

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS**

**EFEITO DO ULTRA-SOM NA ATIVIDADE DE
ENZIMAS AMIOLÍTICAS E SOBRE A EFICIÊNCIA
DE HIDRÓLISE DE AMIDO DE MANDIOCA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Eloísa Xavier Leães

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

PPGEP_{Pro}/UFSM, RS

LEÃES, Eloisa Xavier

Mestre

2012

**EFEITO DO ULTRA-SOM NA ATIVIDADE DE
ENZIMAS AMIOLÍTICAS E SOBRE A EFICIÊNCIA
DE HIDRÓLISE DE AMIDO DE MANDIOCA**

por

Eloisa Xavier Leães

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Agroindustriais e Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Engenharia de Processos**

Orientadora: Prof^a. Lisiane de Marsillac Terra, Dr^a.

Co-Orientador: Prof. Marcio Antonio Mazutti, Dr.

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DO ULTRA-SOM NA ATIVIDADE DE ENZIMAS
AMIOLÍTICAS E SOBRE A EFICIÊNCIA DE HIDRÓLISE DE AMIDO
DE MANDIOCA**

elaborada por
Eloisa Xavier Leães

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia de Processos

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Lisiane de Marsillac Terra, Prof^a. Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)**

Marcio Antonio Mazutti, Prof. Dr. (UFSM)

Paula Rossini Augusti, Prof^a. Dr^a. (UNIPAMPA)

Sérgio Luiz Jahn, Prof. Dr. (UFSM)

Santa Maria, 27 de março de 2012.

*Este trabalho é dedicado aos meus filhos Vinícius e Victor e
aos meus pais Dary e Maria Edith*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela inspiração e por olhar para todos nós como seus filhos.

Aos meus pais por todo amor, dedicação e apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus filhos pela paciência, amor e compreensão, por todas as vezes que não pude dar atenção que eles precisavam.

Aos professores Lisiane de Marsillac Terra e Marcio Antônio Mazutti pelas orientações, pela compreensão e incentivo, fundamentais para realização deste trabalho.

Aos secretários Ivanise Mariano Xavier e Leonardo Brondani pelas informações, pelo cafezinho e pela amizade.

As alunas da iniciação científica Luiza Miklasevicius, Adriana Ramon e Dirléia Lima que me ajudaram na realização dos experimentos.

A CAPES pela bolsa de estudos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DO ULTRA-SOM NA ATIVIDADE DE ENZIMAS AMILOLÍTICAS E SOBRE A EFICIÊNCIA DE HIDRÓLISE DE AMIDO DE MANDIOCA

AUTORA: ELOISA XAVIER LEÃES
ORIENTADORA: PROF. DRA. LISIANE DE MARSILLAC TERRA
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MARCIO ANTÔNIO MAZUTTI
Local e data de Defesa: Santa Maria, 27 de março de 2012.

A produção de etanol a partir de mandioca passa por duas fases, a hidrólise e a fermentação. A hidrólise do amido pode ser feita de forma ácida ou enzimática, sendo a última a que apresenta maiores vantagens. Na produção de hidrolisados de amido por conversão enzimática as enzimas representam um alto custo, portanto o estudo de novas tecnologias visando o aumento da eficiência das enzimas amilolíticas é de suma importância para redução de custos do processo. Este trabalho objetivou a avaliação da influência do ultra-som na hidrólise enzimática de mandioca *in natura* e a caracterização das enzimas α -amilase (Liquozyme® SC DS) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel) utilizadas nas reações. Foram determinadas a temperatura e pH ótimo, parâmetros cinéticos e termo-estabilidade das enzimas através de reações de hidrólise de amido solúvel comercial, com utilização de banho-maria e banho de ultra-som. Os resultados mostraram um pequeno aumento nas atividades das enzimas quando tratadas individualmente durante os experimentos com ultra-som em relação aos realizados somente com o banho-maria, nas mesmas condições de temperatura e pH, no tempo de 30 minutos. Já as reações de hidrólise da mandioca *in natura* com as duas enzimas simultaneamente, mostraram que o uso do ultra-som provocou um aumento significativo na liberação de açúcares redutores totais, de 24,64 a 64,48% maior em relação ao método convencional utilizado, nas condições de temperatura 55^oC, pH 5,5 e mesmas quantidades de substrato e enzimas. Desta forma o uso do ultra-som pode reduzir os custos de produção de etanol utilizando-se a mandioca como fonte de carboidratos, sendo uma tecnologia promissora a ser utilizada.

Palavras chave: Ultra-som; hidrólise enzimática; mandioca *in natura*

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduation Course in Processes Engineering
Federal University of Santa Maria

EFFECT OF ULTRASOUND IN AMYLOLYTIC ENZYMES ACTIVITY AND ON EFFICIENCY OF HYDROLYSIS OF CASSAVA STARCH

AUTHOR: ELOISA XAVIER LEÃES

ADVISOR: PROF. DR. LISIANE DE MARSILLAC TERRA

CO-ADVISOR: PROF. DR. MARCIO ANTONIO MAZUTTI

Place and data of Defense: Santa Maria, March, 27th of 2012.

Ethanol production from cassava undergoes two-stage hydrolysis and fermentation. The starch hydrolysis may be made of acidic or enzymatic way, the latter presents the greatest advantages. In the production of starch hydrolysates by enzymatic conversion enzymes represent a high cost, so the study of new technologies aimed at increasing the efficiency of amylolytic enzymes is of paramount importance to reduce process costs. This study aimed to evaluate the influence of ultrasound on enzymatic hydrolysis of cassava fresh and characterization of the enzymes α -amylase (Liquozyme® SC DS) and glucoamylase (Spirizyme® Fuel) used in the reactions. We determined the temperature and optimum pH, kinetic parameters and thermal stability of enzymes by the hydrolysis of soluble starch, using a water bath and ultrasonic bath. Results showed a small increase in enzyme activities when treated individually during the experiments with ultrasound compared to those made only with the bath under the same conditions of temperature and pH at the time of 30 minutes. The hydrolysis reactions of fresh cassava with both enzymes simultaneously, showed that the use of ultrasound caused a significant increase in the release of total reducing sugars, 24.64 to 64.48% higher compared to the conventional method used in the temperature conditons of 55°C, pH 5.5, and equal amounts of substrate and enzymes. This way the use of ultrasound may reduce the cost of ethanol production using cassava as a carbohydrate source, and a promising technology to be used.

Keywords: Ultrasound; enzymatic hydrolysis; fresh cassava

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura da amilose	32
Figura 2 Estrutura da amilopectina	33
Figura 3 Incubadora Tecnal TE-420	43
Figura 4 Lavadora Ultra-sonica Unique	43
Figura 5: Gráfico de Pareto dos efeitos da temperatura e pH na atividade enzima α -amilase.....	53
Figura 6: Gráfico de Pareto dos efeitos da temperatura e pH sobre a atividade enzimática da α -amilase na hidrólise do amido no banho-maria.....	55
Figura 7: Gráfico de Pareto dos efeitos da temperatura e pH sobre a atividade enzimática da α -amilase na hidrólise do amido em banho de ultra-som.....	55
Figura 8: Gráfico comparativo da atividade da enzima α -amilase na hidrólise de amido solúvel, em temperaturas de 30 a 90 °C, em solução de pH 5,55, no banho-maria e no banho de ultra-som	58
Figura 9: Gráfico de Arrhenius para a enzima α -amilase	58
Figura 10: Gráfico comparativo da atividade da enzima α -amilase na hidrólise de amido solúvel, em concentrações de 5 a 30 g/L, em solução de pH 5,55 e temperatura de 65°C no banho-maria (BM) e banho de ultra-som (US)	60
Figura 11: Gráfico comparativo da atividade da α -amilase em função do tempo de reação de hidrólise do amido, no pH de 5,55 e temperatura de 65°C no banho-maria e banho de ultra-som	61
Figura 12: Gráfico de Pareto dos efeitos da temperatura e pH sobre a atividade enzimática da glicoamilase na hidrólise do amido em banho-maria.....	63
Figura 13: Gráfico de Pareto dos efeitos da temperatura e pH sobre a atividade enzimática da glicoamilase na hidrólise do amido em banho de ultra-som.....	64
Figura 14: Gráfico comparativo da atividade da enzima glicoamilase na hidrólise de amido solúvel, em temperaturas de 30 a 90 °C, em solução de pH 5,5, no banho-maria e banho de ultra-som	65
Figura 15: Gráfico de Arrhenius para a enzima glicoamilase	66
Figura 16: Cinética da hidrólise da mandioca <i>in natura</i> determinada na incubadora Tecnal TE 420	68
Figura 17: Cinética da hidrólise da mandioca <i>in natura</i> determinada no banho de ultra-som com freqüência de 40 KHz e potência 132 W	69

Figura 18: Gráfico de Pareto dos efeitos da razão massa de mandioca/diluyente, concentração da glicoamilase e concentração da α -amilase sobre a liberação de ART durante a hidrólise da mandioca *in natura* na Incubadora Tecnal..... 71

Figura 19: Gráfico de Pareto dos efeitos da razão massa de mandioca/diluyente, concentração da glicoamilase e concentração da α -amilase sobre a liberação de ART durante a hidrólise da mandioca *in natura* no banho de ultra-som 73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 pH, temperatura ótima e temperatura de inativação de alguns tipos de α -amilases de diferentes fontes	29
Quadro 2 Características dos diferentes tipos de amilases sobre o amido	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Primeiro planejamento de experimentos para enzima α -amilase	46
Tabela 2 Segundo planejamento de experimentos para enzima α -amilase	46
Tabela 3 Planejamento de experimentos para enzima glicoamilase	49
Tabela 4 Planejamento de experimentos da hidrólise da mandioca	51
Tabela 5 Atividade da enzima α -amilase nas hidrólises de amido solúvel em banho-maria, em 30 minutos de reação, Volume total = 10 mL, Concentração solução = 10g amido/L, Volume enzima = 1mL	52
Tabela 6 Atividade da enzima α -amilase nas hidrólises de amido solúvel padrão em banho-maria e banho de ultra-som, em 30 minutos de reação, Volume total = 10 mL, Concentração solução = 10g amido/L, Volume enzima = 1mL	54
Tabela 7 Atividades da enzima α -amilase no banho-maria (BM) e banho de ultra-som (US), no pH 5,55, em temperaturas de 30 a 65°C, Volume total = 10 mL, Concentração solução = 10g amido/L, Volume enzima = 1mL	57
Tabela 8 Atividades da enzima α -amilase no banho-maria (BM) e banho de ultra-som (US), no pH 5,55, temperatura 65°C, tempo 30 minutos, em concentrações diferentes de amido, Volume total = 10 mL, Volume enzima = 1mL	59
Tabela 9 Atividades da enzima α -amilase no banho-maria (BM) e banho de ultra-som (US), no pH 5,55 e temperatura de 65°C em diferentes tempos de reação, Volume total = 10 mL, Concentração solução = 10g amido/L, Volume enzima = 1mL.....	61
Tabela 10 Atividade da enzima glicoamilase nas hidrólises de amido solúvel em banho-maria e banho de ultra-som, em 30 minutos de reação, Volume total = 10 mL, Concentração solução = 10g amido/L, Volume enzima = 1mL	62
Tabela 11 da enzima glicoamilase no banho-maria (BM) e banho de ultra-som (US), no pH 5,5, em temperaturas de 30 a 65°C, Volume total = 10 mL, Concentração solução = 10g amido/L, Volume enzima = 1mL.....	65
Tabela 12 Resultados das análises centesimais da mandioca moída <i>in natura</i>	67
Tabela 13 Matriz dos resultados experimentais expressos em termos da concentração de ART obtidos no DCCR para a hidrólise da mandioca na incubadora TECNAL TE 420, na temperatura de 55°C, agitação 120 RPM, pH 5,5, tempo 8 horas	70
Tabela 14 Matriz dos resultados experimentais expressos em termos da concentração de ART obtidos no DCCR para a hidrólise da mandioca no banho de ultra-som, na temperatura de 55°C, pH 5,5, tempo 8 horas	72

SIMBOLOGIA

ART Açúcares redutores Totais
BG β -glicosidases
BM banho-maria
BPC Bioprocesso Consolidado
CBH Celobio-hidrolase
CTBE Laboratório Nacional e Centro de Tecnologia do Bioetanol
CTC Centro de Tecnologia Canavieira
DCCR Delineamento Composto Central Rotacional
DNA *Deoxyribonucleic acid* - Ácido desoxirribonucléico
DNS Ácido 3,5 dinitrosalicílico
EC *Enzyme Commission*
EnG Endoglucanases
ExG Exoglucanases
FEM Fórum Econômico Mundial
FINEP Financiadora de Estudos e Projetos
GEE Gases do efeito estufa
GH Glucano-hidrolase
GP Graus de polimerização
T Temperatura
US Ultra-som

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
2.2.1 Efeito do ultra-som sobre a atividade das enzimas α -amilase (Liquozyme® SC DS) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel)	18
2.2.2 Efeito do ultra-som na eficiência da hidrólise enzimática de mandioca in natura com as enzimas α -amilase (Liquozyme® SC DS) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel)	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Mercado de enzimas para bioetanol	19
3.2 Alternativas para o aumento da oferta de bioetanol.....	20
3.2.1 Hidrólise enzimática do amido	21
3.2.2 Produção de etanol de Segunda Geração.....	22
3.3 Enzimas Amilolíticas:	25
3.4 Atividade Enzimática	31
3.5 Hidrólise de material amiláceo	32
3.5.1 Mandioca	35
3.6 Efeitos do ultra-som na atividade enzimática	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Materiais:.....	40
4.1.1 Amido:	40
4.1.2 Enzimas:	40
4.2 Equipamentos	42
4.3 Métodos Analíticos.....	43
4.3.1 Determinação do teor de amido.....	43
4.3.2 Determinação de açúcares redutores totais (ART).....	44
4.3.3 Determinação da temperatura e pH ótimos para a enzima α -amilase (Liquozyme® SC DS) com solução de amido padrão.....	45

4.3.4	Determinação da atividade enzimática da α -amilase (Liquozyme® SC DS), no pH ótimo, em diferentes temperaturas, com solução de amido padrão .46	46
4.3.5	Determinação da atividade enzimática da α -amilase (Liquozyme® SC DS), no pH e temperatura ótimos, com diferentes concentrações da solução de amido padrão.....47	47
4.3.6	Determinação da cinética da reação de hidrólise de amido solúvel padrão com enzima α -amilase (Liquozyme® SC DS).....47	47
4.3.7	Determinação da temperatura e pH ótimos para a enzima glicoamilase (Spirizyme® Fuel) com solução de amido padrão48	48
4.3.8	Determinação da atividade enzimática da glicoamilase (Spirizyme® Fuel), no pH ótimo, em diferentes temperaturas, com solução de amido padrão 49	49
4.3.9	Hidrólise da mandioca moída <i>in natura</i> com as enzimas α -amilase (Liquozyme® SC DS) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel)49	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO:52	52
5.1	Temperatura e pH ótimos para a enzima α -amilase (Liquozyme® SC DS) .52	52
5.2	Resultados comparativos da atividade da enzima α -amilase, no banho-maria e no banho de ultra-som53	53
5.3	Resultados da atividade da enzima α -amilase na hidrólise de solução de 10 g de amido solúvel /L de solução no pH 5,55, em diferentes temperaturas.....56	56
5.4	Resultados da atividade da enzima α -amilase na hidrólise de solução de 5, 10, 20, 25 e 30 g de amido solúvel /L de solução no pH 5,55 e temperatura constante, no banho-maria e banho de ultra-som.....59	59
5.5	Resultados da atividade da enzima α -amilase na hidrólise de solução de 10 g de amido solúvel /L de solução no pH 5,55 e temperatura 65°C, no banho-maria e banho de ultra-som, com diferentes tempos de reação60	60
5.6	Temperatura e pH ótimos para a enzima glicoamilase (Spirizyme® Fuel)...62	62
5.7	Resultados da atividade da enzima glicoamilase na hidrólise de solução de 10 g de amido solúvel /L de solução no pH 5,5, em diferentes temperaturas.....64	64
5.8	Composição centesimal da massa de mandioca moída <i>in natura</i>66	66
5.9	Determinação do tempo de hidrólise da mandioca moída <i>in natura</i> , com as enzimas α -amilase (Liquozyme SC DS) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel)67	67
5.10	Hidrólise da mandioca moída <i>in natura</i> , com as enzimas α -amilase (Liquozyme SC DS) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel)69	69
6.	CONCLUSÕES.....74	74
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS76	76

1. INTRODUÇÃO:

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de etanol de primeira geração, utilizando o caldo da cana-de-açúcar como matéria-prima. Foi a partir de 1975, com a implantação do Pró-Álcool, que esse etanol passou a substituir grande parte da demanda por gasolina. Avanços tecnológicos no mercado automobilístico levaram à produção de carros dedicados ao uso exclusivo de etanol e mais recentemente, em 2003, à produção de veículos “Flex” por tecnologia desenvolvida no Brasil, que podem utilizar tanto o etanol como a gasolina como combustível (VEIGA FILHO e RAMOS, 2006).

Devido a condições climáticas favoráveis, o Brasil tem grande capacidade de expansão da produção do etanol. Porém, para conseguir suprir a demanda mundial, é necessário que ocorra o aumento na eficiência de produção nas áreas já utilizadas para a canavicultura. Além de programas para melhoramento da cana-de-açúcar, procuram-se alternativas às tradicionais rotas de produção do etanol a partir de cana-de-açúcar e milho. Com o avanço da biotecnologia, têm sido criadas novas formas de produção do etanol, como a partir de material lignocelulósico presente nas plantas – o etanol de segunda geração. A biomassa vegetal foi reconhecida como a mais abundante matéria-prima para produção de energia renovável. A utilização desta matéria-prima, de baixo valor econômico, oferece grande oportunidade para reduções nos custos de produção. Entretanto, ainda há desafios para liberar os açúcares presentes no material lignocelulósico devido à sua constituição (SOUTO e QUIRINO, 2010).

Uma alternativa à substituição da cana-de-açúcar é o uso de xaropes obtido a partir da hidrólise de amido. O emprego do amido para produção de álcool pode levar ao desenvolvimento agroindustrial das regiões Norte e Nordeste, que são as maiores produtoras de mandioca (*Manihot spp.*) do Brasil, e para todas as regiões brasileiras que têm tradição no cultivo de milho (*Zea mays*) e arroz (*Oriza sativa*) e outros amiláceos (FERREIRA, 2005, 2006; LEONEL; CEREDA, 2000; MENEZES,

1980). Essas matérias-primas, contudo, não são diretamente fermentáveis, necessitando de uma hidrólise prévia de suas cadeias.

A mandioca apresenta uma série de vantagens em relação a outros cultivos: fácil propagação, elevada tolerância a estiagens, rendimentos satisfatórios, mesmo em solos de baixa fertilidade, pouca exigência em insumos modernos, potencial resistência ou tolerância a pragas e doenças, elevado teor de amido nas raízes, boas perspectivas de mecanização do plantio à colheita, sem grandes perdas de massa seca (CEREDA et. al., 2003).

A composição de mandioca aponta para uma matéria-prima rica em amido, com menores teores de outros componentes (proteína e lipídios) que a batata. Os hidrolisados, pelas suas propriedades específicas e seus diferentes usos nos setores alimentícios, constituem uma excelente valorização da fécula (CEREDA et. al., 2003).

A obtenção de xaropes por via enzimática requer o controle de uma ou mais reações enzimáticas e a integração industrial da etapa enzimática com o restante do processo. Como são disponíveis no mercado muitas enzimas comerciais, a seleção das enzimas específicas, a escolha do substrato e as determinações das condições operacionais são primordiais (SURMELY et. al., 2003).

O processo enzimático permite a fabricação de uma ampla gama de hidrolisados com a mesma linha de equipamentos. Entretanto, a produção de cada tipo de hidrolisado requer ajustes de parâmetros e condições experimentais específicas. Os produtos de conversão enzimática do amido vão da glicose a dextrinas de peso molecular elevado (SURMELY et. al., 2003).

Na produção de hidrolisados de amido por conversão enzimática, as enzimas representam um alto custo, portanto o estudo de novas tecnologias visando o aumento da eficiência das enzimas amilolíticas é de suma importância.

A influência de ondas ultra-sônicas na atividade e estabilidade de enzimas tem demonstrado ser específica para cada enzima e dependente dos parâmetros de sonicação (BARTON et. al., 1996; SAKAKIBARA et. al., 1996; ÖZBEK & ULGEN, 2000). A aplicação de ultra-som em enzimas pode produzir um efeito positivo na

atividade enzimática, embora ultra-som de alta intensidade possa causar desnaturação das mesmas (MASON et. al., 2000).

Os efeitos físicos do uso de ultra-som que devem ser considerados em processos biotecnológicos são o aumento da temperatura, a transferência de massa, a cavitação estável e a transitória. A cavitação deve ser considerada como um tópico complexo e a questão de como a cavitação leva a alta energia química é de primordial importância para se obter o máximo proveito de sua aplicação (LEPOINT e MULLIE, 1994).

A cavitação transitória é indesejável em processos biotecnológicos, uma vez que causam um aumento da temperatura e pressão que certamente desintegraria as células ou desnaturaria as enzimas, porém, a cavitação estável, na qual bolhas oscilam de um modo regular induzindo ao seu redor uma microcorrenteza que afeta algumas partículas diminuindo o estresse, deve ser analisados visando sua aplicação em bioquímica e biotecnologia (SINISTERRA, 1992).

Neste trabalho, objetivou-se o uso de novas tecnologias tais como o ultra-som visando aumentar a atividade das enzimas amilolíticas: α -amilase e glicoamilase. Na primeira etapa do trabalho foi avaliado o efeito da radiação de ultra-som na atividade de ambas as enzimas, enquanto na segunda etapa foi avaliada a hidrólise enzimática de mandioca in natura em reator de ultra-som.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Efeito do ultra-som sobre a eficiência da hidrólise enzimática de amido de mandioca, com as enzimas α -amilase e glicoamilase .

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Efeito do ultra-som sobre a atividade das enzimas α -amilase (Liquozyme® SC DS) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel), determinando:

- Temperatura e pH ótimo das enzimas na hidrólise de amido solúvel, na presença e ausência de radiação de ultra-som;
- Energia de ativação das enzimas na hidrólise de amido solúvel, na presença e ausência de radiação de ultra-som.

2.2.2 Efeito do ultra-som na eficiência da hidrólise enzimática de mandioca in natura com as enzimas α -amilase (Liquozyme® SC DS) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel), determinando:

- Parâmetros cinéticos: análise do tempo final de reação de hidrólise enzimática do amido de mandioca, na presença e ausência de ultra-som.
- Liberação de açúcares redutores totais (ART) na reação de hidrólise enzimática do amido de mandioca, na presença e ausência de ultra-som.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mercado de enzimas para bioetanol

A importância da sustentabilidade nas atividades produtivas tem sido amplamente reconhecida havendo a necessidade da substituição de processos químicos baseados em insumos não renováveis por processos químicos ou bioquímicos que utilizem insumos renováveis. Reconhece-se também a necessidade da substituição das múltiplas etapas de processos químicos por processos biotecnológicos mais eficientes e menos impactantes ao meio ambiente. Este contexto favorece a utilização de matérias primas renováveis por tecnologias de biotransformação e biocatálise. Estas tecnologias já estão sendo utilizadas por indústrias, existindo um interesse muito grande no desenvolvimento de novos processos; a sua implementação resulta em produtos de maior qualidade, obtidos por processos de menor consumo energético e de menor impacto ambiental (POLITZER, et. al., 2005).

Em decorrência destas necessidades e tendências, prevê-se um aumento significativo do consumo de enzimas a nível internacional. Este cenário é particularmente importante para o Brasil, país que necessita inserir-se de forma representativa como usuário de Tecnologia Enzimática, que concilia desenvolvimento tecnológico com a utilização de matérias primas renováveis e a preservação ambiental. Somos conscientes de que o meio ambiente brasileiro representa um ativo de valor incalculável e contribui decisivamente para a representatividade brasileira no cenário internacional (POLITZER, et. al., 2005).

O mercado brasileiro de enzimas, embora ainda pouco representativo (cerca de 2% do total mundial), revela grande potencial, devido à enorme geração de resíduos agroindustriais e ao dinamismo das indústrias de alimentos, medicamentos, tecidos e celulose/papel. A redução do custo de produção de enzimas é favorecida, no país, pela possibilidade de bioconversão de subprodutos agrícolas como farelo

de trigo, farelo de algodão, casca de soja e outros. Acredita-se, por isso, em um aumento rápido do uso de enzimas, de forma geral, e em particular em processos industriais. No país, em 2005, as importações de enzimas chegaram a US\$ 31 milhões e as exportações a US\$ 3 milhões. As mais importadas foram amilases (US\$ 4 milhões), seguidas de proteases (US\$ 2,5 milhões) (MUSSATTO et. al., 2007).

O Brasil atualmente se defronta com a perspectiva de um significativo aumento na demanda por etanol combustível, devido ao aumento do consumo interno de álcool hidratado com o sucesso dos veículos “flexi-fuel”, a expansão das exportações brasileiras de etanol em função do crescente interesse mundial pela mistura deste à gasolina, como forma de diminuir as emissões de gases de efeito estufa (GEE); e as oscilações no preço do barril de petróleo, fonte não renovável de energia.

No contexto mundial, Estados Unidos e Brasil são os dois maiores produtores de bioetanol. Juntos produzem cerca de 85% de todo o etanol obtido por via fermentativa, em termos globais. Os Estados Unidos é o principal fabricante, com produção de cerca de 48 bilhões de litros no ano de 2010, utilizando o milho como matéria-prima. No Brasil, o etanol, cuja produção próxima de 30 bilhões de litros em 2010, é obtida a partir de cana-de-açúcar, num processo que é o mais barato e de melhor balanço energético no mundo (COLLARES, 2010).

3.2 Alternativas para o aumento da oferta de bioetanol

O etanol voltou a ocupar um lugar de destaque no cenário energético do país e do mundo. No caso brasileiro, o álcool renasceu com o surgimento dos carros bicomcombustíveis, além das várias manifestações de governos e empresas, que mostraram o potencial de mercado e da tecnologia de produção de etanol

(OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2006). Um dos desafios do Brasil é aumentar a oferta de álcool combustível e buscar novas fontes e/ou métodos para produção de álcool.

3.2.1 Hidrólise enzimática do amido

Uma das maneiras de se aumentar a oferta de etanol no país seria a utilização de xaropes obtidos a partir da hidrólise do amido de mandioca, milho, arroz e outros amiláceos (FERREIRA, 2005, 2006; LEONEL; CEREDA, 2000; MENEZES, 1980).

A hidrólise do amido pode ser realizada por processos que utilizam ácidos, solventes orgânicos ou enzimas. Dentre estes, a rota enzimática tem sido amplamente estudada nos últimos anos devido a sua potencialidade em proporcionar maiores rendimentos (por ser realizada a pressão ambiente e temperaturas moderadas – entre 50° e 60° C) e não formar subprodutos indesejáveis. Porém, fatores como o alto custo das enzimas, a baixa produtividade e a dificuldade atual em se atingir os rendimentos esperados têm se mostrado importantes desafios científicos para tornar a produção de bioetanol de amido economicamente viável (CTBE, 2010).

A hidrólise enzimática apresenta vantagens sobre a ácida por ser seletiva, gastar pouca energia e não gerar produtos indesejáveis. As enzimas mais empregadas para este propósito são principalmente as α e β -amilases que são encontradas em diversas fontes, como cereais (cevada, milho, trigo, arroz, etc.) e micro-organismos (FOGARTY; KELLY, 1979; WISEMAN, 1987).

3.2.2 Produção de etanol de Segunda Geração

Outra alternativa para aumentar a oferta de etanol é ampliar a produtividade de litros de álcool por hectare-ano de cana plantada. Duas rotas tecnológicas nos possibilitariam atingir esse objetivo. Uma envolve a introdução de novas variedades de cana (transgênicas inclusive) enquanto a outra busca desenvolver tecnologias que aproveitem integralmente a biomassa da planta para produzir etanol. Essa última recebe o nome de etanol lignocelulósico ou de 2^a geração (CTBE, 2010). Para obtermos etanol lignocelulósico são necessários, basicamente, dois processos: a hidrólise dos polissacarídeos em açúcares e a fermentação destes em etanol. A fermentação é uma técnica bem conhecida e dominada, já a hidrólise possui uma série de gargalos que impedem sua reprodução em escala industrial.

O etanol de segunda geração é alvo de pesquisas do Projeto Bioetanol que envolve 16 universidades brasileiras, R\$ 4 milhões e é capitaneado pela Financiadora de Estudos e Projetos (Finep). A meta dos pesquisadores é tornar o Brasil ainda mais competitivo na produção de biocombustíveis com o uso da biomassa da cana, mas isso só será possível a partir da redução dos custos das celulases, importadas hoje por US\$ 4 a US\$ 8, o quilo (RAMOS, 2009).

Considerando que são necessários 11 kg de enzimas para processar uma tonelada de cana e gerar 50 litros de álcool, o preço para as usinas nacionais é o grande gargalo. O uso das enzimas ainda é uma promessa. Nem o Brasil, nem outros países, conseguiram reduzir seu custo (RAMOS, 2009).

A Bioenzima, uma das poucas indústrias nacionais cujo trabalho é direcionado à produção de álcool através da quebra de enzimas, está na disputa mundial pelo método que deverá impulsionar o setor energético, algo perseguido por diversos centros tecnológicos do planeta. O empreendimento já possui mecanismo patentado, que atraiu investidores e poderá ser aplicado, de forma precursora,

numa grande usina, na Colômbia, que produz álcool a partir do bagaço de cana-de-açúcar (VALENÇA, 2009).

Através de processos biotecnológicos, a empresa de Caruaru produz enzimas, obtidas por meio de micro-organismos – como fungos e bactérias – geneticamente modificados. As enzimas aceleram reações químicas. O material é usado em vários segmentos, entre eles, na degradação de biomassas (bagaço de cana, folhas e tronco de bananeira, sabugo do milho e palma) para a produção de etanol de segunda geração. Neste caso, o processo é realizado através da hidrólise da biomassa (que é a liberação de açúcares contidos nesse material) que, quando fermentados, produzem etanol (VALENÇA, 2009).

A Novozymes, líder em bioinovações, com 47 % do mercado global de enzimas, enxerga no Brasil uma importante oportunidade para o processo de transformação da empresa. O potencial brasileiro de produção do etanol de segunda geração, produzido a partir de celulose, deve ter grande contribuição para fazer das enzimas voltadas para a bioenergia a principal arma da empresa no futuro. O etanol de segunda geração é um dos maiores desafios da indústria de energia renovável (KIRIHATA, 2010).

De acordo com um relatório do Fórum Econômico Mundial (FEM) divulgado no mês de junho de 2010, a conversão de biomassa em combustíveis, energia e produtos químicos tem o potencial de contribuir com mais de US\$ 230 bilhões para a economia mundial até 2020, embora a comercialização do etanol celulósico ainda não é viável economicamente (KIRIHATA, 2010).

O processo industrial do etanol de segunda geração somente será viável se ele for suficientemente atrativo. Segundo dados do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), uma tecnologia comercialmente viável de transformação da biomassa de cana em etanol significaria um aumento inicial de 50% na produção atual deste biocombustível em relação aos padrões atuais de fermentação do caldo da planta. Em 2009/10, a produção de etanol no Brasil foi de 24 bilhões de litros (KIRIHATA, 2010).

No material lignocelulósico são três os principais tipos de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, que se encontram em associação por pontes de hidrogênio ou ligação covalentes. Tanto a celulose quanto a hemicelulose são considerados açúcares complexos. A celulose é formada por subunidades de D-glicose, unidas por ligação glicosídica. Nas plantas, a celulose aparece, em parte, organizada em estruturas cristalinas e em outras partes em estrutura amorfa. A hemicelulose é uma estrutura bem mais complexa que a celulose por ser constituída por diferentes tipos de pentoses, hexoses e açúcares ácidos unidos entre si. A hemicelulose serve como conexão entre a lignina e as fibras de celulose no complexo celulose-hemicelulose-lignina. Depois da celulose e da hemicelulose, a lignina é um dos polímeros mais abundantes na natureza. A lignina é um heteropolímero amorfo formado de três diferentes unidades de fenilpropano unidas por diferentes tipos de ligações e em diferentes proporções dependendo da fonte de lignina (AQUARONE et al,2001).

A bioprospecção de novas enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas visa a sua utilização na hidrólise da biomassa, para tornar a produção do etanol de segunda geração economicamente viável. A busca por enzimas mais eficientes para o processo de hidrólise da biomassa pode ser realizada por duas abordagens: 1) identificação de microrganismos produtores que serão diretamente utilizados no processo ou cujas enzimas produzidas serão utilizadas no processo e 2) identificação de enzimas a partir de DNA de microrganismos presentes em amostra ambiental (metagenoma) que podem ser provenientes de organismos não identificados (SOUTO e QUIRINO, 2010).

Com o intuito de bioprospectar enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas para o processo de produção do etanol de segunda geração, a Embrapa Agroenergia, em parceria com a Universidade Católica de Brasília e a Universidade de Brasília, têm investido na construção de bibliotecas metagenômicas de rúmen de caprinos e da microbiota do solo da Floresta Amazônica. Esses ambientes são abundantes em microrganismos que levam à degradação de material lignocelulósico, o que os torna ideais para realização deste tipo de estudo. As enzimas que apresentarem propriedades mais adequadas para utilização industrial serão purificadas,

caracterizadas e produzidas, gerando um produto de alta relevância econômica que irá ajudar a viabilizar o etanol lignocelulósico no Brasil (SOUTO e QUIRINO, 2010).

3.3 Enzimas Amilolíticas:

As enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido (amilo), que contém dois tipos de polissacarídeos: a amilose (15-20%) e a amilopectina (80-85%) (HARGER, 1982).

Gupta *et. al.* (2003) e Pandey *et. al.* (2005) citam que as amilases hidrolisam moléculas de amido liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose. Estas enzimas apresentam grande importância em biotecnologia com aplicações desde alimentos, fermentação, têxtil e indústrias de papel. Apesar das amilases poderem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, enzimas microbianas geralmente encontram grande demanda industrial. Atualmente grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido.

Conforme conceituadas por Reed (1975), as enzimas responsáveis pela degradação de amido estão amplamente distribuídas na natureza. Entre elas estão as amilases, que atuam sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos para hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4. As amilases podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases); as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glicoamilases (amiloglicosidases), as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato.

Outro conceito dado por Gupta *et. al.* (2003) mostra que as amilases são divididas em duas categorias, endoamilases e exoamilases. As endoamilases

catalisam as hidrólises de forma aleatória no interior da molécula de amido. Esta ação causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos. As exoamilases hidrolisam a partir das extremidades não-redutoras da cadeia resultando em produtos finais pequenos. Atualmente são conhecidas várias enzimas que hidrolisam a molécula de amido em diferentes produtos e a ação combinada de várias enzimas é necessária para a completa hidrólise do amido.

A amilose, um dos componentes do amido e fécula, é formada por unidades de D-glicose unidas linearmente por ligações α (1,4) (CONN & STUMPF, 1975). Segundo os autores, possui uma extremidade redutora e uma não-redutora. A α -amilase hidrolisa a cadeia linear da amilose, atacando ao acaso as ligações α (1,4) por toda a cadeia, produzindo uma mistura de maltose e glicose. A β -amilase ataca a extremidade não redutora da amilose, dando sucessivas unidades de maltose.

A amilopectina é um polissacarídeo ramificado; na sua molécula, cadeias mais curtas de glicose unidas por ligações α (1,4) são também unidas entre si por ligações α (1,6) (das quais se podem obter a isomaltose). A amilopectina também pode ser atacada por α -amilase e β -amilase, mas as ligações α (1,4) próximas das ramificações da amilopectina, e as ligações α (1,6) não são hidrolisadas por essas enzimas. Desse modo, um núcleo condensado e ramificado, obtido da amilopectina original – denominado dextrina limite – é o produto dessas enzimas. Uma outra enzima, a α -1,6 glucosidase irá hidrolisar a amilopectina até uma mistura de glicose e maltose (CONN & STUMPF, 1975).

A β -amilase (EC 3.2.1.2, α -1-4 glicano-maltohidralase) é uma exoenzima a qual tem uma ação rigidamente ordenada. Ela ataca a amilose e a amilopectina somente a partir de extremidades não redutoras e sequencialmente hidrolisa toda ligação α (1,4) posterior. Isso gera maltose (um dissacarídeo fermentescível) e uma nova molécula de amido com reduzido peso molecular (SANTANA, 2007).

Conforme Harger (1982), as β -amilases são obtidas a partir de grãos de gramíneas não germinadas (pois com a germinação surge a α -amilase, que obriga a separação em meio ácido). A raiz da batata doce (*Ipomoea batatas*) contém somente β -amilase. A β -amilase cristalina é obtida a partir de grãos de trigo, cevada, batata e das sementes da soja. Segundo Quaglia (1991), a principal fonte de β -amilase é o extrato de malte, que é proveniente da cevada ou do trigo germinados.

Da cevada maltada prepara-se a β -amilase separando-a da α -amilase por extração fracionada. A β -amilase tem pH ótimo entre 4 e 6 e temperatura ótima de 30 a 50°C.

A α -amilase (EC 3.2.1.1., α -1,4 glicano 4-glicanohidrolase) é uma endoenzima. Tal como a β -amilase, ela ataca somente ligações α (1,4), mas de forma aleatória (SANTANA, 2007). O ataque ocorre na forma não seletiva sobre vários pontos da cadeia simultaneamente, sendo que os primeiros produtos da hidrólise são sempre oligossacarídeos de 5 a 7 unidades de glicose. Isso representa um ataque preferencialmente sobre cada passo da hélice, da cadeia espiral da amilose ou da amilopectina (BRUCHMANN, 1980). Após a ação, liberam unidades de glicose, oligossacarídeos de diferentes pesos moleculares e dextrinas.

Pode atuar, isolada ou simultaneamente, com outras enzimas amilolíticas, apresentando importantes aplicações como na indústria de alimentos, bebidas e na obtenção de produtos têxteis e farmacêuticos. As α -amilases endógenas de sementes de cereais são utilizadas na indústria de panificação e cervejarias, enquanto as de origem microbiana são empregadas em processos onde é necessária a sacarificação e a liquefação do amido (SPIER, 2005).

A ação sinérgica da α -amilase e glicoamilase no processo de hidrólise vem sendo estudada por diversos pesquisadores em amidos de diferentes origens. Monma et al. (1989) apud Leonel e Cabelo (2003) estudaram a eficiência do uso destas duas enzimas em grânulos de amido de arroz, sagu e batata e concluíram que esta combinação apresenta bons rendimentos na conversão do amido à glicose em todos os substratos.

As pesquisas com as α -amilases bacterianas tem recebido grande atenção nos últimos anos devido à sua maior termoestabilidade, a liquefação do amido por aquelas enzimas tem se constituído na unidade operacional mais cara do processo de sacarificação, principalmente por serem produzidas por fermentação submersa (SOUZA et. al., 1996).

A massa molar da α -amilase varia de 10 a 210 KDa, dependendo da sua origem. As α -amilases microbianas apresentam peso molecular entre 50 e 60 KDa (GUPTA et. al., 2003), sendo que as α -amilases bacterianas apresentam variação de 28 a 78 KDa e as α -amilases fúngicas de 41 a 69 KDa (PANDEY et. al., 2005).

As ligações α (1,6) da amilopectina não são hidrolisadas pela amilase, sendo o produto final do ataque da amilopectina pela amilase moléculas de isomaltose.

Segundo Bruchmann (1980), teoricamente a ação da α -amilase sobre a amilose conduz a 87% de maltose e 13% de glicose; e sobre a amilopectina 73% de maltose, 8% de isomaltose e 19% de glicose. Em um sistema fechado, no entanto, não se alcançam esses valores já que a maltose formada inibe competitivamente a α -amilase. No entanto, nas destilarias, por exemplo, trabalha-se com um sistema aberto já que a maltose formada é hidrolisada a glicose pelas enzimas das leveduras, que depois é fermentada a etanol e dióxido de carbono. A partir das amiloglucosidases produzidas pelas leveduras se consegue uma hidrólise total do amido.

Os íons de cálcio atuam como cofatores das α -amilases, estabilizando-as, dentro de certos limites, contra a desnaturação pelo calor e álcalis. O cálcio não participa diretamente na formação do complexo enzima substrato, mas mantém a molécula da enzima na conformação ótima para a máxima atividade e estabilidade. Na verdade, traços de cálcio presentes no amido são geralmente suficientes para compensar enzimas sem adição de cálcio. Entretanto, a adição de sais de cálcio é recomendada para alcançar máxima proteção das enzimas contra desnaturação pelo calor (QUAGLIA, 1991).

De acordo com Spier (2005) o pH ótimo para a α -amilase fúngica está entre 5,0 e 6,0. Possui caráter ácido e é solúvel em água. Sua atividade diminui rapidamente acima de 50°C, mas na presença de um excesso de íons cálcio a desativação pode ser diminuída. Íons de metais pesados, como o mercúrio, a prata e o chumbo inibem a α -amilase.

A faixa ótima de temperatura para a atividade das α -amilases é de 55 a 70°C, que varia dependendo da fonte. A atividade aumenta consideravelmente de 0° a 40°C, sendo que as bacterianas apresentam maior estabilidade frente às temperaturas superiores a 40°C, com atividade ótima ao redor de 70°C (REED, 1975 apud SPIER, 2005).

O quadro 1 apresenta algumas diferenças entre α -amilases de diferentes fontes.

Origem	pH Ótimo	Temperatura Ótima (°C)	Temperatura de Inativação (°C)
Pancreática	6,9 (7,0-8,8)	46	55
Fúngica	5,0 (5,5-8,5)	55	82
Malte	5,0 (4,9-9,1)	60	80
Bacteriana	7,0 (4,8-8,5)	70	93

Quadro 1: pH, temperatura ótima e temperatura de inativação de alguns tipos de α -amilases de diferentes fontes. Fonte: Quaglia, 1991

A amiloglicosidase, ou glicoamilase ou γ -amilase (EC 3.2.1.3 α -D-1,4 glicanglicohidrolase), é uma enzima extracelular que rompe as ligações α (1,4) e α (1,6) do amido a partir da extremidade não redutora até glicose (LIN et. al., 1993; PANDEY et. al., 2005).

Outras moléculas como maltose, dextrinas e glicogênio são hidrolisados pela enzima, que atua também sobre as ligações α -1,3. A amiloglicosidase é uma enzima de indução, sendo importante a presença de maltose ou amido no meio para sua alta produção (SPIER, 2005).

A enzima é encontrada no sangue, em meios de crescimento de bactérias e no malte de cevada; porém são produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus*, assumindo importância industrial devido à habilidade de formar menos produtos de reversão que a hidrólise ácida (PARK & SANTI, 1977), bem como à sua alta taxa de conversão do polissacarídeo em glicose. Assim, a amiloglicosidase é usada em amidos liquefeitos com α -amilase para chegar a produtos que serão usados como substratos para fermentações, ou para a obtenção biotecnológica de glicose e dextrinas.

Segundo Zanin (1989), a origem da amiloglicosidase é essencialmente fúngica (*Aspergillus* e *Rhizopus*), sendo encontrada na forma de duas isoenzimas, o que contribui para que apresentem diferentes especificidades. A maioria das linhagens de *Aspergillus niger* produz principalmente, duas isoenzimas:

amiloglucosidase I e II normalmente presentes nas soluções comerciais em proporções diferentes.

Da mesma forma como acontece com outras enzimas fúngicas (celulases e pectinases, por exemplo), Schmidell (1996) afirma que, quando se produz amiloglucosidase, não se obtém um só tipo de molécula. O autor cita uma série de referências a respeito da existência de duas isoenzimas, amiloglucosidase I (com peso molecular de 99 kDa) e amiloglucosidase II (112 kDa), resultantes da produção de *Aspergillus niger*.

O quadro 2 apresenta algumas características das amilases.

Característica	α -amilase	β -amilase	glicoamilase
Mecanismo	Endoamilase	Exoamilase	Exoamilase
Principal produto da hidrólise	Dextrinas	Maltose	Glicose
Diminuição da consistência	Rápida	Lenta	Lenta
Perda de cor do iodo	Rápida	Lenta	Lenta
Aumento do poder redutor	Lento	Rápido	Rápido
Produção de glicose	Lenta	Não	Rápida
Produção de maltose	Lenta	Rápida	Não
Produção de dextrinas	Rápida	Lenta	Lenta

Quadro 2: Características dos diferentes tipos de amilases sobre o amido. Fonte: Quaglia, 1991.

As amiloglucosidases provenientes de diferentes fontes apresentam pH ótimo entre 3,0 e 5,0 (COSTA, 1996) e entre 4,5-5,0 (SOCCOL *et. al.*, 2005) estando o pH de maior estabilidade da enzima no intervalo de 4,0 a 5,0 (REED, 1975). Essas

amiloglucosidases incluem as produzidas por *A. niger* (Pandey, 1990) *A.oryzae* (MIAH e UEDA, 1977) citados por Soccol *et. al.* (2005). Zanin (1989) também ressalta que o pH em que a enzima amiloglucosidade de *A. niger* apresenta máxima atividade está entre 3,5 e 5,0. A temperatura ótima da enzima se encontra, na maioria das vezes, entre 50 e 60°C (REED, 1975; COSTA, 1996), que incluem a amiloglucosidase de *A. niger*, *A. oryzae*, *Monascus kaoliang*, *Mucor rouxinol*, *Penicillium oxalicum* (SOCCOL *et. al.*, 2005).

3.4 Atividade Enzimática

O parâmetro mais importante que deve ser considerado na quantificação de uma enzima é a sua atividade, ou seja, a atividade enzimática (CHAPLIN & BUCKE, 1992). Através da revisão bibliográfica constatou-se que existem várias unidades para a atividade enzimática, que é descrita no trabalho de pesquisa. 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 de teste (temperatura com pH ótimo e concentração de substrato) (HENRY, 1964; SCOPES, 1988; CHAPLIN & BUCKE, 1992; SEGEL, 1976).

Por outro lado, Surmely *et. al.* (2003) apresenta o *katal* (*kat*) como a unidade internacional de atividade enzimática. O *katal* é definido como a quantidade de enzima que transforma um Mol de substrato por segundo, sob condições experimentais padrões. Para uma unidade menor usa-se a quantidade de enzima que transforma 1 μmol de substrato por minuto. Apesar dessa normatização, cada fabricante de enzima define as próprias unidades em condições experimentais particulares.

3.5 Hidrólise de material amiláceo

A matéria-prima para obtenção dos hidrolisados é o amido, polissacarídeo constituído de cadeias retas e ramificadas onde cada molécula é formada de várias centenas de unidades de glicose ligadas entre si. O amido é composto principalmente de amilose (Figura 1) e amilopectina (Figura 2). A amilose é um polímero linear constituído por em torno de 6000 unidades de glicose, conectadas por ligações α (1,4), seu grau de polimerização depende da fonte do amido. A amilopectina tem uma estrutura altamente ramificada, constituída por cadeias de amilose, de grau de polimerização entre 10 e 60 unidades de glicose. Estas cadeias são conectadas entre si por ligações α (1,6). As unidades de glicose com ligações α (1,6) da amilopectina representam apenas 4 % do total das ligações da amilopectina (WHISTER E DANIEL, 1984). A amilopectina apresenta grau médio de polimerização superior a um milhão.

Os amidos podem ser hidrolisados por via química (ácidos, calor e pressão) ou por via enzimática. Os hidrolisados por enzimas são os mais importantes amidos modificados comerciais. Incluem desde dextrinas até os açucares derivados de amido, passando pelas ciclodextrinas (SURMELY et. al., 2003).

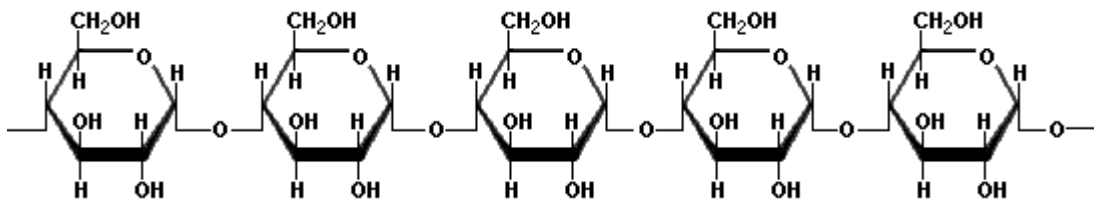


Figura 1: Estrutura da amilose Fonte: ZIM, 2010

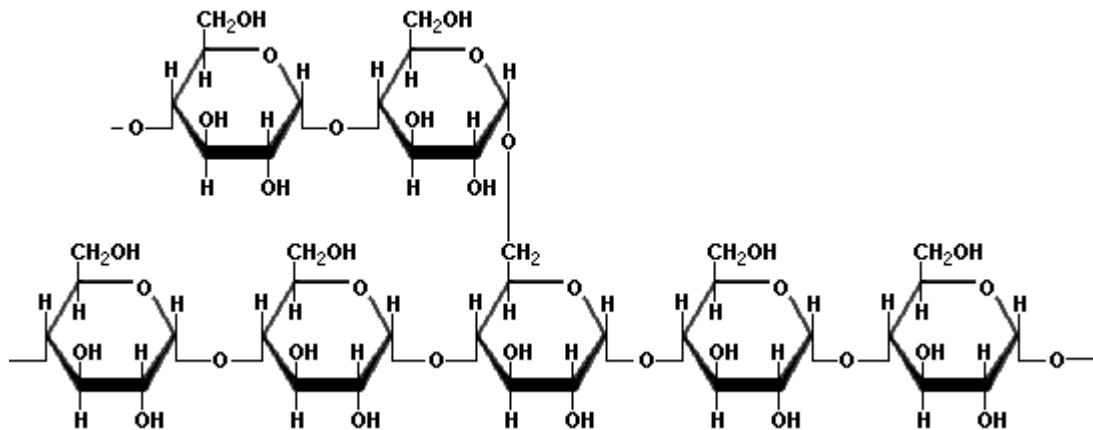


Figura 2: Estrutura da amilopectina Fonte: ZIM, 2010

O processo enzimático permite a fabricação de uma ampla gama de hidrolisado com a mesma linha de equipamentos, enquanto que por via ácida é possível apenas a produção de glicose e dextrina. Entretanto, a produção de cada tipo de hidrolisado requer ajustes de parâmetros e condições experimentais específicas. Na produção de hidrolisados de amido por conversão enzimática as enzimas representam um alto custo. A imobilização destas enzimas pode ser uma forma de conseguir sua reciclagem e reutilização, minimizando assim o custo de produção. Um dos métodos de imobilização usa membranas de ultrafiltração e neste caso, o aparelho de ultrafiltração pode cumprir a função de reator enzimático (SURMELY et. al., 2003). Conforme Fabrício (2011) as enzimas representam em torno de 18% dos custos de produção do etanol a partir de mandioca.

Os hidrolisados de amido pelo processo de hidrólise enzimática são os mais valorizados. No entanto, é possível obter alguns tipos de amido por hidrólise química. Surmely (1996) apud Surmely et. al. (2003) relata as vantagens da hidrólise enzimática em comparação à hidrólise ácida:

- A neutralização de uma hidrólise ácida produz quantidade significativa de sal, enquanto que na hidrólise enzimática, os teores de minerais são mínimos, permitindo o uso de resinas trocadoras de íons para remover os sais formados e obter xarope de condutância leve;
- Na hidrólise enzimática, o volume de carvão ativado usado para remover compostos coloridos e compostos responsáveis de odores e sabores indesejáveis é menor;

- Simplificação da linha de produção, com reatores unitários de liquefação, sacarificação e descoloração;
- Redução do consumo de energia, pois a liquefação ácida tradicional, em processo por batelada, exige cozimento sob pressão com temperatura alta. A liquefação enzimática da fécula de mandioca pode ser realizada em temperatura de 85°C, durante alguns minutos;
- A hidrólise enzimática possibilita a fabricação de uma gama completa de hidrolisados, com a mesma linha de equipamentos.

Apesar de todas essas vantagens, os custos elevados da linha de processamento enzimático e das enzimas são fatores restritivos para a aplicação desta tecnologia. Além do investimento inicial, a tecnologia enzimática exige mão de obra mais especializada, assim como laboratórios e análises mais sofisticados. Os produtos de conversão enzimática do amido vão da glicose a dextrinas de peso molecular elevado. A matéria-prima para obtenção dos hidrolisados é o amido, polissacarídeo constituído de cadeias retas e ramificadas onde cada molécula é formada de várias centenas de unidades glicose, ligadas entre si (SURMELY et. al., 2003).

Embora hajam diferenças pronunciadas entre amidos e féculas, no que diz respeito as suas propriedades funcionais, os produtos de hidrólise serão muito semelhantes, principalmente os hidrolisados de mais baixo peso molecular (SURMELY et. al., 2003).

A produção de etanol a partir de amiláceos passa por duas fases, a hidrólise e a fermentação. Muitos dos processos utilizados em nível industrial são ainda segredos comerciais. A tradição brasileira é de produção de álcool de cana de açúcar, mas há produção isolada de álcool a partir de matérias-primas amiláceas. Na fermentação de matérias-primas amiláceas o processo pode ocorrer simultâneo à etapa de sacarificação ou então se fermenta o extrato obtido após a hidrólise do amido, o que ocasiona composição de açúcares variável de acordo com a eficiência dos processos de hidrólise e sacarificação. Vários são os trabalhos em que se estudou a produção de etanol a partir do farelo, resíduo fibroso das fecularias, entretanto, diversos problemas são citados na utilização do farelo para este fim, principalmente na etapa de hidrólise (LEONEL E CABELO, 2003).

3.5.1 Mandioca

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mandioca, com cerca de 24 milhões de toneladas anuais, colocando esta cultura entre as principais explorações agrícolas do país. A maioria da produção destina-se à fabricação de farinha de mandioca e o restante divide-se entre alimentação humana, animal e processamento para amido (fécula) (CEREDA et. al., 2003).

A mandioca apresenta uma série de vantagens em relação a outros cultivos: fácil propagação, elevada tolerância a estiagens, rendimentos satisfatórios mesmo em solos de baixa fertilidade, pouca exigência em insumos modernos, potencial resistência ou tolerância a pragas e doenças, elevado teor de amido nas raízes, boas perspectivas de mecanização do plantio à colheita, sem grandes perdas na massa seca (CEREDA e VILPOUX, 2003).

Os hidrolisados, pelas suas propriedades específicas e seus diferentes usos nos setores alimentícios, constituem uma excelente valorização da fécula. Apesar da pouca literatura disponível os hidrolisados produzidos a partir de féculas, incluindo os de mandioca, têm as mesmas propriedades dos hidrolisados de milho. Uma vantagem competitiva no caso da mandioca, é que os hidrolisados podem ser elaborados através de um processo mais simples e com menor investimento, devido a características particulares das féculas, tais como menor temperatura de gelificação e menores teores de proteínas e lipídeos (SURMELY et. al., 2003).

Outro fato a ser destacado é que a partir da mandioca podem ser utilizadas como matérias-primas para produção de hidrolisados a fécula, farinha e farelo, entre outros. Para tornar essa potencialidade em realidade, é necessária a avaliação dessas matérias-primas para permitir a escolha mais adequada. A obtenção de xaropes por via enzimática requer o controle de uma ou mais reações enzimáticas e a integração industrial da etapa enzimática com o restante do processo. Como são disponíveis no comércio muitas enzimas comerciais, a seleção de enzimas específicas, a escolha do substrato e as determinações das condições operacionais são primordiais (SURMELY et. al., 2003).

No Brasil, a mandioca foi vista como matéria-prima para produção de álcool carburante em dois períodos, 1932 - 1945 e 1970 - 1980, entretanto, após isso não houve seguimento desse uso. Atualmente, pensar em álcool carburante de mandioca é inviável em grande escala, principalmente em comparação ao processo a partir da cana-de-açúcar e o eficiente uso do bagaço gerado. Todavia, a possibilidade de se produzir álcool refinado a partir do resíduo fibroso de fecularias tem obtido o interesse de alguns industriais da área, que são proprietários ou estão localizados próximos a destilarias, pois este produto apresenta um maior valor de mercado que o álcool carburante, enquanto que a matéria-prima praticamente não apresenta custo. Quimicamente o álcool etílico hidratado não apresenta diferença quanto às matérias-primas utilizadas como cana-de-açúcar, cereais, beterraba e mandioca. As diferenças estão restritas às impurezas que acompanham o álcool, que são características de cada matéria-prima e o grau de purificação pelo qual passou o produto (LOPES, 1986 apud LEONEL e CABELO, 2003).

A produção de álcool de mandioca pode ter desvantagens com relação à produção a partir da cana-de-açúcar em grandes unidades de produção. Quando a produção é realizada em pequenas unidades (1000 a 5000 L/dia) o custo de produção empregando estas matérias-primas apresenta valores bastante próximos. Tal fato ocorre devido à ineficiência do processo de extração do caldo de cana-de-açúcar em pequenas unidades de produção (FABRICIO, 2011).

3.6 Efeitos do ultra-som na atividade enzimática

Na década de 50, com a compreensão do fenômeno de cavitação e o desenvolvimento de transdutores piezoelétricos, os primeiros aparelhos geradores de ondas ultra-sonoras foram comercializados, possibilitando o estudo destas ondas sobre sistemas químicos, o qual é denominado de sonoquímica (BARBOZA e SERRA, 1992, SINISTERRA, 1992).

A sonoquímica pode ser dividida em duas áreas principais: alta potência e baixa potência. As ondas ultra-sonoras de alta potência causam permanente

mudança física e química por produzirem cavitação e microfluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos, e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás. As ondas ultra-sonoras de baixa potência, com frequências maiores que 20 kHz, são usadas em muitos campos da ciência, engenharia e medicina para testes e diagnósticos técnicos. Também são usadas por morcegos, pássaros noturnos e animais marinhos, para sua localização através do eco (BARBOZA e SERRA, 1992).

O efeito das ondas ultra-sonoras resulta em mudanças físicas e químicas, pois a propagação destas ondas no meio reacional origina uma variação de pressão, que é responsável pelo fenômeno de cavitação. Cavitação é a criação e implosão de microbolhas de gás no centro de um líquido (BARBOZA e SERRA, 1992).

A cavitação acústica envolve três estágios; formação de núcleos de cavitação (formação de bolhas de ar próximas das superfícies irregulares de pequenas partículas sólidas presentes), crescimento das bolhas e implosão. Durante a formação das bolhas, podem surgir dois tipos de bolhas: as estáveis, que oscilam periodicamente no meio e possuem tempo de vida grande, seu volume cresce por penetração de gás dissolvido no meio durante a fase de decompressão, e implodem na fase de compressão, quando atingem uma dimensão crítica, podendo tornarem-se bolhas de cavitação transitórias, que possuem tempo de vida curto, de poucos ciclos. No momento de implosão das bolhas, há formação de ondas de choque e na fase final, esperam-se pressões e temperaturas no centro das bolhas muito altas, na ordem de 10000 K e 1000 atm (BARBOZA e SERRA, 1992).

Os efeitos físicos do ultra-som importantes em processos biotecnológicos são o aumento da temperatura, a transferência de massa, a cavitação estável e a transitória. A cavitação deve ser considerada como um tópico complexo e a questão de como a cavitação leva a alta energia química é de primordial importância para se obter o máximo proveito de sua aplicação (LEPOINT e MULLIE, 1994 apud VARGAS et. al., 2003). A cavitação transitória é indesejável em processos biotecnológicos, uma vez que pode causar um aumento da temperatura e pressão que certamente desintegraria as células ou desnaturaria as enzimas, porém, a cavitação estável, na qual bolhas oscilam de um modo regular induzindo ao seu redor uma microcorrenteza que afeta algumas partículas diminuindo o estresse,

deve ser analisados visando sua aplicação em bioquímica e biotecnologia (SINISTERRA, 1992).

O emprego do ultra-som tem sido analisado para a liberação e extração de proteínas, principalmente enzimas intracelulares, e concomitante aumento da atividade das enzimas tem ocorrido (ISHIMORI et. al., 1982; WANG e SAKAKIBARA, 1997; FELIU et. al., 1998; DE CESARE et. al., 2000).

A influência de ondas ultra-sônicas na atividade e estabilidade de enzimas tem demonstrado ser específica para cada enzima e dependente dos parâmetros de sonicação (BARTON et al., 1996; SAKAKIBARA et al., 1996; ÖZBEK e ULGEN, 2000). A aplicação de ultra-som em enzimas pode produzir um efeito positivo na atividade enzimática, embora ultra-som de intensidade possa causar desnaturação (MASON et. al., 2000, SINISTERRA, 1992).

Estudos realizados demonstram que o uso do ultra-som pode aumentar a atividade de certas enzimas. Barton et. al. (1996) demonstraram que na hidrólise enzimática de amido com a enzima α -amilase, em concentrações baixas de substrato, houve um aumento na taxa de reação, sendo que as taxas foram 50% maior a 8 g/l de amido com o uso do ultra-som. Entretanto, em concentrações de 15 a 50 g/l de amido não houve diferença nas taxas de reação com e sem uso de ultra-som. Por outro lado, o efeito do ultra-som na hidrólise do amido com a enzima glicoamilase foi uma maior taxa de reação nas concentrações até 50 g/l, sendo 20 % maior na concentração de 50 g/l de amido. Estes efeitos seriam consequência de uma maior homogeneidade e difusão do substrato, enzimas e produtos na reação, produzidas pelo ultra-som, e de um aumento direto sobre a atividade enzimática na baixa densidade de potência empregada.

O efeito do ultra-som sobre as enzimas depende fundamentalmente da frequência, intensidade e duração da irradiação. Wang et. al. (2011) estudaram as condições ótimas de frequência e intensidade de ultra-som na atividade da enzima allinase de alho fresco, e concluíram que em 40 kHz e intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$ há um aumento da atividade da enzima com o uso do ultra-som de 47,1 % em comparação com o controle (sem irradiação ultra-sônica) e sugeriram que esta melhoria se deve ao fato de baixas frequências e intensidades de ultra-som produzirem cavitação estável, que por sua vez produz uma reação mais homogênea e aumenta a transferência de massa, favorecendo o movimento dos reagentes ao

sítio ativo da enzima, e por último que a cavitação ultra-sônica produz grupamentos hidroxilas que reagem com as moléculas intermediárias produzidas pela enzima, reduzindo a inibição da mesma.

Ishimori et. al. (1981) estudaram os efeitos do ultra-som sobre atividade da enzima α -quimotripsina imobilizada em gel agarose numa reação proteolítica usando a caseína como substrato, chegando a conclusão que a atividade da enzima foi acelerada com irradiação ultra-sônica de 20 kHz, 10-15W, nas condições ótimas (pH 8 e temperatura 35°C), devido a difusão do substrato ter sido aumentada com uso do ultra-som.

A inativação, a desnaturação e danos na estrutura molecular da tripsina foram detectados em estudo dos efeitos do ultra-som na função e estrutura da tripsina com frequência de 20 kHz nas potências de 100 a 500 W (TIAN et. al., 2004).

O uso de energia ultra-sônica de baixo nível (frequência de 20-100 kHz e potência de 2 a 10 W/cm³) na câmara de reação enzimática de biopreparação de tecidos de algodão e bio-conversão de resíduos celulósicos do algodão em açúcares, melhorou consideravelmente o desempenho das enzimas, devido a fatores tais como: a aceleração do transporte da macromolécula de enzima em direção a superfície do substrato através da camada limite líquida na interface líquido-sólido; a agitação vigorosa da normalmente imóvel camada limite de líquido na interface líquido-sólido; a prevenção de eventual aglomeração de macromoléculas de enzimas, o que poderia diminuir a atividade da enzima; a melhor remoção dos produtos da hidrólise enzimática da zona de reação, aumentando a taxa de reação; abertura da superfície do substrato como resultado dos impactos mecânicos do colapso das bolhas de cavitação (CONDON et. al., 2009).

O efeito do tempo de sonicação na liberação de invertase (E. C. 3. 2. 1. 26) por *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliado com irradiações ultra-sônicas de 20Khz, amplitude 40 e intensidade 0.62W/cm³ de 1 a 10 minutos. A irradiação promoveu aumento significativo de 3,45 vezes maior que sem o uso de ultra-som, sem rompimento celular até 5 min de sonicação. Tratamentos superiores à 5 min apresentaram uma maior atividade, porém com alteração da estrutura celular. Podendo-se concluir que a aplicação do ultra-som de baixa frequência, é eficiente na liberação de invertase de *S. Cerevisiae* (VARGAS et. al., 2003).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido nas dependências do laboratório da Pós Graduação em Engenharia de Processos, Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Santa Maria.

4.1 Materiais:

4.1.1 Amido:

O amido utilizado nos experimentos de caracterização das enzimas foi o Amido Solúvel P.A. ACS, cód. 299, marca VETEC.

Na hidrólise de mandioca moída *in natura*, foi utilizada mandioca (*Manihot esculenta*) colhida na região de Santa Maria, com dois anos de cultivo, cuja composição centesimal, foi determinada pelo Laboratório do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM.

4.1.2 Enzimas:

Foram utilizadas as enzimas α -amilase bacteriana termoestável LIQUOZYME® SC DS e a glicoamilase SPIRIZYME® FUEL. Ambas as enzimas foram doadas pela empresa Novozymes Latin America Ltda. As propriedades

descritas abaixo são provenientes das fichas técnicas dos produtos fornecidas pela Novozymes.

4.1.2.1 LIQUOZYME® SC DS

Preparação enzimática aquosa, âmbar, produzida por fermentação submersa de organismo geneticamente modificado, *Bacillus licheniformis*, composta de enzima alfa amilase, com estabilizadores: metionina, cloreto de sódio e sacarose. Densidade: aproximadamente 1,26 g/ml. Atividade: 240 KNU-S/g. Viscosidade: 1-25 cPs. A atividade da liquozyme é dada em KNU, onde 1 KNU representa a quantidade de enzima que hidrolisa 5,26g de amido por hora, avaliado pelo método standard da Novozymes S.A.

4.1.2.2 SPIRIZYME® FUEL

Preparação enzimática aquosa, cor clara ao marrom (a cor pode variar conforme o lote, mas não é indicativo da atividade), produzida por fermentação submersa de organismo geneticamente modificado, *Aspergillus niger*, composta de enzima glicoamilase, com estabilizadores: sacarose e glicose, preservantes: sorbato de potássio e benzoato de sódio. Densidade: aproximadamente 1,15 g/ml. Atividade: 750 AGU /g. A atividade da spirizyme é dada em AGU, onde 1 AGU representa a quantidade de enzima que hidrolisa 1µmol de maltose por minuto sob condições específicas.

4.1.2.3 Determinação da atividade enzimática

Neste trabalho a atividade das enzimas foi determinada conforme descrito a seguir. A atividade da α -amilase foi determinada medindo a concentração de amido pela dosagem de iodo. Uma unidade de α -amilase é definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 10 mg de amido em 30 minutos dentro das condições descritas por Oteng-Gyang (1979) citado por Soccol (1992) também descrito por Pandey *et. al.* (2005).

A atividade da glicoamilase foi determinada através da liberação de açúcares redutores, dosados pelo método DNS (Miller, 1959) citado por COSTA (1996), descrito por Soccol (1992) e por Pandey *et. al.* (2005). Os açúcares são expressos em glicose equivalente. Uma unidade de glicoamilase é definida como sendo a quantidade de enzima liberada por 1 μ mol de açúcar redutor (expresso como glicose) por minuto nas condições de ensaio (ALAZARD e RAIMBAULT, 1981) citado por Soccol (1992).

4.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- Balança Analítica CELTAC, modelo FA2104N.
- pH Metro digital Microprocessado DEL LAB, modelo DLA-PH.
- Incubadora TECNAL TE-420 com controle de temperatura e agitação em RPM (figura 3)
- Banho-maria QUIMIS, modelo 0218-2.
- Lavadora Ultra-sonica UNIQUE, modelo USC-1800 A, frequência US 40 KHz e potência US 0,47 W/cm².(figura 4)
- Espectrofotômetro SHIMADZU, modelo UV – 1800.
- Moinho de martelo e sapatas Marconi Modelo MA 880, peneira 20 Mesh



Figura 3: Incubadora Tecnal TE-420



Figura 4: Lavadora Ultra-sonica UNIQUE

4.3 Métodos Analíticos

4.3.1 Determinação do teor de amido

Foi utilizado o método colorimétrico baseado na coloração azul desenvolvida quando da formação do complexo amido-iodo conforme Soccol (1992) apud Spier (2005). O reativo iodo-iodeto foi preparado por diluição a 4% da solução de base: KI 30g/L e I₂ 3g/L. A reação colorida foi obtida adicionando-se 0,3 mL da amostra convenientemente diluída a 7,2 mL desse reativo (quantidade suficiente para a leitura no espectrofotômetro). Elaborou-se uma reta padrão a partir de uma solução de amido com concentração inferior a 10 g/L e lida a absorção à 620 nm. A densidade ótica das amostras foi lida nesse mesmo comprimento de onda. Os teores em amido – equivalente (g/L) foram obtidos por projeção sobre a reta padrão.

4.3.2 Determinação de açúcares redutores totais (ART)

Os açúcares redutores foram determinados pela reação com o ácido 3,5 dinitrosalicílico “DNS” (MILLER, 1959 apud ZIM, 2010). Em meio básico e a temperatura elevada, o ácido 3,5-dinitrosalicílico passa a 3-amino-5-nitrosalicílico. Desenvolve-se uma coloração amarelo café que absorve a 540 nm.

4.3.2.1 Preparo do reativo DNS:

Dissolveu-se por aquecimento 10 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 200 mL de NaOH a 2 N. Separadamente dissolveu-se também com aquecimento, 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 500 mL de água destilada. As duas soluções foram misturadas e completou-se o volume para 1000 mL com água destilada. Conservou-se em embalagem de vidro âmbar envolvida em papel alumínio.

4.3.2.2 Dosagem de açúcares redutores totais das amostras:

Para dosagem, as amostras foram diluídas de modo a se obter um teor equivalente em glicose inferior a 1 g/L. Adicionou-se 1 mL da amostra convenientemente diluída a 2 mL do reativo DNS, em tubos de ensaio com capacidade de 30 mL. Após 5 minutos em banho-maria fervente, adicionou-se 20 mL de água destilada. Homogeneizou-se. Elaborou-se uma reta padrão a partir de uma solução de glicose com concentração inferior a 1 g/L e a absorbância foi lida à 540 nm. A densidade ótica das amostras foi lida nesse mesmo comprimento de onda. Os

teores em glicose – equivalente (g/L) foram obtidos por projeção sobre a reta padrão.

4.3.3 Determinação da temperatura e pH ótimos para a enzima α -amilase (Liquozyme® SC DS) com solução de amido padrão

Para a determinação da temperatura e pH ótimos para a enzima α -amilase foram realizados ensaios com 9,0 mL de solução de amido na concentração de 10 g de amido/L de solução, tamponada com ácido acético e acetado de sódio no pH desejado, e adicionado 1mL da enzima em tubos de ensaio com capacidade de 30 mL. Os tubos foram colocados em banho-maria por 30 minutos na temperatura estipulada pelo planejamento experimental, e a seguir foi feita a análise de amido da amostra.

A atividade da enzima foi calculada pela diferença de concentração inicial e final de amido nas amostras, determinadas a partir da curva padrão de amido.

Os experimentos foram repetidos nas mesmas condições de temperatura e pH no banho de ultra-som.

4.3.3.1 Planejamento de Experimentos:

Foi feito um planejamento de experimentos delineados inteiramente ao acaso, com adição de pontos axiais, DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional), conforme tabelas 1 e 2, abaixo. Foram consideradas como variáveis independentes a temperatura e o pH. As faixas de temperatura (60 a 90°C) e pH (3,5 a 5,9) utilizadas nos experimentos, dadas na tabela 1, foram baseadas nas características da enzima, conforme ficha técnica do fornecedor.

A variável resposta analisada foi a atividade da enzima, determinada pela análise de amido residual da amostra, conforme metodologia descrita no item 4.3.1.

Tabela 1: Primeiro planejamento de experimentos para enzima α -amilase

	-1,41	-1	0	1	1,41
T	60	64,4	75	85,6	90
pH	3,5	3,8	4,7	5,55	5,9

Devido ao banho de ultra-som disponível no laboratório trabalhar numa faixa de temperatura de 30 a 65⁰ C, novos ensaios foram realizados para esta faixa de temperatura (tabela 2), para permitir comparação entre os dois banhos.

Tabela 2: Segundo planejamento de experimentos para enzima α -amilase

	-1,41	-1	0	1	1,41
T	35	39	47	56	60
pH	3,5	3,8	4,7	5,55	5,9

4.3.4 Determinação da atividade enzimática da α -amilase (Liquozyme® SC DS), no pH ótimo, em diferentes temperaturas, com solução de amido padrão

Tendo sido determinado o pH ótimo da enzima, foram feitos novos ensaios com soluções na concentração de 10 g de amido/L de solução, neste pH, em temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C, no banho-maria e em temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 65 °C no banho de ultra-som para verificar a atividade enzimática em função da temperatura, nas duas condições de reação. Foi feita a análise de amido das amostras para a determinação da atividade da enzima α -amilase, através da diferença de concentrações iniciais e finais de amido na solução, conforme

metodologia descrita no item 4.3.1. A energia de ativação da enzima foi calculada baseada no método de Arrhenius.

4.3.5 Determinação da atividade enzimática da α -amilase (Liquozyme® SC DS), no pH e temperatura ótimos, com diferentes concentrações da solução de amido padrão

Com o pH e a temperatura ótimos conhecidos, foram feitos experimentos com concentrações de 5, 10, 20, 25 e 30 g de amido/L de solução, para se determinar os efeitos da concentração do substrato sobre a atividade enzimática da α -amilase (Liquozyme® SC DS). Foi realizada a análise de amido das amostras para calcular a atividade da enzima α -amilase, através da diferença de concentrações iniciais e finais de amido na solução, conforme metodologia descrita no item 4.3.1.

4.3.6 Determinação da cinética da reação de hidrólise de amido solúvel padrão com enzima α -amilase (Liquozyme® SC DS).

Foram feitos ensaios com 1, 2, 4, 6, 10, 14, 22, 26 e 30 minutos de reação, com 10g de amido/L de solução, no pH e temperatura ótimos, determinados no item 3.3.3, tanto no banho-maria como no banho de ultra-som para verificar a cinética das reações com os dois métodos. Foi realizada a análise de amido das amostras para calcular a atividade da enzima α -amilase, através da diferença de concentrações iniciais e finais de amido na solução, conforme metodologia descrita no item 4.3.1.

4.3.7 Determinação da temperatura e pH ótimos para a enzima glicoamilase (Spirizyme® Fuel) com solução de amido padrão

Para a determinação da temperatura e pH ótimos para a enzima glicoamilase foram realizados ensaios com 9,0 mL de solução de amido na concentração de 10 g de amido/L de solução, tamponados com ácido acético e acetado de sódio no pH desejado, e adicionado 1mL da enzima em tubos de ensaio com capacidade de 30 mL. Os tubos foram colocados em banho-maria por 30 minutos na temperatura estipulada pelo planejamento experimental, e a seguir foi feita a análise de açúcares redutores totais da amostra.

A atividade da enzima foi calculada pela concentração de açúcares redutores totais nas amostras, determinadas a partir da curva padrão de glicose, conforme metodologia descrita no item 4.3.2. Uma unidade de glicoamilase foi definida como sendo a quantidade de enzima liberada por 1 μ mol de açúcar redutor (expresso como glicose) por minuto nas condições de ensaio.

Os experimentos foram repetidos nas mesmas condições de temperatura e pH no banho de ultra-som.

4.3.7.1 Planejamento de Experimentos:

Foi feito um planejamento de experimentos delineados inteiramente ao acaso, com adição de pontos axiais, DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional), conforme tabela 3. Foram consideradas como variáveis independentes a temperatura e o pH. A faixa de temperatura (35 a 60°C) e pH (3,5 a 5,9) utilizada nos experimentos foi baseada nas características da enzima, conforme ficha técnica do fornecedor, com limitante dos equipamentos, pois o banho de ultra-som disponível para os ensaios trabalha na faixa de 30 a 65⁰ C.

A variável resposta analisada foi a atividade da enzima, determinada pela análise de açúcares redutores totais da amostra, conforme metodologia descrita no item 4.3.2.

Tabela 3: Planejamento de experimentos para enzima glicoamilase

	-1,41	-1	0	1	1,41
T	35	39	47	56	60
pH	3,5	3,8	4,7	5,55	5,9

4.3.8 Determinação da atividade enzimática da glicoamilase (Spirizyme® Fuel), no pH ótimo, em diferentes temperaturas, com solução de amido padrão

Tendo sido determinado o pH ótimo da enzima, foram feitos novos ensaios com soluções na concentração de 10 g de amido/L de solução, neste pH, em temperaturas de 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C, no banho-maria e em temperaturas de 30, 40, 50 e 65°C no banho de ultra-som para verificar a atividade enzimática em função da temperatura, nas duas condições de reação. Foi feita a análise de açúcares redutores totais nas amostras para a determinação da atividade da enzima glicoamilase, conforme metodologia descrita no item 4.3.2

4.3.9 Hidrólise da mandioca moída *in natura* com as enzimas α -amilase (Liquozyme® SC DS) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel)

As mandiocas utilizadas nos experimentos foram lavadas, cortadas em rodelas em torno de 3,0 cm de espessura com uso de uma faca, moídas no moinho de martelo e sapatas, formando uma pasta, que foi conservada congelada durante o período dos experimentos (Junho a Dezembro de 2011) em potes de 100g. Um dia

antes dos experimentos, foram retirados do freezer quantidade suficiente para os ensaios e mantidos sob refrigeração.

A mandioca moída *in natura* foi analisada no laboratório do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, do Centro de Ciências Rurais da UFSM. Foram analisados a umidade, cinzas, proteína bruta, fibra bruta, extrato etéreo, amido e carboidratos por diferença, visando determinar a composição centesimal da amostra.

A influência do tempo de reação de hidrólise foi determinado colocando-se uma amostra de 10 g de mandioca moída *in natura* com 100 mL de solução pH 5,5, em erlenmeyer de capacidade 250mL, adicionou-se 0,5 mL de cada enzima e levou-se para incubadora TECNAL TE-420, numa temperatura de 55^oC, com agitação de 120RPM, retirando-se uma alíquota de 0,5 mL de hora em hora e analisando-se açúcares redutores totais (ART), conforme metodologia descrita no item 4.3.2, até que a concentração de ART permanecesse constante.

Levando-se em consideração os resultados dos experimentos para se determinar a temperatura ótima para cada enzima, a temperatura de 55^o C foi estabelecida pela limitação do equipamento utilizado (incubadora). O pH de 5,5 foi determinado como ideal nos experimentos anteriores. O objetivo foi determinar um pH e uma temperatura que favorecesse tanto a atividade máxima da enzima α -amilase como da glicoamilase, pois nestes experimentos elas foram utilizadas simultaneamente.

A hidrólise da mandioca moída *in natura* foi realizada no banho de ultra-som, nas mesmas condições de pH, temperatura e tempo, definidos para a incubadora, conforme planejamento de experimentos (item 4.3.9.1).

Foi realizado também um experimento com 10g de mandioca moída *in natura* com 100 mL de solução pH 5,5, em erlenmeyer de capacidade 250 mL, com adição de 0,5 mL de cada enzima, no banho de ultra-som, retirando-se uma alíquota de 0,5 mL de hora em hora e analisando-se açúcares redutores totais (ART), conforme metodologia descrita no item 4.3.2, para verificar se há diferença no tempo de reação de hidrólise com o uso de ultra-som.

4.3.9.1 Planejamento dos experimentos

Foi feito um planejamento de experimentos delineados inteiramente ao acaso, com adição de pontos axiais, DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional), conforme tabela 4. Os experimentos foram realizados com soluções de mandioca moida *in natura* tendo como variáveis independentes a razão entre a massa de mandioca moida em 100 mL de diluente no pH ótimo das enzimas (pH 5,5), a concentração da enzima glicoamilase e a concentração da enzima α -amilase.

A variável resposta analisada foi a atividade enzimática, determinada pela análise de açúcares redutores totais da amostra, conforme metodologia descrita no item 4.3.2.

Tabela 4: Planejamento de experimentos da hidrólise da mandioca

	-1,68	-1	0	1	1,68
X1	0,1	0,16	0,25	0,34	0,4
X2 (%)*	1	3,8	8	12,2	15
X3 (%)*	1	3,8	8	12,2	15

* As concentrações de enzimas (%) são dadas em relação à massa total de mandioca adicionada em (g).

Sendo:

X1= razão massa de mandioca (g)/ 100 mL de diluente pH 5,5

X2= concentração da glicoamilase (Spirizyme® Fuel) (%)

X3= concentração da α -amilase (Liquozyme® SC DS) (%)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1 Temperatura e pH ótimos para a enzima α -amilase (Liquozyme® SC DS)

Os resultados dos experimentos realizados com a enzima α -amilase, para determinação da temperatura e pH ótimos, nas faixas de temperatura e pH baseadas nos dados da ficha técnica do fornecedor, utilizando-se o amido solúvel padrão como substrato, conforme planejamento do item 4.3.3.1, no banho-maria são mostrados na tabela 5.

Tabela 5: Atividade da enzima α -amilase nas hidrólises de amido solúvel em banho-maria, em 30 minutos de reação, Volume total = 10 mL, Concentração solução = 10g amido/L, Volume enzima = 1mL.

Exp	T (°C)	pH	Atividade (U/mL)*
1	64,4 (-1)	3,8 (-1)	7,68
2	85,6 (1)	3,8 (-1)	6,74
3	64,4 (-1)	5,55 (1)	8,48
4	85,6 (1)	5,55 (1)	8,29
5	60 (-1,41)	4,7 (0)	6,93
6	90 (1,41)	4,7 (0)	7,73
7	75 (0)	3,5 (-1,41)	6,84
8	75 (0)	5,9 (1,41)	7,92
9	75 (0)	4,7 (0)	7,26
10	75 (0)	4,7 (0)	7,45
11	75 (0)	4,7 (0)	7,49

* Média dos resultados = análises em duplicata

Analisando o gráfico de Pareto (figura 5) dos efeitos estimados para a atividade da α -amilase, podemos observar que somente o pH linear teve um efeito significativo sobre a atividade enzimática.

Pelos resultados dos experimentos realizados podemos concluir que a temperatura não tem influência na faixa investigada, e o pH ótimo para a enzima α -amilase é 5,55. A liquozyme® SC DS é de origem bacteriana, conforme Quaglia (1991) a faixa de pH para α -amilases de origem bacteriana é de 4,8 a 8,5.

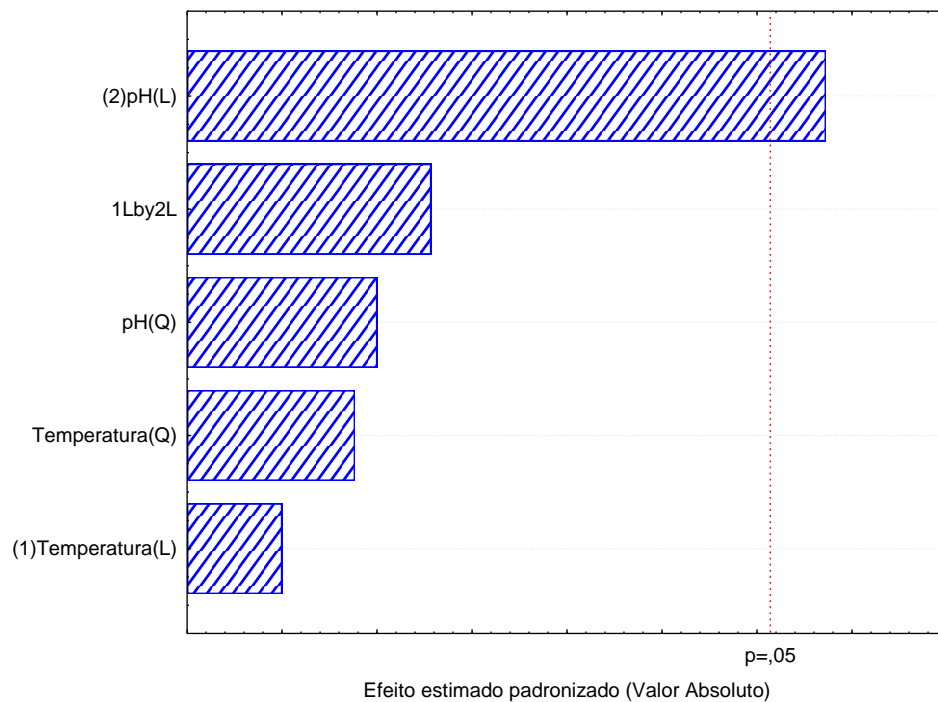


Figura 5: Gráfico de Pareto dos efeitos da temperatura e pH na atividade enzima α -amilase

5.2 Resultados comparativos da atividade da enzima α -amilase, no banho-maria e no banho de ultra-som

Os resultados da atividade enzimática da α -amilase, nos dois banhos, conforme planejamento de experimentos do item 4.3.3.1, na faixa de temperatura do banho de ultra-som (35 a 60⁰C), são mostrados na tabela 6.

Tabela 6: Atividade da enzima α -amilase nas hidrólises de amido solúvel padrão em banho-maria e banho de ultra-som, em 30 minutos de reação, Volume total = 10 mL, Concentração solução = 10g amido/L, Volume enzima = 1mL.

Exp	T(°C)	pH	Atividade (U/mL)* Banho-maria (BM)	Atividade (U/mL)* Banho de ultra- som (US)	% Ganho/ Perda
1	39 (-1)	3,8 (-1)	3,11	5,11	64,41
2	56 (1)	3,8 (-1)	3,55	3,66	3,13
3	39 (-1)	5,55 (1)	4,61	4,66	1,21
4	56 (1)	5,55 (1)	4,94	5,39	9,00
5	35 (-1,41)	4,7 (0)	4,44	3,66	-17,52
6	60 (1,41)	4,7 (0)	4,94	4,27	-13,50
7	47 (0)	3,5 (-1,41)	2,33	2,55	9,55
8	47 (0)	5,9 (1,41)	4,05	4,27	5,49
9	47 (0)	4,7 (0)	3,33	3,39	1,67
10	47 (0)	4,7 (0)	3,00	3,44	14,84
11	47 (0)	4,7 (0)	3,27	3,33	1,71

* Média dos resultados = análises em duplicata

Dos onze experimentos realizados, observou-se que apenas dois obtiveram atividades maiores no banho-maria, em nove experimentos os resultados das atividades da enzima α -amilase foram maiores com o banho de ultra-som. Mostrando uma tendência positiva no uso do ultra-som com frequência de 40 kHz e potência $0,47 \text{ W/cm}^2$ para a hidrólise enzimática do amido com enzima α -amilase.

Os resultados menores no banho de ultra-som foram no pH 4,7, que não é o pH ótimo para esta enzima e nas temperaturas de 35 e 60°C, sendo estas a menor e a maior temperatura da faixa utilizada nos experimentos.

Tanto no banho-maria, como no banho de ultra-som, os melhores resultados para a atividade enzimática, foram em solução com pH 5,55, sendo coerentes com os resultados dos experimentos anteriores para determinar o pH ótimo da enzima, que foi de 5,55.

Na figura 6, podemos verificar que no banho-maria, na faixa de temperatura investigada, de 35 a 60°C, tanto o pH (linear) como a temperatura (quadrática e linear) tiveram efeitos significativos na atividade da enzima α -amilase. O efeitos positivos dos termos lineares de temperatura e pH indicam que o seu aumento irá melhorar a atividade da enzima, enquanto que o valor positivo do termo quadrático

de temperatura indica a presença de um ponto mínimo nos dados. Por outro lado todos os efeitos (linear, quadrática e interação) da atividade da α -amilase em presença de irradiação de ultra-som não foram significativos, o que significa que a atividade enzimática da α -amilase é estatisticamente semelhante em qualquer condição experimental, conforme é mostrado na figura 7.

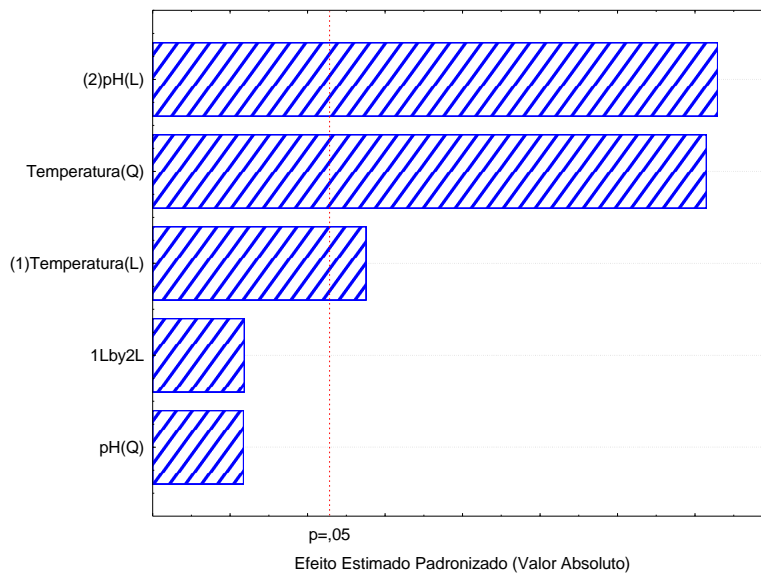


Figura 6: Gráfico de Pareto dos efeitos da temperatura e pH sobre a atividade enzimática da α -amilase na hidrólise do amido no banho-maria

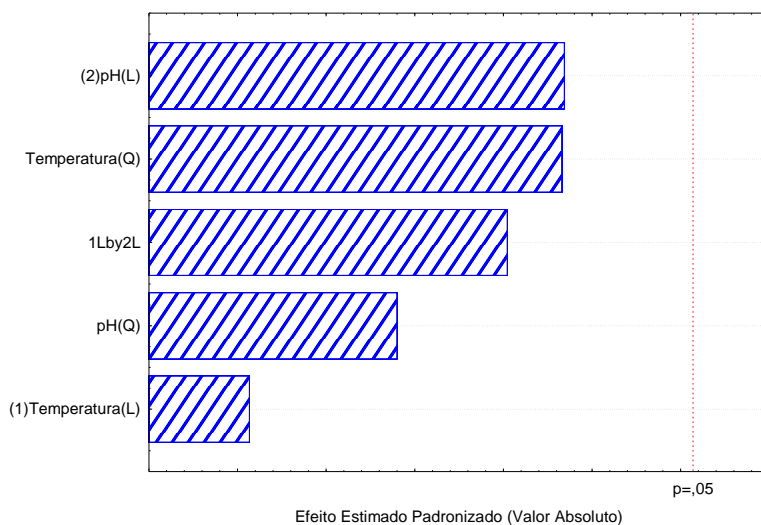


Figura 7: Gráfico de Pareto dos efeitos da temperatura e pH sobre a atividade enzimática da α -amilase na hidrólise do amido em banho de ultra-som

Na hidrólise com banho de ultra-som o modelo não se mostrou adequado, logo não se pode inferir conclusões para o intervalo estudado, em relação aos efeitos do pH e temperatura na atividade da α -amilase, mas podemos chegar a conclusão que existem outras variáveis causadas pelo uso do ultra-som, que não foram levadas em consideração. A intensidade de potência de 132 W, a frequência de 40 kHz e o tempo de irradiação de 30 minutos foram fixos, mas os efeitos de cavitação, transferência de massa, alterações na conformação da molécula da enzima, formação de radicais livres e localização no banho, dentre outras variáveis relacionadas aos efeitos das ondas ultra-sônicas não foram avaliadas.

Podemos constatar também que o melhor resultado para a atividade da enzima α -amilase na hidrólise do amido no banho de ultra-som (atividade=5,39) foi em pH 5,55 e temperatura 56⁰C, sendo estas as mesmas condições em que foi obtido o melhor resultado no banho-maria .

Os resultados obtidos para a enzima α -amilase indicam que as ondas ultrasonicas alteram o comportamento da mesma, visto que os efeitos são diferentes frente as alterações de temperatura e pH utilizados.

5.3 Resultados da atividade da enzima α -amilase na hidrólise de solução de 10 g de amido solúvel /L de solução no pH 5,55, em diferentes temperaturas

Os resultados comparativos da atividade enzimática da α -amilase na hidrólise de solução de 10 g de amido solúvel/L de solução em temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 65 °C, no banho-maria e banho de ultra-som, são mostrados na tabela 7, os demais resultados das temperaturas de 80 e 90 °C, no banho-maria podem ser visualizados na figura 8.

O banho de ultra-som trabalha numa faixa de 30 a 65 °C.

Tabela 7: Atividades da enzima α -amilase no banho-maria (BM) e banho de ultra-som (US), no pH 5,55, em temperaturas de 30 a 65°C, Volume total = 10 mL, Concentração solução = 10g amido/L, Volume enzima = 1mL.

T(°C)	Atividade (U/mL)* Banho-maria (BM)	Atividade (U/mL)* Banho de ultra-som (US)
0	0	2,11
40	1,4	3,39
50	3,59	5,16
60	8,39	5,66
65	8,44	6,22

* Média dos resultados = análises em duplicata

Pode-se perceber, na tabela 7 que até temperaturas de 50°C os resultados da atividade enzimática da α -amilase foram superiores na presença das ondas ultra-sônicas comparadas com os resultados sem o uso do ultra-som. Somente a partir de temperaturas de 60 °C a atividade enzimática da α -amilase foi maior sem o uso do ultra-som. Quando as temperaturas de reação enzimática são baixas (30°C), mesmo no pH ótimo da enzima, não ocorreu hidrólise do amido solúvel em banho-maria nas concentrações de substrato e enzimas utilizadas, porém com o uso de ultra-som observa-se atividade da enzima α -amilase, ficando claro que as ondas ultra-sônicas de baixa frequência e baixa intensidade favorecem as reações enzimáticas, através da cavitação estável e melhoria da transferência de massa conforme verificado por vários autores (Barton et. al. 1996; Sakakibara et. al.,1996; Özbek e Ulgen, 2000; Condon et. al., 2009).

Dados da Figura 8 foram utilizados para estimar a energia de ativação para a α -amilase utilizando um gráfico de Arrhenius (Figura 9), que produz uma linha reta com uma inclinação de $-E_a / R$. Neste trabalho, as energias de ativação de α -amilase, na presença e ausência de irradiação de ultra-som foram 23,28 e 77,67 kJ.mol⁻¹, respectivamente. Os valores dos fatores de frequência foram 2,36E+4 e 1,27E+13, na presença e ausência de irradiação de ultra-som, respectivamente.

Os resultados mostram que o ultra-som tem efeito positivo na reação, pois o abaixamento da energia de ativação, implica num aumento da velocidade da reação.

A menor energia de ativação também favorece a reação em temperatura mais baixa, logo o ultra-som pode representar uma redução nos custos de produção, diminuindo o tempo de reação e reduzindo o consumo de energia.

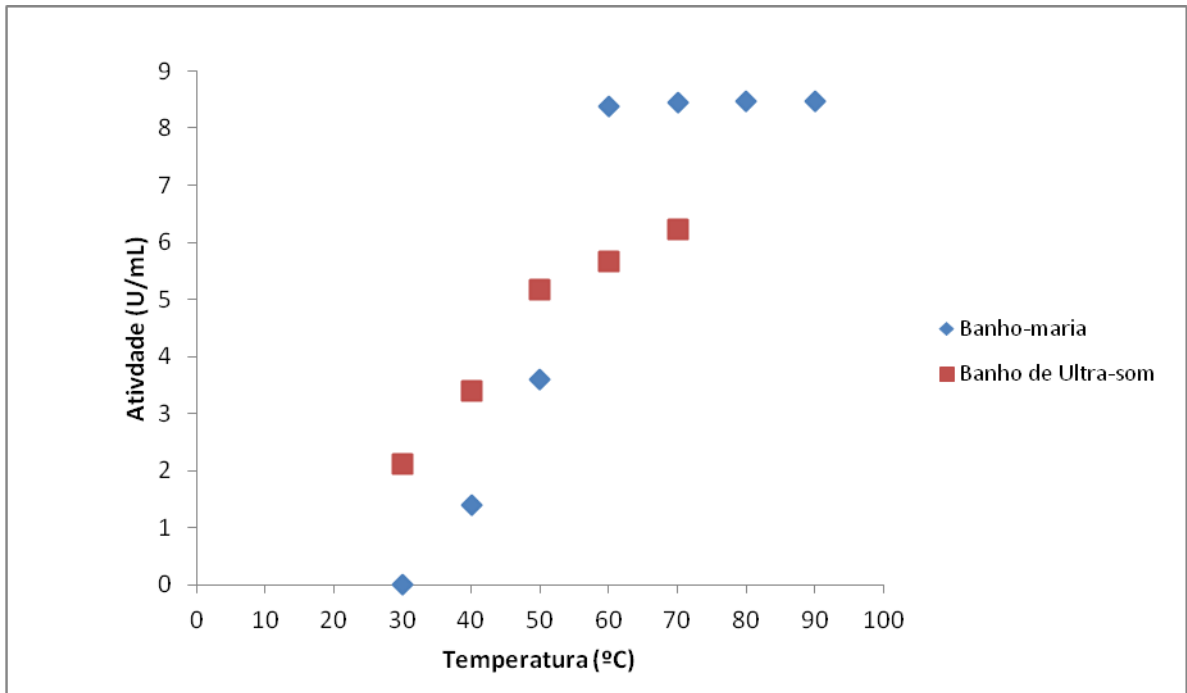


Figura 8: Gráfico comparativo da atividade da enzima α -amilase na hidrólise de amido solúvel, em temperaturas de 30 a 90 °C, em solução de pH 5,55, no banho-maria e no banho de ultra-som

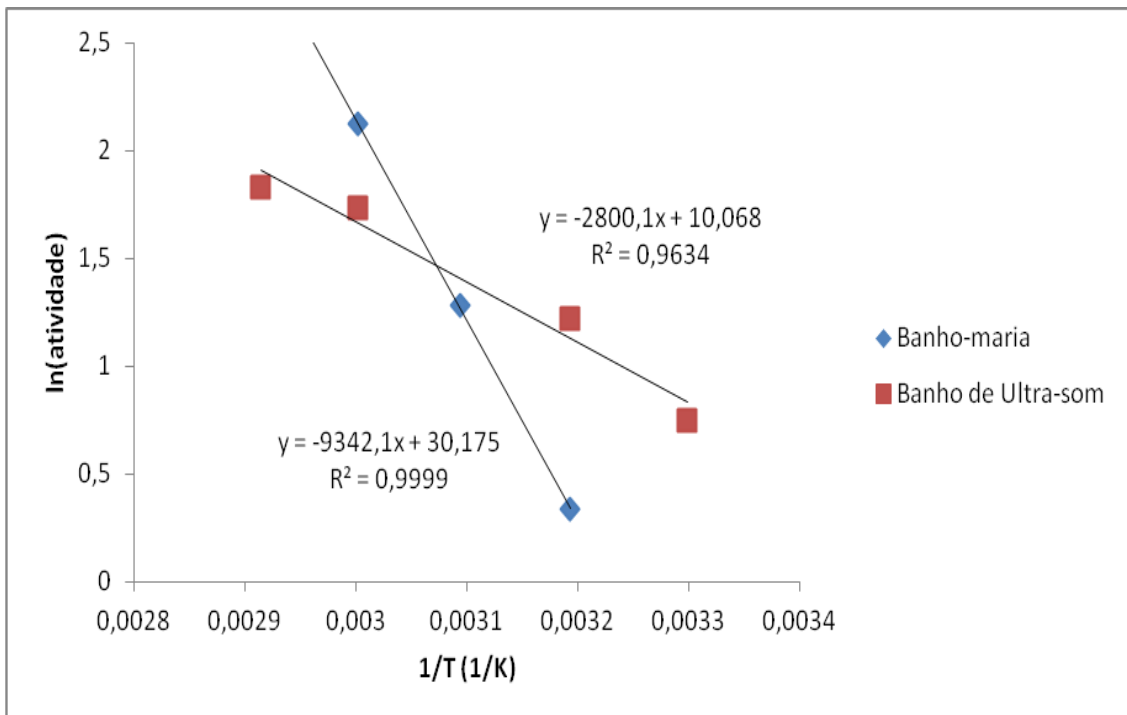


Figura 9: Gráfico de Arrhenius para a enzima α -amilase

5.4 Resultados da atividade da enzima α -amilase na hidrólise de solução de 5, 10, 20, 25 e 30 g de amido solúvel /L de solução no pH 5,55 e temperatura constante, no banho-maria e banho de ultra-som.

Os resultados das atividades enzimáticas da α -amilase com diferentes concentrações de amido, no pH 5,55 e temperatura de 65°C são apresentadas na tabela 8. A concentração de amido não afetou a atividade da enzima α -amilase na hidrólise em banho-maria, entretanto o ultra-som causou um efeito negativo na atividade da enzima α -amilase nas concentrações de amido avaliadas. Este resultado pode ser devido a desnaturação da enzima na temperatura de 65°C com ultra-som de frequência 40kHz e potência de 132 W (0,47 W/cm²).

Tabela 8: Atividades da enzima α -amilase no banho-maria (BM) e banho de ultra-som (US), no pH 5,55, temperatura 65°C, tempo 30 minutos, em concentrações diferentes de amido, Volume total = 10 mL, Volume enzima = 1mL.

Concentração de amido (g/L)	Atividade (U/mL)*	
	BM	US
5	4,22	2,44
10	8,44	5,66
20	17,29	13,55
25	22,22	17,89
30	26,20	20,50

* Média dos resultados = análises em duplicata

Nos estudos realizados por Barton et. al. somente em concentrações baixas de substrato, de até 8 g de amido/L houve um aumento na taxa de reação com o uso de ultra-som na hidrólise de amido com α -amilase.

Para a enzima α -amilase o ultra-som favoreceu a hidrólise em temperaturas de até 50° C, conforme resultados do item 5.3, logo estes resultados são coerentes com estudos anteriores e de literatura.

Nas concentrações de amido de 5 a 30 g/L utilizadas na hidrólise de amido solúvel em solução de pH 5,55 e temperatura de 65°C, observou-se uma maior atividade da enzima α -amilase com o uso do banho-maria, como podemos verificar na figura 10.

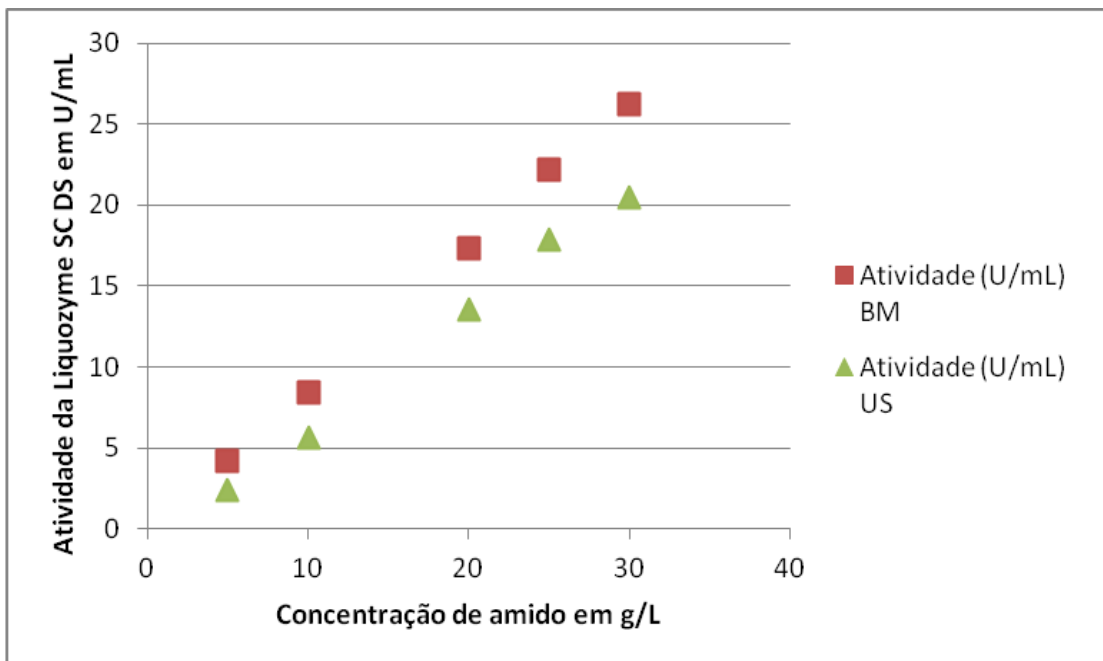


Figura 10: Gráfico comparativo da atividade da enzima α -amilase na hidrólise de amido solúvel, em concentrações de 5 a 30 g/L, em solução de pH 5,55 e temperatura de 65°C no banho-maria (BM) e banho de ultra-som (US)

5.5 Resultados da atividade da enzima α -amilase na hidrólise de solução de 10 g de amido solúvel /L de solução no pH 5,55 e temperatura 65°C, no banho-maria e banho de ultra-som, com diferentes tempos de reação

Os resultados da atividade da enzima α -amilase em tempos de 1 a 30 minutos com solução de 10 g de amido solúvel/L de solução pH 5,55 e temperatura de 65°C são apresentados na tabela 9.

Observa-se que no banho-maria houve uma estabilização da atividade enzimática após 14 minutos de reação, já no banho de ultra-som a atividade mostrou-se crescente durante todo o tempo de reação, de 1 a 30 minutos.

As atividades da enzima α -amilase na hidrólise de amido solúvel no pH de 5,55 e temperatura de 65°C, no intervalo de tempo avaliado (de 1 a 30 minutos) foram maiores no banho-maria, os resultados podem ser visualizados na figura 11.

Tabela 9: Atividades da enzima α -amilase no banho-maria (BM) e banho de ultra-som (US), no pH 5,55 e temperatura de 65°C em diferentes tempos de reação, Volume total = 10 mL, Concentração solução = 10g amido/L, Volume enzima = 1mL.

Tempo (min)	Atividade (U/mL)*	
	BM	US
1	6,74	6,55
2	6,98	6,83
4	7,82	7,14
6	8,15	7,19
10	8,34	7,39
14	8,48	7,80
22	8,58	8,03
26	8,58	8,17
30	8,58	8,28

* Média dos resultados = análises em duplicata

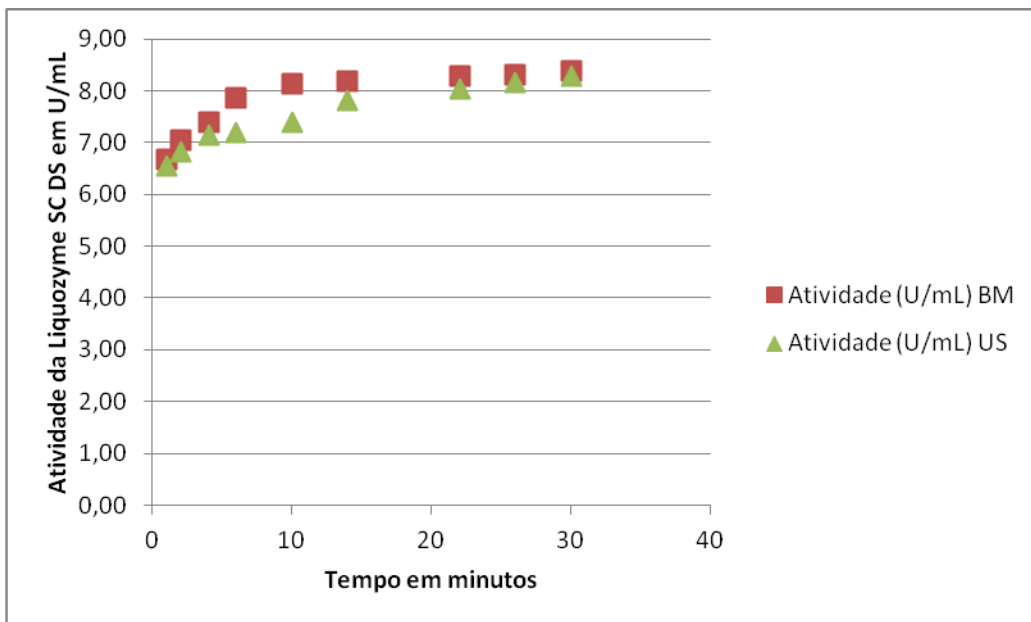


Figura 11: Gráfico comparativo da atividade da α -amilase em função do tempo de reação de hidrólise do amido, no pH de 5,55 e temperatura de 65°C no banho-maria (BM) e banho de ultra-som (US)

Podemos perceber também que em valores absolutos, os valores são muito próximos, no final dos trinta minutos existe uma diferença de 3,5 % entre a atividade no banho-maria e no banho em ultra-som, considerando que o amido não fica totalmente dissolvido na solução, esta diferença não é significativa, pois pode ser considerada como erro de análise, devido a falta de homogeneidade da amostra.

5.6 Temperatura e pH ótimos para a enzima glicoamilase (Spirizyme® Fuel)

Os resultados dos experimentos realizados com a enzima glicoamilase, para determinação da temperatura e pH ótimos, nas faixas de temperatura (35 a 60^o C) e pH (3,5 a 5,5), utilizando-se o amido solúvel padrão como substrato, no banho-maria e no banho com ultra-som, conforme planejamento do item 4.3.7.1, são mostrados na tabela 10.

Tabela 10: Atividade da enzima glicoamilase nas hidrólises de amido solúvel em banho-maria e banho de ultra-som, em 30 minutos de reação, Volume total = 10 mL, Concentração solução = 10g amido/L, Volume enzima = 1mL.

Exp	T(°C)	pH	Atividade (U/mL)* Banho-maria	Atividade (U/mL)* Banho de Ultra-som	% Ganho/ Perda
1	39 (-1)	3,8 (-1)	44,09	47,52	7,78
2	56 (1)	3,8 (-1)	38,50	49,94	29,70
3	39 (-1)	5,2 (1)	48,54	49,43	1,83
4	56 (1)	5,2 (1)	46,76	48,66	4,08
5	35 (-1,41)	4,5 (0)	47,39	47,27	-0,27
6	60 (1,41)	4,5 (0)	47,14	51,21	8,63
7	47 (0)	3,5 (-1,41)	40,15	50,44	25,63
8	47 (0)	5,5 (1,41)	47,65	54,64	14,67
9	47 (0)	4,5 (0)	45,62	50,70	11,14
10	47 (0)	4,5 (0)	44,09	49,81	12,97
11	47 (0)	4,5 (0)	42,69	49,30	15,48

* Média dos resultados = análises em duplicata

Observou-se que houve um aumento na atividade da enzima glicoamilase com o uso do banho de ultra-som com 40 KHz e potência 132 W em relação ao banho-maria, com exceção do experimento com temperatura de 35°C e pH 4,5, onde os resultados podem ser considerados iguais, diferença de 0,27% , pois devido ao amido não ser totalmente solúvel na solução, esta diferença pode ser considerada dentro do erro analítico.

Na média dos onze experimentos os valores da atividade da glicoamilase em banho de ultra-som foram ($49,90 \pm 1,99 \text{ U.mL}^{-1}$) e no banho-maria de ($44,78 \pm 3,25 \text{ U.mL}^{-1}$), mostrando as diferenças estatisticamente diferentes entre os resultados ($p < 0,05$).

Na figura 12, podemos verificar que no banho-maria, na faixa de temperatura investigada, de 35 a 60°C, somente o efeito do pH linear foi significativo na atividade da enzima glicoamilase, logo a atividade enzimática aumenta conforme o aumento do pH. Já no banho de ultra-som, não se percebeu efeitos significativos do pH e temperatura (linear, quadrática e interação), assim como os resultados obtidos com a enzima α -amilase, logo a atividade da glicoamilase com ultra-som é estatisticamente semelhante em qualquer condição experimental, conforme é mostrado na figura 13.

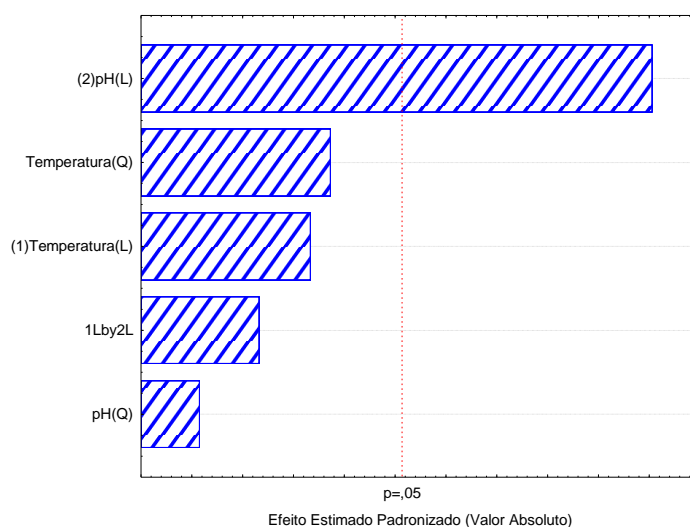


Figura 12: Gráfico de Pareto dos efeitos da temperatura e pH sobre a atividade enzimática da glicoamilase na hidrólise do amido em banho-maria

Como a diferença dos resultados da atividade da enzima glicoamilase na hidrólise do amido solúvel com e sem o uso do ultra-som foram estatisticamente significativas, podemos afirmar que houve uma melhoria no desempenho da enzima com o uso do banho de ultra-som nas condições utilizadas.

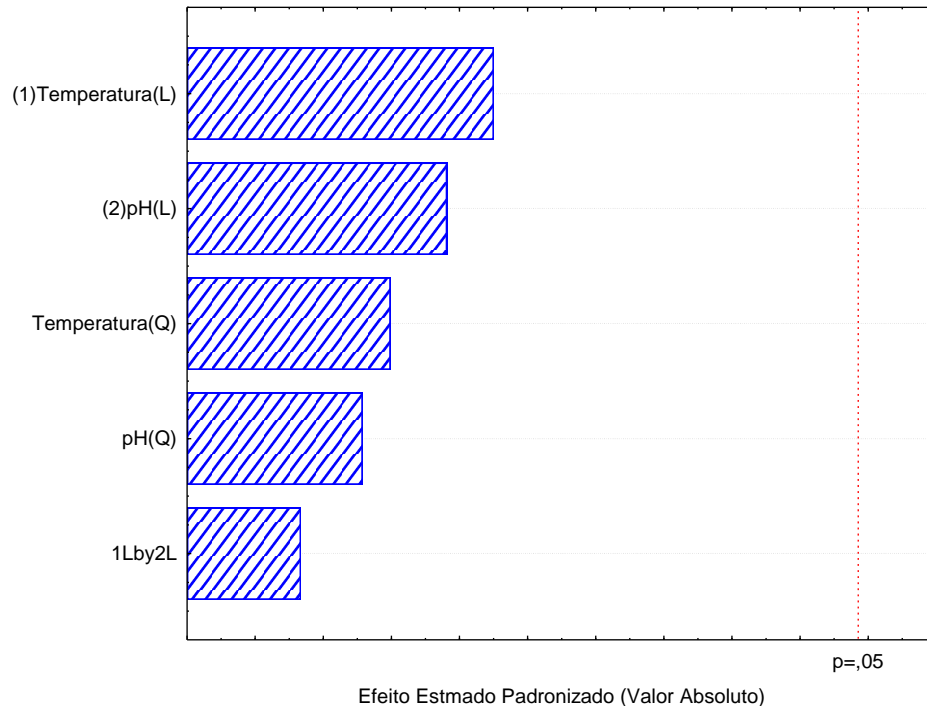


Figura 13: Gráfico de Pareto dos efeitos da temperatura e pH sobre a atividade enzimática da glicoamilase na hidrólise do amido em banho de ultra-som

5.7 Resultados da atividade da enzima glicoamilase na hidrólise de solução de 10 g de amido solúvel /L de solução no pH 5,5, em diferentes temperaturas

Os resultados comparativos da atividade enzimática em temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 65 °C, no banho-maria e banho de ultra-som, são mostrados na tabela 11.

Observou-se que em temperaturas de 30 a 65°C houve um efeito positivo do uso do ultra-som na atividade enzimática, com frequência de 40 KHz e potência de 132 W, na hidrólise de solução de 10 g de amido solúvel/ L de solução no pH 5,5. Os

resultados comparativos da atividade enzimática na faixa de temperatura estudada, no banho-maria e banho de ultra-som, são mostrados na figura 14. Observou-se que a atividade da enzima glicoamilase foi maior no banho de ultra-som do que no banho-maria, principalmente nas temperaturas até 50°C.

Tabela 11: Atividades da enzima glicoamilase no banho-maria (BM) e banho de ultra-som (US), no pH 5,5, em temperaturas de 30 a 65°C, Volume total = 10 mL, Concentração solução = 10g amido/L, Volume enzima = 1mL.

T (°C)	Atividade (U/mL)* Banho-maria	Atividade (U/mL)* Banho de Ultra-som
30	0	42,28
40	31,45	49,53
50	31,45	49,92
60	55,04	51,77
65	47,18	59,67

* Média dos resultados = análises em duplicata

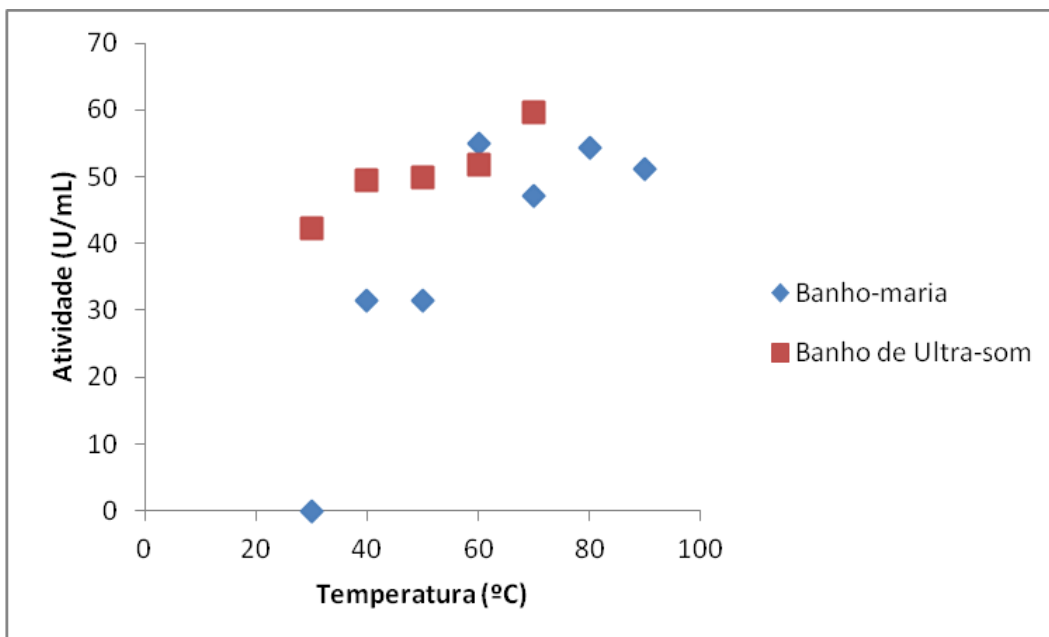


Figura 14: Gráfico comparativo da atividade da enzima glicoamilase na hidrólise de amido solúvel, em temperaturas de 30 a 90 °C, em solução de pH 5,5, no banho-maria e banho de ultra-som

Dados da Figura 14 foram utilizados para estimar a energia de ativação para a glicoamilase utilizando um gráfico de Arrhenius (Figura 15), que produz uma linha reta com uma inclinação de $-E_a / R$. Neste trabalho, as energias de ativação da glicoamilase, na presença e ausência de irradiação de ultra-som foram 7,43 e 13,73 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Os valores dos fatores de frequência foram $8,03\text{E}+2$ e $5,74\text{E}+3$, na presença e ausência de irradiação de ultra-som, respectivamente. Os resultados mostram que o ultra-som tem efeito positivo na reação, pois o abaixamento da energia de ativação, implica num aumento da velocidade da reação.

A menor energia de ativação também favorece a reação em temperatura mais baixa, logo o ultra-som pode representar uma redução nos custos de produção, diminuindo o tempo de reação e reduzindo o consumo de energia.

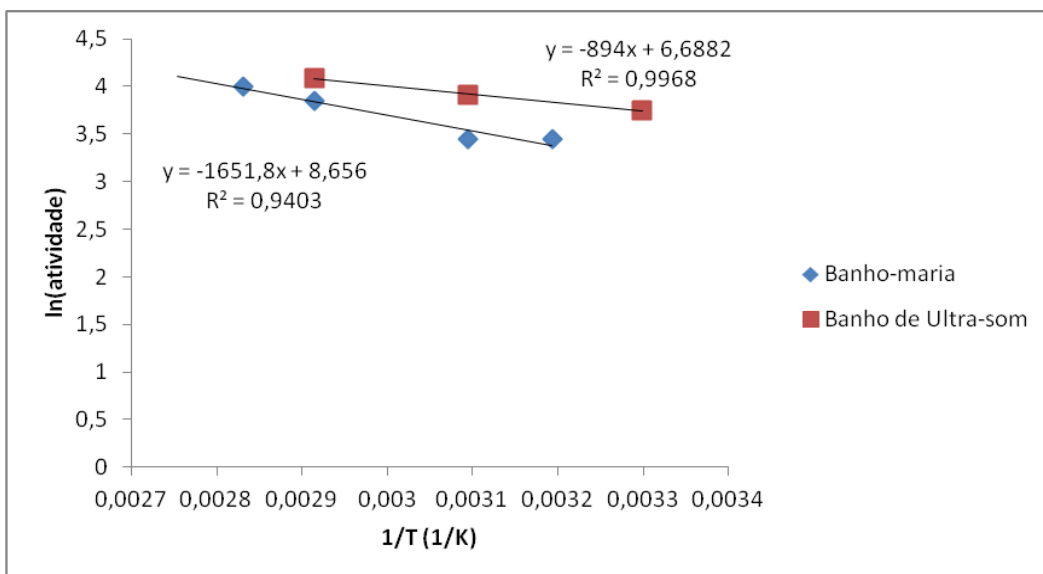


Figura 15: Gráfico de Arrhenius para a enzima glicoamilase

5.8 Composição centesimal da massa de mandioca moída *in natura*

Os resultados das análises físico-químicas da mandioca moída *in natura* utilizada nos experimentos de hidrólise são apresentados na tabela 12.

Tabela 12: Resultados das análises centesimais da mandioca moída *in natura*

Análise	Base úmida (g%)	Base seca(g %)
Umidade	61,3	-
Matéria Seca	38,7	100
Cinzas	0,82	2,12
Proteína Bruta	0,93	2,40
Fibra Bruta	1,56	4,03
Extrato etéreo	0,11	0,28
Carboidratos por diferença	35,28	91,16
Amido	29,02	74,99

Fonte: Laboratório DTCA, UFSM, 2011

A mandioca moída *in natura* apresentou 61,3% de umidade, 1,56 % de fibras, 35,28% de carboidratos e 0,82 % de cinzas. De acordo com Cereda (1994) apud Silva et al (2003) as raízes de mandioca apresentam em média 62% de umidade, 1,3 % de fibras, 34% de carboidratos e 1,1 % de cinzas.

Fukuka e Alves (1987) apud Silva et al (2003) constataram uma variação de 29,3 a 34,8% de amido na raiz, o teor de amido encontrado foi de 29,02 %. Portanto, os resultados das análises físico-químicas encontrados para a mandioca utilizada estão de acordo com a bibliografia estudada.

5.9 Determinação do tempo de hidrólise da mandioca moída *in natura*, com as enzimas α -amilase (Liquozyme SC DS) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel)

Os resultados da hidrólise enzimática da mandioca moída *in natura* em solução de pH 5,5, realizadas na incubadora Tecnal TE 420, de hora em hora, com temperatura de 55°C e agitação de 120 rpm são apresentados na Figura 16 em termos da concentração de açúcar redutor total (ART) liberado. Como pode ser visto, a partir de 6 horas de reação não é verificada variações na concentração de ART, indicando que o processo atingiu o estado estacionário.

Os resultados da hidrólise enzimática da mandioca moída *in natura* em solução de pH 5,5, realizadas no banho de ultra-som, de hora em hora, com temperatura de 55°C e agitação de 120 rpm são apresentados na Figura 17 em termos da concentração de açúcar redutor total (ART) liberado. Conforme podemos visualizar na figura 17, utilizando o banho de ultra-som a concentração de ART permaneceu estável a partir de 4 horas de reação, podendo-se concluir que se pode diminuir o tempo da reação de hidrólise da mandioca moída *in natura*, com as enzimas α -amilase e glicoamilase, utilizando-se o banho de ultra-som.

O ultra-som reduziu o tempo de reação de hidrólise em duas horas, na indústria, isto representa uma redução de custos, pois implica num menor consumo energético.

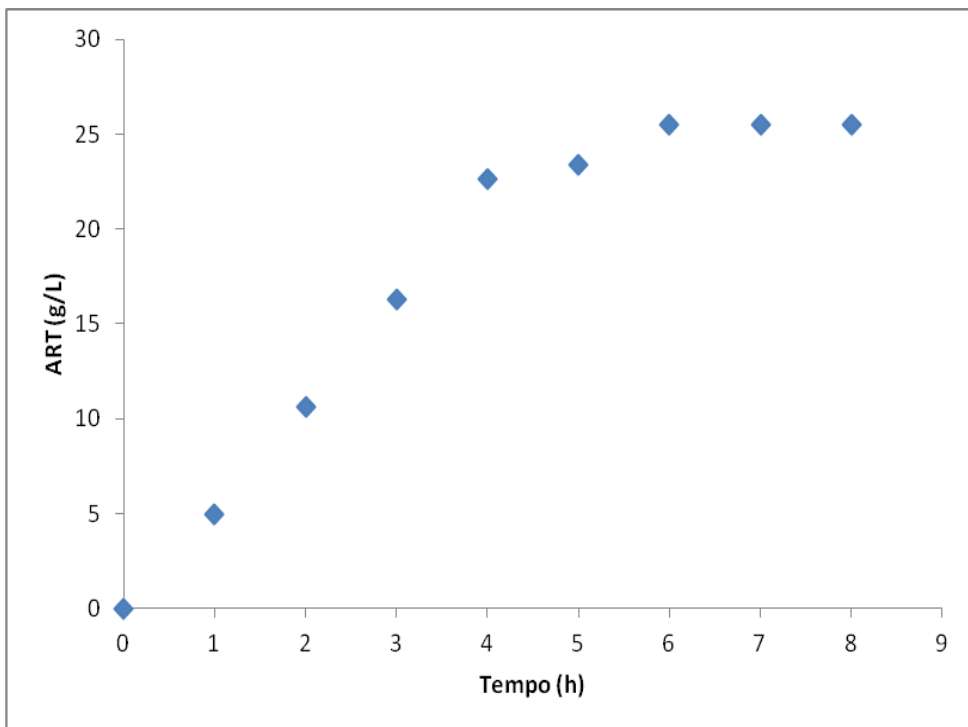


Figura 16: Cinética da hidrólise da mandioca *in natura* determinada na incubadora Tecnal TE 420

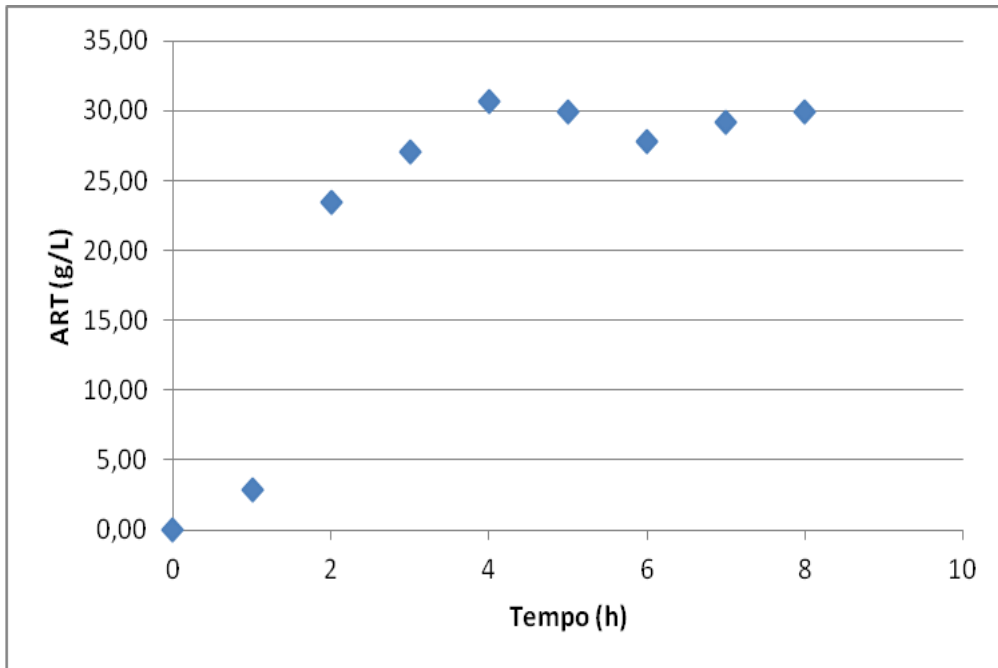


Figura 17: Cinética da hidrólise da mandioca *in natura* determinada no banho de ultra-som com frequência de 40 KHz e potência 132 W

5.10 Hidrólise da mandioca moída *in natura*, com as enzimas α -amilase (Liquozyme SC DS) e glicoamilase (Spirizyme® Fuel)

A Tabela 13 apresenta os resultados do DCCR realizado para avaliar o efeito da concentração das enzimas e da razão sólido líquido na hidrólise da mandioca moída *in natura* em solução de pH 5,5, realizadas na incubadora Tecnal TE 420, com temperatura de 55°C e agitação de 120 RPM por 8 horas.

Tabela 13: Matriz dos resultados experimentais expressos em termos da concentração de ART obtidos no DCCR para a hidrólise da mandioca na incubadora TECNAL TE 420, na temperatura de 55°C, agitação 120 RPM, pH 5,5, tempo 8 horas.

Exp	x_1 (g)	x_2 (mL)	x_3 (mL)	ART (g/L) Incubadora Tecnal
1	16 (-1)	0,61(-1)	0,61 (-1)	35,42
2	34 (1)	1,29 (-1)	1,29 (-1)	62,34
3	16 (-1)	1,95 (1)	0,61 (-1)	36,13
4	34 (1)	4,15 (1)	1,29 (-1)	67,29
5	16 (-1)	0,61 (-1)	1,95 (1)	31,17
6	34 (1)	1,29 (-1)	4,15 (1)	71,54
7	16 (-1)	1,95 (1)	1,95 (1)	43,27
8	34 (1)	4,15 (1)	4,15 (1)	70,74
9	10 (-1,68)	0,80 (0)	0,80 (0)	21,29
10	40 (1,68)	3,20 (0)	3,20 (0)	83,11
11	25 (0)	0,25 (-1,68)	2,00 (0)	56,32
12	25 (0)	3,75 (1,68)	2,00 (0)	59,75
13	25 (0)	2,00 (0)	0,25 (-1,68)	44,64
14	25 (0)	2,00 (0)	3,75 (1,68)	62,50
15	25 (0)	2,00 (0)	2,00 (0)	64,56
16	25 (0)	2,00 (0)	2,00 (0)	65,25
17	25 (0)	2,00 (0)	2,00 (0)	64,56

Base de cálculo: 100 mL de solução

Analisando o gráfico de Pareto, o qual representa os efeitos das variáveis sobre a liberação de ART (figura 18), podemos observar que a variável X_1 (linear), razão da massa de mandioca moída *in natura* por 100 ml de diluente, apresentou o maior efeito, logo, na faixa de 10 a 40% de massa de mandioca, quanto maior a razão maior a atividade enzimática, não havendo nenhuma inibição das enzimas com as concentrações de substrato utilizadas. Foram significativas também as variáveis X_1 (quadrática) e as concentrações de α -amilase variáveis X_3 (linear e quadrática). Já a concentração de glicoamilase, variável X_2 (linear e quadrática) e as interações entre as variáveis: X_1X_2 , X_1X_3 e X_2X_3 não se mostraram significativas.

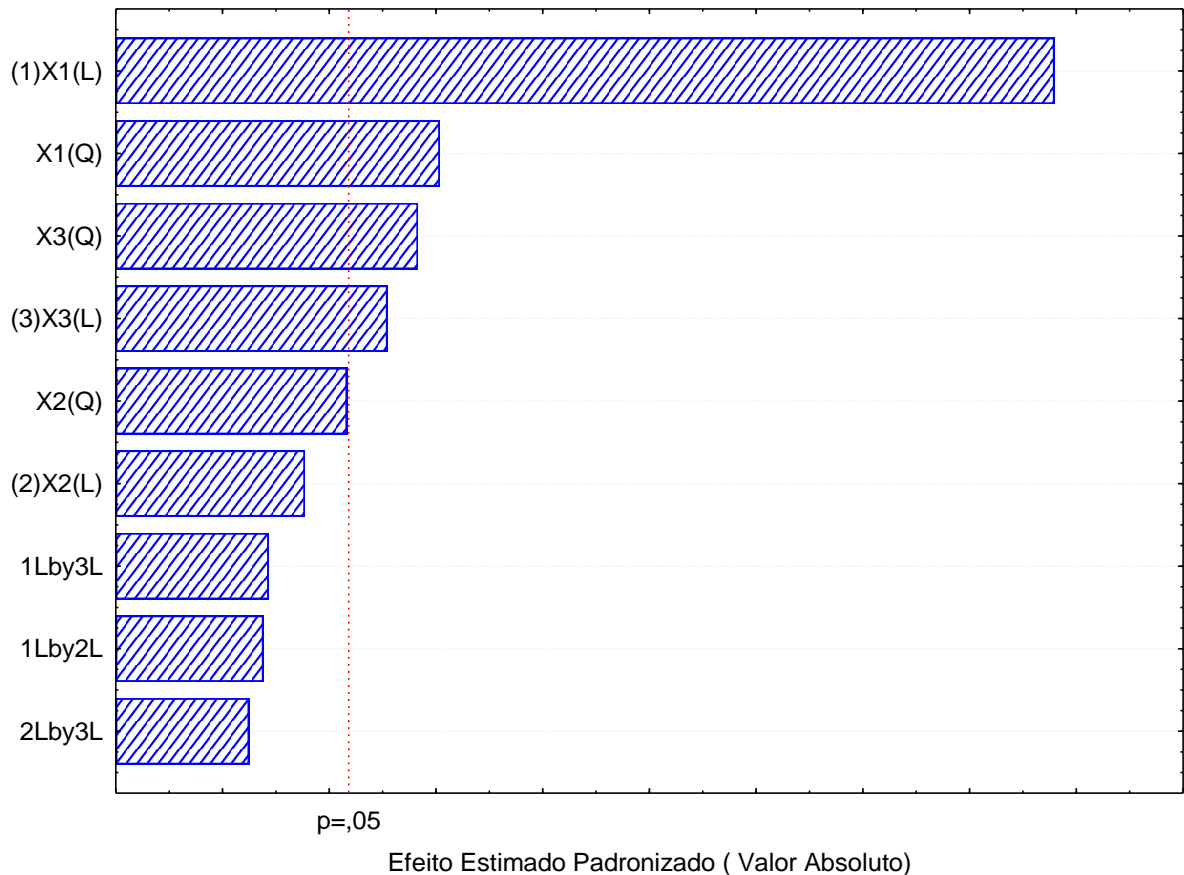


Figura 18: Gráfico de Pareto dos efeitos da razão massa de mandioca/diluyente, concentração da glicoamilase e concentração da α -amilase sobre a liberação de ART durante a hidrólise da mandioca *in natura* na Incubadora Tecnal

A Tabela 14 apresenta os resultados do DCCR realizado para avaliar o efeito da concentração das enzimas e da razão sólido líquido na hidrólise da mandioca moída *in natura* em solução de pH 5,5, realizadas no banho de ultra-som, com temperatura de 55°C e agitação de 120 RPM por 8 horas.

Na hidrólise da mandioca moída *in natura*, houve um aumento significativo na liberação de ART com o uso do ultra-som comparado ao método na incubadora, nas mesmas condições experimentais. Deve-se observar também que na incubadora, foi realizada a reação de hidrólise com agitação constante de 120 RPM durante as 8 horas, e no banho de ultra-som não houve agitação.

Tabela 14: Matriz dos resultados experimentais expressos em termos da concentração de ART obtidos no DCCR para a hidrólise da mandioca no banho de ultra-som, na temperatura de 55°C, pH 5,5, tempo 8 horas.

Exp	x1 (g)	x2 (mL)	x3 (mL)	ART (g/L) Banho de Ultra-som
1	16 (-1)	0,61(-1)	0,61 (-1)	44,15
2	34 (1)	1,29 (-1)	1,29 (-1)	91,85
3	16 (-1)	1,95 (1)	0,61 (-1)	52,69
4	34 (1)	4,15 (1)	1,29 (-1)	99,68
5	16 (-1)	0,61 (-1)	1,95 (1)	51,27
6	34 (1)	1,29 (-1)	4,15 (1)	89,71
7	16 (-1)	1,95 (1)	1,95 (1)	56,25
8	34 (1)	4,15 (1)	4,15 (1)	98,26
9	10 (-1,68)	0,80 (0)	0,80 (0)	32,75
10	40 (1,68)	3,20 (0)	3,20 (0)	116,06
11	25 (0)	0,25 (-1,68)	2,00 (0)	81,88
12	25 (0)	3,75 (1,68)	2,00 (0)	91,14
13	25 (0)	2,00 (0)	0,25 (-1,68)	70,49
14	25 (0)	2,00 (0)	3,75 (1,68)	86,15
15	25 (0)	2,00 (0)	2,00 (0)	83,31
16	25 (0)	2,00 (0)	2,00 (0)	82,59
17	25 (0)	2,00 (0)	2,00 (0)	82,59

Base de cálculo: 100 mL de solução

O efeito positivo das ondas ultra-sônicas com baixa frequência e potência sobre a liberação de ART pode ser devido a cavitação estável produzida no meio, aumento da transferência de massa, facilitando as ligações entre o substrato nos sítios ativos das enzimas, aumentando assim a reatividade das enzimas. A redução da energia de ativação pelo ultra-som causa um aumento na energia cinética das moléculas, fazendo com que ocorra elevação no número de choques entre as moléculas e aumento no número de choques efetivos.

O aumento da atividade enzimática com o uso do ultra-som foi em média 40,91 % maior do que o método convencional, concluindo-se que o uso do ultra-som melhora significativamente a atividade enzimática das enzimas α -amilase e glicoamilase na hidrólise da mandioca *in natura* moída.

Analisando o gráfico de Pareto determinado a partir dos dados de liberação de ART usando banho de ultra-som (Figura 19), pode-se verificar que somente a

variável X_1 (linear e quadrática), razão da massa de mandioca moída in natura por 100 ml de diluente teve um efeito significativo sobre a concentração de ART. As concentrações das enzimas e as interações entre as variáveis estudadas não foram significativas, reforçando assim a hipótese de que os resultados foram melhores, devido aos efeitos causados pelas ondas ultra-sônicas.

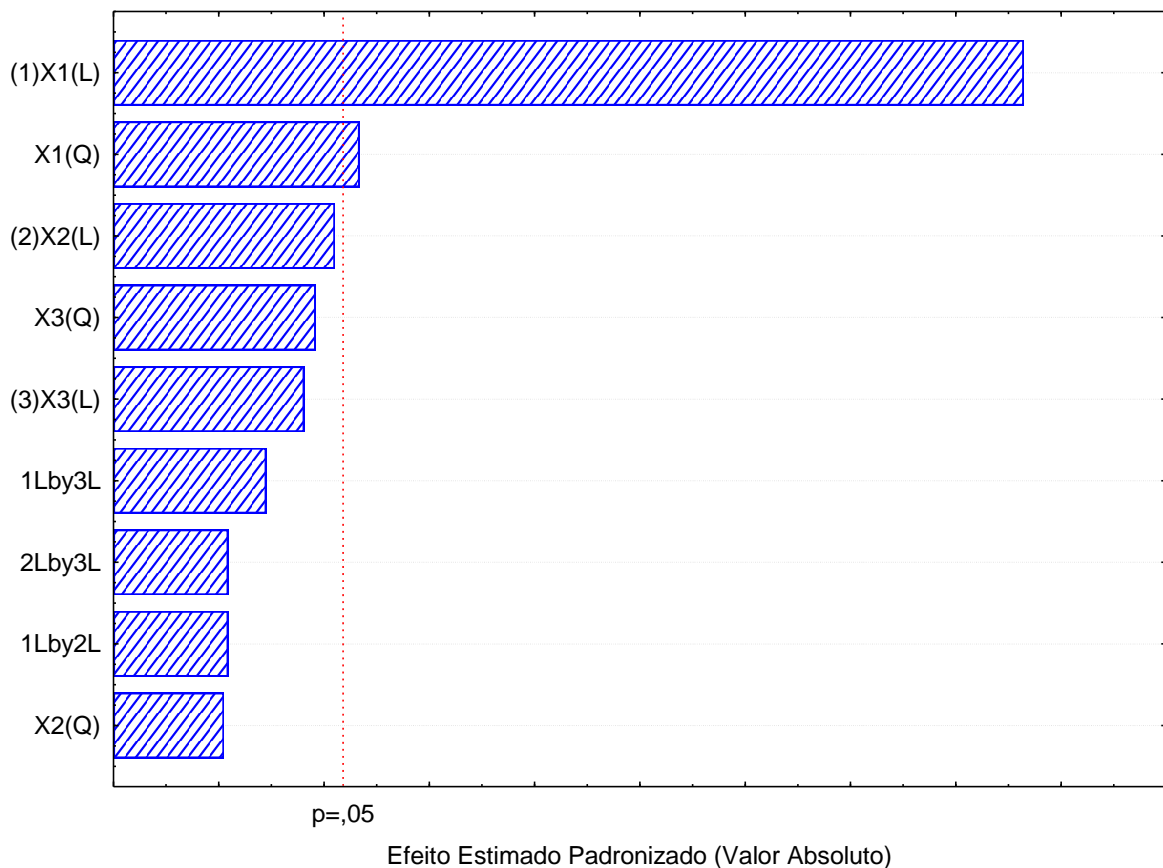


Figura 19: Gráfico de Pareto dos efeitos da razão massa de mandioca/diluente, concentração da glicoamilase e concentração da α -amilase sobre a liberação de ART durante a hidrólise da mandioca *in natura* no banho de ultra-som

6. CONCLUSÕES

Na determinação do pH e temperatura ótimos para as enzimas α -amilase e glicoamilase, houveram alterações no comportamento das enzimas, na presença e ausência de ultra-som. Para a enzima α -amilase os resultados mostraram que não há diferença estatística ($p < 0,05$) entre as atividades determinadas com e sem ultra-som. Entretanto para a enzima glicoamilase os resultados das atividades foram em média 5% maiores com uso de banho de ultra-som em relação ao banho-maria. Podendo-se concluir que nas faixas de temperatura de 35 a 60°C e pH 3,5 a 5,5 o ultra-som com frequência de 40 kHz e intensidade de potência 0,47 W/cm², apresenta um efeito positivo na hidrólise enzimática do amido com enzima glicoamilase.

Tanto para a α -amilase como para a glicoamilase o efeito do ultra-som foi uma redução considerável na energia de ativação na reação de hidrólise de amido solúvel, aumentando a energia cinética das moléculas, e consequentemente aumentando a eficiência da atividade de ambas enzimas.

Comparando-se a cinética da reação de hidrólise da mandioca moída *in natura* com as enzimas α -amilase e glicoamilase determinada na incubadora Tecnal TE-420, com temperatura de 55°C e 120 rpm e a determinada no banho de ultra-som, com temperatura de 55°C, frequência 40 kHz e intensidade de potência 0,47 W/cm², verificamos que com o uso de ultra-som o estado estacionário foi obtido duas horas antes, concluindo-se que se pode diminuir o tempo de reação de hidrólise da mandioca com o uso do ultra-som, o que implica numa redução de gastos de consumo de energia na produção.

Na hidrólise da mandioca moída *in natura*, houve um aumento significativo na liberação de ART com o uso do ultra-som comparado ao método na incubadora, nas mesmas condições experimentais. O aumento da liberação de açúcares redutores totais com o uso do ultra-som foi em média 40,91 % maior do que o método convencional, concluindo-se que o uso do ultra-som melhora significativamente a eficiência da hidrólise enzimática de amido de mandioca com as enzimas α -amilase e glicoamilase.

Estudos futuros poderiam ser feitos usando maiores concentrações de amido, menores quantidades de enzimas, ou outras fontes amiláceas para verificar os efeitos do ultra-som na eficiência da hidrólise de amido, com as enzimas α -amilase e glicoamilase.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUARONE, E; LIMA, U. A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. Vol.03. editora Edgar Blücher Ltda. SÃO Paulo – SP, Brasil, 2001. 595p.

BARBOZA, J.C.S.; SERRA, A. A. **Ultrassom: Influência do Ultrassom na química**. Química Nova, Vol 15, No. 4, 302-316, 1992.

BARTON, S.; BULLOCK, C.; WEIR, D. **The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance**. *Enzyme and Microbial Technology* 18:190-194, Elsevier Science Inc., 1996.

BRUCHMANN, E. **Bioquímica técnica**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1980. 233 p.

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

CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. Conservação de raízes. In: Cereda, M. P et al (Coord). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Volume 3. Cap. 1; Fundação CARGILL; 2003. P 13-29.

CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. TAKAHASHI, M. Balança hidrostática como forma de avaliação do teor de massa seca e amido. In: Cereda, M. P et al (Coord). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Volume 3. Cap. 2; Fundação CARGILL; 2003. P 30-46.

COLLARES, D. G. (<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2010/agosto/3a-semana/assessores-parlamentares-norte-americanos-buscam-informacoes-sobre-biocombustiveis-brasileiros>) Acesso em setembro de 2010

CONDON, B.; EASSON, M.; YACHMENEV, V.; LAMBERT, A.; DELHOM, C.; SMITH, J. **Application of a low-level, uniform ultrasound field for the acceleration of enzymatic bio-processing of cotton**. *Cellulose chemistry and Technology*. V. 43, p. 443-453, 2009.

CONN, E.E. ; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 447 p.

COSTA, J.A.V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por Aspergillus niger NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996. 203 p.

CTBE, Laboratório Nacional e Centro de Tecnologia do bioetanol <http://www.bioetanol.org.br/interna/index.php?pg=MzM>, Acesso em setembro de 2010.

DE CESARE, F. et al. (2000), ***Use of sonication for measuring acid phosphatase activity in soil***. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxon, v. 32, p. 825-832.

FABRICIO, A. M. **Determinação dos custos de produção do etanol a partir da mandioca (manihot esculent Crantz) Pelo método de custeio por atividade (ABC)**. Santa Maria, 2011. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Produção, UFSM.

FELIU, J. X.; CUBARSI, R. e VILLAVERDE, A. (1998), ***Optimize release of recombinant proteins by ultrasonication of E. coli cells***. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v. 58, n. 5, p. 536-540.

FERREIRA, G. B. ***Characterizing of obtaining process of a manioc spirit***. In: *SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUCCIÓN DE ALCOHOLES Y LEVADURAS*, 5, 2005.

FERREIRA, G. B. Produção de álcool a partir da hidrólise do amido de mandioca por amilases do malte de milho. **Revista SODEBRAS**, 2006.

FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. ***Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology***. [S.l.]: J. Wiley and Sons, 1979. v. 3.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K. ; CHAUHAN, B. ***Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective***. *Process Biochemistry*. Jan. 2003. p. 1-18. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>> Acesso em 15 Ago. 2011.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. ***Amilase Fúngica***. In: *Bioquímica das Fermentações*, 1982. 56p.

HENRY, J.B. ***Clinical Enzymology Pre-Workshop Manual***. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1964. 288p.

ISHIMORI, Y.; KARUBE, I. e SUZUKI, S., ***Acceleration of immobilized α -chymotrypsin activity with ultrasonic irradiation***. *Journal of Molecular Catalysis*, v. 12, p. 253-259, 1981.

ISHIMORI, Y.; KARUBE, I. e SUZUKI, S. **Continuous production of glucose oxidase with *Aspergillus sp* under ultrasound wave.** *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 4, p. 85-88, 1982.

KIRIHATA, J. (<http://economia.ig.com.br/empresas/agronegocio/novozymes+prepara+nova+fabrica+no+brasil/n1237718319958.html>) 2010, acesso em 26 de setembro de 2011.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P. Avaliação da concentração de pectinase no processo de hidrólise-sacarificação do farelo de mandioca para obtenção de etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, 2000.

LEONEL, M.; CABELO, C. Hidrólise Enzimática do Farelo de Mandioca: Glicose e Álcool. In: Cereda, M. P et al (Coord). **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca.** Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Volume 3. Cap. 1; Fundação CARGILL; 2003. P 13-29.

LEPOINT, T. e MULLIE, F. **What exactly is cavitation chemistry?** *Ultrasonics Sonochemistry*, Oxford, v. 1, n. 1, 1994. p. 13-22.

LIN, W.L. ; FELDBERG, R.S. ; CLARK, E.D.B. **Kinetics of Cell Growth and Heterologous Glucoamylases Production in Recombinant *Aspergillus nidulans*.** *Biotechnology and Bioengineering*. v. 41, 1993. p. 273-279.

MASON, T. J. (2000), **Large scale sonochemical processing: aspiration and actuality.** *Ultrasonics Sonochemistry*, Oxford, v. 7, n. 4, p. 145-149.

MENEZES, T. J. B. **Etanol, o Combustível do Brasil.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M. e MILAGRES, A. M. F.. **Enzimas, poderosa ferramenta na indústria.** Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, outubro 2007, *Ciência Hoje*, vol.41, No. 242, 28-33).

OLIVEIRA, M.; VASCONCELOS, Y. Revolução no canavial. **Pesquisa FAPESP**, v. 122, p. 62-70, 2006.

ÖZBEK, B. e ÜLGEN, K. O. (2000), **The stability of enzymes after sonication.** *Process Biochemistry*, Rickmansworth, v. 35, p. 1037-1043.

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

PARK, Y.K. ; SANTI, M.S.S. **Induction of High Amyloglucosidase Producing Mutant from *Aspergillus awamori***. *Journal of Fermentation Technology*. v. 55, 1977. p. 193-195.

POLITZER, K.; BOM, E. P. S. Documento elaborado no âmbito do convênio 143/2005 CGEE – IQ/UFRJ-FUJB, relativo ao Termo de Referência Fórum de Biotecnologia 03, 2005.

QUAGLIA, G. **Ciência y Tecnología de la Panificación**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. 485 p.

RAMOS, E. ([HTTP://www.bioenzima.com.br/page_4.html](http://www.bioenzima.com.br/page_4.html) - Notícias: Empresa desenvolve enzimas- publicado em 28/06/2009 – jornal do comércio) acessado em 26 de outubro de 2011.

REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 2.ed. New York: Academic Press Inc., 1975. p. 62-87.

SAKAKIBARA, M. et al. (1996), **Influence of ultrasound irradiation on hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase**. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 18, p. 444-448.

SANTANA, N.B. **Eficiência da Hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzimas e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. MG. 2007. 104p.

SCHMIDELL, W. **Estudo do Processo Fermentativo Contínuo de Produção de Amiloglucosidase Por *Aspergillus niger* NRRL 337 – Comparação com o Processo Descontínuo**. São Paulo, 1996. Tese (Livre Docência em Engenharia Química). Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.

SCOPES, R.K. **Proteins Purification Principles and Practice**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1988. 283 p.

SEGEL, I. H. **Biochemical Calculations**. Cap. 4. *Enzymes*. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1976. 441p.

SILVA, R. M. ; FARALDO, M. I. F. ; VEASEY, A. A.; VEASEY, E. A. **Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca**. In: Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. V. 2. Cap. 11. 2003. p. 207-241.

SINISTERRA, J.V. **Application of ultrasound to biotechnology: an overview.** *Ultrasonics*. Vol. 30, No. 3, p. 180- 185, 1992.

SOCCOL, C.R. **Physiologie et Métabolisme de Rhizopus en Culture Solide et Submergée en Relation Avec la Dégradation d'Amidon et la Production d'Acide L(+)⁺ Lactique.** *Thèse de Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion et Microbiologie, Université de Technologie de Compiègne. Compiègne-France, 1992.* 218 p.

SOCCOL, C.R. ROJAN, P.J.; PATEL, A.K.; WOICIECHOWSKI, A.L.; SURMELY, R; ALVAREZ, H.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. Hidrólise de Amido. In: Cereda, M. P et al (Coord). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas.** Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, Volume 3. Cap. 15; Fundação CARGILL; 2003. P 377-448.

SOCCOL, C.R. ROJAN, P.J.; PATEL, A.K.; WOICIECHOWSKI, A.L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. **Glucoamylase.** In: **Enzyme Technology.** New Delhi: Asiatec Publishers Inc., 2005. p. 221-230.

SOUTO, B. M.; QUIRINO, B. (<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2010/a-metagenomica-na-prospeccao-de-enzimas-para-etanol-celulosico/?searchterm=bioetanol>)

SOUZA, E.L. ; HOFFMANN, E.H.E. ; CASTILHO, V.M. ; LIMA, V.A. ; BELLINI, M.Z.; CRUZ, V.D. ; CRUZ, R. **Produção e Caracterização de α -Amilase Produzida por Rhizopus sp.** In: *Arq. Biol. Tecnol.* 39 (4). Dez, 1996. p. 831-839.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amilogucosidades por fermentação no Estado Sólido.** Dissertação de Mestrado. Univerisdade Federal do Paraná. Curitiba, PR. 2005. 157p.

SURMELY, R. ; ALVAREZ, H. ; CEREDA, M.P. ; VILPOUX, O.F. **Hidrólise do Amido.** In: *Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas.* v. 3. Cap. 15. 2003. p. 377-395.

TIAN, Z.M., WAN, M.X., WANG, S.P., KANG, J.Q. **Effects of ultrasound and additives on the function and structure of trypsin.** *Ultrasonics sonochemistry.* V. 11, p. 399-404, 2004.

VALENÇA, M. ([HTTP://www.bioenzima.com.br/page_4.html](http://www.bioenzima.com.br/page_4.html)) - Notícias: Busca pela Produção de Etanol- publicado em 18/05/2009 – jornal do comércio) em 26 de outubro de 2011.

VARGAS, L. H. M.; CAMPOS, V. E.; CELLIGOI, M. A. P. C. **Avaliação do Tempo de Sonicação na Liberação de Invertase por *Saccharomyces cerevisiae***. 2003. In: SINAFERM. CD-ROM. Florianópolis, Brazil.

VEIGA FILHO, A. A.; RAMOS, P. Proálcool e evidências de concentração na produção e processamento da cana-de-açúcar. **Informações econômicas**, SP, v. 36, n.7, jul p 48-61, 2006.

WANG, J., CAO, Y., SUN, B., WANG, C., MO, Y. **Effect of ultrasound on the activity of aliinase from fresh garlic**. *Ultrasonics sonochemistry*. V. 18, p. 534-540, 2011.

WANG, D. e SAKAKIBARA, M. **Lactose hydrolysis and β -galactosidase activity in sonicated fermentation with *Lactobacillus* strains**. *Ultrasonics Sonochemistry, Oxford*, v. 4, p. 255-261, 1997.

WHISTLER, R.L.; DANIEL, J.R. **Molecular structure of starch**. In: WHISTER, R.L.; BEMILLER, J.N.; PASCHALL, E.F. (Edit.). *Starch: chemistry and technology*. New York: Academic Press, 1984. p.153-182.

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

ZANIN, G. M. **Sacarificação de Amido em Reator de Leito Fluidizado com Enzima Amiloglucosidase Imobilizada**. Campinas, 1989. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos. FEA, UNICAMP.

ZIM, D. S. B. **Hidrólise Enzimática do Amido de Mandioca para a Produção de Bioetanol**. Blumenau, 2010. Dissertação de Mestrado em Química, FURB.