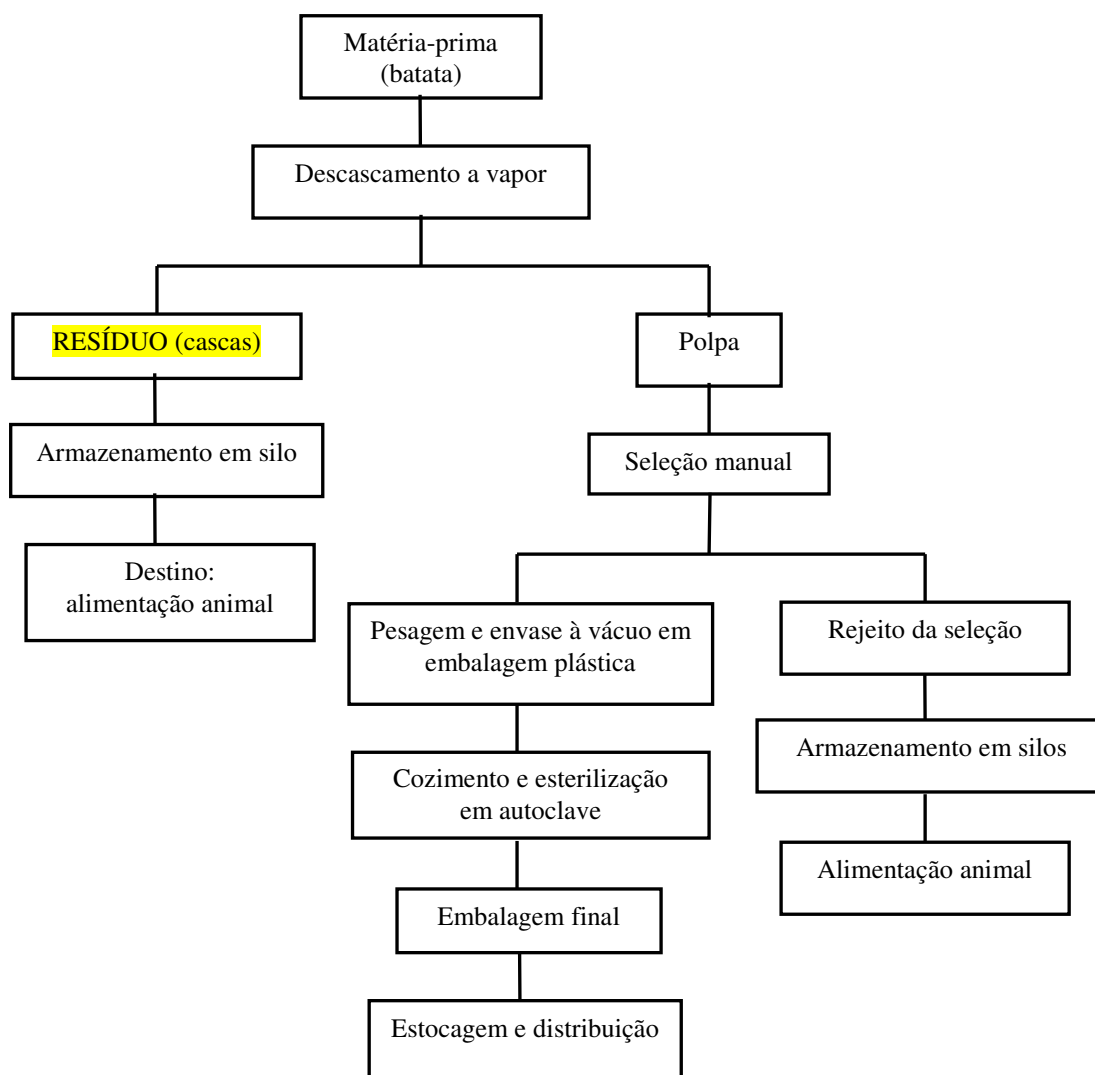


FIGURA 3 – Fluxograma do processamento da batata.
Fonte: Pereira et al. (2005)

4.2.2 Caracterização físico-química do resíduo

A caracterização físico-química do resíduo de batata foi realizada através das análises de teor de amido, açúcar redutor, glucose, umidade, cinzas, fibras, lipídeos, proteínas, fósforo, e nitrogênio, conforme a Tabela 6.

TABELA 6 – Métodos utilizados na caracterização físico-química do resíduo de batata.

DETERMINAÇÃO	DESCRIÇÃO	MÉTODO
Amido	Método enzimático	Leonel e Cereda (2002)
Açúcar redutor	Hidrólise ácida	Somogyi (1952)
Glucose	Glucose-oxidase	Dahlqvist (1961)
Umidade	Método termogravimétrico usando estufa a 105 °C durante 24 horas.	Instituto Adolfo Lutz (1985)
Cinzas	Método termogravimétrico após calcinação do material em mufla a 660 °C por 24 horas	AOAC (2000)
Fibras	Método gravimétrico	Instituto Adolfo Lutz (1985)
Lipídeos	Determinado por gravimetria após extração com hexano, refluxado por 4 horas em extrator Soxhlet	Instituto Adolfo Lutz (1985)
Proteínas e Nitrogênio	Fração protéica determinada indiretamente, a partir da determinação da concentração de nitrogênio pelo método de Kjeldahl	Instituto Adolfo Lutz (1985)
Fósforo	Digestão ácida, via seca	Silva (1981)
<i>pH</i>	Medido em potenciômetro	

4.2.3 Produção de glucoamilase por FES

4.2.3.1 Preparação do meio de cultura

Foram utilizados como substrato 50 g de resíduo de batata, sem suplementação de nutrientes, adicionados em frascos erlenmeyer com capacidade de 250 mL como fermentadores. A umidade foi ajustada para 85 % e o meio autoclavado a 121 °C por 15 minutos para posterior inoculação do fungo. A Figura 4 ilustra o sistema de fermentação utilizado.



FIGURA 4 – Foto do sistema de fermentação para produção de glucoamilase.

4.2.3.2 Manutenção do microrganismo *Aspergillus niger*

O meio utilizado para manutenção foi o Potato Dextrose Agar (PDA) marca Difco, sendo preparado em uma concentração de 39 g/L. Em seguida foi distribuído em tubos de 25 mL na razão de 15 mL por tubo. Os tubos então foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Após a esterilização o *pH* foi ajustado para 3,5 pela adição de 150 µL de ácido tártarico 10 % (m/V) e colocados em posição inclinada para solidificação.

A repicagem do fungo foi realizada em fluxo laminar com auxílio de uma alça metálica, os esporos do fungo foram transferidos do tubo estoque para um meio recém preparado e deixados a 28 °C por 72 horas para multiplicação celular. Após este período os fungos eram armazenados a 4 °C e a repicagem repetida a cada 15 dias, evitando desta forma a utilização de uma cultura velha e o aumento da fase de lag no crescimento microbiano.

4.2.3.3 Preparo da suspensão de esporos e inoculação

Para a fermentação do resíduo de batata pelo *Aspergillus niger*, esporos do fungo foram inoculados nos fermentadores na ordem de 10^7 ufc/mL, reproduzindo a concentração ótima obtida por Spier (2005). A suspensão de esporos foi preparada adicionando 10 mL de água estéril ao tubo contendo o microrganismo anteriormente repicado. O micélio foi raspado gentilmente com auxílio de uma alça metálica para a liberação dos esporos e a solução obtida

foi inoculada em cada erlenmeyer contendo o meio de cultura para a fermentação, a qual ocorreu a 32 °C por 48 horas (SILVA; ASQUIERI; FERNANDES, 2005; SPIER, 2005).

A quantidade de esporos inoculada foi padronizada através de contagem em câmara de Neubauer, colocando-se sobre a lâmina, uma gota de esporos em suspensão e cobrindo-se com lamínula. A leitura foi realizada em microscópio ótico utilizando lente com aumento de 100x.

4.2.3.4 Recuperação da glucoamilase

Após o crescimento celular e produção da enzima foi adicionado ao frasco fermentador 25 mL de tampão acetato 0,1 mol/L, *pH* 4,6. O meio de cultura foi triturado com bastão de vidro e levado para agitação em *shaker* rotatório (Edison NJ - USA, C25KC) a 150 rpm e 15 °C por 1 h. Após este período a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm e 4 °C por 15 min (Centrífuga Himac CR21G), o sobrenadante, considerado como extrato bruto, foi então filtrado em papel Whatman nº 1 e armazenado em refrigerador a 4 °C.

4.2.3.5 Determinação de atividade da glucoamilase

Para a verificação da atividade enzimática da glucoamilase foi utilizada a metodologia descrita por Silva, Asquiere e Fernandes (2005) adaptada para um volume de 1 mL, no qual continha solução da enzima (200 µL), solução de amido solúvel da marca Sigma-Aldrich a 0,5 g/100 mL como substrato (333 µL) e tampão acetato 0,1 mol/L, *pH* 4,6 (467 µL). O sistema foi colocado para reagir por 15 min a 60 °C, após este período a enzima foi inativada por aquecimento a 100 °C por 5 min. O controle foi feito misturando-se 200 µL do extrato enzimático com 800 µL de tampão acetato 0,1 mol/L, *pH* 4,6. A glucose produzida

pela ação enzimática e a glucose livre¹ (controle) foram determinadas pelo método da glucose oxidase – GOD (DAHLQVIST, 1961), no qual foram adicionados ao sistema 1 mL de água e 1 mL do reativo de GOD da marca Gold Analisa, após 20 min a 37 °C foi realizada leitura a 520 nm (Espectrofotômetro Femto 428).

A glucose oxidase catalisa a oxidação da glucose para ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorbância medida em 520 nm é diretamente proporcional à concentração de glucose na amostra (Gold Analisa).

Uma unidade de glucoamilase corresponde à quantidade de enzima que catalisa a formação 1,0 µmol de glucose por minuto sob as condições do ensaio.

4.2.4 Estudo cinético de produção de glucoamilase

O estudo cinético de produção de glucoamilase foi realizada com o objetivo de determinar o tempo no qual o *Aspergillus niger* apresenta o maior rendimento na produção da enzima sob as condições de fermentação descritas no item 4.3.2.1. Para esta etapa da pesquisa o crescimento do fungo foi conduzido durante 120 horas, a 32 °C. Foram realizados 3 ensaios separados, todos nas mesmas condições, utilizando 11 fermentadores em cada um, sendo que a cada 12 horas um frasco era separado, a enzima extraída e a atividade enzimática medida como já descrito anteriormente.

4.2.5 Suplementação do meio de cultura com fontes de nitrogênio e fósforo

Com intuito de verificar a interferência da presença de fontes de nitrogênio e fósforo na produção da glucoamilase pelo *Aspergillus niger* foram realizados quatro

¹ Quantidade de glucose liberada pela ação da glucoamilase sobre o amido presente no substrato de fermentação e que não foi consumida pelo microrganismo.

experimentos como ilustrado na Tabela 7. As concentrações de fósforo e nitrogênio adicionadas aos meios de cultura foram utilizadas conforme Zaldivar-Aguero et al. (1997) e Chiquetto (1991), respectivamente. Os fermentadores foram incubados por 48 horas a 32 °C, transcorrido este período foi feita a extração da glucoamilase e a atividade catalítica foi medida de acordo com o item 4.2.3.5.

TABELA 7 – Matriz dos experimentos analisando a suplementação de nutrientes.

ENSAIOS	Na ₂ HPO ₄ 7,6/kg	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1,1 g/kg
1	-	-
2	X	-
3	-	X
4	X	X

4.2.6 Caracterização bioquímica

O extrato enzimático bruto produzido pela fermentação ficou armazenado em geladeira a 4 °C por 48 horas até a realização das análises bioquímicas as quais verificaram, temperatura e *pH* ótimos e de estabilidade e os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$).

4.2.6.1 Determinação da temperatura e *pH* ótimos de ação catalítica

Para a determinação da temperatura e *pH* ótimos para atividade da enzima foi utilizado planejamento fatorial completo 2², os níveis de estudo estão apresentados na Tabela 8. A resposta ou a variável independente foi a atividade da glucoamilase determinada como já descrito anteriormente. Para o experimento foram realizados 11 ensaios com 3 pontos centrais e 2 pontos axiais. Os resultados foram analisados através do software *Statistica* utilizando Experimental design.

TABELA 8 – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental fatorial de 2 níveis para *pH* e temperatura ótimos de atividade.

Fatores	Níveis				
	- 1,41	- 1	0	+ 1	+ 1,41
<i>pH</i>	3,0	3,6	5,0	6,9	7,5
<i>T</i> (°C)	40	46	60	71	75

4.2.6.2 Determinação da estabilidade térmica da glucoamilase

A estabilidade da glucoamilase em relação à temperatura foi analisada em 15, 35, 60 e 70 °C. Para cada experimento 5 mL da preparação enzimática foram previamente diluídos em tampão acetato 0,1 mol/L, *pH* 4,6 na proporção de 1:10, de modo a garantir que não ocorresse variação no valor de *pH*. O experimento foi conduzido por 0, 2, 4, 19 e 26 horas. Após cada tempo, uma alíquota de 5 mL de cada uma das amostras foi resfriada em banho de gelo e em seguida foi feita a medida da atividade residual da glucoamilase a 60 °C em *pH* 4,6 através de ensaio enzimático como descrito no item 4.2.3.5. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.6.3 Determinação da estabilidade da glucoamilase em relação ao *pH*

A estabilidade da glucoamilase foi analisada em *pH* 3,6; 4,0; 4,6 e 5,0 com tampão acetato 0,1 mol/L e *pH* 6,0 e 7,0 com tampão fosfato 0,1mol/L. Em cada experimento 5 mL da preparação enzimática foram diluídos nos tampões acima na proporção de 1:10 e incubados a 60 °C. O experimento foi conduzido por 0, 2, 18, 24 e 28 horas. Após cada tempo, uma alíquota de 1 mL de cada uma das amostras foi separada e diluída em 20 mL de tampão acetato 0,1 mol/L, *pH* 4,6 de modo que o sistema retornasse ao *pH* ótimo, em seguida foi feita a dosagem de atividade enzimática residual a 60 °C e *pH* 4,6 como descrito no item 4.2.3.5. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.6.4 Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$)

Os parâmetros cinéticos foram determinados através da variação da concentração de substrato utilizada para a verificação da atividade enzimática (velocidade de reação). O ensaio enzimático foi realizado utilizando solução de amido solúvel nas concentrações entre 0,1 e 1,0 g/100 mL com intervalos de 0,1, em *pH* 4,6 com tampão acetato 0,1 mol/L e 60 °C de acordo

com a metodologia descrita no item 4.2.3.5. Para cada concentração de substrato foi realizado um controle com amido em 200 μ L de tampão acetato 0,1 mol/L pH 4,6 no lugar da enzima. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados através dos dados obtidos pelo gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

4.2.7 Purificação da glucoamilase

4.2.7.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

O sulfato de amônio induz a precipitação de proteínas por *salting out*, sendo requerido em concentração variável. É comumente usado na primeira etapa da purificação para retirar as proteínas que precipitam em concentrações diferentes da proteína de interesse e ainda para concentrá-la (SCOPES, 1988).

O fracionamento com sulfato de amônio foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa foi adicionada à preparação enzimática uma determinada quantidade do sal de modo que a concentração final ficasse em 60%. Partindo-se de um volume de 1470 mL a 4 °C foram adicionados aos poucos e sob agitação constante 530,67 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (marca Biotec), após a dissolução completa do sal a solução foi deixada em repouso a 4 °C por 72 horas. Passado este tempo, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm e 4 °C por 30 min, sendo obtido 1710 mL de sobrenadante. Na segunda etapa foi adicionado ao sobrenadante 280,44 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ levando o sistema de uma concentração de 60 para 85% de saturação. Esta adição do sal também ocorreu lentamente e sob agitação, a solução final foi armazenada a 4 °C por 72 horas. Após este período a solução foi centrifugada a 10.000 rpm e 4 °C por 30 min e o precipitado foi ressuspenso em 24 mL de tampão acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 4,6.

4.2.7.2 Cromatografia de troca aniônica

A cromatografia de troca aniônica foi realizada em coluna Q-Sepharose que apresenta uma matriz de agarose (polissacarídeo linear que consiste de resíduos alternados de G-galactose e 3,6 anidro L-galactose) ligada a grupos de amina quaternária ($-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$). Esses grupos agem como trocadores fortes de ânions, uma vez que a ligação das proteínas negativamente carregadas a essa matriz é forte. A eluição foi feita em presença de sal NaCl. O íon Cl^- retira a molécula alvo do grupo amino imobilizado e, simultaneamente, o íon Na^+ se liga a molécula alvo, favorecendo a eluição da mesma.

Após a primeira etapa de purificação, realizada a partir da precipitação seletiva com sulfato de amônio, a enzima de interesse foi dialisada contra o tampão fosfato 0,005 mol/L *pH* 6,9 por 48 horas a 4 °C utilizando membrana de diálise de 14 kDa, após a diálise, 41 mL de amostra foram aplicados em Q-Sepharose Big Beads Coarse (Ge Healthcare). A resina foi empacotada em coluna C 16/20 (32 mL) também da GE Healthcare e equilibrada com tampão fosfato 0,005 mol/L *pH* 6,9 (2 volumes de coluna - VC), em um fluxo de 60 mL/h. Foi utilizado como eluente tampão fosfato de sódio, *pH* 6,9, 2 VC de cada uma das concentrações: 0,005, 0,02 e 0,2 mol/L; gradiente com tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L e o mesmo tampão acrescido de NaCl 1 mol/L e soluções de tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L com concentrações crescentes de NaCl de 1, 2 e 3 mol/L, aplicados em um fluxo de 60 mL/h. Frações de 4 mL foram monitoradas a 280 nm. As amostras referentes aos picos obtidos no cromatograma foram dialisadas contra água e analisadas em eletroforese SDS-PAGE e em relação ao desempenho de atividade catalítica, aquelas que apresentaram resultados condizentes com a presença da GA foram unidas e submetidas a uma nova etapa de purificação.

4.2.7.3 Cromatografia de troca catiônica

A cromatografia de troca catiônica foi realizada em coluna SP-Sepharose que apresenta uma matriz de agarose ligada a grupos sulfopropil ($-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$). Esses grupos agem como trocadores fortes de cátion, uma vez que a ligação das proteínas positivamente carregadas a essa matriz é bastante forte.

A fração obtida da cromatografia de troca aniônica foi dialisada contra tampão acetato 0,005 mol/L *pH* 4,6 por 48 horas a 4 °C em membrana de 14 kDa, após a diálise, 20 mL de amostra foram aplicados em SP-Sepharose Fast Flow (Ge Healthcare). A resina foi empacotada em coluna C 16/20 (32 mL) também da GE Healthcare e equilibrada com tampão acetato 0,005 mol/L *pH* 4,6 (2VC), em um fluxo de 60 mL/h. Foi utilizado como eluente tampão acetato, *pH* 4,6, 2 VC de cada uma das concentrações: 0,005, 0,02 e 0,2mol/L; gradiente com tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L e o mesmo tampão acrescido de NaCl 1 mol/L e soluções de tampão acetato 0,2 mol/L com concentrações crescentes de NaCl de 1, 2 e 3 mol/L, aplicados em um fluxo de 60 mL/h. Frações de 4 mL foram monitoradas a 280 nm. As amostras referentes aos picos obtidos no cromatograma foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE e em relação ao desempenho de atividade catalítica, aquelas que apresentaram resultados condizentes com a presença da GA foram unidas e submetidas a uma nova etapa de purificação.

4.2.7.4 Cromatografia em filtração em gel

A resina utilizada nesta cromatografia foi Sephadex G-100 da Sigma-Aldrich, formada por esferas porosas de dextrana polimerizadas responsáveis pela separação de proteínas por massa molecular em uma faixa que vai de 5 a 150 kDa. As proteínas menores conseguem penetrar mais facilmente as esferas e demoram mais para serem eluídas, já as moléculas

maiores são eluídas primeiro devido ao fato de apresentarem maior dificuldade em penetrar nos poros dos grânulos da resina.

A Sephadex G-100 foi empacotada em uma coluna de vidro (178 mL) com 2 VC de tampão acetato 0,005 mol/L, *pH* 4,6, através da gravidade, então, a amostra recolhida da cromatografia de troca catiônica (20 mL) foi aplicada na resina e eluída com tampão acetato 0,005 mol/L, *pH* 4,6 em um fluxo de 8 mL/h. Frações de 4 mL foram monitoradas a 280 nm. As amostras referentes aos picos obtidos no cromatograma foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE e em relação ao desempenho de atividade catalítica.

4.2.8 Métodos analíticos

Para a realização de toda a metodologia analítica as amostras necessitaram ser previamente dialisadas contra água por 48 horas a 4 °C, utilizando sistema de microdiálise com membrana de 14 kDa, com o objetivo de eliminar sais, solventes orgânicos ou outras moléculas químicas que pudessem interferir nas análises.

4.2.8.1 Eletroforese em SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida que utiliza o SDS como agente desnaturante de proteína é denominada SDS-PAGE (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*). A desnaturação é promovida pela ligação do SDS à proteína formando um complexo proteína-SDS de carga negativa. O número de moléculas de SDS ligado à proteína é proporcional ao seu tamanho. As análises eletroforéticas de proteínas em gel de poliacrilamida em condição desnaturante foram feitas como descrito por Laemmli (1970) usando sistema BioRad. A Tabela 9 contém a composição dos géis utilizados nas análises por SDS-PAGE realizadas neste trabalho.

TABELA 9 – Composição dos géis de separação e empilhamento utilizados nas análises por SDS-PAGE.

COMPONENTES	GEL DE SEPARAÇÃO	GEL DE EMPILHAMENTO
	10 %	
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0,8 % - m/v))	2,82 mL	0,792 mL
H ₂ O destilada	1,8 mL	3,72 mL
Tampão do gel – <i>pH</i> 8,45 (Tris 3 mol/L : SDS 0,3 % (m/v) : HCl)	2,82 mL	1,48 mL
Glicerol	1,14 g	-
TEMED	7,2 µL	7,2 µL
Persulfato de amônio (10 % - m/v)	200 µL	100 µL
Total	8,5 mL	6,1 mL

As amostras, antes de serem analisadas por SDS-PAGE, foram misturadas com tampão de amostra - SDS-PAGE (Tabela 10) na proporção de 1:4 e aquecidas a 95°C por 5 minutos. As eletroforeses foram realizadas a 100 V em tampão de corrida (Tabela 11) durante 3-4 horas, ou até o azul do bromofenol atingir 1 cm da borda inferior do gel. O gel foi corado com solução de azul de Coomassie e descorado com solução de ácido acético 7 %.

TABELA 10 – Composição do tampão de amostra para SDS-PAGE.

COMPONENTES	(mL)
H ₂ O destilada	4,0
Tris-HCl (0,5 M), <i>pH</i> 6,8	1,0
Glicerol	0,8
SDS (10 % - m/v)	1,6
2-Mercaptoetanol	0,4
Azul de bromofenol (0,5 % - m/v)	0,2
Total	8,0

TABELA 11 – Composição do tampão de corrida para SDS-PAGE

TAMPÃO DO CÁTODO	TAMPÃO DO ÂNODO
COMPONENTES	COMPONENTES
Tris (0,1 mol/L)	Tris (0,2 mol/L)
Tricina (0,1 mol/L)	H ₂ O destilada para 1000 mL
SDS (0,1 % -m/v))	<i>pH</i> 8,9 – solução de HCl
H ₂ O destilada p/ 1000 mL	
<i>pH</i> 8,25 – solução de HCl	

4.2.8.2 Ensaio de atividade enzimática

Em todas as etapas de purificação a presença da glucoamilase foi monitorada por ensaios de atividade enzimática como descrito no item 4.2.3.5.

4.2.8.3 Dosagem protéica

A quantificação de proteínas (mg/mL) foi feita através do método de Lowry (1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto de cor azul cuja absorbância é proporcional a concentração das proteínas. Os principais cromóforos são as ligações peptídicas, resíduos aromáticos de tirosina e triptofano e as cadeias polares. A concentração das amostras protéicas foi feita após a determinação da absorbância das mesmas em 700 nm.

4.2.9 Caracterização bioquímica da glucoamilase parcialmente purificada

Após a realização das etapas de purificação foi feita novamente a caracterização bioquímica da glucoamilase com a finalidade de se verificar se a enzima isolada mantém as mesmas características da preparação bruta. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.9.1 Determinação do *pH* ótimo de ação catalítica da glucoamilase parcialmente purificada

A determinação do *pH* ótimo para a GA parcialmente purificada foi realizada através de método univariado, seguindo os ensaios de atividade catalítica descritos no item 4.2.3.5, porém, substituindo o tampão utilizado na técnica por tampão HCl/KCl 0,1 mol/L, *pH* 1,5; citrato/fosfato 0,1 mol/L, *pH* 3,0 e 3,6; acetato 0,1 mol/L, *pH* 4,6 e 5,0; fosfato 0,1 mol/L, *pH* 6,9; 7,5 e 8,0; ácido bórico/bórax 0,1 mol/L, *pH* 9,0 e bórax/NaOH 0,1 mol/L, *pH* 10,5. A temperatura foi mantida fixa em 60 °C.

4.2.9.2 Determinação da temperatura ótima para a ação catalítica da glucoamilase parcialmente purificada

A determinação da temperatura ótima para a glucoamilase parcialmente purificada foi realizada através de método univariado, seguindo os ensaios de atividade catalítica descritos no item 4.2.3.5. Os experimentos foram conduzidos a 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C.

4.2.9.3 Determinação da temperatura e *pH* ótimos por planejamento fatorial completo (2^2) para a glucoamilase parcialmente purificada

Os níveis de estudo do planejamento fatorial completo (2^2) realizados neste experimento estão apresentados na Tabela 12. A resposta ou a variável dependente foi a atividade da glucoamilase determinada como já descrito anteriormente. Foram realizados 11 ensaios com 3 pontos centrais e 2 pontos axiais. Os resultados foram analisados através do software *Statistica* utilizando Experimental design.

TABELA 12 – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental fatorial de 2 níveis para *pH* e temperatura ótimos de atividade da glucoamilase parcialmente purificada.

Fatores	Níveis				
	- 1,41	- 1	0	+ 1	+ 1,41
<i>pH</i>	3,0	3,6	5,0	6,9	7,5
<i>T</i> (°C)	40	46	60	71	75

4.2.9.4 Determinação da estabilidade da glucoamilase parcialmente purificada em relação ao *pH*

A estabilidade da glucoamilase parcialmente purificada foi analisada em *pH* 3,6; 4,0; 4,6 e 5,0 com tampão acetato 0,1 mol/L e *pH* 6,0 e 7,0 com tampão fosfato 0,1 mol/L. Em cada experimento 0,5 mL da amostra foi diluído nos tampões acima na proporção de 1:20 e incubados a 60 °C. O experimento foi conduzido por 0, 2, 4, 8 e 24 horas. Após cada tempo, uma alíquota de 1 mL de cada uma das amostras foi separada e diluída em 30 mL de tampão acetato 0,1 mol/L, *pH* 4,6 de modo que o sistema retornasse ao *pH* ótimo, em seguida foi feita a dosagem de atividade enzimática residual a 60 °C e *pH* 4,6 como descrito no item 4.2.3.5.

4.2.9.5 Determinação da estabilidade térmica da glucoamilase parcialmente purificada

A estabilidade da glucoamilase parcialmente purificada em relação à temperatura foi analisada em 15, 35, 60 e 70 °C. Para cada experimento 0,5 mL da preparação enzimática foram previamente diluído em tampão acetato 0,1 mol/L, *pH* 4,6 na proporção de 1:20, de modo a garantir que não ocorresse variação no valor de *pH*. O experimento foi conduzido por 0, 2, 4, 8 e 24 horas. Após cada tempo, uma alíquota de 1 mL de cada uma das amostras foi resfriada em banho de gelo e em seguida foi feita a medida da atividade residual da glucoamilase a 60 °C em *pH* 4,6 através de ensaio enzimático como descrito no item 4.2.3.5.

4.2.9.6 Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$)

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ foram determinados conforme metodologia já descrita no item 4.2.6.4.

4.2.9.7 Diagrama de blocos

As Figuras 5, 6 e 7 apresentam as metodologias e suas etapas realizadas neste trabalho na forma de diagrama de blocos.

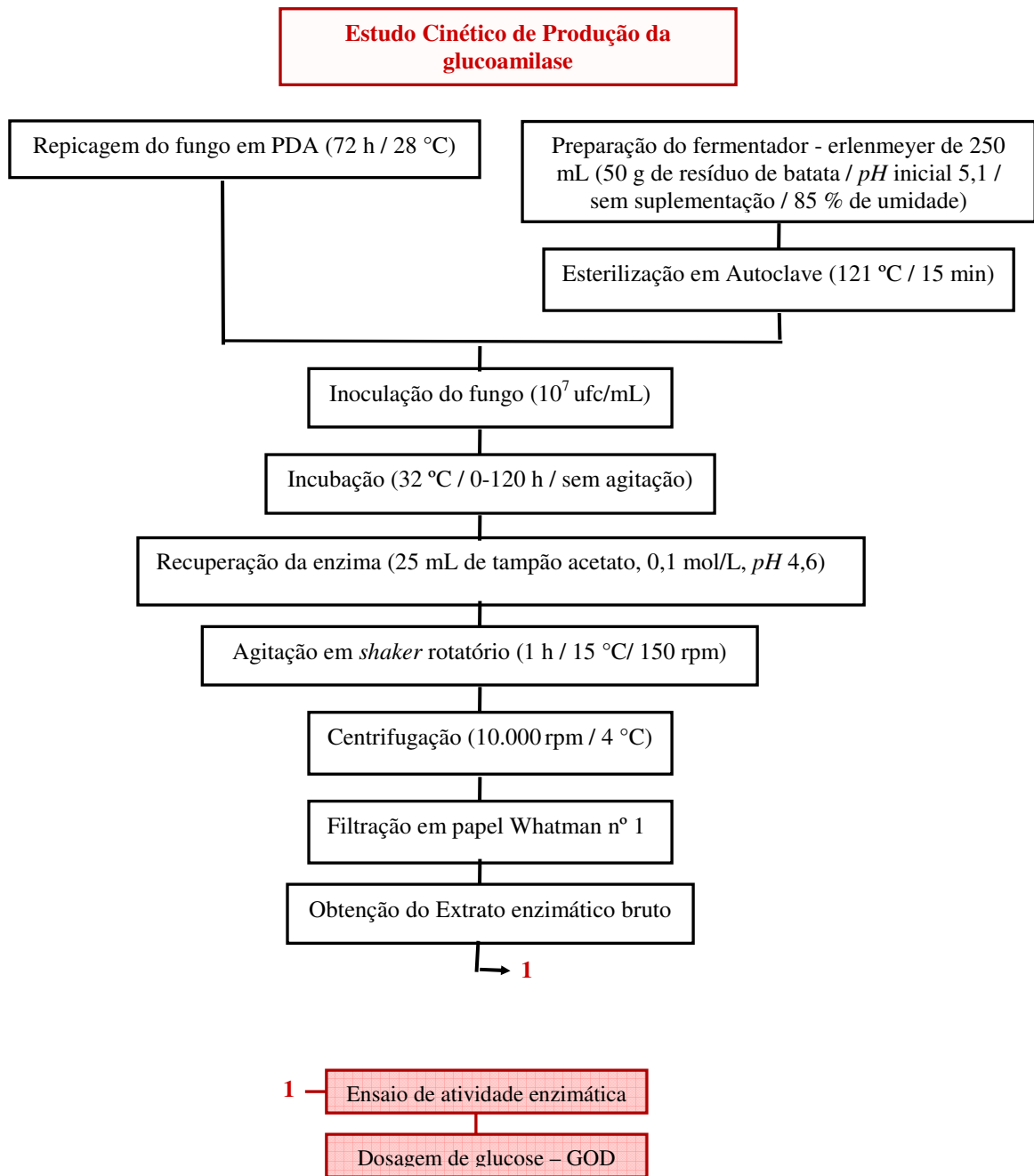


FIGURA 5 – Diagrama de blocos das etapas do estudo cinético de produção da glucoamilase.

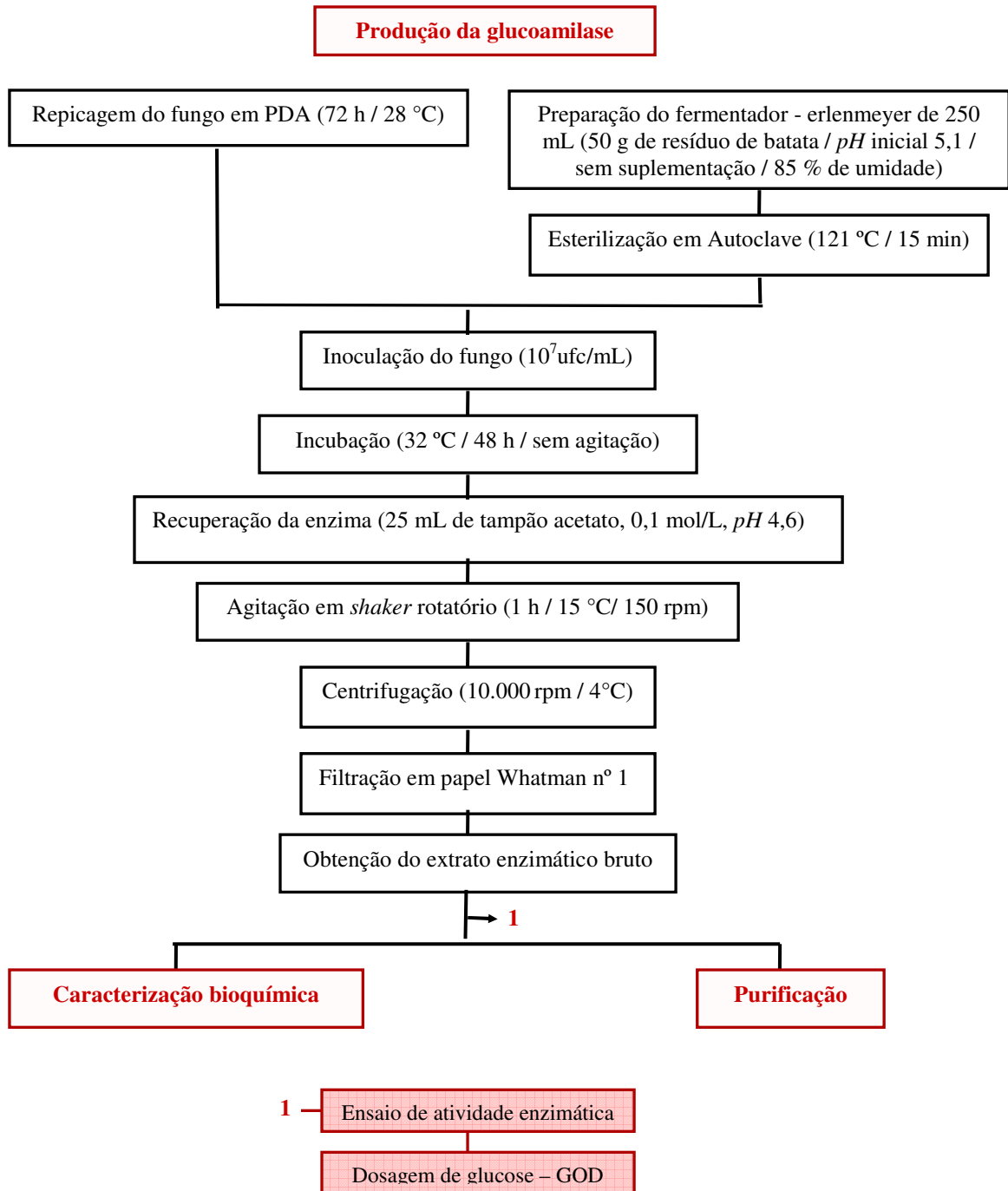


FIGURA 6 – Diagrama de blocos das etapas de produção da glucoamilase

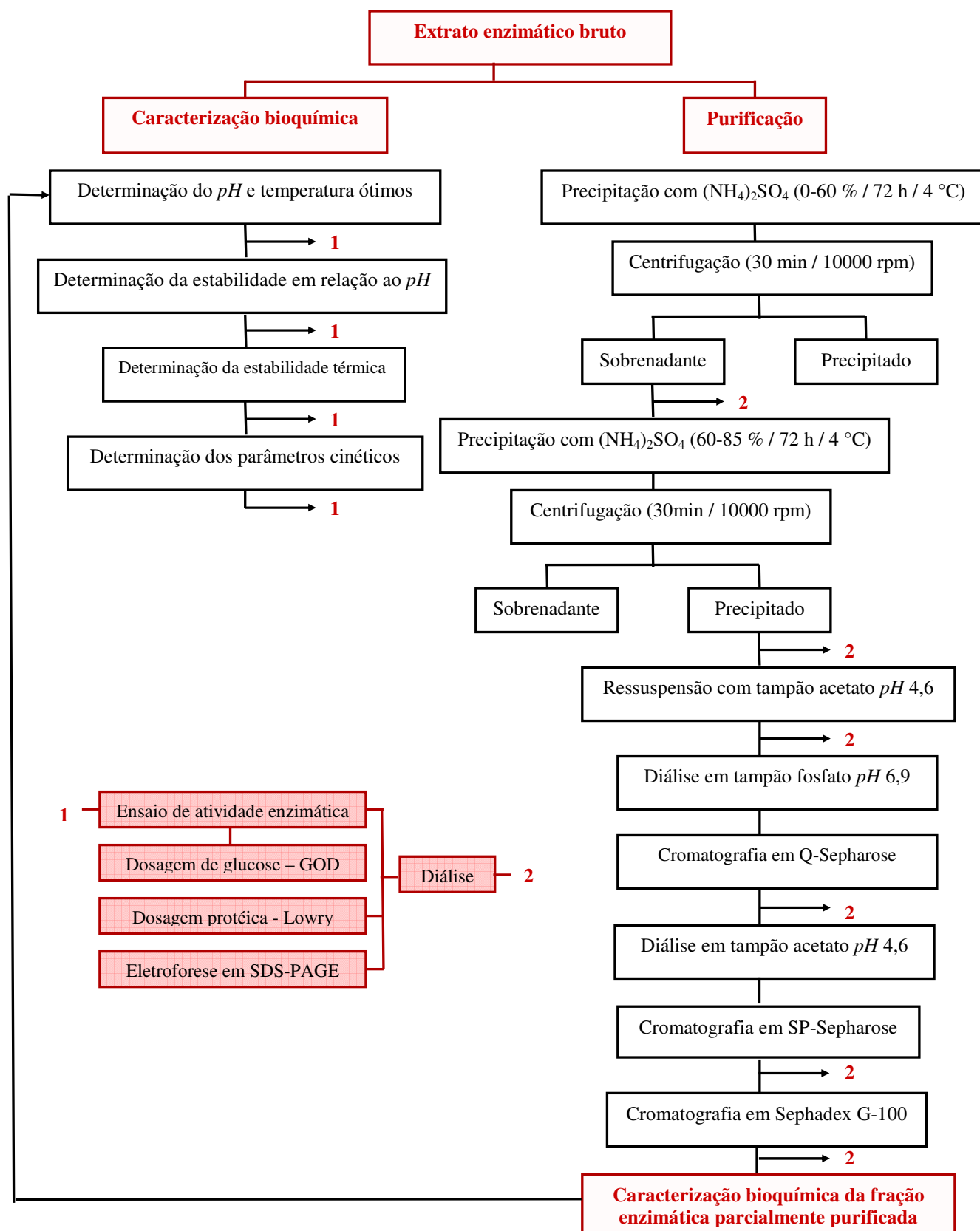


FIGURA 7 – Diagrama de blocos das etapas de caracterização bioquímica e purificação da glucoamilase.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO RESÍDUO DE BATATA

A caracterização físico-química do resíduo de batata foi realizada com o objetivo de se determinar a composição do meio de cultura utilizado neste estudo. As médias dos resultados obtidos em g /100 g de resíduo de batata em base úmida a partir de determinações feitas em triplicata estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 – Caracterização físico-química do resíduo de batata (valores por 100 g de amostra expressos em base úmida).

PARÂMETROS	RESULTADOS
Amido (g)	12,56
Açúcar redutor (g)	0,21
Glucose (g)	n.d.
Proteína (g)	1,30
Lipídeo (g)	0,04
Fibras (g)	0,43
Umidade (g)	84,66
Cinzas (g)	0,56
Fósforo (g)	0,02
Nitrogênio (g)	0,21
<i>pH</i>	5,1
n.d. – não detectado	

Conforme ilustrado na Tabela 13, o resíduo de batata apresenta uma grande quantidade de amido quando esta é comparada à percentagem de massa seca (da percentagem de 15,34 % o amido é responsável por 12,56 %), caracterizando o resíduo de batata como uma excelente fonte de carbono além de uma excelente fonte amilácea, indispensável para a síntese de amilases. Alguns autores como Fellows (1994), Pandey et al. (1999) e Gupta et al. (2003) relataram em seus trabalhos a necessidade da presença de uma fonte de amido para induzir a produção de amilases por fungos, leveduras e bactérias. Estes microrganismos não apresentam condições de assimilar diretamente moléculas complexas como o amido, passando então a sintetizar enzimas específicas que degradam o substrato complexo em moléculas mais simples, como as amilases – para que estas convertam o amido em açúcares assimiláveis (glucose), garantindo o crescimento e desenvolvimento do microrganismo.

A escolha da fonte de carbono deve ser feita com cautela, evitando-se altas concentrações de açúcares facilmente assimiláveis como a glucose, de modo a impedir a

repressão da síntese da enzima (SANT'ANA JR, 2001). Segundo Schmidell e Menezes (1986), a hidrólise do amido à glucose ocorre mais rapidamente do que o consumo de glucose pelo microrganismo, causando inibição do crescimento e repressão da síntese da enzima devido ao acúmulo do produto da reação, sendo assim, a ausência inicial de glucose no resíduo de batata é um fator extremamente importante para induzir a síntese da glucoamilase.

5.2 ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DA GLUCOAMILASE

Baseando-se nas observações feitas por Raimbault e Alazard (1980), Jin et al. (1999) e Saucedo-Castañeda (1991) de que a suplementação dos meios de cultura com fontes de N e P apenas aumentaram a massa celular mas não afetaram o consumo de açúcares ou a produção de enzimas, a realização dos estudos cinéticos de produção de glucoamilase foi feita com o substrato sem suplementação de nutrientes.

A Tabela 14 e a Figura 8 apresentam as medidas de atividade catalítica da glucoamilase e de concentração de glucose livre durante as etapas do estudo cinético de produção da enzima.

TABELA 14 – Atividade da glucoamilase e concentração de glucose livre medidas durante as etapas das cinéticas de produção da enzima.

INTERVALO DE TEMPO (horas)	ENSAIO 1		ENSAIO 2		ENSAIO 3	
	U GA (U/mL)	[glucose livre] (mg/mL)	U GA (U/mL)	[glucose livre] (mg/mL)	U GA (U/mL)	[glucose livre] (mg/mL)
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	1,17 ± 0,17	30,41 ± 0,66	0,32 ± 0,06	7,54 ± 0,13	0,34 ± 0,05	1,26 ± 0,08
24	3,38 ± 0,35	39,59 ± 1,20	1,26 ± 0,14	9,15 ± 0,11	5,27 ± 0,14	31,80 ± 0,44
36	7,44 ± 0,49	45,96 ± 0,95	3,99 ± 0,45	42,01 ± 0,99	12,30 ± 0,90	50,24 ± 1,31
48	13,46 ± 0,18	48,17 ± 0,73	6,62 ± 0,16	49,42 ± 1,10	15,82 ± 0,50	53,01 ± 1,17
60	9,63 ± 0,53	33,58 ± 1,04	15,01 ± 0,21	54,13 ± 1,11	11,15 ± 0,76	41,55 ± 1,21
72	8,21 ± 0,47	46,65 ± 0,83	8,27 ± 0,79	40,29 ± 1,52	9,66 ± 0,51	58,25 ± 0,00
84	11,42 ± 0,49	49,13 ± 0,83	10,07 ± 0,43	24,51 ± 1,47	10,20 ± 0,28	58,98 ± 0,36
96	10,02 ± 0,39	49,45 ± 0,42	11,73 ± 0,08	45,44 ± 0,66	9,89 ± 0,31	55,92 ± 0,29
102	9,24 ± 0,46	33,12 ± 0,69	8,01 ± 0,16	53,37 ± 0,67	9,28 ± 0,22	54,76 ± 1,05
120	7,11 ± 0,40	34,75 ± 0,52	7,71 ± 0,26	54,90 ± 0,77	8,56 ± 0,31	42,62 ± 0,73

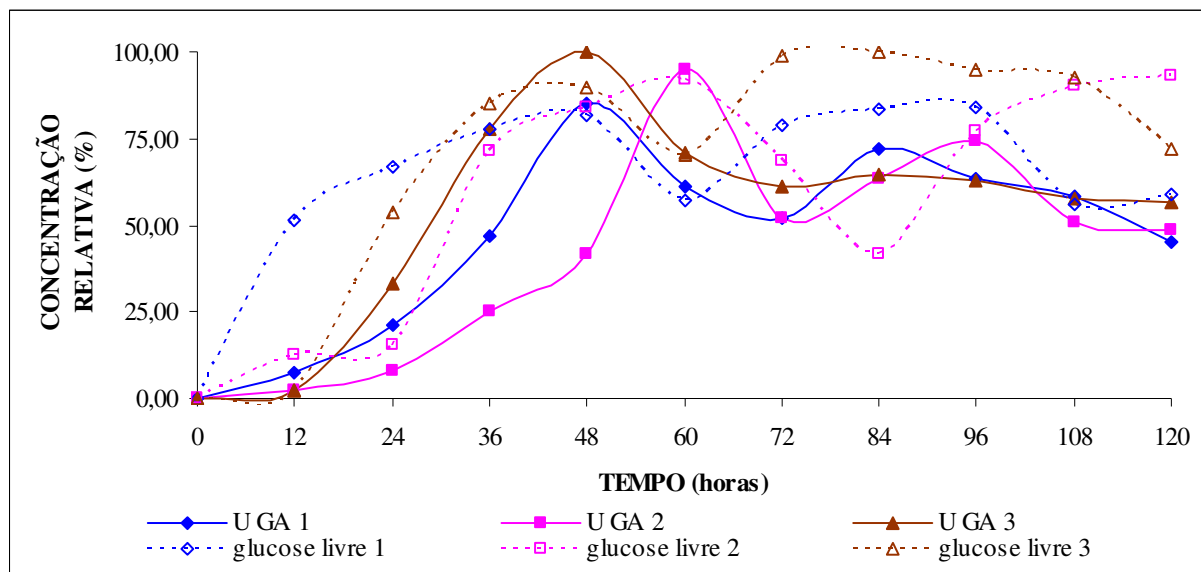


FIGURA 8 – Resultados das cinéticas de produção de glucoamilase (linha contínua – percentagem de atividade de glucoamilase; linha tracejada – percentagem da concentração de glucose livre).

De acordo com os dados apresentados acima, observa-se que o *Aspergillus niger* é capaz de produzir glucoamilase utilizando resíduo do processamento de batata como substrato, sendo que o melhor tempo de produção gira em torno de 48 horas de incubação (13,46 U/mL para o ensaio 1 e 15,82 U/mL para o ensaio 3). No ensaio 2 foi encontrado como melhor tempo de incubação para a produção de glucoamilase 60 horas (15,01 U/mL). As variações ocorridas no tempo de fermentação são difíceis de ser controladas e podem ser devidas a vários fatores, tais como: diferentes períodos em que o microrganismo permanece na fase lag durante seu crescimento, adiando ou retardando a fase log na qual inicia a produção da enzima; dificuldade em controlar o *pH* do meio de cultura, o qual pode interferir na fisiologia do microrganismo e finalmente o fato de se trabalhar com um ser vivo, que nem sempre responde de maneira igual às condições do meio.

De um modo geral, pôde ser observado que nos períodos iniciais, à medida que a enzima começa a ser produzida, a concentração de glucose livre vai aumentando até um momento (aproximadamente 48 horas de incubação) em que as concentrações de ambas passam a diminuir. O microrganismo tem a produção da enzima reprimida devido à alta concentração de glucose presente no meio. Quando a concentração deste açúcar decresce (72-

84 horas de incubação), o fungo passa novamente a produzir glucoamilase e esta, por sua vez, a transformar amido em glucose.

Segundo Pamboukian (1997), quando não é utilizada agitação na incubação do sistema de fermentação, a falta de cisalhamento leva a uma aglomeração de esporos durante o processo de germinação e o desenvolvimento não ocorrerá ao mesmo tempo para todos os esporos, levando a uma diferença no perfil de formação do produto de interesse.

5.3 PRODUÇÃO DE GLUCOAMILASE

A partir das informações obtidas nos ensaios cinéticos, produziu-se toda a glucoamilase utilizada neste trabalho através de fermentação em estado sólido por um período de incubação de 48 horas a 32 °C, sem agitação. A germinação dos esporos de *Aspergillus niger* foi conduzida no meio de cultura em *pH* inicial igual a 5,1, sem a realização de qualquer ajuste neste valor. Em estudos sobre produção de glucoamilase por fermentação de *Aspergillus niger* em estado sólido, Anto, Trivedi e Patel (2006) verificaram a influência do *pH* durante o processo de produção da enzima utilizando como substrato resíduos do manufaturamento de farinha de arroz, encontrando rendimento máximo em *pH* 5,0, e Spier (2005) encontrou valores entre 4,0 e 6,0 para o *pH* ideal de fermentação durante a produção de α -amilase e glucoamilase utilizando como substrato fécula de mandioca e farelo de trigo. Nahas e Waldermarin (2002) e Ellaiah et al. (2002) também relatam em seus experimentos que culturas de fungos em geral têm produção ótima de enzimas em *pH* 5,0. Estes dados indicam que pelo menos o *pH* inicial do meio de fermentação para a produção da glucoamilase está de acordo com as condições comumente encontradas para *Aspergillus niger*.

A Figura 9 ilustra as diferenças entre os fermentadores em vários momentos do processo fermentativo.

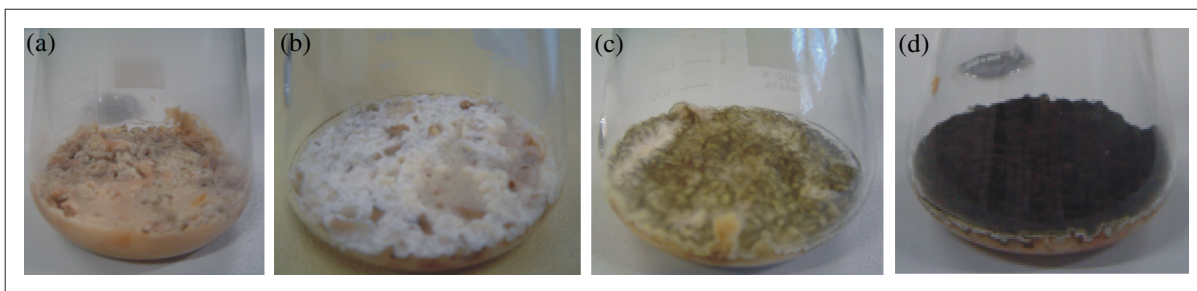


FIGURA 9 – Fotos dos fermentadores: (a) antes da inoculação dos esporos; (b) após 24 horas; (c) após 48 horas e (d) após 60 horas de fermentação.

Já no início da germinação observa-se a presença de colônias brancas (Figura 9b) que rapidamente vão formando hifas finas que são recobertas por esporos arredondados que apresentam coloração negra (Figuras 9c e 9d), fato que origina a denominação deste fungo.

5.4 SUPLEMENTAÇÃO COM FONTES DE NITROGÊNIO E FÓSFORO

Apesar do objetivo desta pesquisa não contemplar a otimização do meio de cultura para a produção de glucoamilase, uma análise da influência da suplementação do resíduo de batata com fonte de nitrogênio e fósforo foi realizada, utilizando fosfato de sódio dibásico – Na_2HPO_4 – como fonte de fósforo e sulfato de amônio – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – como fonte de nitrogênio, de acordo com Zaldivar-Aguero (1997) e Chiqueto (1991), respectivamente. Os resultados estão apresentados na Tabela 15 e Figura 10.

TABELA 15 – Atividade da glucoamilase com suplementação de nutrientes no meio de cultura.

ENSAIOS	[SAIS] g / kg	[N] e [P] g / 50 g	U GA / mL
1 – controle	0,00	0,00	18,35 ± 0,52
2 – Na_2HPO_4	7,6	0,082	11,59 ± 0,80
3 – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,1	0,011	32,37 ± 0,76
4 – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	(7,6 + 1,1)	(0,082 + 0,011)	21,86 ± 0,63

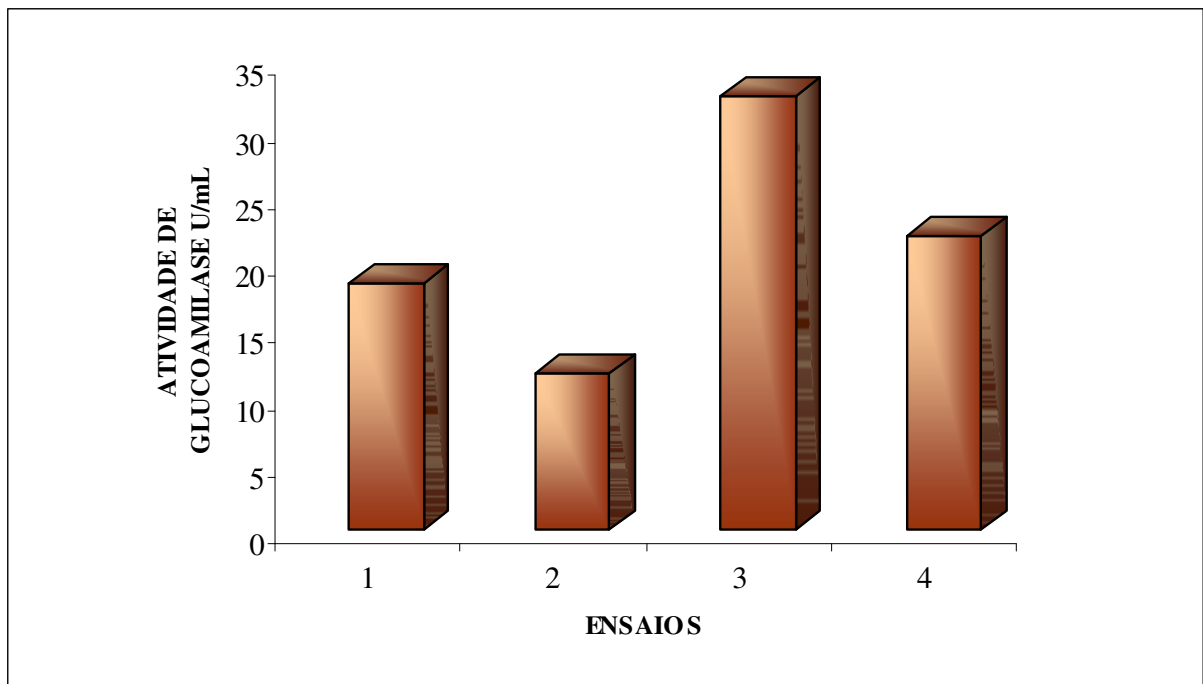


FIGURA 10 – Resultado da suplementação de nutrientes no resíduo de batata. (1 – controle; 2 – suplementado com 7,6 g/kg Na₂HPO₄; 3 – suplementado com 1,1 g/kg (NH₄)₂SO₄; 4 – suplementado com 7,6 g/kg Na₂HPO₄ + 1,1 g/kg (NH₄)₂SO₄.

A suplementação do meio de cultura apenas com fonte de fósforo levou o microrganismo a reduzir a produção de glucoamilase em 37 %, sendo o rendimento de 11,59 U/mL em comparação ao controle de 18,35 U/mL, indicando que este nutriente pode estar inibindo o crescimento do fungo, seja por uma possível alteração do *pH* do meio de cultura ou por estar sendo utilizado em concentrações superiores às necessárias para o microrganismo. O ensaio realizado utilizando fonte de nitrogênio levou a um aumento de 74 % na produção da glucoamilase, sendo obtidas 32,37 U/mL. Quando foram testados os dois nutrientes em conjunto, foi observado um aumento de 27 % na produção da enzima em relação ao controle, fornecendo uma produção de 21,86 U/mL, porém, este resultado é inferior ao obtido quando o meio foi suplementado apenas com fonte de nitrogênio, reforçando a hipótese de que a presença de sais de fosfato pode estar inibindo a síntese da enzima pelo fungo.

Lauríos, Garcia e Huitron (1989) e Daniel et al. (1996), quando trabalharam com fermentação de *Aspergillus* sp em casca de limão, obtiveram maior atividade pectinolítica utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e baixas concentrações de fosfato de

potássio como fonte de fósforo. Pessoa et al. (2003) trabalhando com subprodutos de óleos vegetais para a produção de riboflavina observaram que a presença de fósforo inibe a formação da enzima. Schlegel (1993) afirmou que uma alta concentração de fosfato no meio requer um aumento na concentração de oxigênio para que ocorra liberação de ATP por fosforilação oxidativa; caso o oxigênio não esteja presente, o fosfato passa a atuar como inibidor do metabolismo, diminuindo o consumo de açúcares e consequentemente a produção de enzimas amilolíticas.

Com relação à presença de nitrogênio, experimentos desenvolvidos por Ellaiah et al. (2002), Pessoa et al. (2003), Bertolin, Casara e Costa (2003) e Anto, Trivedi e Patel (2006) foram realizados utilizando uréia e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fontes deste nutriente, com o objetivo de estudar a sua influência nos meios de cultura para fermentação de fungos filamentosos. Todos os autores verificaram aumento na produção das enzimas estudadas, tendo a uréia apresentado os melhores resultados. Estes dados estão em desacordo com os obtidos por Maccari Junior et al. (1996) que testaram a suplementação de resíduos de batata pela adição de extrato de levedura, uréia e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio na produção de glucoamilase por leveduras amilolíticas. Segundo estes autores, cada um dos compostos possui ação específica, porém, todos os ensaios apresentaram resultados equivalentes ao controle, sugerindo ser desnecessária uma suplementação com fontes de nitrogênio. Esse resultado está em contradição com os dados apresentados na Figura 10, o que indica a necessidade de trabalhos futuros, com análises mais detalhadas em relação à suplementação de nutrientes nos meios de cultura.

5.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

5.5.1 Determinação da temperatura e *pH* ótimos de ação catalítica

Para o estudo da temperatura e *pH* ótimos de atividade da glucoamilase de *Aspergillus niger* foi utilizado planejamento fatorial de dois níveis. Os resultados estão apresentados na Tabela 16, sendo a análise realizada com os valores das variáveis dependentes codificados e a resposta como a atividade da enzima. As variáveis *pH* e temperatura e suas interações foram significativas ao nível de 5%.

TABELA 16 - Matriz de planejamento fatorial dos experimentos com dois níveis, variáveis *pH* e temperatura e resultado a atividade de glucoamilase.

	<i>pH</i> codificado	<i>T</i> (°C)	<i>pH</i> decodificado	<i>T</i> (°C)	Atividade (U/mL)
1	- 1	- 1	3,6	46	11,16
2	+ 1	- 1	6,9	46	6,29
3	- 1	+ 1	3,6	71	11,64
4	+ 1	+ 1	6,9	71	4,72
5	+ 1,41	0	7,5	60	5,19
6	- 1,41	0	3,0	60	11,48
7	0	+ 1,41	5,0	75	8,49
8	0	- 1,41	5,0	40	6,60
9	0	0	5,0	60	11,95
10	0	0	5,0	60	11,95
11	0	0	5,0	60	11,79

TABELA 17 –Efeitos do *pH* e temperatura na ação da glucoamilase.

	Efeitos	Erro puro	t(5)	p
Média	11,894	0,475	25,036	0,000002
(1) <i>pH</i> (L)	- 5,180	0,291	- 8,889	0,000300
(2) Temperatura (L)	0,394	0,291	0,677	0,528075
(1) e (2)	- 1,025	0,411	- 1,245	0,268100

Conforme observado na Tabela 17, os efeitos de *pH*, temperatura e de sua interação foram significativos, sendo que o *pH* apresentou maior efeito na atividade da enzima do que a temperatura. Quando houve o aumento do nível -1 para +1, o efeito do *pH* foi negativo e o da temperatura foi positivo, indicando que a enzima apresentou melhor atividade em valores de *pH* 3,6 que 6,9 e a temperatura de 71 °C que 46 °C; o efeito da interação das duas variáveis foi negativo, indicando que *pH* 3,6 e temperatura de 46 °C em conjunto apresentaram maior efeito para a atividade enzimática do que considerando essas variáveis isoladas.

Pelos dados apresentados na Tabela 16 pode ser observado que o melhor resultado de *pH* de atuação da glucoamilase para este ensaio se apresenta em torno de 5,0 e a temperatura em torno de 60 °C com atividade média de 11,87 U/mL. Porém, nota-se que em valores de *pH* inferiores a 5,0 e em temperaturas superiores a 60 °C a glucoamilase também apresenta uma boa atividade enzimática, o que indica que este resultado não é pontual e que a glucoamilase apresenta uma faixa de *pH* e temperatura ótimos para sua atuação, sendo bem resistente a pequenas alterações do meio.

O valor alto encontrado para temperatura ótima de atividade de glucoamilase de *Aspergillus niger* associado ao *pH* ácido é de grande interesse para aplicação industrial, pois estas condições minimizam contaminações microbianas.

Bahar e Çelebi (1998) estudaram as condições ótimas da glucoamilase de *Aspergillus niger* e obtiveram os valores de *pH* 5,0 e 55 °C. Anto, Trivedi e Patel (2006) encontraram como ótimos *pH* 5,0 e 55 °C e Silva, Asquieri e Fernandes (2005) apresentaram como uma faixa de *pH* ótimo 3,0-5,5 e temperatura de 60 °C. Para a glucoamilase de *Thermomyces lanuginosus* foram encontrados como ótimos *pH* entre 3,8-4,0 e temperatura de 70 °C (THORSEN et al., 2006), para a glucoamilase de *Aspergillus fulmigatus* foi relatado *pH* ótimo de 5,0 e temperatura de 65 °C (DA SILVA; PERALTA, 2006).

A análise de variância, ilustrada na Tabela 18, demonstrou que o modelo é estatisticamente significativo com relação F_{cal}/F_{tab} de 4,991, $p < 0,05$.

TABELA 18 – Análise de variância (ANOVA) para *pH* e temperatura ótimos de atividade.

	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{cal}	F _{tab}	F _{cal} /F _{tab}
Regressão	85,324	5	17,065	25,207	5,05	4,991
Resíduo	3,385	5	0,677			
Falta de ajuste	3,368	3	1,123			
Erro puro	0,017	2	0,0085			
Total	88,709	10				

$R^2 = 0,9618$, $p < 0,05$

5.5.2 Determinação da estabilidade térmica da glucoamilase

Conforme ilustrado nas Tabelas 19 e 20 e na Figura 11, a enzima mostrou-se estável a temperaturas de 15, 35 e 60 °C, apresentando pouca queda de atividade após 4 horas, com 73,35; 76,20 e 74,92 % de capacidade catalítica remanescente, respectivamente, e após 26 horas ainda permaneceu, a 35 °C, com 58,75 % e a 60 °C com 60,33 % de atividade enzimática. À temperatura de 15 °C, após 19 horas de experimento, a glucoamilase apresentou menos de 50 % de atividade e a 70 °C, após 2 horas, já havia perdido 80,31 % de capacidade catalítica.

TABELA 19 - Atividade da glucoamilase durante os ensaios de determinação da estabilidade térmica (em U/mL).

Temperatura (°C)	0 horas	2 horas	4 horas	19 horas	26 horas
15	16,51 ± 1,26	12,11 ± 0,57	9,64 ± 0,60	8,23 ± 0,60	6,71 ± 0,33
35	16,51 ± 1,26	12,58 ± 0,16	10,01 ± 0,55	9,91 ± 0,31	9,70 ± 0,55
60	16,51 ± 1,26	12,37 ± 0,33	10,48 ± 0,81	10,12 ± 0,36	9,96 ± 0,48
70	16,51 ± 1,26	3,25 ± 0,48	2,46 ± 0,48	2,15 ± 0,18	1,57 ± 0,27

TABELA 20 – Atividade relativa da glucoamilase durante a determinação da estabilidade térmica (em %).

Temperatura (°C)	0 horas	2 horas	4 horas	19 horas	26 horas
15	100	73,35	58,39	49,85	40,64
35	100	76,20	60,63	60,02	58,75
60	100	74,92	63,48	61,30	60,33
70	100	19,69	14,90	13,02	9,51

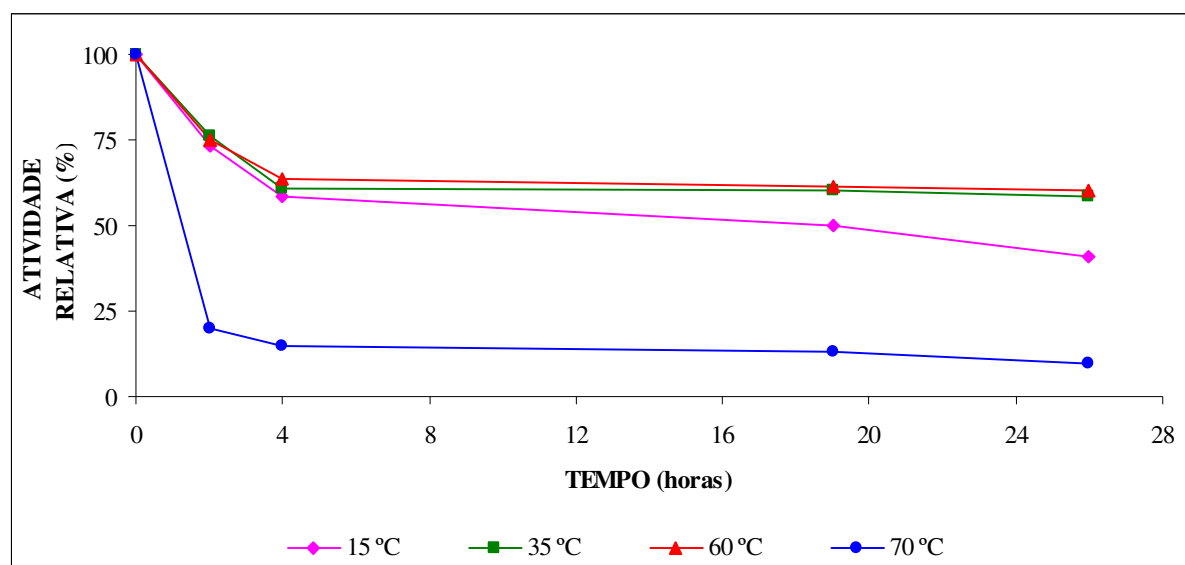


FIGURA 11 – Estabilidade térmica da glucoamilase.

A estabilidade da estrutura nativa de uma proteína é mantida por interações fracas não covalentes, como ligações de hidrogênio, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals. Se uma enzima termofílica for resfriada, sua flutuação térmica é reduzida, diminuindo a mobilidade conformacional do sítio catalítico e, conseqüentemente, ocorre uma redução da sua eficiência de catálise (FÁGÁIN, 1995). Segundo Shiraki et al. (2001) a elevada rigidez intrínseca de uma proteína termofílica, decorrente da estabilidade de seu enovelamento, requer alta temperatura (maior que 40 °C) para promover o movimento térmico e o aumento da flexibilidade essencial para a atividade catalítica, ou seja, a adaptação da proteína às temperaturas elevadas parece resultar de um equilíbrio entre o aumento da rigidez responsável pela estabilidade térmica e a flexibilidade requerida para exercer sua função fisiológica. Sabendo que a glucoamilase é uma enzima termoestável, estas informações podem justificar o fato da diminuição de sua atividade catalítica quando exposta às temperaturas mais baixas ou às temperaturas muito elevadas e apresentar boa estabilidade a 60 °C.

Conforme a literatura abaixo, os resultados de maior estabilidade da glucoamilase em relação à temperatura encontram-se dentro da faixa de variação de 50 a 70 °C; esta variação é decorrente do meio de fermentação e do microrganismo utilizado para a produção da enzima. De acordo com Stamford et al. (2002) e Gomes et al. (2005), a glucoamilase de *Aspergillus flavus* apresenta estabilidade a 70 °C, Gomes et al. (2005) e Taylor, Napier e Fleming (1978) mostraram que a glucoamilase produzida por *Thermomyces lanuginosus* é estável a 60 °C e Bahar e Çelebi (1998) encontraram para a glucoamilase de *Aspergillus niger* estabilidade a 50 °C.

Em processos de sacarificação do amido para produção de xarope de glucose, muitas enzimas necessitam resfriamento do material a temperaturas inferiores a 60 °C para poderem ser utilizadas (Gomes et al., 2007). O fato de a glucoamilase manter mais de 60 % de sua

função enzimática após 24 horas a 60 °C permite que ela possa ser amplamente utilizada para o processamento industrial do amido.

5.5.3 Determinação da estabilidade da glucoamilase em relação ao *pH*

Conforme observado nas Tabela 21 e 22 e na Figura 12, a glucoamilase apresentou diferentes valores de atividade enzimática no tempo 0 (controle) dentro da faixa de *pH* testada, sendo o maior valor encontrado em *pH* 4,6.

As amostras incubadas em valores de *pH* de 3,6, 4,0 e 5,0, apesar de não serem as que forneceram o maior rendimento, mantiveram boa estabilidade até 18 horas de exposição, apresentando queda brusca de atividade após este período. Em tempos de incubação superiores à 28 horas, a glucoamilase analisada em *pH* 3,6 e *pH* 7,0 já havia perdido mais de 95 % da capacidade catalítica.

Em condições de *pH* de 4,0; 4,6 e 5,0, até 18 horas de exposição, não se observa nenhuma diferença significativa entre estes valores em relação à estabilidade da enzima, indicando que a glucoamilase apresenta durante este período uma faixa de *pH* de estabilidade entre 4,0-5,0, estreitando para o centro depois de transcorrido um determinado intervalo de tempo, preservando 72,87 % de atividade enzimática em *pH* 4,6 após 28 horas de incubação.

Estes resultados estão de acordo com Bahar & Çelebi (1998) que encontraram o valor de 4,5 para o *pH* de estabilidade de glucoamilase de *Aspergillus niger* imobilizada em partícula de poliestireno.

TABELA 21 - Atividade da glucoamilase durante os ensaios de determinação da estabilidade em relação ao *pH* (em U/mL).

<i>pH</i>	0 horas	2 horas	18 horas	24 horas	28 horas
3,6	6,91 ± 1,71	6,74 ± 0,98	6,24 ± 1,46	0,43 ± 0,29	0,03 ± 0,45
4,0	10,51 ± 1,65	10,14 ± 1,02	9,64 ± 0,38	2,37 ± 1,92	1,94 ± 0,67
4,6	12,18 ± 1,92	10,98 ± 1,07	9,98 ± 1,19	9,48 ± 0,78	8,88 ± 1,01
5,0	10,98 ± 0,67	10,21 ± 0,44	9,88 ± 0,15	4,97 ± 0,67	4,17 ± 0,99
6,0	9,14 ± 1,05	9,11 ± 0,66	6,87 ± 1,10	1,50 ± 0,78	1,23 ± 0,51
7,0	2,00 ± 0,35	1,90 ± 0,52	1,60 ± 0,69	0,90 ± 0,66	0,70 ± 0,66

TABELA 22 – Atividade relativa da glucoamilase durante a determinação da estabilidade em relação ao *pH* (em %).

<i>pH</i>	0 horas	2 horas	18 horas	24 horas	28 horas
3,6	56,71	55,34	51,23	3,56	0,27
4,0	86,29	83,28	79,17	19,45	15,89
4,6	100	90,13	81,91	77,80	72,87
5,0	90,13	83,83	81,09	40,82	34,24
6,0	75,06	74,79	56,43	12,33	10,14
7,0	16,44	15,61	13,15	7,40	5,75

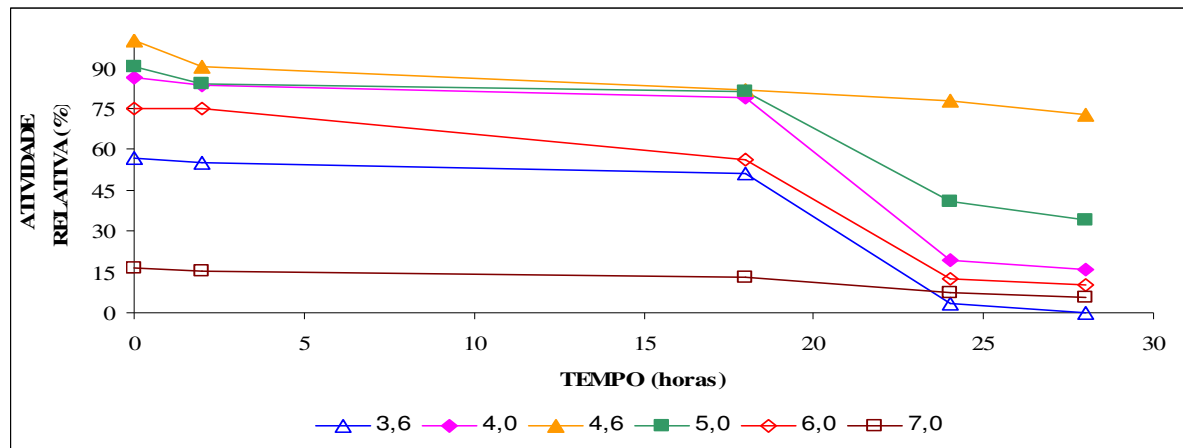


FIGURA 12 – Estabilidade da glucoamilase em relação ao *pH*.

Segundo Gomes et al. (2007), nos processamentos industriais para a hidrólise do amido, durante a realização da etapa de sacarificação, o sistema deve ter o *pH* ajustado para um valor entre 4,2-5,0. As condições de *pH* e temperatura para as fases de liquefação e sacarificação foram definidas e padronizadas pela indústria de modo a evitar subprodutos indesejáveis e, principalmente, levar em consideração condições ótimas de atividade e de estabilidade das enzimas; sendo assim, uma enzima estável dentro desta faixa de *pH* é desejável para o processo. Os dados obtidos neste trabalho mostram que a glucoamilase de *Aspergillus niger* apresenta esta característica, fato que justifica a sua ampla utilização nas indústrias alimentícias para o processamento do amido.

5.5.4 Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$)

A Tabela 23 e Figura 13 apresentam a atividade de glucoamilase obtida nos ensaios de variação da concentração de amido, os quais demonstraram estar de acordo com o comportamento proposto por Michaelis-Menten.

TABELA 23 – Efeito da variação da concentração do substrato na atividade enzimática da glucoamilase.

[Amido] g/100 mL	Velocidade inicial (U/mL)
0,1	15,19 ± 0,97
0,2	21,97 ± 0,32
0,3	27,14 ± 0,00
0,4	29,41 ± 0,32
0,5	29,30 ± 0,81
0,6	29,19 ± 0,19
0,7	28,97 ± 0,67
0,8	29,41 ± 0,56
0,9	28,97 ± 0,81
1,0	28,65 ± 1,31

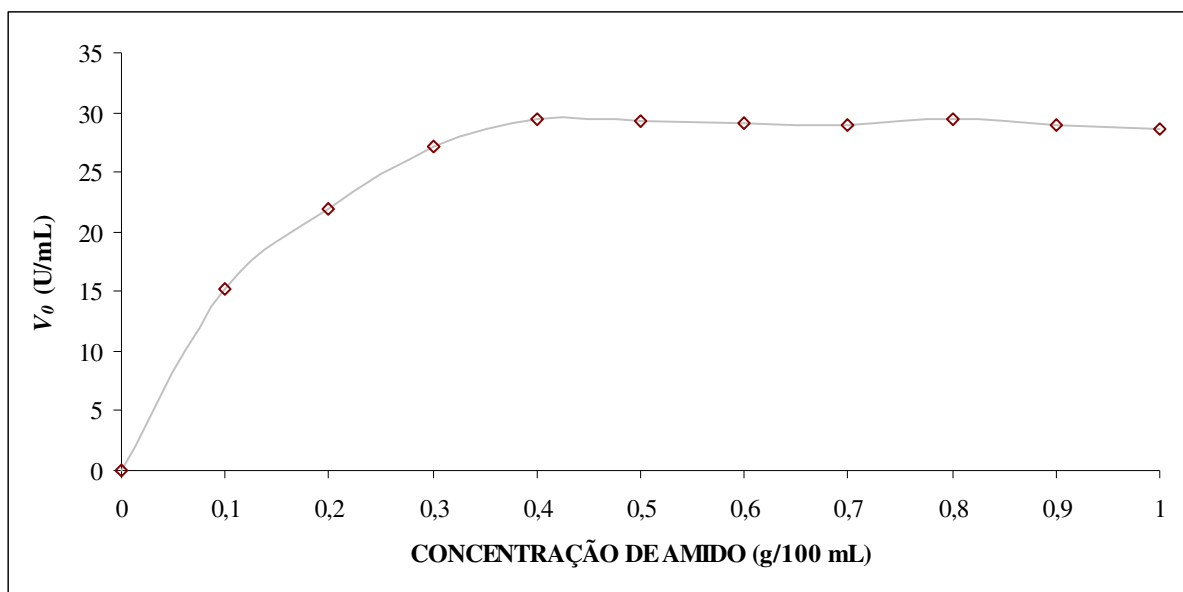


FIGURA 13 – Efeito da concentração de amido sobre a velocidade inicial da reação catalisada pela glucoamilase.

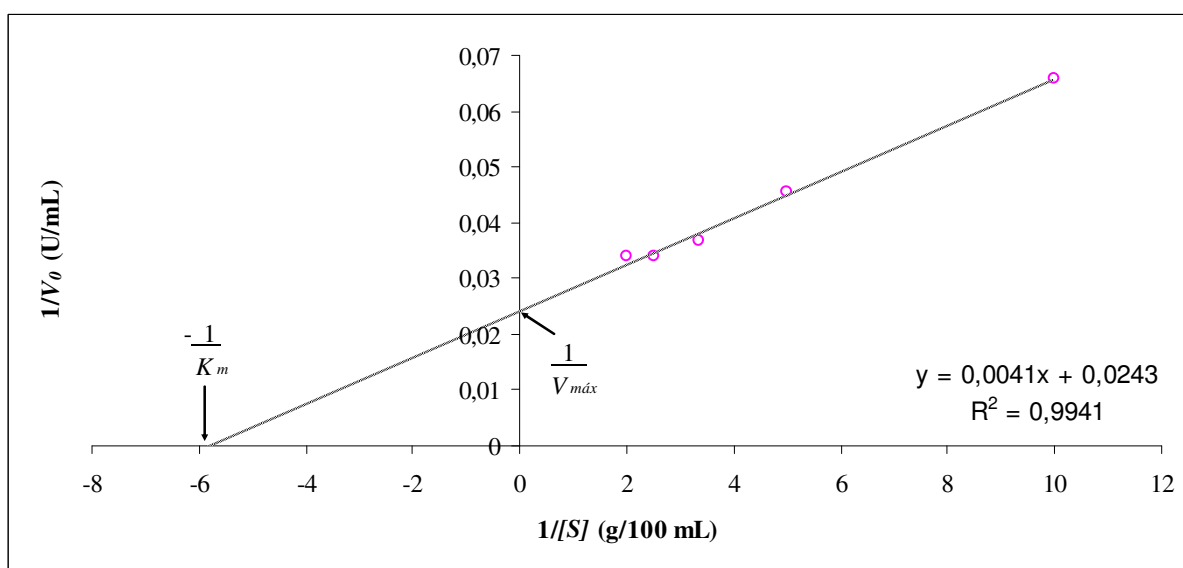


FIGURA 14 – Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.

Invertidos os dados da Tabela 23, obteve-se o gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, representado na Figura 14. Através da equação da melhor reta calculada por regressão linear, foi possível determinar os valores de K_m e $V_{máx}$.

Foram encontrados 1,68 mg/mL e 41,15 U/mL para os valores de K_m e $V_{máx}$, respectivamente. Segundo Marlida et al. (2000), um valor de K_m baixo para o amido solúvel reflete um alto número de ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas entre o substrato e os resíduos do sítio ativo da enzima.

A literatura apresenta valores de K_m de 3,5 mg/mL para a glucoamilase de *Aspergillus* sp (SELVAKUMAR; ASHAKUMARY; PANDEY, 1996) e 10,0 mg/mL para *Acremonium* sp (MARLIDA et al., 2000).

5.6 PURIFICAÇÃO DA GLUCOAMILASE

Conforme apresentado na revisão da literatura (ítem 3.9), muitos trabalhos têm sido conduzidos com o objetivo de purificar a glucoamilase, sendo esta destinada a diversas finalidades, como uso industrial, caracterização química e bioquímica, determinação de estrutura, entre outros. As metodologias realizadas para atingir esse objetivo utilizaram técnicas de precipitação com sais, cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão em gel, extração em sistema bifásico, entre outros (BELSHAW; WILLIAMSON, 1990, HATA et al., 1997, TANUJA et al., 1997, HARSA; FURUSAKI, 2001, THORSEN et al., 2006, BHATTI et al., 2007).

Neste trabalho, para a purificação da glucoamilase, foram utilizadas técnicas de precipitação com sal e cromatografias de troca aniônica, catiônica e exclusão em gel, escolhidas de acordo com as condições existentes no laboratório e que se assemelhassem à literatura consultada.

5.6.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio

Várias concentrações de sulfato de amônio foram testadas até se obter uma faixa de concentração ideal para precipitação de glucoamilase. O melhor resultado foi obtido com 60-85 % de saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A Tabela 24 apresenta a atividade catalítica da enzima após diálise para eliminação do sal, procedimento adotado em todo o trabalho.

TABELA 24 –Perfil das frações obtidas na precipitação com sulfato de amônio.

AMOSTRAS	Volume (mL)	Atividade de glucoamilase (U/mL)	Atividade de glucoamilase total (U)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)
Prep. bruta	1470	10,61 ± 0,40	15596,70	0,533 ± 0,006	783,29	19,91
0-60 % sobr.	1710	6,44 ± 0,03	11012,40	0,063 ± 0,002	107,39	102,55
0-60 % prec.	37	1,44 ± 0,10	53,28	0,269 ± 0,003	9,94	5,36
60-85 % sobr.	1845	1,56 ± 0,10	2878,20	0,046 ± 0,002	84,67	33,99
60-85 % prec.	24	103,66 ± 0,70	2485,44	0,258 ± 0,003	6,19	401,70

Pelos resultados observados verifica-se que na primeira etapa de saturação – 0-60 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – a maior parte da glucoamilase permaneceu no sobrenadante, com 102,55 U/mg de atividade específica. Na segunda etapa de saturação – 60-85 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – foi observada a presença da enzima no precipitado com 401,44 U/mg de atividade enzimática específica.

A capacidade dos sais neutros de influenciar a solubilidade das proteínas é uma função de sua força iônica, que tanto depende de sua concentração como da valência de cátions e ânions que formam o sal. Em altas forças iônicas, conseguidas pela adição de grandes quantidades de um sal muito solúvel (por exemplo, o sulfato de amônio) a uma solução de proteína, pode ocorrer remoção de moléculas de água de hidratação das proteínas, o que leva à predominância das interações proteína-proteína, resultando em precipitação, fenômeno conhecido como *salting-out*. Esta técnica é utilizada com frequência para separação de misturas complexas de proteínas, baseando-se na concentração de sal necessária para precipitar diferentes proteínas, a qual deve ser variável (DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-UFPR, 1995).

A Figura 15 apresenta a eletroforese realizada com as amostras das etapas de saturação com sulfato de amônio, onde podem ser observadas diferentes bandas protéicas entre as raias correspondentes a cada uma destas, demonstrando que ocorreu separação de proteínas durante esta etapa de purificação.

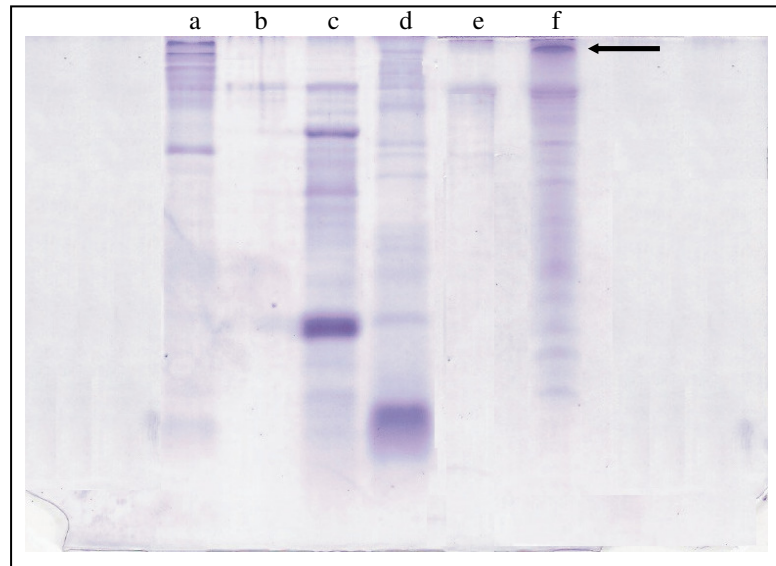


FIGURA 15 – Perfil eletroforético em SDS-PAGE das etapas de saturação com sulfato de amônio. a – Preparação enzimática bruta; b – 0-60 % sobrenadante; c – padrão de massa molecular; d – 0-60 % precipitado; e – 60-85 % sobrenadante; f – 60-85 % precipitado. Indicada a suposta posição de migração da glucoamilase.

5.6.2 Cromatografia em Q-Sepharose

Após a precipitação da glucoamilase com o uso de sulfato de amônio, a amostra foi ressuspensa em tampão acetato 0,1 mol/L *pH* 4,6 e então dialisada contra tampão fosfato 0,005 mol/L *pH* 6,9 para depois ser aplicada em coluna de troca aniônica empacotada com Q-Sepharose. O cromatograma está ilustrado na Figura 16 e os resultados do ensaio enzimático das frações obtidas estão apresentados na Tabela 25. Logo após o início da aplicação da amostra, observa-se no cromatograma um pico, indicando que uma determinada quantidade de proteínas presente na amostra praticamente não interage com a resina. O cromatograma apresenta ainda outros seis picos e, através de ensaios de atividade catalítica, observou-se que a glucoamilase foi eluída durante o gradiente entre tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L *pH* 6,9

e tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L *pH* 6,9 + NaCl 1 mol/L, correspondendo ao quarto pico, denominado Q-4.

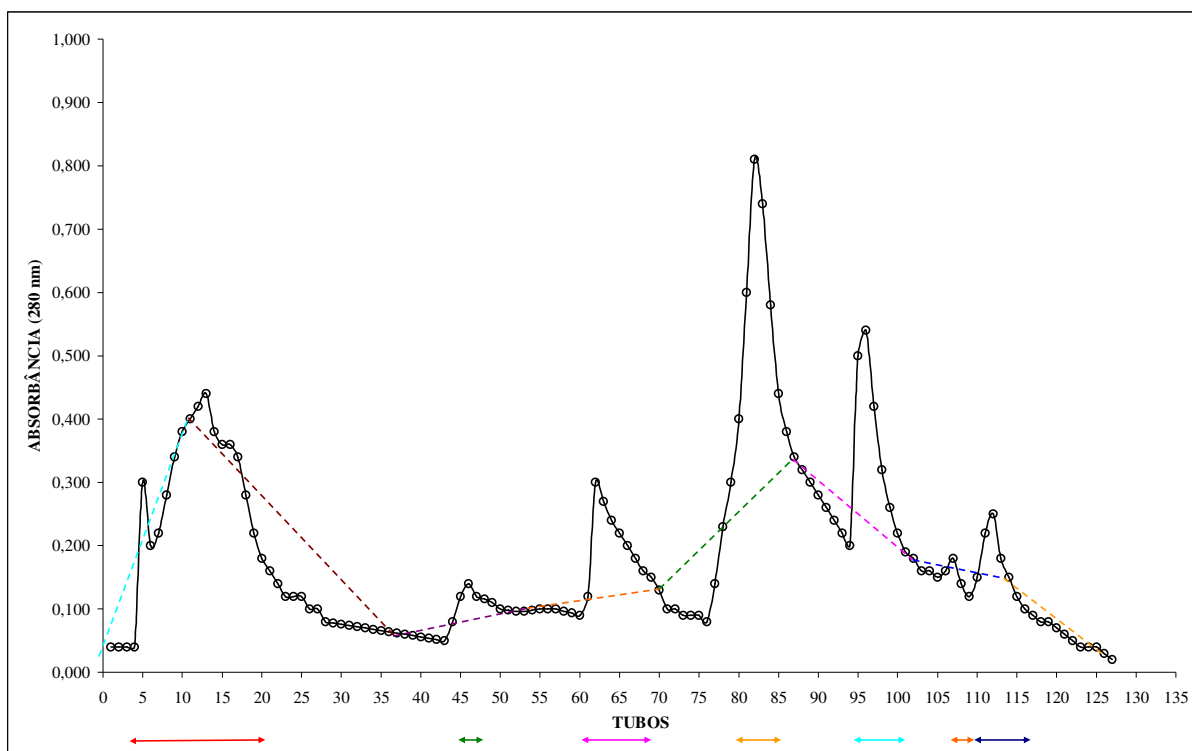


FIGURA 16 – Cromatograma da troca aniônica em Q-Sepharose. Cada cor de linha tracejada corresponde a determinado perfil de aplicação de eluentes – ---- aplicação da amostra; ---- tampão fosfato 0,005 mol/L, *pH* 6,9; ---- tampão fosfato 0,02 mol/L, *pH* 6,9; ---- tampão fosfato 0,2 mol/L, *pH* 6,9; ---- gradiente com tampão fosfato 0,2 mol/L *pH* 6,9 + NaCl 1 mol/L; ---- tampão fosfato 0,2 mol/L + NaCl 1 mol/L, *pH* 6,9; ---- tampão fosfato 0,2 mol/L + NaCl 2 mol/L, *pH* 6,9 e ---- tampão fosfato 0,2 mol/L + NaCl 3 mol/L, *pH* 6,9. As setas coloridas correspondem aos pools formados a partir dos picos observados no cromatograma - ↔ pool Q-1 (tubos 4-21); ↔ pool Q-2 (tubos 45-48); ↔ pool Q-3 (tubos 61-69); ↔ pool Q-4 (tubos 80-85); ↔ pool Q-5 (95-98); ↔ pool Q-6 (tubo 107) e ↔ pool Q-7 (tubos 111-113).

TABELA 25 – Atividade enzimática dos pools preparados, cromatografia em Q-Sepharose.

AMOSTRAS	Atividade de glucoamilase (U/mL)
pool Q-1	2,67 ± 0,18
pool Q-2	1,02 ± 0,15
pool Q-3	0,92 ± 0,15
pool Q-4	174,20 ± 4,24
pool Q-5	1,86 ± 0,13
pool Q-6	1,61 ± 0,09
pool Q-7	1,54 ± 0,06

Observando-se o cromatograma, verifica-se que entre o pico Q-4 e seus adjacentes a absorbância não retornou à linha de base, indicando certo grau de mistura de proteínas, fato que pode ser observado pela presença de mais de uma banda protéica na eletroforese da Figura 17, demonstrando a necessidade da aplicação do pool correspondente em uma nova coluna cromatográfica.

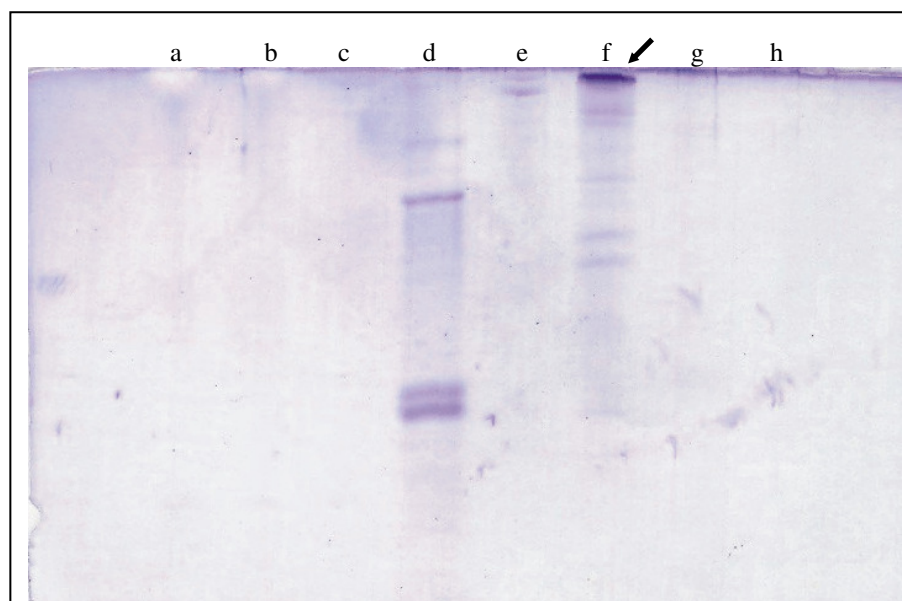


FIGURA 17 – Perfil eletroforético em SDS-PAGE dos picos obtidos na cromatografia em Q-Sepharose. (a – pool Q-1; b – pool Q-2; c – pool Q-3; d – padrão de massa molecular; e – pool Q- 5; f – pool Q-4; g – pool Q-6; h – pool Q-7). Indicada a suposta posição de migração da glucoamilase.

A resina Q-Sepharose é um trocador aniônico forte, o que significa que interage muito bem com proteínas que apresentam carga elétrica negativa, que para serem eluídas necessitam da presença no eluente de alta força iônica para promover a troca de ligantes. Segundo a literatura, o *pI* (valor de *pH* no qual a soma das cargas da proteína é nula) da glucoamilase de *Aspergillus niger* é em torno de 3,4-3,5 (WENISCH et al., 1993 e SUTTHIRAK; DHARMSTHITI; LERTSIRI, 2005); isto significa que em valores de *pH* em torno de 7,0, a enzima deveria apresentar carga elétrica negativa, ficando ligada à resina quando aplicada na coluna. O perfil cromatográfico obtido em Q-Sepharose indica que a glucoamilase interagiu fortemente com a resina, necessitando para sua eluição de um gradiente de concentração de NaCl, purificando-a, todavia, parcialmente.

5.6.3 Cromatografia em SP-Sepharose

O pool Q-4, contendo a glucoamilase, obtido na cromatografia em Q-Sepharose, foi dialisado contra tampão acetato de sódio 0,005 mol/L *pH* 4,6 e, posteriormente, aplicado em coluna de troca catiônica SP-Sepharose. O cromatograma apresentado na Figura 18 indica a

presença de apenas dois picos de proteínas eluídas durante a cromatografia. Os ensaios de atividade enzimática apresentados na Tabela 26 mostram que a glucoamilase está no primeiro pico; este, como eluído logo no início da cromatografia, indica que praticamente não houve interação de quase todas as proteínas do pool Q-4 com a resina.

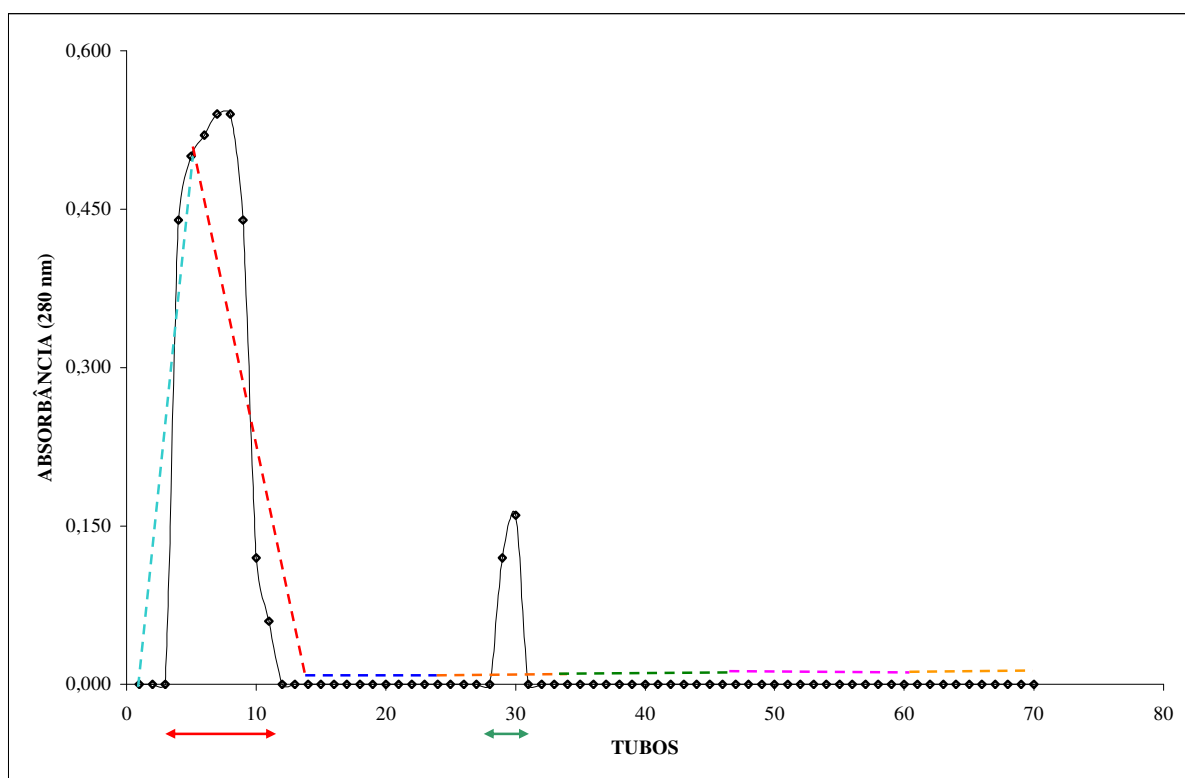


FIGURA 18 – Cromatograma da troca catiônica em SP-Sepharose. Cada cor de linha tracejada corresponde a determinado perfil de aplicação de eluentes – ---- aplicação da amostra; ---- tampão acetato 0,005mol/L, *pH* 4,6; ---- tampão acetato 0,02 mol/L, *pH* 4,6; ---- tampão acetato 0,2mol/L, *pH* 4,6; ---- gradiente com tampão acetato 0,2 mol/L *pH* 4,6 + NaCl 1 mol/L; ---- tampão acetato 0,2 mol/L + NaCl 1 mol/L, *pH* 4,6 e ---- tampão acetato 0,2 mol/L + NaCl 2 mol/L, *pH* 4,6. As setas coloridas correspondem aos pools formados a partir dos picos observados no cromatograma - ↔ pool SP-1 (tubos 5-9) e ↔ pool SP-2 (tubos 29-30).

TABELA 26 – Atividade enzimática dos pools preparados, cromatografia em SP-Sepharose.

AMOSTRAS	Atividade de glucoamilase (U/mL)
pool SP-1	159,07 ± 0,79
pool SP-2	10,05 ± 0,80

O perfil obtido na eletroforese da Figura 19 mostra algumas características comuns ao da eletroforese da Figura 18. A raia referente ao pool Q-4 na Figura 18 é bastante semelhante à raia referente ao pool SP-1 na Figura 19, confirmando a hipótese de que não houve muita interação do pool Q-4 com a resina e, portanto, não ocorreu aumento significativo do grau de purificação da glucoamilase, indicando a necessidade de uma nova etapa de purificação.

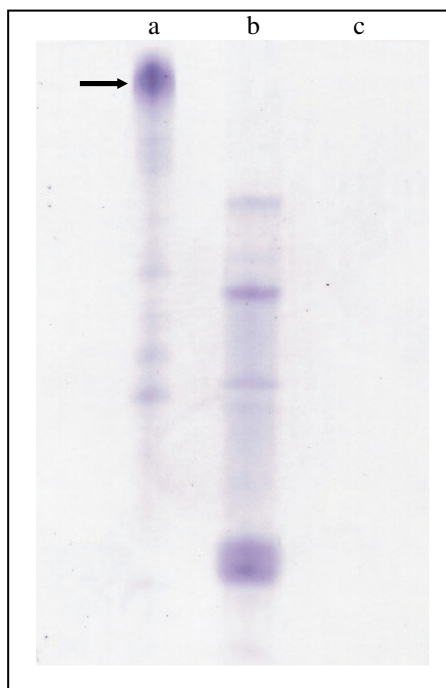


FIGURA 19 – Perfil eletroforético em SDS-PAGE dos picos obtidos na cromatografia em SP-Sepharose. (a – pool SP-1; b – padrão de massa molecular e c – pool SP-2. Indica a suposta posição de migração da glucoamilase.

Ao se dialisar contra tampão acetato pH 4,6 o pool Q-4 obtido na troca aniônica, pode-se promover uma diminuição das cargas negativas das proteínas, mas não o suficiente para que a glucoamilase apresentasse saldo positivo de cargas, para que então pudesse interagir com uma resina de troca catiônica, já que este valor de pH é maior que o seu pI . Este fato justifica a falta de interação da glucoamilase com a resina SP-Sepharose, um trocador catiônico forte de íons.

5.6.4 Cromatografia em Sephadex G-100

A resina Sephadex G-100 é utilizada para separação de proteínas que são eluídas por diferença em sua massa molecular, sendo sua capacidade de separação de 5 à 150 kDa. Segundo a literatura anteriormente comentada (ítem 3.7), a glucoamilase apresenta massa molecular entre 59 e 112 kDa dependendo do organismo que a produz e da ação de proteases que podem clivar parte de sua estrutura protéica sem que haja perda de função catalítica (PAZUR; KLEPPE, 1971, HATA et al., 1997, AALBAEK et al., 2002). A Tabela 27 traz os

resultados da atividade enzimática dos pools obtidos durante a cromatografia em Sephadex G-100.

TABELA 27 – Atividade enzimática dos pools preparados, cromatografia em Sephadex G-100.

AMOSTRAS	Atividade de glucoamilase (U/mL)
pool G100-1	$4,55 \pm 0,14$
pool G100-2	$3,63 \pm 0,16$
pool G100-3	$4,18 \pm 0,21$
pool G100-4	$166,97 \pm 1,61$
pool G100-5	$4,32 \pm 0,29$

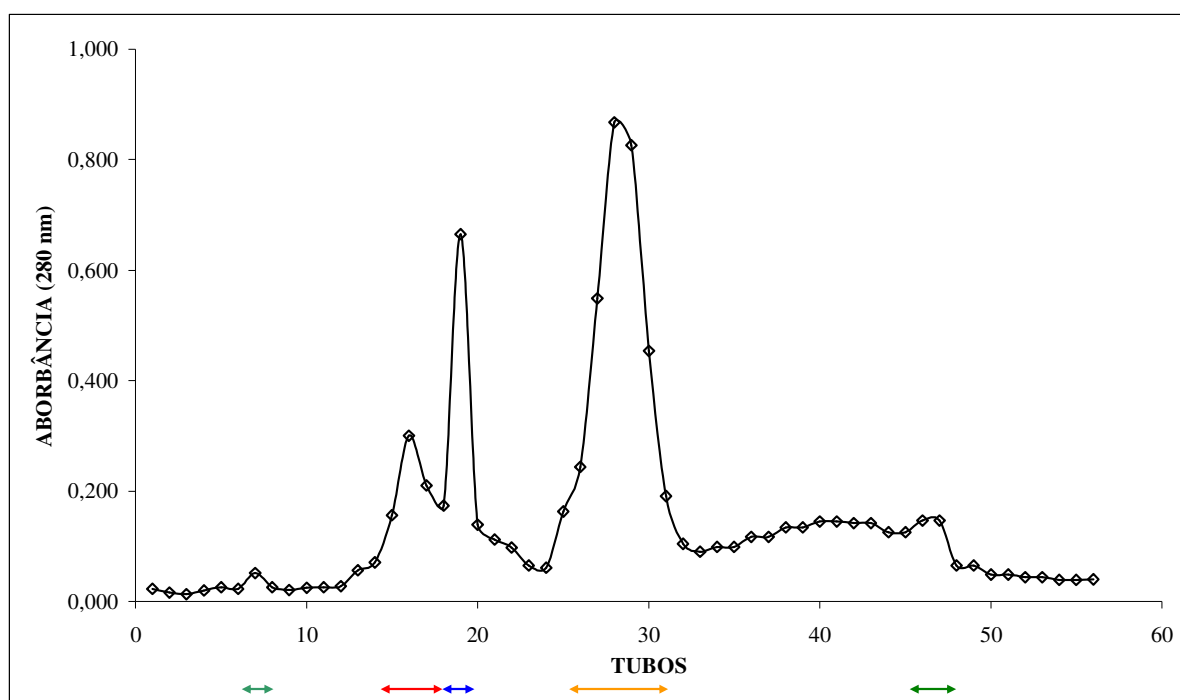


FIGURA 20 – Cromatograma da filtração em gel em Sephadex G-100. O eluente foi tampão acetato de sódio 0,005 mol/L *pH* 4,6. As setas coloridas correspondem aos pools formados a partir dos picos observados no cromatograma – ↔ pool G100-1 (tubos 6-8); ↔ pool G100-2 (tubos 14-17); ↔ pool G100-3 (tubo 19); ↔ pool G100-4 (tubo 27-30) e ↔ pool G100-6 (tubos 46-47).

Ao observar os resultados ilustrados no cromatograma da Figura 20, nota-se que entre os picos obtidos não houve retorno à linha de base, indicando que ainda existe mistura de proteínas, o que pôde ser confirmado pela eletroforese apresentada na Figura 21, caracterizando uma purificação parcial da glucoamilase, embora já melhorada, encontrada na fração denominada pool G100-4.

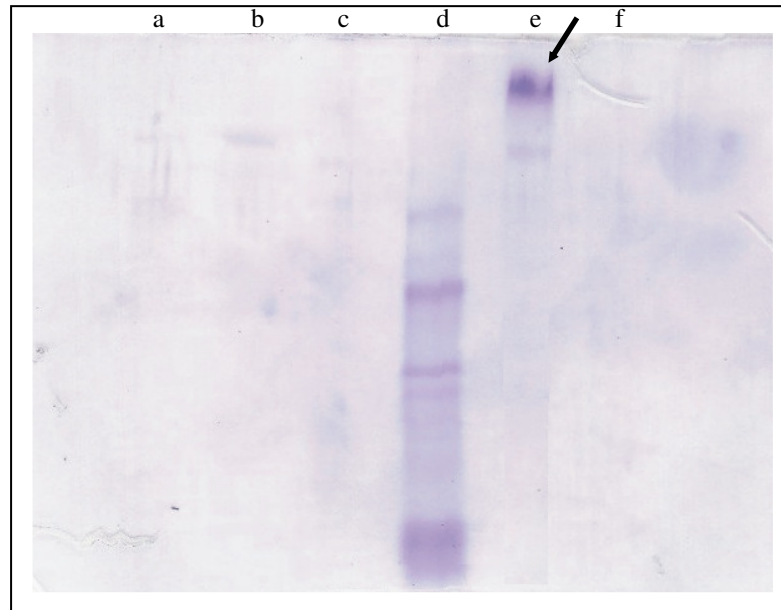


FIGURA 21 – Perfil eletroforético em SDS-PAGE dos picos obtidos na cromatografia em Sephadex G-100. (a – pool G100-1; b – pool G100-2; c – pool G100-3; d – padrão de massa molar; e – pool G100-4 e f – pool G100-5. Indicada a suposta posição de migração da glucoamilase.

Segundo Pazur et al. (1971), *Aspergillus niger* sintetiza duas formas de glucoamilase nativa que apresentam massa molecular de 112 e 99 kDa, sendo assim, era esperado que houvesse até purificação total da glucoamilase na coluna Sephadex G-100.

Vários fatores podem ter contribuído com a ausência de separação total da glucoamilase. O tamanho da coluna utilizada para filtração em gel deve ser preferencialmente ser bem longa e estreita. O volume de amostra aplicado deve ficar no máximo em 10 % do volume total da coluna, neste trabalho foram aplicados em torno de 12 %. O fluxo de passagem do eluente deve ser ajustado de modo a melhorar a resolução no perfil de eluição. Durante a realização da cromatografia, não foi possível ajustar o fluxo para um valor superior a 8 mL/h, o que se encontra abaixo do que é recomendado pelo fabricante da resina, em torno de 30 mL/h (Amersham Biosciences).

5.6.5 Perfis das etapas de purificação

Os resultados das etapas purificação estão resumidos na Tabela 28. A enzima teve a pureza aumentada em 109,23 vezes em relação à preparação enzimática bruta, com um rendimento de 11,71 %, apresentando atividade específica final para a hidrólise de amido solúvel de 2174,72 U/mg de proteína.

TABELA 28 – Fator de purificação e % de recuperação da glucoamilase.

Etapas	Volume (mL)	Atividade (U/mL)	Atividade total (U)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	% de recuperação
Ext..Bruto	1470	10,61	15596,7	0,533	783,29	19,91	1,00	100
60-85% P	41	103,66	4250,06	0,258	10,58	401,70	20,17	27,24
Q-4	20	174,20	3484	0,132	2,64	1319,69	66,28	22,33
SP-1	20	159,07	3199,4	0,119	2,38	1344,28	67,54	20,51
G100-4	11	166,97	1826,77	0,077	0,84	2174,72	109,23	11,71

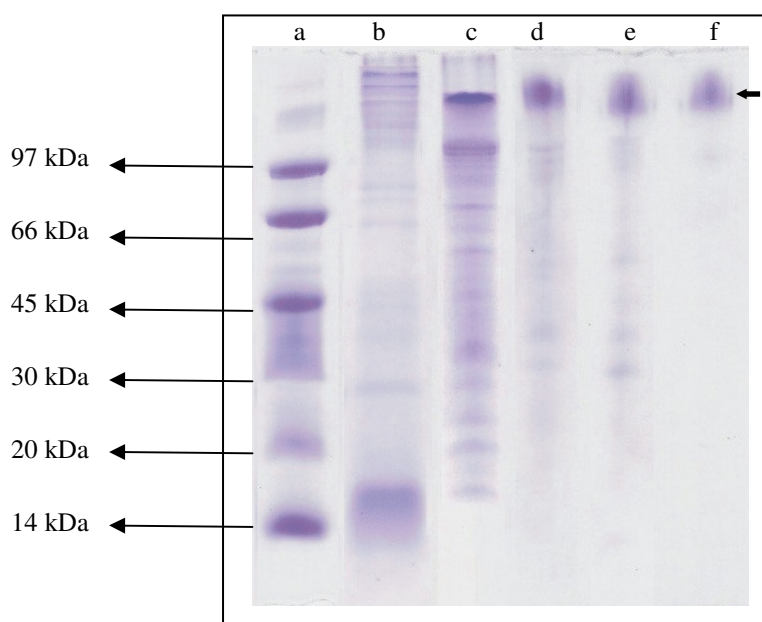


FIGURA 22 – Perfil eletroforético em SDS-PAGE de todas as etapas de purificação da glucoamilase. (a – padrão de massa molar; b – preparação bruta; c – precipitado com sulfato de amônio 60-85%; d – pool Q-4; e – pool SP-1 e f – pool G100-4). Indicada a suposta posição de migração da glucoamilase.

NOTA - As proteínas do padrão de massa molecular utilizado foram: 97 kDa, fosforilase b; 66 kDa, albumina; 45 kDa, ovoalbumina; 30 kDa, anidrase carbônica; 20,1 kDa, inibidor de tripsina e 14,4 kDa, α -lactoalbumina.

A purificação parcial da enzima foi confirmada por eletroforese SDS-PAGE (Figura 22). A banda estimada como glucoamilase apresentou massa molecular de aproximadamente 130,88 kDa, calculada a partir da equação da melhor reta obtida considerando-se os dados das distâncias percorridas pelas proteínas da mistura de padrões de massa molecular, apresentada na Figura 23.

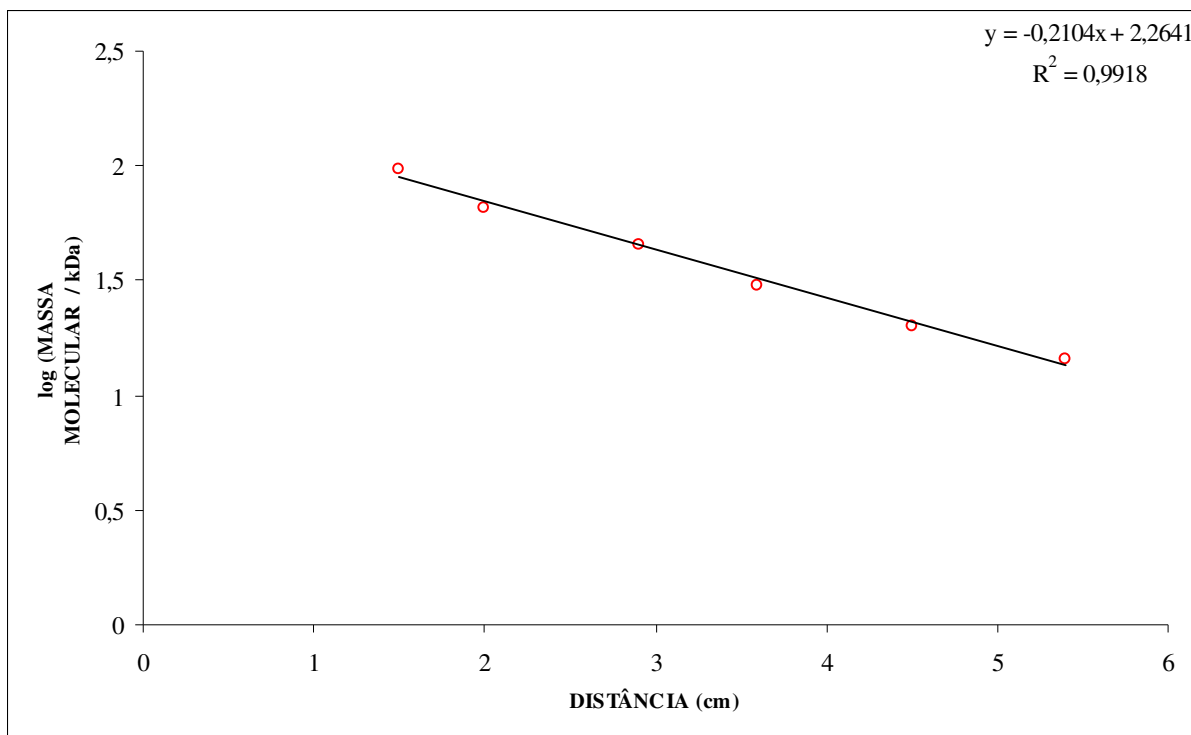


FIGURA 23 – Linha de tendência e equação da reta do padrão de massa molecular em SDS-PAGE.

5.7 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA GLUCOAMILASE PARCIALMENTE PURIFICADA

A estrutura nativa de uma proteína é estabilizada pelas interações atômicas intramoleculares além das interações da molécula com o meio no qual ela está inserida. Durante sua purificação vão sendo eliminados vários compostos que poderiam estar interagindo com a proteína e auxiliando na manutenção da sua conformação nativa (funcional), portanto, levando a perda de função. A caracterização bioquímica da glucoamilase parcialmente purificada foi realizada com o objetivo de verificar se a enzima mantém sua capacidade catalítica, bem como as condições na qual ela ocorre.

5.7.1 Determinação do *pH* e temperatura ótimos da glucoamilase parcialmente purificada

A determinação do *pH* e temperatura ótimos da glucoamilase parcialmente purificada foi realizada pelo método univariado e também por planejamento fatorial de dois níveis. No ensaio univariado de determinação de *pH* ótimo foi fixado o valor da temperatura em 60 °C. O

ensaio univariado de determinação da temperatura ótima foi realizado fixando o valor de pH em 4,6. A Tabela 29 e Figura 24 apresentam os resultados para o ensaio univariado para determinação de pH .

TABELA 29 – Atividade da glucoamilase parcialmente purificada para determinação de pH ótimo (método univariado).

pH	Atividade de glucoamilase (U/mL)
1,5	$29,84 \pm 1,38$
3,0	$102,08 \pm 1,48$
3,6	$120,29 \pm 0,92$
4,6	$144,02 \pm 0,96$
5,0	$140,80 \pm 0,70$
6,9	$46,07 \pm 0,70$
7,5	$22,34 \pm 0,27$
8,0	$18,37 \pm 0,92$
9,0	$17,60 \pm 0,53$
10,5	$16,38 \pm 0,96$

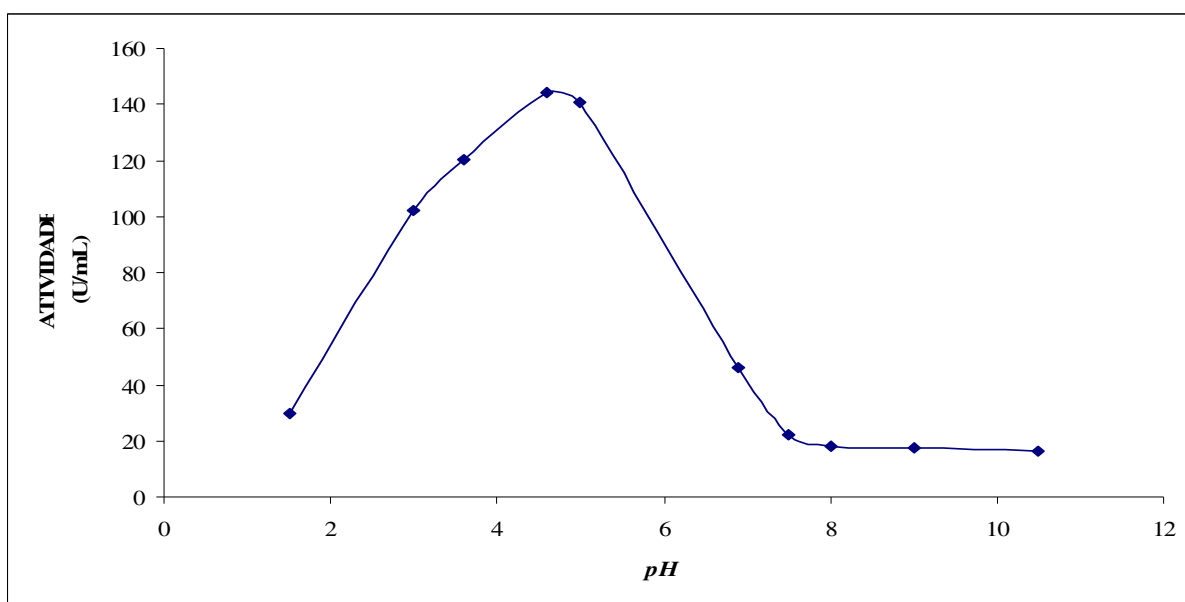


FIGURA 24 – pH ótimo da glucoamilase parcialmente purificada.

A Tabela 30 e Figura 25 apresentam os resultados para o ensaio univariado de determinação de temperatura.

TABELA 30 – Atividade da glucoamilase parcialmente purificada para determinação de temperatura ótima (método univariado).

T (°C)	Atividade de glucoamilase (U/mL)
20	$23,72 \pm 0,70$
30	$40,25 \pm 0,27$
40	$52,49 \pm 1,48$
50	$77,75 \pm 1,40$
60	$175,70 \pm 1,40$
70	$158,56 \pm 0,70$
80	$33,82 \pm 0,96$

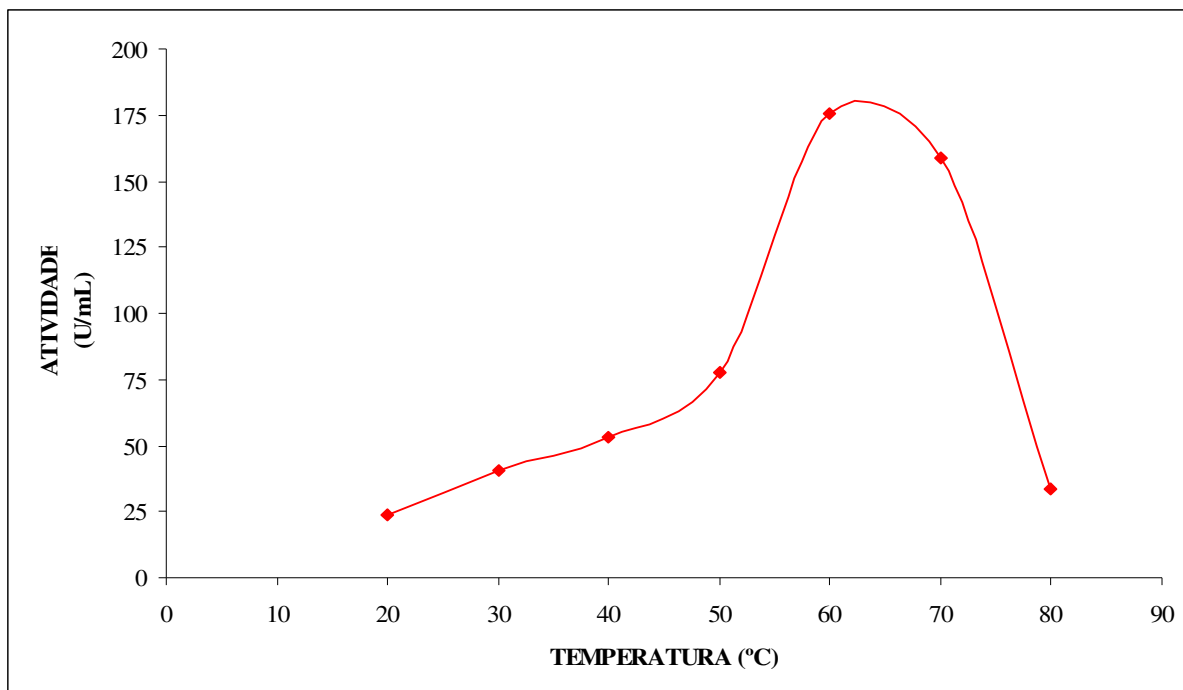


FIGURA 25 – Temperatura ótima da glucoamilase parcialmente purificada.

Os resultados do planejamento fatorial de dois níveis estão apresentados na Tabela 31, sendo a análise realizada com os valores das variáveis dependentes codificadas e a resposta como a atividade da enzima. As variáveis *pH* e temperatura e suas interações foram significativas ao nível de 5 %.

TABELA 31 - Matriz de planejamento fatorial dos experimentos com dois níveis, variáveis *pH* e temperatura e resultado a atividade de glucoamilase parcialmente purificada.

	<i>pH</i> codificado	<i>T</i> (°C)	<i>pH</i> decodificado	<i>T</i> (°C)	Atividade (U/mL)
1	- 1	- 1	3,6	46	70,33
2	+ 1	- 1	6,9	46	32,83
3	- 1	+ 1	3,6	71	128,76
4	+ 1	+ 1	6,9	71	10,01
5	+ 1,41	0	7,5	60	13,48
6	- 1,41	0	3,0	60	105,55
7	0	+ 1,41	5,0	75	68,64
8	0	- 1,41	5,0	40	46,91
9	0	0	5,0	60	138,98
10	0	0	5,0	60	138,88
11	0	0	5,0	60	138,68

TABELA 32 - Efeito do *pH* e temperatura na determinação da atividade da glucoamilase parcialmente purificada.

	Efeitos	Erro puro	t(2)	p
Média	138,837	0,0881	1574,288	0,000000
(1) <i>pH</i> (L)	- 71,7306	0,1081	- 663,107	0,000002
(2) Temperatura (L)	16,6117	0,1081	153,566	0,000042
(1) e (2)	- 40,6250	0,1527	- 265,953	0,000014

Conforme observado na Tabela 32, os efeitos de *pH*, temperatura e sua interação foram significativos, sendo que o *pH* apresentou maior efeito na atividade da enzima do que a temperatura. Quando houve o aumento do nível -1 para +1 o efeito de *pH* foi negativo e o da temperatura foi positivo, indicando que a enzima apresentou melhor atividade em valores de *pH* 3,6 que 6,9 e a temperatura de 71 °C que 46 °C; o efeito da interação das duas variáveis foi negativo, indicando que *pH* 3,6 e 46 °C em conjunto apresentaram maior efeito para a atividade enzimática do que essas variáveis isoladas. A Figura 26 apresenta a superfície de resposta para os efeitos do *pH* e temperatura da glucoamilase parcialmente purificada.

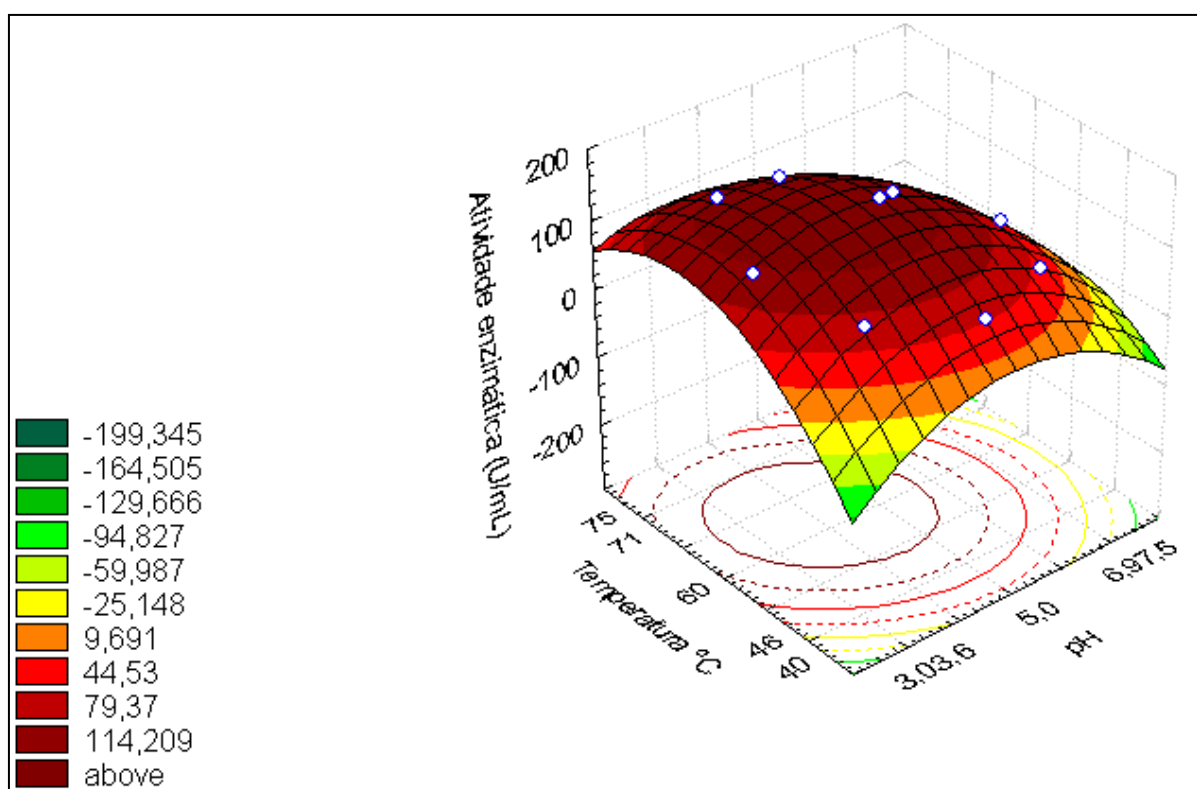


FIGURA 26 – Superfície de resposta mostrando o efeito do *pH* e temperatura na atividade da glucoamilase de *Aspergillus niger* parcialmente purificada.

Através dos resultados observados tanto na análise univariada quanto no planejamento fatorial pode-se notar que a atividade ótima da glucoamilase ocorre em torno de 60 °C e em valores de *pH* entre 4,5 e 5,0 ou abaixo, confirmando a hipótese de que a enzima não apresenta um valor fixo de *pH* no qual tem melhor atuação e sim uma faixa de *pH* ótimo. O resultado obtido para a glucoamilase parcialmente purificada reproduz aquele obtido para a

preparação enzimática bruta, demonstrando que a enzima mantém essas condições preferidas de atuação após ser submetida a etapas de purificação.

TABELA 33 – Análise de variância (ANOVA) para *pH* e temperatura ótima de atividade da glucoamilase parcialmente purificada.

	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Fcal	Ftab	Fcal/Ftab
Regressão	26174,11	5	5234,82	273,78	5,05	54,21
Resíduo	95,61	5	19,12			
Falta de ajuste	95,56	3	31,85			
Erro puro	0,05	2	0,025			
Total	26269,72	10				

$R^2 = 0,9964$, $p < 0,05$

A análise de variância ilustrada na Tabela 33 demonstrou que o modelo é preditivo e estatisticamente significativo, com relação Fcal/Ftab de 54,21, $p < 0,05$. O modelo matemático obtido da análise estatística é apresentado na equação abaixo, com $R^2 = 0,9964$ para os dados experimentais, onde $x_1 = pH$ e $x_2 = temperatura$:

$$\text{Atividade de glucoamilase} = 138,837 - 35,865x_1 - 39,315x_1^2 + 8,306x_2 - 40,191x_2^2 - 20,312x_1x_2$$

5.7.2 Determinação da estabilidade da glucoamilase parcialmente purificada em relação ao *pH*

As Tabelas 34 e 35 e Figura 27 trazem os resultados para a atividade relativa da glucoamilase parcialmente purificada durante a determinação do *pH* de estabilidade.

TABELA 34 - Atividade da glucoamilase parcialmente purificada durante os ensaios de determinação da estabilidade em relação ao *pH* (em U/mL).

<i>pH</i>	0 horas	2 horas	4 horas	8 horas	24 horas
3,6	129,85 ± 0,30	99,89 ± 0,45	89,57 ± 0,62	23,80 ± 1,05	7,73 ± 0,17
4,0	128,96 ± 0,30	112,49 ± 0,45	94,43 ± 0,79	26,68 ± 0,91	7,83 ± 0,60
4,6	150,59 ± 0,75	114,77 ± 0,62	98,80 ± 0,45	27,27 ± 0,75	7,93 ± 0,34
5,0	138,58 ± 0,34	134,81 ± 0,75	124,99 ± 1,34	34,22 ± 1,05	8,22 ± 0,45
6,0	132,63 ± 0,62	89,57 ± 0,62	53,07 ± 0,89	12,89 ± 1,07	8,13 ± 0,52
7,0	116,26 ± 0,75	28,56 ± 0,45	12,09 ± 0,75	8,62 ± 0,91	8,42 ± 0,79

TABELA 35 – Atividade relativa da glucoamilase parcialmente purificada durante a determinação da estabilidade em relação ao *pH* (em %).

<i>pH</i>	0 horas	2 horas	4 horas	8 horas	24 horas
3,6	86,23	66,33	59,48	15,80	5,13
4,0	85,64	74,70	62,71	17,71	5,20
4,6	100,00	76,21	65,61	18,11	5,26
5,0	92,03	89,52	83,00	22,72	5,46
6,0	88,07	59,48	35,24	8,56	5,40
7,0	77,20	18,97	8,03	5,72	5,59

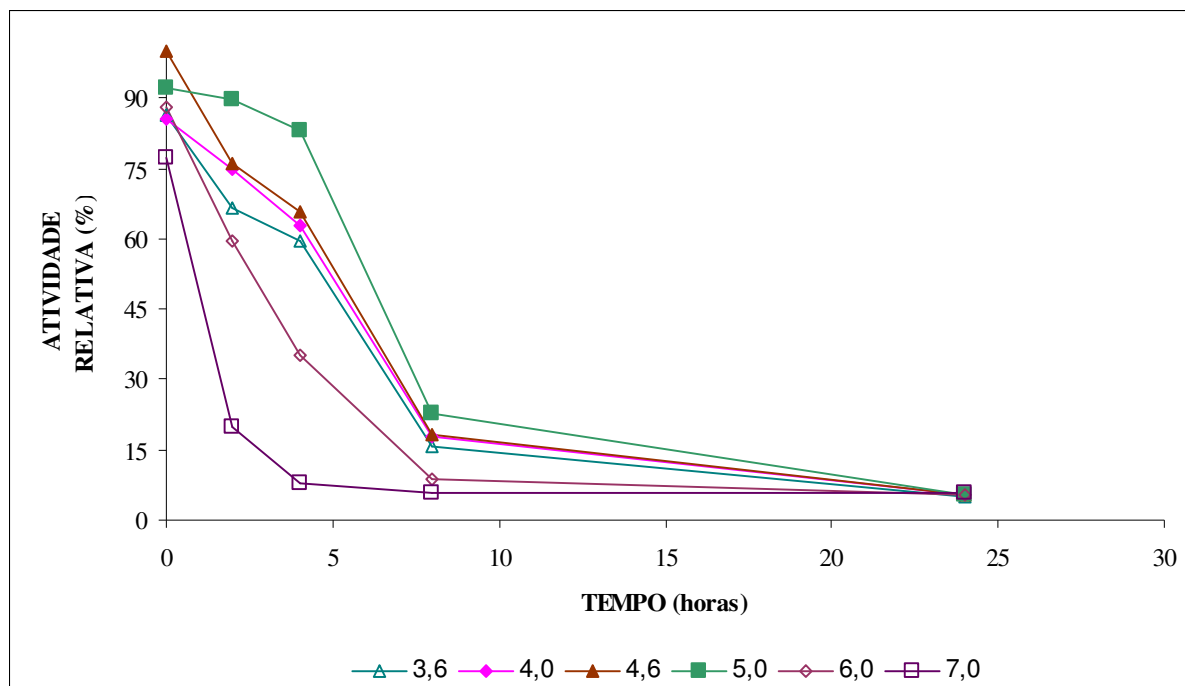


FIGURA 27 – Estabilidade da glucoamilase parcialmente purificada em relação ao *pH*.

Após a purificação da glucoamilase, o perfil de estabilidade torna-se bastante diferente em relação à preparação enzimática bruta. Em 2 horas de incubação, a enzima em *pH* 5,0 demonstrou estar mais estável, apresentando 89,52 % de atividade relativa, e manteve essa característica após 4 horas com 83 % de atividade. O *pH* 4,6, que foi considerado como *pH* de estabilidade da preparação enzimática bruta, resultou numa atividade relativa para a glucoamilase parcialmente purificada um pouco inferior em relação ao *pH* 5,0, com 76,21 % após 2 horas e 65,61 % após 4 horas de incubação, seguido pelo *pH* 4,0 com 74,60 % e 62,71 %, respectivamente. Nos valores de *pH* 3,6 e 6,0, após 2 horas de incubação, a enzima havia perdido cerca de 40 % de sua atividade catalítica e, em *pH* 7,0, cerca de 80 %. Com 8 horas de incubação, a glucoamilase já não apresentava mais estabilidade considerável em nenhum valor de *pH*, sendo a atividade mais alta encontrada para *pH* 5,0 com 22,72 % de capacidade catalítica, diferente do que foi encontrado na preparação bruta, em que manteve estabilidade após 24 horas de incubação.

Estes resultados indicam que após as etapas de purificação a enzima torna-se mais sensível a ação do *pH*, provavelmente por estar mais desprotegida. Vários fatores extrínsecos

estão relacionados com a estabilização de proteínas, seja em relação ao *pH* ou à temperatura, nos quais destacam-se os solutos, proteínas ligantes, chaperonas moleculares (chaperoninas), sais, coenzimas, ativadores, poliaminas e o próprio substrato (MUKLHOPADHYAY et al., 2003). Se durante um processo de purificação estas moléculas são separadas, a enzima pode vir a perder estabilidade.

5.7.3 Determinação da estabilidade térmica da glucoamilase parcialmente purificada

As Tabelas 36 e 37 e a Figura 28 apresentam os resultados para a atividade relativa da glucoamilase parcialmente purificada durante a determinação da temperatura de estabilidade.

TABELA 36 - Atividade da glucoamilase parcialmente purificada durante os ensaios de determinação da estabilidade térmica (em U/mL).

Temperatura °C	0 horas	2 horas	4 horas	8 horas	24 horas
15	149,89 ± 0,75	142,55 ± 0,75	137,39 ± 0,45	134,91 ± 0,30	127,77 ± 0,30
35	149,89 ± 0,75	148,90 ± 0,60	138,88 ± 0,45	139,18 ± 0,96	131,14 ± 1,13
60	149,89 ± 0,75	116,66 ± 1,53	98,80 ± 0,45	27,27 ± 0,75	7,93 ± 0,34
70	149,89 ± 0,75	8,92 ± 0,45	7,83 ± 0,30	7,83 ± 0,30	7,83 ± 0,30

TABELA 37 – Atividade relativa da glucoamilase parcialmente purificada durante a determinação da estabilidade térmica (em %).

Temperatura °C	0 horas	2 horas	4 horas	8 horas	24 horas
15	100	95,10	91,66	90,01	85,24
35	100	99,34	92,65	92,85	87,49
60	100	77,83	65,91	18,19	5,29
70	100	5,95	5,22	5,22	5,22

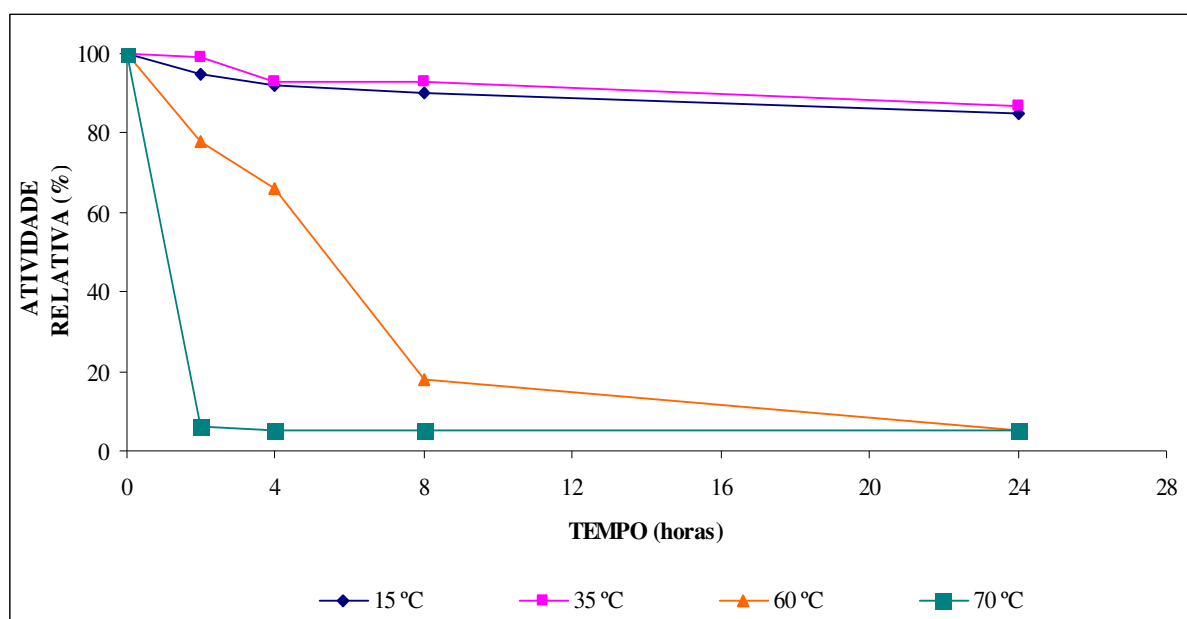


FIGURA 28 – Temperatura de estabilidade da glucoamilase parcialmente purificada.

A glucoamilase incubada a 15 e 35 °C apresentou boa estabilidade após 24 horas de experimento, mantendo 85,24 e 87,49 % de atividade catalítica residual, diferindo do que foi observado no extrato enzimático bruto que após 26 horas de incubação apresentou 40,64 e 58,75 % de atividade remanescente a 15 e 35 °C respectivamente. A 60 °C, após 2 horas de incubação, a glucoamilase apresentava 77,83 % de atividade e, após 4 horas, 65,91 %, porém, após 8 horas, restavam apenas 27,27 % de atividade residual, fornecendo resultados diferentes daqueles encontrados para a enzima na preparação bruta, onde ela apresentou temperatura de estabilidade 60 °C. A 70 °C, já nas primeiras 2 horas de incubação, a glucoamilase havia perdido mais de 90 % de atividade enzimática.

Como já foi discutido no item sobre *pH* de estabilidade, várias enzimas ao passar por processos de purificação acabam ficando sem moléculas que interagiam consigo e ajudavam a manter sua estabilidade. Esta influência fica ainda mais pronunciada quando se trata de estabilidade térmica, pois em temperaturas mais altas as moléculas tendem a apresentar um maior grau de agitação dificultando a estabilização de interações fracas responsáveis pela estrutura da proteína. Se estas interações estavam protegidas por moléculas de solutos, proteínas ligantes, chaperonas, sais, coenzimas etc, após a purificação ficam expostas e mais suscetíveis à ação do meio.

Estes resultados indicam que após as etapas de purificação a enzima passa a ser mais estável em temperaturas menores, onde a agitação das moléculas também é menor, sofrendo menos influência da ação da temperatura.

5.7.4 Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$) para a glucoamilase parcialmente purificada

A Tabela 38 e Figura 29 apresentam a atividade enzimática da glucoamilase parcialmente purificada obtida nos ensaios de variação da concentração de amido, os quais demonstraram estar de acordo com o comportamento proposto por Michaelis-Menten.

TABELA 38 – Efeito da variação da concentração do substrato na atividade enzimática da glucoamilase parcialmente purificada.

[Amido] g/100 mL	Atividade de glucoamilase (U/mL)
0,1	110,96 ± 0,27
0,2	133,61 ± 0,46
0,3	145,09 ± 0,46
0,4	150,90 ± 0,27
0,5	152,13 ± 0,27
0,6	152,50 ± 0,70
0,7	153,20 ± 0,27
0,8	153,50 ± 0,27
0,9	153,96 ± 0,27
1,0	153,81 ± 0,46

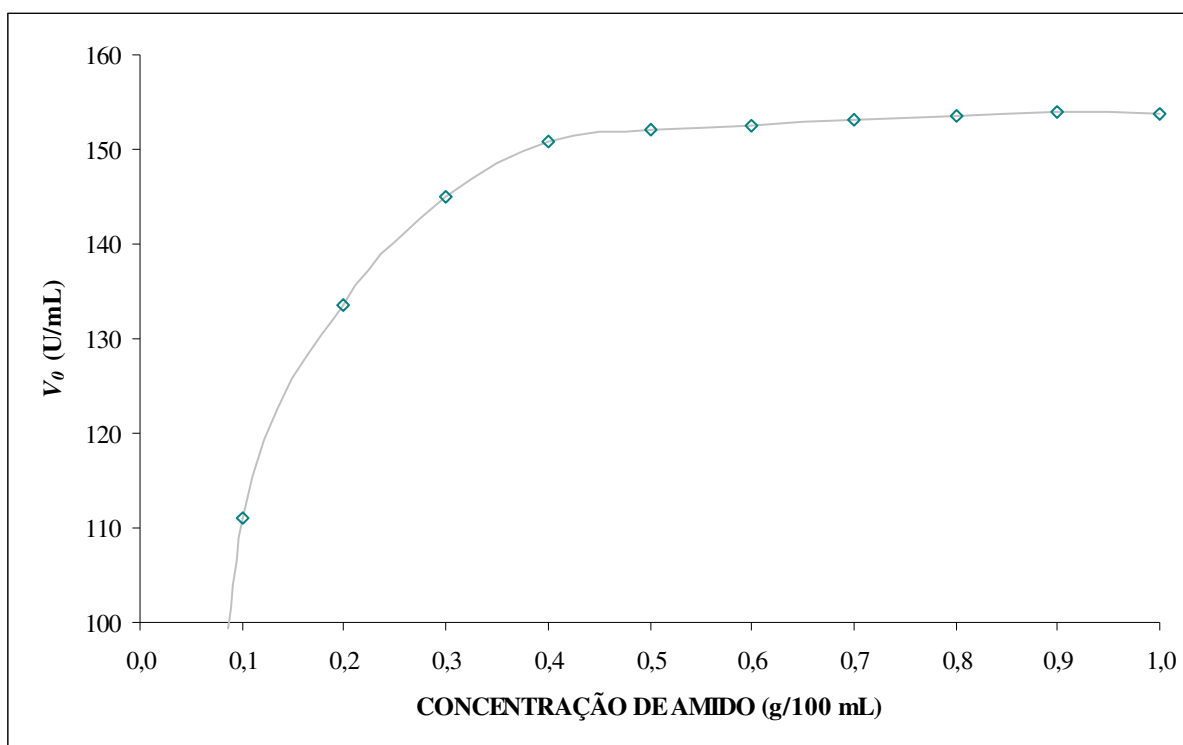


FIGURA 29 – Efeito da concentração de amido sobre a velocidade inicial da reação catalisada pela glucoamilase.

Invertidos os dados da Tabela 38, obteve-se o gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, representado na Figura 30. Através da equação da melhor reta calculada por regressão linear, foi possível determinar os valores de K_m e $V_{máx}$.

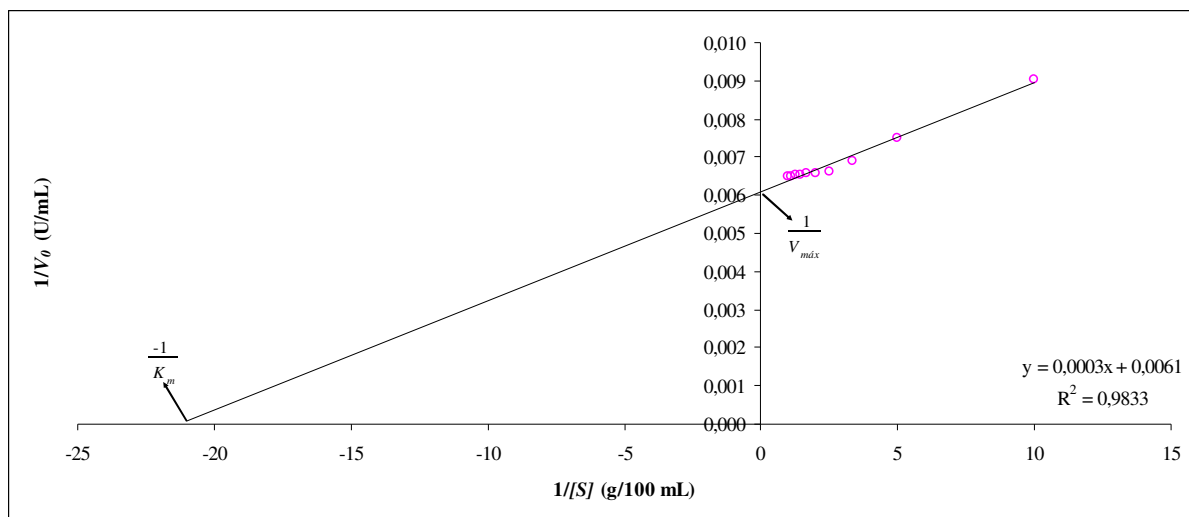


FIGURA 30 – Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para a glucoamilase parcialmente purificada.

Foram encontrados 0,049 mg/mL e 163,93 U/mL para os valores de K_m e V_{max} , respectivamente. Relembrando as informações de Marlida et al. (2000) de que um valor de K_m baixo para o amido solúvel reflete um alto número de interações fracas entre o substrato e os resíduos do sítio ativo da enzima, caracterizando alta afinidade, pode-se deduzir que após as etapas de purificação, quando o valor de K_m vai de 1,68 para 0,049 mg/mL, a enzima com maior grau de pureza passa a apresentar maior afinidade pelo amido do que quando presente na preparação bruta.

6 CONCLUSÕES

O resíduo da indústria de processamento de batata demonstrou ser um bom substrato para utilização em fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger* na produção de glucoamilase, o tempo de fermentação foi curto, 48 horas, e a quantidade de enzima produzida ficou em torno de 15,82 U/mL.

Os valores de *pH* e temperatura ótimos obtidos para a atividade enzimática da preparação bruta da glucoamilase se encontram próximos ao *pH* 5,0 e em torno de 60 °C, com atividade média de 11,87 U/mL. As análises realizadas através de planejamento fatorial de 2 níveis demonstraram que a enzima responde melhor a valores de *pH* mais ácidos e temperaturas mais altas, sendo que alterações no valor de *pH* provocam mais efeitos na atividade enzimática do que alterações na temperatura. As características de *pH* e temperatura de estabilidade também se apresentam dentro de uma faixa entre 4,0 e 5,0 para o *pH* e entre 35 e 60 °C para a temperatura, mantendo 72,87 % e 60,33 % de atividade catalítica em *pH* 4,6 e a 60 °C, respectivamente, por mais de 24 horas, indicando que se trata de uma enzima termoestável que tem boa atuação em *pH* ácido. Estes resultados são satisfatórios para a utilização da glucoamilase na indústria de processamento de amido durante a etapa de sacarificação, que ocorre justamente nas condições ótimas e de estabilidade de atuação da enzima.

Quando a glucoamilase foi submetida às etapas de purificação, passou a apresentar maior afinidade pelo amido, indicada pela diminuição do valor de K_m de 1,68 mg/mL da preparação enzimática bruta para 0,049 mg/mL da fração obtida na cromatografia em filtração em gel. A enzima manteve suas características de *pH* e temperatura ótimos, apresentando maior atividade em *pH* 4,6 e a 60 °C, com um valor médio de 152,85 U/mL, porém, diminuiu sua estabilidade para um período máximo de 4 horas quando incubada nestas condições,

sendo que após 8 horas não restavam mais do que 25 % de atividade catalítica, fato que não favorece o uso industrial da enzima purificada.

Por outro lado, quando o objetivo é estudar as características físico-químicas da molécula da glucoamilase em relação ao seu mecanismo de atuação, o alto grau de purificação é um fator fundamental. Durante o presente estudo, foi realizada uma purificação parcial da glucoamilase, através de precipitação fracionada com sulfato de amônio entre 60-85 % e interação em coluna de Q-Sepharose e Sephadex G-100. O fator de purificação foi 109,23 com um rendimento de 11,71 %, apresentando atividade específica final de hidrólise para o amido solúvel de 2174,72 U/mg.

A massa molecular da glucoamilase foi estimada em 130,88 kDa através de eletroforese em SDS-PAGE, valor superior ao relatado pela literatura para a glucoamilase I produzida por *Aspergillus niger*, sendo considerada a forma nativa da enzima, isto é, sem sofrer ação de proteases. Esta informação passa a ser valiosa para estudos futuros na determinação estrutural cristalográfica da enzima, a qual ainda não pôde ser realizada pela dificuldade da purificação total da molécula nativa, sendo que a única estrutura disponível é a de uma molécula de glucoamilase II de *Aspergillus awamori*.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar a otimização do meio de fermentação para a produção de glucoamilase quanto à suplementação de nutrientes, teor de umidade, *pH*, temperatura e agitação.
- Ampliar a produção de glucoamilase para a escala industrial.
- Analisar o efeito da concentração de glucose livre na produção de glucoamilase.
- Testar outras formas de purificação da glucoamilase com o objetivo de aumentar o grau de purificação e o rendimento da enzima.
- Com a glucoamilase purificada, determinar sua estrutura tridimensional e as características físico-químicas relacionadas ao mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- AALBAEK, T.; REESLEV, M.; JENSEN, B.; ERIKSEN, S.H. et al. Acid protease and formation of multiple forms of glucoamylase in batch and continuous cultures of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 410-415, 2002.
- AGUILAR, C.N.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 565-570, 2001.
- AIDOO, K.E.; HENDRY, R.; WOOF, B.J.B. Solid substrate fermentations. **Advance Applied Microbiology**, v. 28, p. 201-237, 1982.
- AIYER, P. Amylases and their applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 13, p. 1525-1529, 2005.
- ANTO, H.; TRIVEDI, U.B.; PATEL, K.C. Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 10, p. 1161-1166, 2006.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 205, de 14 de novembro de 2006. Aprova o regulamento técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 de novembro de 2006 Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 3 mai. 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA BATATA. **História**. Disponível em: <<http://www.abbabatatabrasileira.com.br/historia.htm>>. Acesso em: 10 jul. 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC Internacional**. 17 ed: Gaithersburg, MD, 2000.
- ASTHER, M.; HAON, M.; ROUSSOS, S.; RECORD, E.; DELATTRE, M.; LESAGE-MEESSEN, L.; LABAT, M.; ASTHER, M. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 685-691, 2002.
- BAHAR, T.; ÇELEBI, S.S. Characterization of glucoamylase immobilized on magnetic poly(styrene) particles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 301-304, 1998.
- BARAMPOUTI, E.M.P; VLYSSIDES, A.G. Dynamic modeling of biogas production in an UASB reactor for potato processing wastewater treatment. **Chemical Engineering Journal**. n. 106, p. 53-58, 2005.
- BHATTI, H.N.; RASHID, M.H.; NAWAZ, R.; ASGHER, M.; PERVEEN, R.; JABBAR, A. Purification and characterization of a novel glucoamylase from *Fusarium solani*. **Food Chemistry**, v. 103, p. 338-343, 2007.

BELSHAW, N.J.; WILLIAMSON, G. Production and purification of a granular-starch-binding domain of glucoamylase 1 from *Aspergillus niger*. **FEBS Letters**, v. 269, n. 2, p. 350-353, 1990.

BERTOLIN, T. E.; CASARA, J.C.; MAIORANO, A.E.; SCHMIDELL, W. Estudo da indução da síntese de glicoamilase por fermentação semi-sólida. In: V SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 1996, Mariangá. **Anais do V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1996.

BERTOLIN, T.E.; CASARA, J.; COSTA, J.A.V. Influence of carbon, nitrogen and phosphorous sources on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. **Zeitschrift Für Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, v. 58, p. 708-712, 2003.

BIZUKOJC, M.; LEDKOWICZ, S. A kinetic model to predict biomass content for *Aspergillus niger* germinating spores in the submerged culture. **Process Biochemistry**, Article in press, 2006.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Coord.). **Biotecnologia industrial: fundamentos**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, 254 p.

BRAMORSKI, A.; SOCCOL, C.R.; CHRISTEN, P.; REVAH, S. Fruit aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in static cultures from solid agro-industrial wastes. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 208-212, 1998.

BRYJAK, J. Glucoamylase, α -amylase and β -amylase immobilisation on acrylic carriers. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 347-355, 2003.

CASTILHO, L.R.; MEDRONHO, R.A.; ALVES, T.L.M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CEPEDA, E.; HERMOSA, M.; BALLESTEROS, A. Optimization of maltodextrin hydrolysis by glucoamylase in a batch reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 76, p. 70-76, 2001.

CHAPLIN, M.F.; BUCKE, C. **Enzyme technology**. New York: Cambridge University Press, 1992. 264 p.

CHIQUETTO, M.L. **Estudo comparativo entre diferentes fontes de carbono e de nitrogênio na síntese de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em fermentação submersa**. 1991. 203 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

COONEY, C.L. Growth of microorganisms. In: REHM, H.J.; REED, G. **Biotechnology: a comprehensive treatise**. 1981, v. 1, 75-112.

COSTA, J.A.V. **Estudo da produção de amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz**. 1996. 203 f. Tese (Doutorado) - Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

COULTATE, T.P. Polissacarídeos. In: _____. **Alimentos: a química de seus componentes**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 39-62.

DAHLQVIST, A. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose-oxidase reagent. **Biochemistry Journal**, v. 80, p. 547-551, 1961.

DANIEL, M.R.; TRINDADE, V.; CASTILHO, L.R.; COELHO, M.A.Z.; MEDRONHO, R.A. Influência do *pH* na produção de pectinases usando casca de limão como meio semi-sólido. In: **SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS**, 1996, Maringá. Disponível em: <www.uem.br/biblioteca/deq.htm> Acesso em: 28/12/2005.

DARTORA, A. B. et al. Seleção de fungos filamentosos e estudo de diferentes indutores para produção de pectinase em processo semi-sólido. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2000, Fortaleza, **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Fortaleza, 2000, v. 3. p. 9101-9101.

DA SILVA, W.B.; PERALTA, R.M. Caracterização bioquímica de uma enzima extracelular de um fungo termotolerante. **Publicatio UEPG – Biological and Health Sciences**, v. 6, n. 1, p. 7-19, 2006.

DE PAULA, E.H.; AZEVEDO, M. O. . Biodegradação de resíduos agroindustriais pelo fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* II Análise da expressão gênica sob condições de indução direta e indireta. In: V SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 1996, Maringá. **Anais do V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1996.

DEL BIANCHI, V.L.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. Fermentação em estado sólido. In: LIMA, U.A. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica**. 1. ed., v. 3. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 13. p. 247-276.

DELMAS, J. **Les champignons et leur culture**. Flammarion, La maison Rustique, Paris, 1989.

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. **Bioquímica: aulas práticas**. Curitiba: Editora da UFPR, 1995.

DIAZ-GODINEZ, G.; SORIANO-SANTOS, J.; AUGUR, C.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 271-275, 2001.

ELLAIAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. **Process Biochemistry**. v. 38, p. 615-620, 2002.

FÁGÁIN, O. C. Understanding and increasing protein stability. **Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular**, v. 1252, n. 1, p. 1-14, 1995.

FELLOWS, P. **Tecnologia del procesado de los alimentos: principios e practicas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p. 172-177.

FIEROBE, H.P.; MIRGORODSKAYA, E.; FRANDSEN, T.P.; ROEPSTORFF, P.; SVENSSON, B. Overexpression and characterisation of *Aspergillus awamori* wildtype and mutant glucoamylase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: comparison with wild-type recombinant glucoamylase produced using *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* as hosts. **Protein Expression and Purification**, v. 9, p.159–70, 1997.

FORGARTY, W.M. Microbial amylase. In: FORGARTY, W.M. (Ed.). **Microbiology and biotechnology**. Barking U.K.: Applied Science Publishers, 1983. p. 1-92.

FRANCO, C.M.L.; DAIUTO, E.R.; DEMIATE, I.M.; CARVALHO, L.J.C.B.; LEONEL, M.; DEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F.; SARMENTO, S.B.S. **Propriedades gerais do amido**. São Paulo: Fundação Cargil, 2001, 221 p. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, 1).

GLICOSE-PP: kit enzimático. Responsável técnico Homero Jackson de Jesus Lopes. Belo Horizonte, MG: Gold Analisa Diagnóstica LTDA, 2006. Bula de reagente.

GOMES, E.; SOUZA, R.S.; GRANDI, R.P.; SILVA, R. Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* A 1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A 13.37 **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 75-82, 2005.

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

GOUKA, R.J.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**., v. 47, p. 1–11, 1997.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α - amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**., v.38, p. 1599-1616, 2003.

GUZMÁN-MALDONADO, H.; PAREDE-LÓPES, O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 5, p. 373-403, 1995.

HANSEN, B.W.; WILLUMSEN, B.; WINTHER, S.K.; DRABOL, H. Multistep determination of enzyme activity by flow injection and sequential injection analysis. Assay of amiloglucosidase. **Talanta**, New York, v. 41, n. 11, p. 1881-1893, 1994.

HARSA, S.; FURUSAKI, S. Chromatographic separation of amyloglucosidase from the mixtures of enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 257–261, 2001.

HATA, Y.; ISHIDA, H.; KOJIMA, Y.; ICHIKAWA, E.; KAWATO, A.; SUGINAMI, K.; IMAYASU, S. Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (koji) and in submerged culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 6, p. 532-537, 1997.

HENRY, J.B. **Clinical enzymology pre-workshop manual**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1964. 288 p.

HERNANDÉZ, M.S.; RODRÍGEZ, M.R.; GUERRA, N.P.; ROSÉS, R.P. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 93-100, 2006.

HESELTIME, C. W. Solid state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 14, p. 517-532, 1976.

HESELTIME, C.W. Solid state fermentation – Parte I. **Process Biochemistry**, v.4, p. 24-27, 1977.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, v.1, 1985. 533p.

JAFARI-AGHDAM, J.; KHAJEH, K.; RANJBAR, B.; NEMAT-GORGANI, M. Deglycosylation of glucoamylase from *Aspergillus niger*: Effects on structure, activity and stability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1750, n. 1, p. 61-68, 2005.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, p.1-5, 2000.

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

JUGE, N.; NØHR, J.; LE GAL-COËFFET, M.F.; KRAMHØFT, B.; FURNISS, C.S.M.; PLANCHOT, V.; ARCHER, D.B.; WILLIAMSON, G.; SVENSSON, B. The activity of barley α -amylase on starch granules is enhanced by fusion of a starch binding domain from *Aspergillus niger* glucoamylase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 275–284, 2006.

KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR. A. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHMIDEL W. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. 1. ed., v. 2 São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 21. p. 493-521.

KOUTINAS, A.A.; WANG, R.; WEBB, C. Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 93–100, 2003.

LABELLE, P.; BARET, J.L.; BEAUX, Y.; DUCHIRON, F. Comparative study of wheat flour saccharification and ethanol production with two amilogucosidase preparations. **Industrial Crops and Products**, v. 6, p. 291-295, 1997.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARÍOS, G.; GARCIA, J.M.; HUITRON, C. Endo-polygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 10, p. 729-734, 1989.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 839 p.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 65-69, 2002.

LINEBACK, D.R.; RUSSELL, I.J.; RASMUSSEN, C. Two forms of the glucoamylase of *Aspergillus niger*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 134, p. 539–553, 1969.

LOERA, O.; AGUIRRE, J.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 25, p. 103-108, 1999.

LONSANE, B.K.; GHILDYAL, N.P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 7, p. 258-265, 1985.

LONSANE, B.K.; RAMESH, M.V. Production of bacterial thermostable α -amylase by solid-state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. **Advance Applied Microbiology**, v. 35, p. 1-56, 1990.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACCARI JUNIOR et al. Seleção de leveduras amilolíticas e alcoogênicas para produção de etanol, por fermentação associativa, a partir de refugos de batata. In: XI SINAFERM - Simpósio Nacional de Fermentações, 1996, São Carlos. **Anais do XI Simpósio Nacional de Fermentações**. São Carlos: Editora da Universidade Federal de São Carlos, 1996. p. 514-519.

MACEDO, G. R.; FACCIOTTI, M. C. R. ; SCHMIDELL, Willibaldo . Aspectos da inibição do crescimento e repressão pela glicose, no cultivo da *Aspergillus awamori* para a produção de glicoamilase. In: VI SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS (VI SHEB), 1999, Maringá. **Anais do V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1999.

MACKENZIEA, D.A.; JEENES, D.J.; GOU, X.; ARCHER, D.B. Molecular basis of glucoamylase overproduction by a mutagenised industrial strain of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 193–200, 2000.

MARLIDA, Y.; SAARI, N.; HASSAN, Z.; RADU, S.; BAKAR, J. Purification and characterization of sago starch degrading glucoamylase from *Acremonium* sp. Endophytic fungus. **Food Chemistry**, v. 71, p. 221–227, 2000.

MARZZOCCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MEAGHER, M.M.; NIKOLOV, Z.L.; REILLY, P.J. Subsite mapping of *Aspergillus niger* glucoamylases I and II with malto- and isomaltooligosaccharides. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 681–688, 1989.

MERCIER, C. Les enzymes amylolytiques. In: MOURANCHE, A.; COSTES, C. **Hydrolases et dépolymérase**s. Enzymes d'intérêt industriel. Paris: Ed. Gauthier-Villars-Bordas, 1985. p. 109-142.

MINAMI, N.M.; KILIKIAN, B.V. Separation and purification of glucoamylase in aqueous two-phase systems by a two-step extraction. **Journal of Chromatography**, v. 711, p. 309–312, 1998.

MISHRA, B.K.; ARORA, A.; LATA. Optimization of a biological process for treating potato chips industry wastewater using a mixed culture of *Aspergillus foetidus* and *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**. n. 94, p. 9-12, 2004.

MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; STUART, D.M.; PANDEY, A. New developments in solid state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.

MONTIEL-GONZÁLEZ, A.M. et al. Effect of water activity on invertase production in solid state fermentation by improved diploid strains of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2085-2090, 2004.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A.R.; TERGERDY, R.P. Principles of solid-substrate fermentation. In: **The filamentous fungi**: Fungal biotechnology, v. 4. London: Smith Berry & Kristiansen Ed, 1983. p. 117-144.

MORAES, I.O. Produção de microrganismos. In: LIMA, U.A. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. 1. ed., v. 3. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 9. p. 199-214.

MUKLHOPADHYAY, A.; HAZRA, P.P.; SENGUPTA, T.; SAHA, R.; NANDI, R.; SENGUPTA, S. Protein-protein interaction conferring stability to an extracellular acetyl (xylan) esterase produced by *Termitomyces clypeatus*. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 720-726, 2003.

NAHAS, E.; WALDERMARIN, M.M.. Control of amylase production and growth characteristics of *Aspergillus ochraceus*. **Microbiologia**, v. 44, p. 5–10, 2002.

NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J.M.; MOO-YOUNG, M. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 80-85, 2006.

OLSEN, H.S. Como processar batatas sem perdas. **BioTimes**, n. 3, p. 4-5, sep. 2000.

OSHEROV, N.; MAY, G.S. The molecular mechanisms of conidial germination. **FEMS. Microbiology Letters**, v. 199, p. 153-160, 2001.

PAES DE CARVALHO, A. **Patentes para a biotecnologia**. Apresentado à Academia Brasileira de Ciências em 06 de dezembro de 1993.

PAMBOUKIAN, C.R.D. **Influência das condições de preparo do inoculo na morfologia do microrganismo e na síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori***. 1997, 189 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

PANDEY, A. Recent process development in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 109-117, 1992.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 81-87, 2000.

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

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme technology**. 1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005. 760 p.

PAPAGIANNI, M.; MOO-YOUNG, M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1271-1278, 2002.

PAUL, G.C.; KENT, C.A.; THOMAS, C.R. Viability testing and characterisation of germination of fungal spores by automatic image analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 11-23, 1993.

PAUL, G.C.; THOMAS, C.R. Characterisation of mycelial morphology using image analysis. **Advance of Biochemistry Engineering and Biotechnology**, v. 60, p. 1-59, 1998.

PARK, Y.K.; SANTI, M.S.S. Induction of high amiloglucosidase producing mutant from *Aspergillus awamori*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 55, p.193-195, 1977.

PAZUR, J.H.; KLEPPE, K. Glucoamylase structure and properties of the two form so of glucoamylase from *Aspergillus niger*. **Carboydrate Research**, v. 20, p. 83-96, 1971.

PELCZAR, **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 4. ed. São Paulo: Makron Books, 1998. cap. 10. p. 258-271.

PEREIRA, C.A.; DE CARLI, L.; BEUX, S.; SANTOS, M.S.; BUSATO, S.B.; KOBELNIK, M.; BARANA, A.C. Utilização de farinha obtida a partir de rejeito de batata na elaboração de biscoitos. **Publicatio UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharia**, Ponta Grossa, v. 1, n. 11, p. 19-26, 2005.

PESSOA, M.L.A.; ANDRADE, S.A.C.; SALGUEIRO, A.A.; STAMFORD, T.L.M. Aproveitamento de subproduto industrial de óleos vegetais para produção de riboflavina por *Candida guilliermondii* DM 644. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, Campinas, 2003.

PETER, W.S.; CHIOU, S.W.; CHIU, C.R. Value de *Aspergillus niger* fermentation product as a dietary ingredient for broiler chickens. **Chen.- Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 171-182, 2001.

POLAKOVIC, M.; BRYJAC, J. Modelling of potato starch saccharification by an *Aspergillus niger* glucoamylase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 57–63, 2004.

PRADO, F.C. **Desenvolvimento de bioprocesso em escala semipiloto para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido a partir do bagaço de mandioca**. 2002, 81 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

PRICE, M.S.; CLASSEN, J.J.; PAYNE, G.A. *Aspergillus niger* absorbs copper and zinc from swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 41-49, 2001.

PRICE, N.C.; DWEK, R.A. **A química física em bioquímica**. Mira-Sintra. Portugal: Publicações Europa-América, 1979.

PRIEST, F.G. **Extracellular enzymes**. Londres: Van Nostrand Reinhold, 1984.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os reinos dos fungos**. 2. ed., v. 1. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004. 605 p.

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p.199–203, 1980.

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

REED, G. **Enzyme in food processing**. 2. ed. New York: Academic Press Inc., 1975. p. 62-87.

RIZZATTO, M. L.; GOMES, E.; MONTE ALEGRE, R Pectinase production by solid-state fermentation of orange bagasse by *Penicillium italicum* and *Aspergillus niger*. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2001, Foz do Iguaçu. **Anais doXXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, 2001.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 284-289, 2001.

ROBYT, J.F. Enzymes in the hydrolysis and synthesis of starch. In: WHISTLER, J.M.; FENILLER, E.R.; PASCHELL, E.R. (Ed.). **Starch: chemistry and technology**. New York: Academic Press, 1984. p. 87-123.

ROUSSOS, S. Advances in solid state fermentation. proceedings of the 2nd international symposium on solid state fermentation. FMS-95. **Kluwer Academic Publishers**, 1995.

RUBIO, M.C.; MOLINA, O.E. Treatment of potato waste effluents with bacterial protein production. **Biological Wastes**. n. 29, p. 221–228, 1989.

SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Glucoamylase immobilized on montmorillonite: synthesis, characterization and starch hydrolysis activity in a fixed bed reactor. **Catalysis communications**, v. 6, n. 8, p. 525-530, 2005.

SANT'ANA JR., G.L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U.A. (Coord.) **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. 1. ed., v. 3. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 14. p.351-362.

SANTOS, G. Dos. **Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori***. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. **Controle du Metabolisme de *Schwanniomyces castelli* cultive sur support solide**. (Tese de Doutorado) Montpellier: Universite Montpellier II, 1991. p. 31-41.

SCHLEGEL, H.G. **Basic mechanism and energy conversion**. In: General Microbiology, Reino Unido: Cambridge University Press, 7 ed., p. 234-289, 1993.

SCHMIDELL, W.; MENEZES, J. R. G., Influência da glicose na determinação da atividade da amiloglicosidase. **Revista de Microbiologia**, v. 17, p. 194-200, 1986

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL W.; BORZANI, W.B.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Coord.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. 1. ed., v. 2 São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 2. p. 5-18.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R Biorreatores e processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.B.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Coord.). **Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica**. 1. ed. V. 2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap 8. p. 179-192.

SCOPES, R.K. **Proteins purification principles and practice**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1988. 283p.

SEGEL, I.H. Enzymes. In: _____. **Biochemical calculations**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1976. 441 p.

SELVAKUMAR, P.; ASHAKUMARY, L.; PANDEY, A. Microbial synthesis of starch saccharifying enzyme in solid state fermentation. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 55, p, 443-449, 1996.

SELVAKUMAR, P.; ASHAKUMARY, L.; PANDEY, A. Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basis of a solid substrate. **Bioresourcr Technology**, v. 65, p. 83-85, 1997.

SERAFINI, R.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463 p.

SHIRAKI, K.; NISHIKORI, S.; FUJIWARA, S.; HASHIMOTO, H.; KAI, Y.; TAKAGI, M.; IMANAKA, T. Comparative analyses of the conformational stability of a hyperthermophilic protein and its mesophilic counterpart. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 15, p. 4144-4150, 2001.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos** – Métodos químicos e biológicos. Viçosa: Imprensa Universitária, 1981.

SILVA, R.N.; ASQUIERI, E.R.; FERNANDES, K.F. Immobilization of *Aspergillus niger* glucoamylase onto a polyaniline polymer. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1155-1159, 2005.

SOCCOL, C.R.; ROJAN, P.J.; PATEL, A.K.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. Glucoamylase. In: PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme technology**. 1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005. p. 221-230.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological**, v. 195, n. 1, p. 19-23, 1952.

SPIER, M.R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 157 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

STAMFORD, T. L. M. et al. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 105-109, 2002.

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. Hidrólise do amido. In: Cereda, M. P. (coord.). (Org.). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. v. 3, cap. 15, Campinas: Fundação Cargil, 2003. p. 377-395.

SUSSMAN, A. S. **Microrganismos: crescimento, nutrição e interação**. São Paulo: EDART, 1974. 159 p.

SUTTHIRAK, P.; DHARMSTHITI S., LERTSIRI, S. Effect of glycation on stability and kinetic parameters of thermostable glucoamylase from *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2821-2826, 2005.

TANUJA, S.; SRINIVAS, N.D.; RAGHAVA RAO, K.S.M.S.; GOWTHAMAN, M.K. Aqueous two-phase extraction for downstream processing of amiloglucosidase. **Process Biochemistr**, v. 32, n. 8, p. 635-641, 1997.

TAYLOR, P. M.; NAPIER, E.J.; FLEMING, I.D. Some properties of a glucoamylase produced by the thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. **Carbohydrate Research**, v. 61, p. 301-308, 1978.

THORSEN, T.S.; JOHNSEN, A.H.; JOSEFSEN, K.; JENSEN, B. Identification and characterization of glucoamylase from the fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 671-676, 2006.

TRINDADE, V.; DANIEL, M.R.; CASTILHO, L.R.; COELHO, M.A.Z.; MEDRONHO, R.A.; LEITE, S.G.F. Emprego de diferentes substratos para a produção de pectinases em meio semi-sólido. In: V SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 1996, Maringá. **Anais do V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1996.

VILLEN, R.A. **Biotecnologia: histórico e tendências**. Disponível em: <<http://www.hottopos.com>>. Acesso em: 20 de março de 2007.

VITOLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. 1. ed., v. 4. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 14. p. 387-418.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos**. Zaragoza: Acribia, 1995. 228 p.

WALLIS, G.L.F.; SWIFT, R.J.; ATTERBURY, R.; TRAPPE, S.; RINAS, U.; HEMMING, F.W.; WIEBE, M.G.; TRINCI, A.P.J.; PEBERDY, J.F. The effect of *pH* on glucoamylase production, glycosilation and chemostat evolution of *Aspergillus niger*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1527, p. 112-122, 2001.

WANG, H.L.; HESSELTINE, C.W. Wheat tempeh. **Cereal Chemistry**, v. 43, p. 563-570, 1969.

WENISCH, E.; SCHNEIDER, P.; HANSEN, S.A.; REZZONICO, R.; RIGHETTI, P.G. Isoelectric focusing in a multicompartiment electrolyzer with zwitterionic membranes, exemplified by purification of glucoamylase. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 27, n. 3, p. 199-213, 1993.

WHITAKER, A.; LONG, P.A. Fungal pelleting. **Process Biochemistry**, v. 8, p. 27-31, 1973.

WIKIPEDIA FOUNDATION INC, The Free Encyclopedia. *Aspergillus niger*. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Aspergillus_niger#Industrial_use>. Acesso em: 23 abr. 2006.

YAYKASH, K.O.; DEMIREL, G.; YASAR A. Influence of alcohols on citric acid production by *Aspergillus niger* A-9 entrapped in polyacrylamide gels. **Journal of Food Engineering**, v. 70, p. 518-522, 2005.

ZALDIVAR-AGUERO, J.M.; BADINO JR., A.C.; VILAÇA, P.R.; FACCIOTTI, M.C.R., SCHIMIDELL, W. Influence of phosphate concentrations on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in submerged culture. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 4, 1997.

ZANIN, G.M. **Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglucosidase imobilizada**. 1989. Tese (Doutorado) – Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas, Campinas, 1989.

ANEXO A - Resolução – RDC nº 205, de 14 de novembro de 2006.

TÍTULO: Resolução RDC nº 205, de 14 de novembro de 2006

EMENTA NÃO OFICIAL: Aprova o “Regulamento técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano”.

PUBLICAÇÃO: D.O.U. – Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 17 de novembro de 2006.

ÓRGÃO EMISSOR: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ALCANCE DO ATO: Federal – Brasil

ÁREA DE ATURAÇÃO: Alimentos

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 205, DE 14 DE NOVEMBRO DE 2006.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição que lhe confere o inciso IV do art. 11 do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, e tendo em vista o disposto no inciso II e nos §§ 1º e 3º do art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria nº 354 da ANVISA, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em 6 de novembro de 2006, e

- considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos visando à proteção da saúde da população;

- considerando que é indispensável o estabelecimento de Regulamentos Técnicos que dispõem sobre o uso de aditivos e coadjuvantes de tecnologia em alimentos, com vistas a minimizar os riscos à saúde humana;

- considerando que os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia aprovados ficam sujeitos à revisão periódica, podendo o seu emprego ser proibido desde que nova concepção científica ou tecnológica modifique convicção anterior quanto à sua inocuidade ou aos seus limites de tolerância;

- considerando que antes de ser autorizado o uso de uma substância em alimentos, esta foi submetida a uma adequada avaliação toxicológica, em que foram considerados, dentre outros aspectos, quaisquer efeitos cumulativo, sinérgico e de proteção decorrente de seu uso;

- considerando que os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia devem ser utilizados sob condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado;

considerando o resultado da consolidação da Consulta Pública/ANVISA nº 93, de 21/12/2005 (D.O.U. de 22/12/2005).

- considerando que a CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança classificou as enzimas, proteínas heterólogas, aminoácidos e vitaminas produzidas por organismos geneticamente modificados como substâncias quimicamente definidas (§2º do Art. 3º da Lei nº. 11.105/05), ou seja, não se submetem à apreciação da CTNBio, desde que se apresentem purificadas, sem formas viáveis dos organismos que as produziram e, ainda, sem traços de material genético (ácidos nucleicos);

- adota a seguinte Resolução da Diretoria Colegiada e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º - Aprovar o “Regulamento Técnico sobre Enzimas e Preparações Enzimáticas para Uso na Produção de Alimentos Destinados ao Consumo Humano”, constante do Anexo desta Resolução.

Art. 2º - O descumprimento desta Resolução constitui infração sanitária, sujeitando os infratores às penalidades previstas na Lei nº. 6.437, de 20 de agosto de 1977, e demais disposições aplicáveis.

Art. 3º - Revogam-se as disposições em contrário, especialmente a Resolução CNNPA nº. 14, publicada no DOU de 28/06/72; Resolução CNNPA nº. 30, publicada no DOU de 07/03/75; Resolução CNNPA nº. 24/76, publicada no DOU de 09/05/77, e o Anexo: Enzimas de Origem Animal e Vegetal, publicado no DOU de 09/11/77; a Portaria DETEN/MS nº. 241, de 22 de maio de 1996, publicada no DOU de 28/05/96; e a Resolução RDC nº. 348, de 2 de dezembro de 2003, publicada no DOU de 03/12/03.

Art. 4º - Esta Resolução de Diretoria Colegiada entra em vigor na data de sua publicação.

DIRCEU RAPOSO DE MELLO

ANEXO

REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE ENZIMAS E PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS PARA USO NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS DESTINADOS AO CONSUMO HUMANO

1 ALCANCE

1.1 Objetivo

Este Regulamento tem como objetivo estabelecer a relação nominal e as respectivas fontes de enzimas e preparações enzimáticas permitidas para a fabricação de alimentos, constantes do Anexo I, bem como as condições gerais de uso e os critérios de atualização.

1.2 Âmbito de aplicação

O presente Regulamento se aplica às enzimas e preparações enzimáticas utilizadas na fabricação de alimentos.

2. DESCRIÇÃO

2.1 DEFINIÇÃO

Para efeito deste Regulamento adotam-se as seguintes definições:

2.1.1 Alimento: é toda substância que se ingere no estado natural, semi-elaborada ou elaborada, destinada ao consumo humano, incluídas as bebidas e qualquer outra substância utilizada em sua elaboração, preparo ou tratamento, excluídos os cosméticos, o tabaco e as substâncias utilizadas unicamente como medicamentos.

2.1.2 Enzimas: são proteínas capazes de catalisar reações bioquímicas, aumentando sua velocidade sem interferir no processo e resultando em alterações desejáveis nas características de um alimento durante o seu processamento.

2.1.3 Preparação enzimática: é a mistura de duas ou mais enzimas.

2.2. CLASSIFICAÇÃO

2.2.1.Quanto à origem:

2.2.1.1 Animal: são enzimas extraídas de órgãos ou produtos animais.

2.2.1.2 Vegetal: são enzimas extraídas de vegetais (ex.: papaína extraída do mamão papaia, bromelina extraída do abacaxi).

2.2.1.3 Microbiana: são enzimas produzidas por meio de uma fermentação por bactérias, fungos ou leveduras.

2.3 DESIGNAÇÃO

As enzimas e preparações enzimáticas serão designadas segundo a sua atividade principal, conforme Anexo I, e sua classificação de acordo com o item 2.2.1.

2.3.1. No caso de enzimas e preparações enzimáticas que contenham enzima de origem microbiana, deve constar o nome do microrganismo que deu origem à enzima.

3. REFERÊNCIAS

3.1 BRASIL. Decreto-Lei nº. 986, de 12/10/69. Institui Normas Básicas sobre Alimentos.

3.2 BRASIL. Lei nº. 6437, de 24 de agosto de 1977. Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá providências.

3.3 BRASIL. Decreto nº. 50.040, de 24/01/61. Dispõe sobre as Normas Técnicas Especiais Reguladoras do emprego de aditivos químicos a alimentos.

3.4 BRASIL. Decreto nº. 55.871, de 26/03/65. Modifica o Decreto nº. 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº. 691, de 13 de março de 1962.

3.5 BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 540, de 27/10/97. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia de Fabricação.

3.6 BRASIL. Lei nº. 11.105, de 24/03/05. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados - OGM - e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança - CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança - PNB, revoga a Lei nº. 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº. 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10º e 16º da Lei nº. 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências.

3.7 BRASIL. Resolução RDC nº. 259 de 20/09/02. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados.

3.8 BRASIL. Resolução RDC nº. 278 de 22/09/05. Aprova as Categorias de Alimentos e Embalagens Dispensados e com Obrigatoriedade de Registro.

3.9 EU-SCF. European Scientific Committee on Food - Guidelines for the presentation of data on food enzymes, 1991.

3.10 FCC. Food Chemicals Codex. Food and Nutrition Board - Institute of Medicine National Academy of Science. 4ª Edição 1996.

3.11 IUB. International Union of Biochemistry (IUB, Biochemical Nomenclature and Related documents, 1978, The Biochemical Society).

3.12 IUPAC. Nomenclature of Inorganic Chemistry (Recommendations 1990), 1990, Blackwell Scientific Publications.) (IUPAC, Nomenclature of Organic Chemistry (Sections A, B, C, D, E, F, and H, 1979 Edition), 1979, Pergamon Press).

3.13 JAPÃO. Guidelines for Designation of Food Additives and for Revision of Standards for Use of Food Additives - Food Sanitation Law, Articles 6 and 7, Ministry of Health and Welfare, 1999.

3.14 JECFA, FAO/OMS. General Specifications for Enzyme Preparations Used in Food Processing (GUIDE TO SPECIFICATION - General notices, General analytical techniques, Identification tests, Test solutions and other reference materials).

3.15 NC-IUBMB. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

4. REQUISITOS MÍNIMOS

4.1 O emprego de enzimas e preparações enzimáticas na fabricação de um alimento está condicionado à sua necessidade tecnológica.

4.2 Para efeito de fiscalização, o importador ou fabricante deve dispor de documentos que comprovem o atendimento aos seguintes requisitos:

4.2.1 A empresa deve manter cadastro interno e controle da composição da enzima ou preparação enzimática, faixa de atividade enzimática e método analítico empregado para o seu controle.

4.2.2 Os tecidos animais utilizados na obtenção da enzima devem ser obtidos em estabelecimentos licenciados para esse fim e obtidos de acordo com as Boas Práticas de Fabricação.

4.2.3 As células vegetais e os meios de culturas para os microrganismos não devem ceder contaminantes ao produto acabado em níveis que possam torná-lo nocivo à saúde.

4.2.4 As enzimas de origem microbiana devem ser obtidas por métodos e condições que garantam a fermentação controlada e impeçam a introdução de microrganismos capazes de originar substâncias tóxicas ou indesejáveis.

4.2.5 As enzimas produzidas por microrganismos geneticamente modificados devem ser purificadas, sem formas viáveis dos organismos que as produziram e, ainda, sem traços de material genético (ácidos nucleicos).

4.2.6 Todos os processos que se realizarem no Brasil (pesquisa, produção, purificação e descarte dos subprodutos dos microrganismos geneticamente modificados) que antecederem a obtenção do produto final estão sujeitos às normas legais preconizadas na Lei nº. 11.105/05.

4.2.7 As enzimas devem obedecer aos requisitos de identidade e pureza e às demais especificações, sendo reconhecidas como referências:

JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

FCC - Food Chemicals Codex

FDA - Food and Drug Administration

IUB - International Union of Biochemistry

4.2.8 Não devem ser utilizados microrganismos patogênicos na produção de enzimas e preparações enzimáticas.

4.2.9 As enzimas e preparações enzimáticas não devem contribuir para aumentar a contagem microbiana total do alimento tratado, e não podem exceder o limite de contaminação microbiana fixado para o mesmo alimento. Caso a enzima ou preparação enzimática seja destinada à fabricação de mais de um alimento, deve ser atendido o padrão microbiológico mais restritivo.

5. FORMAS DE APRESENTAÇÃO

As enzimas e as preparações enzimáticas podem ser apresentadas sob forma sólida, pastosa ou líquida.

6. SUBSTÂNCIAS PERMITIDAS NA ELABORAÇÃO DE ENZIMAS E PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

Os veículos - diluentes e solventes - autorizados na elaboração de enzimas e preparações enzimáticas constam do Anexo II da presente Resolução. Ingredientes permitidos para os alimentos aos quais se destinam as enzimas e preparações enzimáticas podem ser também utilizados como veículos.

7. ADITIVOS

As enzimas e preparações enzimáticas poderão ser adicionadas de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia permitidos para os alimentos aos quais se destinam, constantes em Regulamentos Técnicos específicos.

8. CONTAMINANTES

As enzimas e preparações enzimáticas devem atender aos Regulamentos Técnicos específicos de contaminantes.

9. HIGIENE

As enzimas e preparações enzimáticas devem atender aos Regulamentos Técnicos específicos de higiene, características macroscópicas e microscópicas, quando houver, e outras legislações pertinentes.

10 ROTULAGEM

A rotulagem de enzimas e preparações enzimáticas deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações:

- Denominação da enzima (de acordo com o item 2.3)
- Lista de ingredientes
- Conteúdos líquidos
- Identificação da origem
- Nome ou razão social e endereço do fabricante ou do importador
- Identificação do lote
- Prazo de validade
- Instruções sobre preparo e uso, quando necessário
- A(s) finalidade(s) da enzima ou da preparação enzimática
- No caso de preparações enzimáticas, as enzimas da sua composição

11. DISPOSIÇÕES GERAIS

11.1 Cabe à empresa responsável pelo produto, comunicar imediatamente à ANVISA qualquer informação adicional que implique a reavaliação de risco e segurança de uso do produto, bem como em mudanças taxonômicas das enzimas e ou microrganismos.

11.2 Quando uma enzima não estiver contemplada no Anexo I deste Regulamento Técnico, o interessado (importador ou fabricante) deverá proceder ao pedido de sua inclusão. Para tal, será necessário apresentar documentação à ANVISA que comprove o atendimento a todos os critérios estabelecidos no presente Regulamento.

ANEXO I

ENZIMAS PERMITIDAS PARA USO EM ALIMENTOS DESTINADOS AO CONSUMO HUMANO, CONFORME A SUA ORIGEM

ENZIMAS DE ORIGEM ANIMAL

Nome da Enzima ou Complexo	Fonte(s)
Alfa-amilase	Pâncreas de suíno e bovino
Catalase	Fígado de cavalo ou bovino
Quimosina	Abomaso de bezerro e caprino
Lactoperoxidase	Leite bovino
Lipase	Abomaso e glândula salivar de bovino, suíno, caprino e ovino
	Estômago bovino
	Pâncreas de suíno e bovino
Lisozima	Clara de ovo
Pepsina bovina	Abomaso (4a parte do estômago)
Pepsina suína	Mucosa vermelha (como mucosa gástrica)
Pepsina ave	proventricum de frango
Fosfolipase A2	Pâncreas de suínos
Pancreatina	Pâncreas de suíno e bovino
Proteases - coalho complexo	Abomaso de ruminantes
Tripsina (ou quimotripsina)	Pâncreas de suíno e bovino

ENZIMAS DE ORIGEM VEGETAL

Nome da Enzima ou Complexo	Fonte(s)
Alfa-amilase	Malte, cereais e leguminosas maltadas
Beta-amilase	Malte, cereais e leguminosas maltadas
	Batata doce (Ipomoea batatas)
Bromelina	Caule, folhas e frutos da família Bromeliaceae (Ananas sativus e Ananas comosus)
Coagulase vegetal	Cardo Cynara cardunculus
	Figo Ficus carica
Ficina	Caules, folhas e frutos da família Ficus (Ficus glabrata e Ficus carica)
Lipoxigenase	Farinha de soja
Papaína	Caule, folhas e frutos de plantas da família Carica (Carica papaya e Ananas bracteatus)
Peroxidase	Raiz forte, farinha de soja, farinha de trigo

ENZIMAS DE ORIGEM MICROBIANA

Nome da Enzima ou Complexo	Fonte(s)
Alfa-acetolactato decarboxilase	Bacillus brevis expresso em Bacillus subtilis
Alfa-amilase	Aspergillus niger
	Aspergillus oryzae
	Bacillus licheniformis
	Bacillus licheniformis expresso em Bacillus licheniformis
	Bacillus licheniformis e Bacillus amyloliquefaciens expresso em Bacillus licheniformis
	Bacillus megaterium expresso em
	Bacillus subtilis
	Bacillus stearothermophilus
	Bacillus stearothermophilus expresso em Bacillus licheniformis
	Bacillus stearothermophilus expresso em Bacillus subtilis
	Bacillus subtilis
	Pseudomonas fluorescens
	Rhizopus delemar
	Rhizopus oryzae
Alfa-galactosidase	Aspergillus niger
	Mortierella vinacea

Amilase maltogênica Amiloglucosidase ou glucoamilas	Saccharomyces carlsbergensis
	Bacillus stearothermophilus expresso em Bacillus subtilis
	Aspergillus awamori
	Aspergillus niger
	Aspergillus niger
	Aspergillus oryzae
	Rhizopus arrhizus
	Rhizopus delemar
	Rhizopus niveus
	Rhizopus oryzae
	Trichoderma reesei
	Lactococcus lactis
Aminopeptidase leucina	Aspergillus niger
Arabinofuranosidase	Bacillus cereus
Beta-amilase	Bacillus megaterium
	Bacillus subtilis
Beta-glucanase	Aspergillus aculeatus
	Aspergillus niger
	Bacillus subtilis
	Disporotrichum dimorphosporum
	Humicola insolens
	Penicillium emersonii
	Talaromyces emersonii
	Trichoderma harzianum
	Trichoderma longibrachiatum
	Trichoderma reesei
Beta-glucosidase (ou celobiose)	Aspergillus niger
	Trichoderma harzianum
	Trichoderma reesei
Catalase	Aspergillus niger
Celulase	Micrococcus lysodeicticus
	Aspergillus niger
	Aspergillus oryzae
	Penicillium funiculosum
	Rhizopus delemar
	Rhizopus oryzae
	Sporotrichum dimorphosporum
	Thielavia terrestris
	Trichoderma longibrachiatum
	Trichoderma reesei
	Bacillus subtilis
Dextranase	Chaetomium erraticum
	Chaetomium gracile
	Klebsiella aerogenes
	Penicillium funiculosum
	Penicillium lilacinum
Esterase	Aspergillus niger
	Mucor miehei
	Trichoderma reesei
Fitase	Aspergillus niger
Fosfolipase A1	Fusarium venenatum expresso em Aspergillus oryzae
Fosfolipase A2	Streptomyces violaceoruber
Glucose isomerase (ou xilose isomerase)	Actinoplanes missourienses
	Bacillus coagulans
	Microbacterium arborensens
	Streptomyces albus
	Streptomyces murinus
	Streptomyces olivaceus

	Streptomyces olivochromogenes
	Streptomyces rubiginosus
	Streptomyces violaceoniger
Glucose-oxidase	Aspergillus niger
	Aspergillus niger expresso em Aspergillus niger
	Aspergillus niger expresso em Aspergillus oryzae
	Penicillium amagasakiense
Hemicelulase	Aspergillus niger
	Aspergillus oryzae
	Bacillus subtilis
	Rhizopus delemar
	Rhizopus oryzae
	Sporotrichum dimorphosporum
	Trichoderma reesei
Hexose oxidase	Chondrus crispus expresso em Hansenula polymorpha
Inulinase	Aspergillus niger
	Kluyveromyces fragilis
	Sporotrichum dimorphosporum
Invertase (ou beta-frutofuranosidase)	Aspergillus niger
	Bacillus subtilis
	Kluyveromyces fragilis
	Saccharomyces carlsbergensis
	Saccharomyces cerevisiae
Lacase	Myceliophthora thermophila expresso em Aspergillus oryzae
Lactase (ou beta-galactosidase)	Aspergillus niger
	Aspergillus oryzae
	Candida pseudotropicalis
	Kluyveromyces fragilis
	Kluyveromyces lactis
	Kluyveromyces marxianus
	Saccharomyces sp
Lipase	Aspergillus niger
	Aspergillus oryzae
	Brevibacterium lineus
	Candida antarctica expresso em Aspergillus niger
	Candida lipolytica
	Candida rugosa
	Fusarium oxysporum expresso em Aspergillus oryzae
	Humicola lanuginosa expresso em Aspergillus oryzae
	Mucor javanicus
	Mucor pusillus
	Penicillium camembertii
	Rhizomucor miehei
	Rhizopus arrhizus
	Rhizopus delemar
	Rhizopus nigrican
	Rhizopus niveus
	Thermomyces lanuginosus expresso em Aspergillus oryzae
	Thermomyces lanuginosus e
	Fusarium oxysporum expresso em Aspergillus oryzae
Maltase (ou alfa-glucosidase)	Aspergillus niger
	Aspergillus oryzae
	Rhizopus oryzae
	Trichoderma reesei
Nitrato redutase	Micrococcus violagabriella
Pectina esterase	Aspergillus niger
Pectinaliase	Aspergillus niger
	Aspergillus niger expresso em Trichoderma reesei

Pectinase	<i>Aspergillus awamori</i> <i>Aspergillus foetidus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Penicillium simplicissimum</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Trichoderma reesei</i>
Poligalacturonase	<i>Aspergillus niger</i>
Protease	<i>Aspergillus melleus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Endothia parasitica</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Micrococcus caseolyticus</i> <i>Mucor pusillus</i> <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Rhizomucor miehei</i> expresso em <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Streptomyces fradiae</i>
Pululanase	<i>Bacillus acidopullulyticus</i> <i>Bacillus deramificans</i> expresso em <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus naganoensis</i> expresso em <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Quimosina	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i> <i>Escherichia coli</i> K-12 contendo gene de Proquimosina A <i>Kluyveromyces lactis</i> contendo gene de Proquimosina B
Renina	<i>Bacillus cereus</i> <i>Endothia parasitica</i> <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Rhizomucor pusillus</i>
Tanase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>
Transglutaminase	<i>Streptovercillium mobaraense</i> <i>Streptomyces mobaraense</i>
Xilanase	<i>Aspergillus niger</i> <i>Bacillus subtilis</i> expresso em <i>Bacillus subtilis</i> <i>Humicola insolens</i> <i>Sporotrichum dimorphosporum</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i> expresso em <i>Fusarium venenatum</i> <i>Trichoderma reesei</i>

ANEXO II

LISTA DE VEÍCULOS PERMITIDOS PARA ELABORAÇÃO DE ENZIMAS E PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS

- Água
- Amido
- Amido modificado
- Carbonato de cálcio
- Caseinato de sódio
- Cloreto de sódio
- Dextrinas
- Dextrose
- Farinha de cereais
- Farinha de leguminosas
- Fécula de mandioca
- Fibra vegetal
- Gelatina
- Glucose
- Glúten
- Hidrolisado de Caseína
- Lactose
- Maltodextrina
- Óleos Vegetais
- Proteína hidrolisada de leguminosas
- Proteína isolada de leguminosas
- Proteínas lácteas
- Sacarose
- Soro de leite em pó