



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA**  
**DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE ALFA-AMILASE POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO:**  
**SEPARAÇÃO POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

**ADEJANILDO DA SILVA PEREIRA**

**ITAPETINGA-BA**

**2015**

**ADEJANILDO DA SILVA PEREIRA**

**PRODUÇÃO DE ALFA-AMILASE POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO:  
SEPARAÇÃO POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, como parte integrante das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração em Engenharia de Processos de Alimentos, para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

**ORIENTADORA:**

Profª. DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo

**CO-ORIENTADORES:**

Prof. DSc. Marcelo Franco

Prof. DSc. Rafael Ilhéu da Costa Fontan

**ITAPETINGA-BA**

**2015**

<p>661.8 07 P154p</p>	<p>Pereira, Adejanildo da Silva          Produção de <math>\alpha</math>-amilase por fermentação no estado sólido: separação por sistemas aquosos bifásicos. / Adejanildo da Silva Pereira. - Itapetinga: UESB, 2015.          89f.</p> <p>Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – <i>Campus</i> de Itapetinga, para fins de obtenção do título de Mestre. Sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. D.Sc. Renata Cristina Ferreira Bonomo e co-orientação do Prof. D.Sc. Rafael Ilhéu da Costa Fontan e Prof. D.Sc. Marcelo Franco.</p> <p>1. Produção de enzima <math>\alpha</math>-amilase. 2. Sistemas aquosos bifásicos - Separação. 3. Fermentação no estado sólido. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos. II. Bonomo, Renata Cristina Ferreira. III. Fontan, Rafael Ilhéu da Costa. IV. Franco, Marcelo. V. Título.</p> <p style="text-align: right;"><b>CDD(21): 661.807</b></p>
-------------------------------	--

Catalogação na fonte:  
 Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535  
 Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Produção de enzima  $\alpha$ -amilase
2. Sistemas aquosos bifásicos - Separação
3. Fermentação no estado sólido



**Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**  
Programa de Pós-Graduação  
**Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos**



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos  
Ciência de Alimentos

**DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO**

**Título:** PRODUÇÃO DE ALFA-AMILASE POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO: SEPARAÇÃO POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS.

**Autor (a):** ADEJANILDO DA SILVA PEREIRA

**Orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo

**Co-orientador (a):** Prof.<sup>o</sup> Dr. Rafael Ilhéu da Costa Fontan

Prof.<sup>o</sup> Dr. Marcelo Franco

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENGENHARIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Cristina Ferreira Bonomo (UESB)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Martins Veloso (UESB)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luiza Helena Meller da Silva (UFPA)

**Itapetinga-BA, 10 de fevereiro de 2015.**

*Aos meus pais que que fizeram tudo para que o  
meu sonho se realizasse, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por ter me proporcionando inúmeras conquistas ao longo de minha caminhada e por ter me dado força para lutar contra os muitos obstáculos que a vida nos impõem.

À minha família, em especial aos meus pais – JÓAO DE LIMA PEREIRA e MARIA HELENA DA SILVA PEREIRA – que, desde criança, me apresentaram ao mundo, com toda a sua heterogeneidade e complexidade.

Aos meus irmãos, Adevaí Pereira e Daniela Pereira, pela torcida e incentivo.

À minha orientadora DSc. Renata Cristina Ferreira Bonomo, pelo apoio, orientação, respeito, amizade, mas, acima de tudo, por acreditar em mim, e por ter influenciado no meu crescimento pessoal e profissional, me dando total liberdade nas decisões.

Ao Professor e co-orientador DSc. Rafael Fontan pelos inúmeros conhecimentos passados durante todo o desenvolvimento do experimento.

Aos Professor Marcelo Franco pela Co-orientação.

Ao Professor DSc. Paulo Bonomo pelas inúmeras contribuições na análise estatística dos dados.

Ao Professor DSc. Leandro Soares pelos conhecimentos transferidos.

Aos professores Evaldo Cardozo e Vanessa Sampaio pelas tantas contribuições durante o experimento.

Ao meu colega “irmão” Rafael Costa pela amizade, mais acima de tudo por estar sempre presente diante das dificuldades no decorrer do curso.

Aos colegas e grandes amigos do LEP, Simone Neres, Taline Amorim, Juliana Gomes, Gabriel Ramos, Olga Gandolfi, Ludimila Mascarenhas pela ajuda incessante.

Aos meus grandes amigos, Tamires Prado, Ben-Hur Gonçalves, Grazielle Silva, Laíse Teles, Aila Riany, Nadabe Reis, Alexandre Pimentel, Roberta Cardozo, Tamires Carvalho, Manuela Barreto, Cláudia Laís, Milena Junqueira, Ruí, Laísa, Alexandra, Dhiéssica, Lívia e Nátila pela torcida.

Á todos que de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

PEREIRA, A. S. **Produção de  $\alpha$ -amilase por fermentação no estado sólido: separação por sistemas aquosos bifásicos**. Itapetinga – BA: UESB, 2015. 89p. Dissertação – Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos.

## RESUMO

Objetivou-se neste trabalho, otimizar a produção da enzima  $\alpha$ -amilase por meio da fermentação em estado sólido (FES) e estudar o comportamento de partição desta enzima em sistemas aquosos bifásicos (SAB's) constituídos por polietilenoglicol (PEG) e fosfato de potássio e líquido iônico (LI) e fosfato de potássio. Para determinar as melhores condições de produção da  $\alpha$ -amilase foi realizado um delineamento composto central rotacional para duas variáveis independentes: tempo de fermentação e umidade. Para o estudo de partição foi realizado para os sistemas formados por PEG-sal, um delineamento composto central face centrada (CCF) com quatro variáveis: Massa molecular do PEG, pH, temperatura e tempo partição e para os sistemas LI-sal, um delineamento composto central rotacional (DCCR) com duas variáveis: temperatura e tempo de partição. As respostas estudadas foram determinadas por meio da quantificação do conteúdo protéico e da atividade enzimática. Foram avaliadas a atividade específica, para a otimização da fermentação e o coeficiente de partição da atividade amilásica ( $K_e$ ), o coeficiente de partição da proteína ( $K_p$ ) e a seletividade para o estudo de partição nos referidos SAB's. Os resultados do processo de otimização da fermentação mostrou que as melhores condições de produção da enzima foi com um tempo de fermentação de 35 horas e teor de água de 45,7%. Quanto aos resultados encontrados para os sistemas formados por PEG-sal verificou-se que a variável mais significativa foi a massa molecular do polímero, uma vez que a enzima apresentou maior afinidade pela fase superior quando esta era composta por PEG com menor massa molecular. Foi observado ainda que os coeficientes de partição aumentaram com o aumento dos valores do pH e com redução da temperatura e que o tempo de partição foi significativo apenas para a variável  $K_e$ . Na partição da  $\alpha$ -amilase proveniente da FES para este sistema, verificou-se que houve uma boa seletividade ( $S$ ), evidenciando que esta enzima possui maior afinidade por uma das fases nas condições estudadas que outras proteínas presentes no extrato enzimático bruto. Em relação aos resultados encontrados para os SAB's formados por LI-sal verificou-se que as melhores condições para o  $K_e$  foi em uma temperatura de 5,9 °C e um tempo de partição de 9,3 horas. Para a partição da  $\alpha$ -amilase proveniente da FES no ponto ótimo do referido SAB foi observado que a mesma possui maior afinidade pela fase rica em líquido iônico ( $K_e=21,962$ ;  $K_p=21,524$ ), entretanto foi observado que as demais proteínas também possui maior afinidade por esta fase, devido ao baixo valor de seletividade obtido ( $S=1,020$ ). Portanto conclui-se que o processo de produção da  $\alpha$ -amilase ocorreu de forma satisfatória, tendo em vista que, que o fungo sintetizou e excretou a  $\alpha$ -amilase sem a necessidade de qualquer outro indutor além do resíduo empregado, que SAB's formados por LI-sal possui baixa seletividade para separação da  $\alpha$ -amilase proveniente da FES e que os SAB's formados por PEG-sal possui potencial para ser aplicado na pré-concentração da enzima  $\alpha$ -amilase, em virtude da boa seletividade apresentada.

**Palavras-chave:** Enzima;  $\alpha$ -amilase; separação; sistemas aquosos bifásicos.

## ABSTRACT

The objective of this work , to optimize the production of  $\alpha$ -amylase enzyme by solid state fermentation (SSF) and study the behavior of this partition of enzyme in aqueous two-phase systems (ATPS) made of polyethylene glycol (PEG), potassium phosphate and ionic liquid (IL). To determine the best conditions for the production of  $\alpha$ -amylase was made a rotational central composite design for two independent variables: time of fermentation and moisture. To partition study, was performed the systems formed by PEG-salt, a face-centered central composite design (TLC) with four variables: the molecular mass of the PEG, pH, temperature and time for the partition and IL-salt systems, a design central composite (CCRD) with two variables: temperature and time of partition. The responses studied were determined by quantifying protein content and enzymatic activity. Were evaluated; the specific activity, for the optimization of fermentation and the partition coefficient of amylase activity ( $K_e$ ). The protein partition coefficient ( $K_p$ ) and the selectivity to partition study in the related ATPS. The results of the optimization process of fermentation showed that the best conditions for enzyme production was with a fermentation time of 35 hours and 45.7% water content. As to the results found for systems composed of PEG-salt was found that the most significant variable was the molecular mass of the polymer, since the enzyme showed the highest affinity when this upper phase consisted of PEG with a lower molecular mass. It was also observed that the partition coefficient increased with increasing pH values and reducing the temperature and time partition was significant only for  $K_e$  variable. In the partition of  $\alpha$ -amylase from the SSF to this system, it was found that there was a good selectivity ( $S$ ), indicating that this enzyme has greater affinity for one phase under the conditions studied that other proteins present in the crude enzyme extract. Regarding the results for the ATPS formed by LI-salt was found that the best conditions for the  $K_e$  was at a temperature of 5.9 ° C and a time partition of 9.3 hours. To partition the FES from the optimum  $\alpha$ -amylase said ATPS was observed that one has higher affinity for the ionic liquid-rich phase ( $K_e = 21.962$ ;  $K_p = 21.524$ ), however it was observed that the other proteins also have a higher affinity. By this stage, due to the low selectivity obtained value ( $S = 1.020$ ). Therefore it is concluded that the production process of  $\alpha$ -amylase occurred in a satisfactory way taking into account that the fungus synthesized and excreted by  $\alpha$ -amylase without the need for any other inducer addition applied residue which ATPS formed by LI -salt has low selectivity for the separation of  $\alpha$ -amylase from SSF and the ATPS formed by PEG-salt has the potential to be applied to the pre-concentration of  $\alpha$ -amylase due to the good selectivity displayed.

**KEYWORDS:** Enzyme;  $\alpha$ -amylase; separation; aqueous two-phase systems.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES .....	xvi
CAPÍTULO 1.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral .....	20
2.2 Objetivos específicos .....	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
3.1 Extração Líquido-Líquido (ELL).....	21
3.2 Sistemas Aquosos Bifásicos .....	21
3.2.1 Diagrama de Equilíbrio de Fases.....	22
3.2.2 Coeficiente de Partição.....	23
3.2.3 Fatores que Influenciam a Formação e Partição em SAB.....	25
3.2.3.1 Massa molar do polímero.....	25
3.2.3.2 Potencial hidrogeniônico.....	25
3.2.3.3 Temperatura .....	26
3.2.4 Componentes dos Sistemas .....	26
3.2.4.1 Polietileno glicol (PEG).....	26
3.2.4.2 Líquido Iônico .....	27
3.2.4.3 Sal.....	29
3.2.5 Aplicação dos Sistemas Aquosos Bifásicos na Separação de Proteínas .....	29
3.3 Fermentação em estado sólido (FES) .....	30
3.3.1 Microrganismos empregados na Fermentação em Estado Sólido.....	31
3.3.2 Fungos Filamentosos .....	31
3.3.2.1 Gênero Aspergillus.....	32
3.3.3 Matérias-primas empregadas na FES .....	32
3.3.3.1 Resíduo de mandioca .....	33
3.3.4 Enzimas amilolíticas.....	33
3.3.4.1 $\alpha$ -Amilase .....	34
4 REFERÊNCIAS .....	36
CAPÍTULO 2 .....	43
Otimização da produção da enzima $\alpha$ -amilase por fermentação em estado sólido do resíduo mandioca.....	43
RESUMO .....	44

ABSTRACT .....	44
1 INTRODUÇÃO.....	44
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
2.1 Condições de cultivo do Microrganismos .....	46
2.2 Preparação das amostras .....	46
2.3 Fermentação em estado sólido .....	46
2.4 Preparo do extrato enzimático .....	47
2.5 Determinação da atividade enzimática .....	47
2.6 Teor de proteínas no extrato enzimático.....	48
2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS - PAGE).....	48
2.8 Análises estatísticas .....	48
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4 CONCLUSÕES .....	53
5 REFERÊNCIAS .....	54
CAPÍTULO 3.....	57
Estudo de partição da enzima $\alpha$ -amilase proveniente da fermentação em estado sólido em sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol e sal inorgânico.....	57
RESUMO .....	58
ABSTRACT .....	58
1 INTRODUÇÃO.....	58
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
2.1 Materiais .....	60
2.2 Fermentação em estado sólido .....	60
2.3 Preparação do Sistema Aquoso Bifásico (SAB).....	60
2.4 Ensaio de partição da $\alpha$ -amilase .....	61
2.5 Determinação da atividade enzimática .....	62
2.6 Determinação de proteínas totais .....	62
2.7 Determinação dos parâmetros de partição .....	63
2.8 Análises estatísticas .....	63
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
4 CONCLUSÕES .....	73
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA .....	73
CAPÍTULO 4.....	76
Otimização da partição da enzima $\alpha$ -amilase proveniente da fermentação em estado sólido em sistemas aquosos bifásicos formados por líquido iônico e sal.....	76
RESUMO .....	77
ABSTRACT .....	77
1 INTRODUÇÃO.....	77

2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
2.1	Materiais .....	79
2.2	Fermentação em estado sólido .....	79
2.3	Experimentos com sistemas aquosos bifásicos.....	80
2.4	Determinação da atividade enzimática .....	81
2.5	Determinação de proteínas totais .....	81
2.6	Determinação dos parâmetros de partição .....	81
2.7	Análises estatísticas .....	82
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	82
4	CONCLUSÕES .....	86
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87
	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	89

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares..... 23
- Figura 2.** Representação esquemática da partição de biomoléculas no SAB ..... 24
- Figura 3.** Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema..... 27
- Figura 4.** Estruturas de cátions em LI (R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> = cadeias alquílicas). ..... 28
- Figura 5.** Representação do ataque inicial da  $\alpha$ -amilase sobre as cadeias helicoidais  $\alpha$ -1,4-glucan da amilose e da amilopectina. .... 34

### CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis umidade (U) e tempo de fermentação (T) utilizada na produção da amilase ..... 50
- Figura 2.** Superfície de resposta para a atividade específica da  $\alpha$ -amilase em função da umidade (U) e tempo de fermentação (TF). ..... 51
- Figura 3.** SDS-PAGE para a  $\alpha$ -amilase produzida por FES. Poço 1: marcador molecular de proteínas; 2: Padrão  $\alpha$ -amilase pura (>95%) 3: Extrato enzimático bruto. .... 53

### CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis Massa molar do PEG (MM<sub>peg</sub>), pH (pH), Temperatura (T) e tempo de partição (TK) para as variáveis Ke e Kp ..... 66
- Figura 2.** Superfície de resposta para o coeficiente de partição da proteína (Kp) em função da massa molar do polímero (MM<sub>peg</sub>) e do pH..... 68
- Figura 3.** Superfície de resposta para o coeficiente de partição da proteína (Kp) em função da massa molar do polímero (MM<sub>peg</sub>) e da temperatura (T °C). ..... 69
- Figura 4.** Superfície de resposta para o coeficiente de partição da atividade enzimática em função da massa molar do polímero (MM<sub>PEG</sub>) e do pH. .... 70
- Figura 5.** Superfície de resposta para o coeficiente de partição da atividade enzimática em função da massa molar do polímero (MM<sub>PEG</sub>) e do T (°C). ..... 71

## CAPÍTULO 4

**Figura 1.** Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis temperatura (T) e tempo de partição (TK) sobre o coeficiente de partição da atividade enzimática. .... 84

**Figura 2.** Superfície de resposta para o coeficiente de partição da atividade (Ke) em função da temperatura (T °C) e do tempo de partição (TK). .... 85

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Nome e abreviações dos ânions presentes em LI. ....	28
<b>Tabela 2.</b> Sistemas aquosos bifásicos utilizados na separação de biomoléculas.....	30
<b>Tabela 3.</b> Produtos obtidos por Fermentação em Estado Sólido .....	30

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 1.</b> Níveis e variáveis estudadas no (DCCR 2 <sup>2</sup> ) para avaliação da umidade e tempo de fermentação ótimos na produção da $\alpha$ -amilase. ....	47
<b>Tabela 2.</b> Atividade específica da $\alpha$ -amilase em função da umidade e tempo de fermentação. ....	49
<b>Tabela 3.</b> Resultados da análise de regressão para a atividade específica da $\alpha$ -amilase para DCCR 2 <sup>2</sup> .....	49

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1.</b> Composição global dos sistemas aquosos bifásicos utilizados para a extração da $\alpha$ -amilase, considerando-se as concentrações finais de PEG e sal fosfato de potássio.....	59
<b>Tabela 2.</b> Valores codificados e não codificados das variáveis pesquisadas no delineamento composto central face centrada.....	62
<b>Tabela 3.</b> Coeficiente de partição da proteína (Kp) e da atividade enzimática (Ke) para os experimentos realizados no CCF.....	64
<b>Tabela 4.</b> Resultados da análise de regressão para o coeficiente de partição da proteína (Kp) e da atividade enzimática (Ke) para o CCF.....	65
<b>Tabela 5.</b> Resultados da determinação dos parâmetros de partição da $\alpha$ -amilase proveniente da FES nas fases dos SAB's.....	72

### CAPÍTULO 4

<b>Tabela 1.</b> Composição global dos sistemas aquosos bifásicos utilizados para a extração da $\alpha$ -amilase, considerando-se as concentrações finais de Líquido iônico (LI) e sal fosfato de potássio.....	79
<b>Tabela 2.</b> Coeficiente de partição da atividade enzimática para os experimentos realizados no DCCR em função da temperatura e tempo de partição. ....	83

<b>Tabela 3.</b> Resultados da análise de regressão para o coeficiente de partição da atividade enzimática da $\alpha$ -amilase para DCCR 2 <sup>2</sup> . .....	83
<b>Tabela 4.</b> Resultados da determinação dos parâmetros de partição da $\alpha$ -amilase proveniente da FES nas fases dos SAB's. ....	86

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SAB	Sistema Aquoso Bifásico
ELL	Extração Líquido-Líquido
LI	Líquido Iônico
LA	Linha de Amarração
Pc	Ponto Crítico
K	Coefficiente de Partição
PEG	Polietilenoglicol
PI	Ponto Isoelétrico
CCF	Delineamento Composto Central Face Centrada
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
R <sup>2</sup>	Coefficiente de Determinação
PDA	Potato dextrose Agar
ART	Açúcares redutores Totais
BSA	Albumina do Soro Bovino
AE	Atividade Específica
ANOVA	Análise de Variância
GL	Graus de Liberdade
SQ	Somas dos Quadrados
QM	Quadrado Médio
P	Probabilidade
FES	Fermentação em Estado Sólido
Ke	Coefficiente de partição da Atividade enzimática
Kp	Coefficiente de partição da proteína
S	Seletividade
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
MMpeg	Massa molecular do polietilenoglicol
$\Delta S^\circ$	Entropia Padrão
$\Delta H^\circ$	Entalpia Padrão
$\Delta G^\circ$	Energia livre de Gibbs Padrão

# CAPÍTULO 1

---

*INTRODUÇÃO*

*OBJETIVOS*

*REFERÊNCIAL TEÓRICO*

---

## 1 INTRODUÇÃO

Em tempos de melhoria da engenharia molecular e projeção de proteínas, o desenvolvimento de novos e biocompatíveis métodos de extração, para a separação e purificação de enzimas e proteínas, vêm ganhando importância crescente. Dentre os processos existentes atualmente um método eficaz e economicamente viável, que é uma ramificação da extração líquido-líquido chamada de extração por Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's), vem destacando-se para a separação e purificação de biomoléculas. Este processo tem como princípio a utilização de duas fases aquosas imiscíveis que podem ser obtidas pela adição de duas soluções aquosas de dois polímeros hidrófilos naturais ou sintéticos ou de uma solução polimérica e uma solução salina. Portanto, a separação/purificação das biomoléculas é realizada em ambiente adequado e sob condições amenas, visto que as fases de um SAB são compostas em sua maioria de água (70% a 90%), o que favorece seu uso na extração de compostos de origem biológica, uma vez que favorecem a estabilidade dos mesmos (ALBERTSSON, 1986).

Esta técnica é amplamente utilizada na purificação de biomoléculas, onde as suas vantagens incluem seletividade favorável, baixo custo e adaptabilidade para o processamento contínuo da amostra e retenção da atividade biológica (SELBER et al, 2001). Os SAB formados por PEG e dextrana ou PEG e sais são os mais utilizados, devido principalmente a disponibilidade em grandes quantidades no mercado, por não serem tóxicos, possuírem alta seletividade, possibilidade de reciclagem dos reagentes e por manterem a integridade das proteínas (FERREIRA et al., 2011).

Líquidos Iônicos (LIs) também vem sendo aplicados em processos de biopurificação e bio-extração com SAB, e possuem vantagens, tais como a melhoria da estabilidade das proteínas, do substrato e/ou seletividade do produto, e supressão de reações secundárias. Além disso, os SAB's baseados em LI são substancialmente menos viscosos do que os típicos SAB's à base de polímeros (LOUROS et al., 2010). A maioria dos LIs solúveis em água, à temperatura ambiente, são eletrólitos indutores de "salting-in" (geralmente conhecido como sais "caotrópicos") que podem formar uma segunda fase aquosa na presença de soluções aquosas de sais inorgânicos "salting-out" (sais "cosmotrópicos"), resultando na formação de SAB's (GUTOWSKI et al., 2003; NEVES et al., 2009). Em sistemas aquosos compostos de LI, sal inorgânico e de água, a força motriz para a separação de fases é a competição entre o LI e o sal pelas moléculas de água. A maior afinidade do sal inorgânico pela água induz uma migração de água para longe dos íons de LI reduzindo a sua hidratação

e reduzindo a solubilidade em água dos LIs (FREIRE et al., 2009).

Para aperfeiçoar o emprego dos sistemas aquosos bifásicos na partição de biocompostos é necessário o estudo do comportamento destes sistemas em diferentes composições e em variadas condições de temperatura e pH. Assim, desde 1960 diversos estudos têm sido conduzidos com objetivo de encontrar os SAB's mais adequados e as melhores condições para a partição e/ou concentração de células animais ou vegetais, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (MAGESTE et al., 2012; ALCÂNTARA et al., 2014; SOUZA JR et al., 2014).

Dentre as enzimas as amilases, uma classe de hidrolases, são vastamente distribuídas na natureza. Estas agem especificamente sobre as ligações glicosídicas do amido. Atuam na digestão, como as amilases salivar e pancreática, na germinação de grãos e no crescimento microbiano (HIZUKURI, 1996; WHITAKER, 1994). Existem diversos tipos de enzimas amilolíticas e elas têm utilizações em vários tipos de indústrias como a de papel, têxtil, panificação, produção de xaropes, álcool, bebidas, dentre outras. Estas enzimas vêm sendo produzidas por fermentação em estado sólido a partir de resíduos da agroindústria (SANTANA et al., 2012). Neste processo, as enzimas são produzidas pelos fungos diretamente sobre substratos insolúveis em água, como cereais ou derivados de cereais, na presença de quantidades variáveis de água livre (MITCHELL e LONSANE, 1992).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar a produção da enzima  $\alpha$ -amilase por fermentação em estado sólido e o seu comportamento de partição em sistemas aquosos bifásicos, constituídos por polietilenoglicol, líquido iônico e fosfato de potássio.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Estudar a produção da  $\alpha$ -amilase por fermentação em estado sólido sob diferentes valores de umidade e tempos de fermentação;
- Avaliar a partição da  $\alpha$ -amilase em sistemas constituídos por polietilenoglicol e tampão fosfato de potássio.
- Estudar o comportamento de partição da  $\alpha$ -amilase em sistemas formado por líquido iônico e tampão fosfato de potássio;

### **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 Extração Líquido-Líquido (ELL)**

A extração líquido-líquido é uma operação muito utilizada na indústria química como técnica de purificação, que consiste na separação dos componentes de uma solução líquida pelo contato de outro líquido imiscível. A extração de biomoléculas em sistemas de duas fases constituídas de uma fase aquosa e um solvente orgânico é utilizada há cerca de 60 anos na purificação de antibióticos e ácidos orgânicos (PESSOA & KILIKIAN, 2005). Esta operação unitária apresenta muitas vantagens, tornando-a bastante atrativa como processo de separação, tais como a facilidade na aplicação em larga escala e o fato de normalmente não envolver equipamentos de difícil operação e o uso de energia térmica (MATIASSON et al., 1987). No entanto em processamento envolvendo biomoléculas como proteínas, tem apresentado aplicação limitada devido à baixa solubilidade das moléculas e ao efeito desnaturante dos solventes orgânicos, além destes normalmente serem tóxicos, cancerígenos e inflamáveis (SUBRAMANIAM, 1998).

Com o crescimento das indústrias de biotecnologia e química fina gerou-se uma demanda por processos de extração com sistemas não convencionais devido às rigorosas exigências do mercado com relação a pureza e qualidade dos produtos, muitos deles de elevado valor comercial (COIMBRA, 1995). Assim uma variante da extração líquido-líquido tradicional, compatível com os processos de biosseparações, é a purificação utilizando sistemas aquosos bifásicos, os quais vem sendo usados com sucesso no isolamento de proteínas e de outras biomoléculas. (COIMBRA & TEIXEIRA, 2009).

#### **3.2 Sistemas Aquosos Bifásicos**

Quando duas soluções aquosas de polímeros quimicamente distintos ou um polímero e um sal inorgânico são misturados sob certas condições de composição, pressão e temperatura ocorre um fenômeno de segregação, formando duas fases, isto é, duas regiões com propriedades termodinâmicas intensivas distintas denominados de sistema aquosos bifásicos (ROGERS et al., 1996).

Estes sistemas foram descritos pela primeira vez em 1896 quando, Beijerinck, um microbiologista holandês, descobriu que soluções aquosas de gelatina e Agar ou gelatina e amido solúvel, misturadas em uma dada faixa de temperatura e concentração, se separavam em duas fases aquosas. Ostwald e Hertel em 1929, prosseguiram os estudos sobre esses sistemas e verificaram que amidos provenientes de origens distintas (arroz, milho, etc),

apresentavam comportamentos diferenciados na formação de fases, evidenciando a grande influência que pequenas variações nas interações intermoleculares têm sobre as composições das fases em equilíbrio. Com o intuito de verificar este fenômeno, Dobry e Boyer-Kawenoki, no final da década de 40, também se propuseram a estudá-lo por meio da mistura de um grande número de pares de diferentes polímeros dissolvidos em solventes orgânicos ou em soluções aquosas. Os autores verificaram que dos 35 pares de macromoléculas estudados, apenas 4 não produziram a formação das duas fases, evidenciando a incompatibilidade entre polímeros como um fenômeno geral (DA SILVA e LOH, 2006).

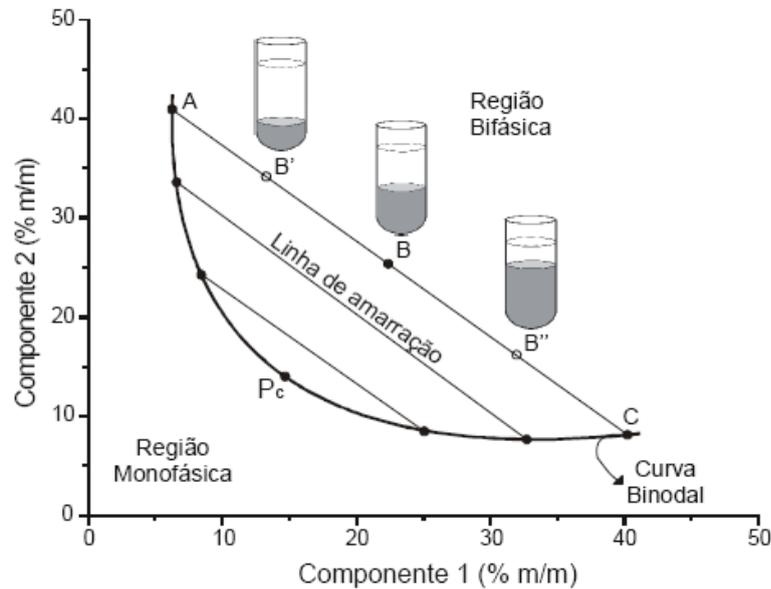
Os SAB's comuns geralmente são formados por polietileno glicol (PEG), pois este facilmente forma um sistema bifásico com sais inorgânicos e polímeros neutros, devido alguns polímeros hidrofílicos não serem imiscíveis entre eles em soluções aquosas. A água misturada com polímeros atua como o principal solvente e pode estabelecer ligações não-covalentes com eles. A presença de um sal inorgânico em concentrações críticas em um sistema único polímero-água também pode levar à formação de duas fases aquosas distintas, onde normalmente a fase inferior é rica em sal inorgânico, enquanto a fase superior é rica em polímero (SALABAT, 2001). A separação de fases certamente depende do tipo de sal inorgânico e da respectiva concentração destes, sendo as fases geralmente compostas por cerca de (70-90) % de água, o que explica o porquê as biomoléculas não são facilmente desnaturadas (LI et al., 2005).

### **3.2.1 Diagrama de Equilíbrio de Fases**

Para a utilização dos SAB é necessário o conhecimento do comportamento das fases nos sistemas. Para isto são construídos diagramas de fases para os componentes, nos quais as composições dos constituintes para a separação das fases são determinadas. Deste modo, o diagrama de equilíbrio de fases pode ser descrito como uma representação gráfica utilizada para expressar as concentrações de um sistema de fases sob temperatura e pressão constantes. Este é muito importante para os estudos de separação de biomoléculas, pois são usados como ferramenta básica para o início e desenvolvimento de um processo de extração (KABIRI-BADR e CABEZAS JR., 1996).

Na Figura 1 é apresentado um exemplo de diagrama de fases, mostrando a composição das fases em equilíbrio em coordenadas retangulares.

**Figura 1.** Diagrama de fases expresso em coordenadas retangulares



Fonte: CARVALHO, 2004.

A curva que divide a região em duas fases é denominada de curva binodal ou curva de equilíbrio, na qual é possível prever em quais composições globais o sistema é homogêneo e em quais é heterogêneo. As retas que ligam pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio são chamadas “tie-lines” ou linhas de amarração (LA). Qualquer ponto que pertença à região bifásica e que esteja sobre a mesma linha de amarração fornecerá fases com propriedades termodinâmicas intensivas iguais (densidade, volume molar, entalpia molar, etc.) e propriedades extensivas diferentes (massa, volume, etc).

Outra característica importante de um diagrama de fases é o ponto crítico ( $P_c$ ), no qual as propriedades extensivas (composição, volume, entre outras) das duas fases são teoricamente iguais. Nas proximidades do ponto crítico, pequenas alterações na composição dos sistemas podem provocar mudanças drásticas, como levar o sistema de uma para duas fases e vice-versa (ALBERTSSON, 1986).

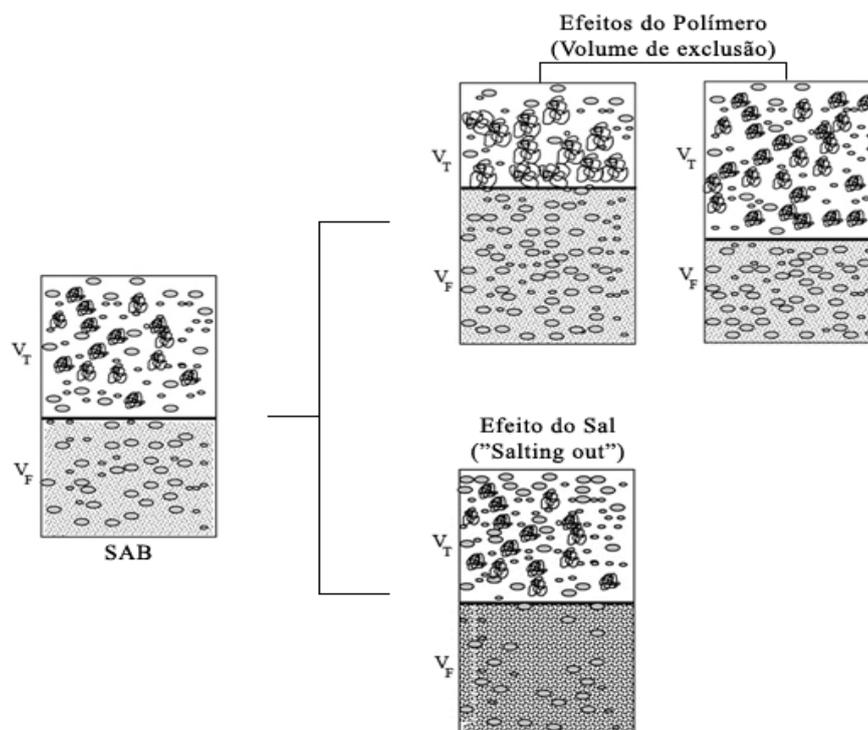
### 3.2.2 Coeficiente de Partição

Materiais biológicos quando adicionados em um SAB, distribuem-se seletivamente entre as duas fases. Esta distribuição das biomoléculas entre as fases aquosas dos SAB é caracterizada por um parâmetro denominado coeficiente de partição ( $K$ ), o qual é definido pela relação entre as concentrações da biomolécula na fase superior e inferior do SAB.

Inúmeras propriedades físico-químicas do sistema e do biopolímero determinam o valor de  $K$ . Os fatores associados à proteína são o tamanho, a conformação (estrutura secundária, terciária e quaternária) e a composição (estrutura primária), presença de carga elétrica e hidrofobicidade. Além disto, propriedades importantes das fases também contribuem nesta distribuição, como a natureza química dos componentes formadores do SAB, a massa molar e concentração dos polímeros, a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica que possam interagir especificamente com sítios da proteína, o pH, a temperatura e a adição de sais inorgânicos (CHAIWUT et al., 2010).

Na Figura 2 são apresentados os principais efeitos que podem ocorrer no SAB: o volume de exclusão e salting out. O efeito de volume de exclusão é ocasionado pelo aumento da massa molar ou concentração do polímero, que ocupa os espaços intersticiais da fase superior ocasionando a diminuição da solubilidade e aumento da viscosidade das proteínas na fase polimérica (RAWDKUEN et al., 2010). O efeito salting out é devido ao aumento da concentração do sal, resultando na diminuição da solubilidade das biomoléculas na fase inferior e consequentemente o aumento da sua partição para a fase superior (BABU *et al.*, 2008).

**Figura 2.** Representação esquemática da partição de biomoléculas no SAB: (●) Polímero; (○) Enzimas/proteínas; (■) Sal; VT: volume da fase de topo; VB: volume da fase de fundo.



Fonte: BABU *et al.*, 2008

O comportamento dos componentes nos SAB's, também está intimamente relacionado com suas propriedades interfaciais. Proteínas, por exemplo, são polímeros de aminoácidos que possuem diferentes características de carga e hidrofobicidade. A posição destes aminoácidos nesta biomolécula determina suas propriedades superficiais, assim como define por qual fase a molécula terá mais afinidade (FORCINITI et al., 1991).

### **3.2.3 Fatores que Influenciam a Formação e Partição em SAB**

Normalmente os fatores, tipo e concentração dos constituintes das fases, pH e temperatura são os mais conhecidos por influenciar a natureza da solução dos SAB's (ALBERTSSON, 1986). Os mecanismos que governam a separação destes materiais é um fenômeno complexo e ainda não estão bem elucidados, no entanto muitos pesquisadores atribuem o coeficiente de partição como resultado das interações entre as biomoléculas com as fases do sistema, as quais podem ser citadas: forças de van de Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, interações entre cargas e interações iônicas (GÜNDÜZ & KORKMAZ, 2000).

#### **3.2.3.1 Massa molar do polímero**

A massa molar exerce grande influência sobre o coeficiente de partição de biomoléculas, pois o aumento da mesma em um sistema de duas fases aquosas para uma determinada composição de fases, ocasiona uma redução da concentração necessária do polímero para que ocorra separação. Isto implica em uma redução do volume de solvente disponível, acarretando um decréscimo da solubilidade das proteínas na fase rica em polímero e conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição (ALBERTSSON, 1986).

O efeito da massa molecular dos polímeros também é influenciado pela massa molar da biomolécula a ser separada. No caso de proteínas por exemplo, aquelas com massas molares mais alta são mais influenciadas pelas mudanças na massa molar dos polímeros que as proteínas com menor massa molar (ASENJO, 1990).

#### **3.2.3.2 Potencial hidrogeniônico**

O pH altera as cargas da superfície das proteínas e conseqüentemente o seu coeficiente de partição (LEHNINGER, 1976). Em geral, quando se diminui o valor do pH dos SAB's, as concentrações necessárias dos constituintes das fases aumentam, deslocando a curva binodal para a direita (YU et al., 2011).

Quanto a partição mudanças nos valores pH podem produzir alterações conformacionais na estrutura das proteínas, causando modificações em seu comportamento de separação. Geralmente, a partição de proteínas desnaturadas é diferente da partição das mesmas proteínas na forma nativa, o que pode ser atribuído não só a maior área superficial da forma desnaturada, mas também ao fato da superfície exposta desta ser muito mais hidrofóbica (ALBERTSSON, 1986). Como regra geral as proteínas carregadas negativamente (nos casos em que o pH é superior ao pI) tem maior afinidade pela fase superior (FORCINITI et al, 1991).

### **3.2.3.3 Temperatura**

A temperatura exerce influência indireta sobre a partição de biomoléculas. A variação da temperatura pode levar a mudanças na viscosidade das fases ou na estrutura dos polímeros deslocando a curva binodal no diagrama de fases (CARVALHO, 2004). A influência deste parâmetro termodinâmico é bastante complexa devido ao seu efeito sob composição das fases em equilíbrio, assim como a alteração da estrutura das biomoléculas a serem particionadas (SARUBBO, 2000). Normalmente em temperaturas abaixo de 20 °C a curva binodal desloca-se em direção às baixas concentrações dos componentes que formam as fases, resultando no aumento do comprimento das linhas de amarração, o que pode variar com o tipo de sistema utilizado (BAMBERGER et al, 1985).

Sistemas PEG e dextrana por exemplo quando submetidos a temperaturas elevadas necessitam de uma maior concentração dos polímeros para que haja a separação das fases, por este motivo este tipo de sistema normalmente é submetido a temperaturas inferiores a ambiente. Entretanto para sistemas PEG / sal o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração do polímero na fase superior, e conseqüentemente, ocorre a redução da concentração do polímero na fase inferior (PESSOA-JUNIOR & KILIKIAN, 2005).

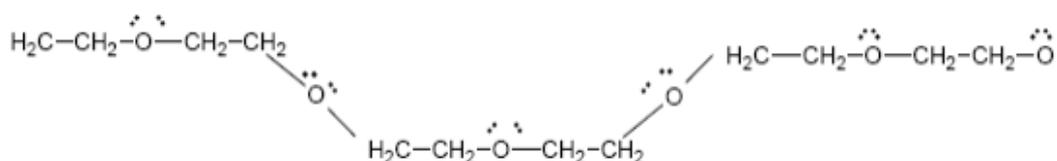
## **3.2.4 Componentes dos Sistemas**

### **3.2.4.1 Polietileno glicol (PEG)**

O polietileno glicol é um dos principais polímeros sintéticos utilizados industrialmente, sendo básico para produção de plásticos, embalagens, fibras, adesivos, tintas e esmaltes (MURRAY & JENKINS, 1994). Este polímero é formado por unidades de óxido de etileno, em que cada unidade contém sítios ativos (oxigênios portadores de pares de elétrons livres), onde são formadas as interações com as moléculas de água, íons e outras substâncias.

A alta flexibilidade da cadeia principal e da ligação com as moléculas de água faz com que a molécula de PEG aja como se fosse cinco a 10 vezes maior do que uma proteína solúvel de peso molecular semelhante, razão pela qual o mesmo têm a capacidade de excluir proteínas e células de superfície e evitar a degradação de células de mamíferos e enzimas (ROBERTS et al., 2002). Na figura 3 é apresentada a estrutura plana parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com outras substâncias.

**Figura 3.** Representação planar parcial da molécula de PEG com os sítios disponíveis para as interações com os demais componentes do sistema.



Em aplicações biotecnológicas, a utilização do PEG é de grande interesse, principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Outro fator importante é a sua alta biodegradabilidade e atoxicidade, sendo portanto o seu descarte não problemático para o meio ambiente (SILVA, 2007). Estes fatores possivelmente podem explicar o porquê o PEG é altamente utilizado na purificação de biomoléculas com sistemas aquosos bifásicos.

#### 3.2.4.2 Líquido Iônico

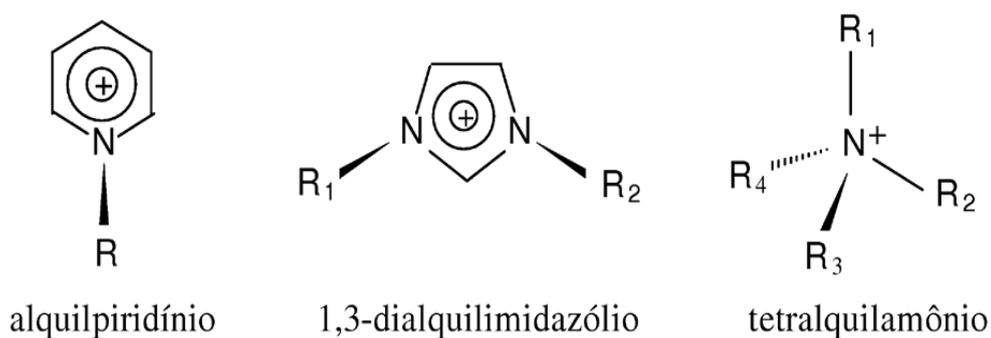
Os líquidos iônicos são compostos iônicos que pertencem ao grupo de sais fundidos, os quais são geralmente formados por grandes cátions orgânicos e ânions orgânicos ou inorgânicos, o que lhes permite permanecer líquidos próximo da temperatura ambiente. Ao contrário de líquidos moleculares, a natureza iônica destes líquidos resulta em uma combinação única de propriedades, como a estabilidade térmica elevada, alta condutividade iônica, pressão de vapor desprezível e não-inflamabilidade. Estas propriedades têm determinado o seu elevado potencial para ser explorado como "solventes verdes" (EARLE et al., 2006; ROGERS & SEDDON, 2003). Além disso, o grande número de possíveis combinações entre cátions e ânions permite a possibilidade de ajuste dos líquidos iônicos, podendo desta forma ser projetado para uma determinada aplicação ou para mostrar um conjunto específico de propriedades intrínsecas (PLECHKOVA & SEDDON, 2008).

A não volatilidade, associados a sua alta estabilidade, grande variedade de líquidos

e boa solvatação, têm tornado os mesmos atraentes como solventes para reações químicas e separações. Com esses recursos exclusivos, os LIs ganharam maior atenção na investigação de meios acadêmicos e industriais, sendo atualmente sugeridos como alternativas interessantes para solventes orgânicos voláteis e não-benignos (ZHAO et al., 2005).

Na Figura 4 e Tabela 1 estão apresentados alguns cátions e ânions comumente utilizados na formação dos LI.

**Figura 4.** Estruturas de cátions em LI (R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> = cadeias alquílicas).



**Tabela 1.** Nome e abreviações dos ânions presentes em LI.

Ânions	Nome	Abreviação
Cl <sup>-</sup>	Cloreto	Cl
Br <sup>-</sup>	Brometo	Br
BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Tetrafluorborato	BF <sub>4</sub>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato	NO <sub>3</sub>
AlCl <sub>4</sub> <sup>-</sup> / Al <sub>2</sub> Cl <sub>7</sub> <sup>-</sup>	Cloroaluminato	AlCl <sub>4</sub> / Al <sub>2</sub> Cl <sub>7</sub>
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Acetato	Ac

Fonte: FRANZOI et al., 2011.

Gutowski et al. (2003) foram os primeiros a mostrar que soluções aquosas de LIs à base de nitrogênio podem formar SAB na presença de soluções aquosas de alguns sais inorgânicos, tais como fosfato de potássio. Desde então, foram investigadas as propriedades de equilíbrio de sistemas compostos por LIs, para o desenvolvimento de procedimentos de isolamento e extração específica (LOUROS et al., 2010). Esses novos SAB's também têm muitas vantagens oferecidas pelo uso de LIs, tais como baixa viscosidade, pouca formação de emulsão, não há necessidade do uso de solvente orgânico volátil, separação de fases rápida, extração de alta eficiência e ambiente biocompatível.

### 3.2.4.3 Sal

Os sais comumente utilizados para formação dos SAB's são o Sulfato de Sódio, Sulfato de Lítio e Fosfato de Potássio monobásico e bibásico. O sulfato de Lítio ( $\text{LiSO}_4$ ), possui solubilidade de  $356,4 \text{ g L}^{-1}$ , em água a  $18 \text{ }^\circ\text{C}$ , e é um componente muito utilizado na detecção de radiação a laser, como um elemento ótico de transmissão de imagens, na fabricação de cristais de alta resistência e na indústria farmacêutica. Pode ser recuperado de soluções através da adição de agentes precipitantes, sendo esta uma alternativa para a técnica de cristalização por congelamento e vaporização (TABOADA, 2002).

O sulfato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) é um sal branco, cristalino, com solubilidade em água de  $168,6 \text{ g L}^{-1}$  a  $18 \text{ }^\circ\text{C}$ . Apresenta pH entre 5,2 e 9,2 a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  quando em solução de  $50 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de sódio em água (MERCK, 2014).

O fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) é branco e granulado. Apresenta solubilidade em água igual a  $222 \text{ g L}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ . Possui o pH entre 4,4 e 4,7 quando em solução de  $50 \text{ g L}^{-1}$  de água. O fosfato de potássio bibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) também possui a cor branca, é higroscópico e solúvel em água. A solução aquosa formada com este sal é ligeiramente alcalina, sendo o pH situado em torno 8,7 e 9,3 quando em solução de  $50 \text{ g L}^{-1}$  de água. (SIGMA-ALDRICH, 2001).

### 3.2.5 Aplicação dos Sistemas Aquosos Bifásicos na Separação de Proteínas

Desde a sua descoberta os SAB's têm sido extensamente estudados por centros de estudos de purificação de biomoléculas, devido suas diversas características positivas quanto a preservação das características estruturais destes materiais. A primeira aplicação de SAB's para separação de materiais de interesse bioquímico, foi sugerida de fato em 1956, sendo que estas aplicações foram descobertas pelo sueco Per Ake Albertsson. Ele observou que as biopartículas extraídas apresentavam uma grande estabilidade e isso estava associado ao fato de que o alto teor de água presente nas fases simulava o ambiente de origem das biopartículas (MARTINS, 2008).

Os trabalhos de Albertsson despertaram o interesse de muitos cientistas em todo mundo e isto pode ser comprovado pelo grande número de publicações utilizando sistemas aquosos bifásicos para extração de proteínas, aminoácidos, bactérias, vírus e uma infinidade de materiais de interesse bioquímico. Na tabela 2 são apresentadas algumas aplicações de extração e os SAB's utilizados.

**Tabela 2.** Sistemas aquosos bifásicos utilizados na separação de biomoléculas.

Biomolécula	Sistema
Pululanase	PEG-Dextrana
Formaldeído desidrogenase	PEG-Dextrana
Fumarase	PEG-fosfato
$\beta$ -glucosidade	PEG-fosfato
BSA	[C <sub>4</sub> mim]Cl + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Testosterona e epitestosterona	[C <sub>4</sub> mim]Cl/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

(COIMBRA, 2003; PIGNATA, 2014).

### 3.3 Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação no estado sólido pode ser definida como o processo que se refere à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI et al., 2001).

Esta técnica tem sido utilizada há 4000 anos na produção de alimentos. O primeiro produto desenvolvido utilizando este processo surgiu quando os chineses enfrentaram problemas de limitação de proteína e baixa digestibilidade das matérias-primas, semelhantes aos que temos enfrentado atualmente. A FES também está envolvida em uma série de processos microbianos bem conhecidos, como a compostagem, a produção de silagem e o cultivo de cogumelos. Muitos alimentos consumidos nos EUA, como alguns tipos de queijos e pães, e na Ásia, como missô, tempê e shoyu, são produzidos através de fermentação em estado sólido. Na Tabela 3 são mostrados alguns exemplos de produtos obtidos por FES.

**Tabela 3.** Produtos obtidos por Fermentação em Estado Sólido

Produto	Microorganismo	Materiais
Natto	<i>Bacillus natto</i>	Soja
Tempê	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Soja
Queijo	<i>Penicillium roqueforti</i>	Queijo
Saquê	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. kawachii</i>	Arroz, cevada
Missô	<i>A. oryzae</i>	Soja, arroz
Shoyu	<i>A. sojae</i>	Soja, trigo

Fonte: RUTZ, et al 2008

LONSANE & GHILDYAL (1992), em uma extensiva revisão sobre a produção de enzimas por FES, relatam a produção em escala industrial de alguns tipos de enzima, entre as quais pectinases,  $\alpha$ -amilases e glucoamilases. Já os relatos de produção em escala de laboratório são muitos e incluem além das já citadas, as proteases, celulasas, lipases, catalases e xilanases.

### **3.3.1 Microrganismos empregados na Fermentação em Estado Sólido**

Os fungos são os microrganismos mais utilizados nos processos de fermentação em estado sólido. Isto deve-se à grande capacidade dos mesmos em crescer na ausência de água livre, além da facilidade de adaptação e manipulação dos mesmos (COSTA, 1996). Os microrganismos que crescem bem nas fermentações sólidas são geralmente organismos que podem tolerar valores de atividade de água ( $a_w$  ou  $a_a$ ) baixos os quais possuem respostas distintas quando submetidos a esse estresse.

Os microrganismos utilizados na FES podem ser qualificados em dois grandes grupos: os que fermentam naturalmente ou selvagens, e os de cultura pura (individuais ou consorciados). A compostagem e a ensilagem são processos que utilizam a microflora natural. As culturas puras, conhecidas desde a Antiguidade, são utilizadas nos processos industriais para propiciar o controle da utilização do substrato e a formação do produto final (SOCCOL, 1994).

A seleção adequada do tipo microrganismo é um dos mais importantes critérios quando se trabalha com fermentação sólida. PANDEY (1992), apresenta como exemplo o fato de que uma cultura de *Aspergillus niger* pode produzir cerca de vinte tipos diferentes de enzimas; assim como a enzima  $\alpha$ -amilase pode ser obtida a partir do cultivo de mais de vinte e oito cepas distintas.

### **3.3.2 Fungos Filamentosos**

Os fungos são microrganismos multicelulares, filamentosos, de aspecto algodinoso, que se apresentam em várias cores (branco, verde claro, rosa, cinza escuro, etc.); as células são eucarióticas e a reprodução pode ser por meio de esporos. Segundo NEDER (1992), em condições favoráveis, o esporo absorve água, aumenta de tamanho e germina emitindo um tubo germinal, que se alonga por crescimento da extremidade distal e se tornam filamentosos longos que se ramificam. Cada filamento é chamado hifa, sendo que um conjunto de hifas é chamado de micélio. Ainda segundo o autor, ao continuar o crescimento, as hifas podem ser divididas em uma cadeia de células pela formação de paredes transversais ou septos.

### 3.3.2.1 Gênero *Aspergillus*

Espécies do gênero *Aspergillus* formam o grupo mais importante de microrganismos utilizados para a produção de enzimas empregadas na indústria alimentícia (ZANGIROLAMI, 2000). Estes microrganismos crescem bem em concentrações elevadas de açúcar e sal, portanto em muitos alimentos com baixo teor de atividade de água. Os conídios desse gênero de fungo possuem uma coloração esverdeada e seus ascósporos se encontram dentro de ascas cujos peritécios têm cor que varia de amarelo a avermelhado (FRAZIER e WESTHOFF, 1993).

O gênero *Aspergillus* compreende mais de 100 espécies. Seu micélio é septado e sua reprodução assexuada. Algumas espécies, como o *A. glaucus* e *A. repens*, são importantes agentes de deterioração de alimentos. Outras espécies, como o *A. orizae* e *A. soyae*, são utilizadas na produção de alimentos.

O uso do *A. niger* apresenta algumas vantagens como facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos. PANDEY et al (1999) relataram que o *A. niger* pode produzir 19 tipos de enzimas, tais como celulases, xilanase, poligalacturonase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -amilase, glucoamilase,  $\beta$ -glucosidase, protease ácida entre outras. A enzima que será produzida depende do tipo de substrato da fermentação.

### 3.3.3 Matérias-primas empregadas na FES

A seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. No processo de fermentação sólida, os substratos são constituídos basicamente, de polímeros orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano. Comumente utilizam-se produtos ou subprodutos oriundos da agroindústria, que tem como principal característica servir de matriz sólida e fornecer carbono e fontes de energia para o desenvolvimento do microrganismo de interesse. São exemplos: polpa de café, farelo de cereais, palhas, bagaço de cana, cascas de frutas processadas, batata, farinha de cereais, mandioca, entre outros (PARIS, 2008).

Outra característica comum aos substratos utilizados em FES é sua necessidade de sofrer um pré-tratamento para adequar-se às condições necessárias ao crescimento e à produção de metabólitos pelo microrganismo. SCHMIDELL et al. (2001) relatam alguns destes pré-tratamentos utilizados para a realização do processo de FES, os quais são: moagem e peneiramento, visando a adequação da granulometria; Suplementação de

nutrientes e correção de pH; embebição para regular o teor e umidade inicial do processo; adição de agente sequestrante, com o objetivo de retirar íons metálicos do meio; esterilização do substrato visando eliminar microrganismos competidores, entre outros.

### **3.3.3.1 Resíduo de mandioca**

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*), originária da América do Sul, é uma planta bastante cultivada em países de clima tropical. Segundo PANDEY et al (2000) a cultura da mandioca é a sexta cultura mais importante do mundo e é um componente básico da alimentação de mais 700 milhões pessoas.

Durante o seu processamento é produzida uma grande quantidade de resíduo, sendo este constituído de casca, entrecasca e pontas, os quais apresentam elevado teor de umidade (85%). A casca de mandioca desidratada apresenta 58,1% de amido, 3,4% de proteína bruta e 28,6% de fibras (MARTINS et al., 2000). A qualidade dos resíduos é determinada por fatores como cultivar, idade da planta, tempo após a colheita, tipo e regulação de equipamento industrial, etc. Em média de tudo que é processado 47% torna-se resíduo, o que leva a poluição da água e do solo e também a poluição visual gerada através das montanhas de resíduos que são formadas (CEREDA, 1994). Desta forma estes resíduos podem ser transformados em um importante subproduto para ser utilizado no processo de fermentação no estado sólido, visando a produção dos mais diversificados produtos.

### **3.3.4 Enzimas amilolíticas**

As amilases, uma classe de hidrolases, são vastamente distribuídas na natureza. Estas agem especificamente sobre as ligações glicosídicas do amido, atuando na digestão, como as amilases salivar e pancreática, na germinação de grãos e no crescimento microbiano (HIZUKURI, 1996). Existem diversos tipos de enzimas amilolíticas e elas têm utilizações em vários tipos de indústrias como a de papel, têxtil, panificação, produção de xaropes, álcool, bebidas, dentre outras.

As  $\alpha$ -amilases são encontradas em animais, plantas e microrganismos. As  $\beta$ -amilases são abundantemente encontradas em plantas, especialmente em trigo, soja, batata doce e algumas culturas de microrganismos (*Bacillus polymyxa*, *B. cereus* e *B. megaterium*) (HIZUKURI, 1996).

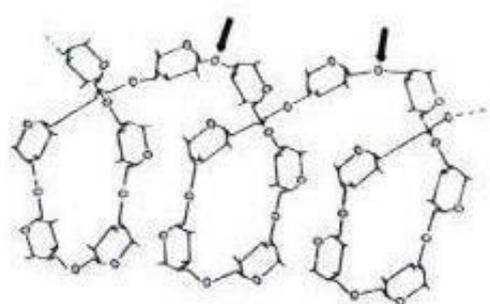
A amiloglicosidase também conhecida como glucoamilase ou  $\gamma$  amilase, é uma exoenzima que catalisa a reação de hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 das extremidades não redutoras do amido e de outros polissacarídeos transformando-os em glicose (BOYER,

1971). Esta é em sua maior parte produzida por espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus*, sendo que, dentre essas, a amiloglicosidase de *Aspergillus* é a mais termoestável. A amiloglicosidase catalisa eficientemente a hidrólise do amido dentro de uma faixa estreita de temperatura (SANTOS, 2006). Moreira citado por SANTOS (2006), relatam em seu trabalho que as enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase parcialmente purificadas exibiram máxima atividade na faixa de pH entre 4,5 a 6,0, apresentando grande estabilidade sob condições ácidas (pH 4,0 a 7,0). A máxima atividade ocorreu em temperaturas entre 50°C e 60°C, apresentando estabilidade por mais de 10 horas à 55°C.

### 3.3.4.1 $\alpha$ -Amilase

A  $\alpha$ -amilase é definida como (1,4- $\alpha$ -glucan-4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.1.), sendo esta uma enzima que quebra as ligações  $\alpha(1,4)$  dos polissacarídeos que possuem três ou mais unidades de D-glucose em união. 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, como apresentado na Figura 5. As ligações  $\alpha$ -1,6 da amilopectina não são hidrolisadas pela amilase, sendo o produto final do ataque da amilopectina pela amilase moléculas de isomaltose (BRUCHMANN, 1980).

**Figura 5.** Representação do ataque inicial da  $\alpha$ -amilase sobre as cadeias helicoidais  $\alpha$ -1,4-glucan da amilose e da amilopectina.



Fonte: BRUCHMANN (1980)

A massa molar da  $\alpha$ -amilase varia de 10 a 210 KDa, dependendo da sua origem. As  $\alpha$ -amilases microbianas apresentam peso molecular entre 50 e 60 KDa, sendo que as  $\alpha$ -amilases bacterianas apresentam variação de 28 a 78 KDa e as  $\alpha$ -amilases fúngicas de 41 a 69 KDa (Pandey citado por SPIER, 2005).

Segundo SPIER (2005), o pH ótimo para a  $\alpha$ -amilase fúngica está entre 5,0 e 6,0.

Possui caráter ácido e é solúvel em água. Sua atividade diminui rapidamente em temperaturas acima de 50°C, mas na presença de um excesso de íons cálcio a desativação pode ser diminuída.

#### 4 REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, P.A. **Aqueous Polymer-phase Systems Partition of Cell Particles and Macromolecules**, 3rd edition, Wiley, New York, 1986.
- ALCÂNTARA, L. A. P.; AMARAL, I. V.; BONOMO, R. C. F.; SILVA, L. H. M.; SILVA, M. C. H.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Partitioning of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin from cheese whey in aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycol) and sodium polyacrylate. **Food Bioproducts Process**, v. 92, p. 409-415, 2014.
- ASENJO, J. A. **Separation Processes in Biotechnology**. Marcell Dekker Inc., New York, 1990.
- BABU, B. R.; RASTOGI, N.K.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**. v. 47, p. 83-89, 2008.
- BAMBERGER, S.; BROOKS, D.E.; SHARP, K.A.; VAN ALSTINE, J.M.; WEBBER, T.J. Preparation of phase system and measurement of their physicochemical properties. In; BROOKS, D.E.; WALTER, H.; FISCHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase system**. Academic Press, Orlando, 1985.
- BOYER, P. D. **The Enzymes. Hydrolysis: Sulfate esters, carboxyl esters, glycosides**. Volume 5. Terceira Edição. Academic Press. New York and London. 1971.
- BRUCHMANN, E. **Bioquímica técnica**. Zaragoza: Editorial Acribia, p.233, 1980.
- CARVALHO, C. **Estudo de Equilíbrio de Fases para Sistemas Aquosos Bifásicos Compostos por Polietileno Glicol, Sais e Água**. Viçosa, 2004. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV).
- CEREDA, M. P. Caracterização dos Resíduos da Industrialização da mandioca. In: CEREDA, M. P. **Industrialização da Mandioca no Brasil**. Paulicélia, São Paulo, SP, p. 11-50, 1994.
- CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S.; BENJAKUL, S. Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol-salts biphasic system. **Process Biochemistry**. 45, 1148-55. 2010.
- COIMBRA, J. S. R., GIRALDO-ZUÑIGA, A. D., MINIM, L.A., MEIRELLES, A.J.A. Uso

- de Sistemas Aquosos Bifásicos na Extração Líquido-Líquido Editora UFV, Viçosa, 2003.
- COIMBRA, J. S. R.; THOEMMES, J.; KULA, M. R; SILVA, L. H. M.; MEIRELLES, A. J. A. Separation of  $\beta$ -lactoglobulin from cheese whey using an aqueous two-phase system. **Arquivos Biologia e Tecnologia** v.40, p. 189-196, 1995.
- COIMBRA, J.S. R.; TEIXEIRA, J. **Engineering Aspects of Milk and Dairy Products**. Boca-Raton, CRC Press, 2009.
- COSTA, J.A.V. **Estudo da Produção de Amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas –UNICAMP, p.203, 1996
- DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas, **Química Nova**. v. 29, p.1345-1351, 2006.
- DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. de O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em Estado Sólido. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 542 p.
- EARLE, M.J., ESPERANCA, J., GILEA, M.A., LOPES, J.N.C., REBELO, L.P.N., MAGEE, J.W., SEDDON, K.R., AND WIDEGREN, J.A., **Nature**, v. 439, p.831-834, 2006.
- FERREIRA, L.A.; TEIXEIRA, J.A.; MIKHEEVA, L.M.; CHAIT, A. e ZASLAVSKY, B.Y. Effect of salt additives on partition of nonionic solutes in aqueous PEG\_sodium sulfate two-phase system. **Jornal of Chromatography A**, v.1218, p.5031-5039, 2011.
- FORCINITI, D.; HALL, C. K. Influence of polymer molecular weight in temperature on phase composition in ATPS. **Fluid Phase Equilibria**, v. 61, p. 243-262, 1991.
- FRANZOI, A.C.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; MOCCELINI, S.K.; FERNANDES, S.C.; VIEIRA, I.C. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v.34, n.6, p.1042-1050, 2011.
- FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos: microorganismos importantes em microbiologia de los alimentos**. Zaragoza Acribia, p.31-34, 1993.

- FREIRE, M.G.; NEVES, C.; SILVA, A.M.S.; SANTOS, L. M. N. B. F.; MARRUCHO, I.M.; REBELO, L.P.N.; SHAH, J.K.; MAGINN, E.J. and COUTINHO, J.A.P. H-1 NMR and Molecular Dynamics Evidence for an Unexpected Interaction on the Origin of Salting-In/Salting-Out Phenomena. **Journal of Physical Chemistry B**, 114(5): p. 2004-2014.
- GÜNDÜZ, U.; KORKMAZ, K. Bovine serum albumin partitioning in aqueous two-phase system: Effect of pH and sodium chloride concentration. **Journal of Chromatography B**, v.743, p.255-258, 2000.
- GUTOWSKI, K.E.; BROKER, G.A.; WILLAUER, H.D.; HUDDLESTON, J.G.; SWATLOSKI, R.P.; HOLBREY, J.D.; ROGERS, R.D. Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: Aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations. **Journal of the American Chemical Society**, v.125, n.22, p.6632-6633, 2003.
- HIZUKURI, S. Starch: analytical aspects. In: Eliasson, A.-C., Editor, 1996. **Carbohydrates in Food**. Marcel Dekker, New York, p. 347–429, 1996.
- KABIRI-BADR, M. and CABEZAS JR., H. A thermodynamic model for the phase behavior of salt-polymer aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v.115, n.2, p. 39-58, 1996.
- LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, p.126-145, 1976.
- LI, S.H.; HE, C.Y.; LIU, H.W.; LI, K. and LIU, F. Ionic liquid-based aqueous two-phase system, a sample pretreatment procedure prior to high-performance liquid chromatography of opium alkaloids. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.826, n.1-2, p.58-62, 2005.
- LONSANE, B.K. E GHILDYAL, N.P. Exoenzymes In: Solid Substrate Cultivation. **Elsevier Applied Scienc**. London, 1992.
- LOUROS, C.L.S.; CLÁUDIO, A.F.M; NEVES, C.M.S.S.; FREIRE, M.G.; MARRUCHO, I.M.; PAULY, J.; and COUTINHO, J.A.P. Extraction of Biomolecules Using Phosphonium-Based Ionic Liquids + K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> Aqueous Biphasic Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, n.4, p.1777-1791, 2010.
- MAGESTE, A. B.; SENRA, T. D. A.; SILVA, M. C. H.; BONOMO, R. C. F.; SILVA, L. H. M. Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous

- biphasic systems formed by polymers and organic salts. **Separation and Purification Technology**, v.98, p. 69-77, 2012.
- MARTINS, A.S.; ALCALDE, C.R.; ZEOULA, L.M.; MARQUES, J.A. Desempenho de novilhas alimentadas com rações contendo milho ou casca de mandioca como fonte energética e farelo de algodão ou levedura como fonte protéica. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29, p.278-87, 2000.
- MARTINS, J. P. Partição de cianocomplexos em Sistemas Aquosos Bifásicos com diferentes balanços hidrofílico-lipofílicos. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 74 p., 2008.
- MATIASSON, B.; LING, T. G. I. Extraction in aqueous for biotechnology. IN: VENAL, N.S., HUDSON, M.J. **Biochemistry and Biotechnology**. p. 270-292, 1897.
- MERCK. Disponível em: <http://chemdat.merck>, julho, 2014.
- MITCHELL, D. A., LONSANE, B. K. Solid Substrate Cultivation. **Elsevier Applied Science**, London, p.1-16, 1992.
- MURRAY, J. N.; JENKINS, A. D. **Properties of liquids and solutions**, 2 ed. New York: J. Wiley, 303, 1994.
- NEDER, R.N. **Microbiologia: Manual de Laboratório**. São Paulo: Nobel S.A., 1992. p.46-54.
- NEVES, C.; VENTURA, S.P.M.; FREIRE, M.G.; MARRUCHO, I.M. and COUTINHO, J.A.P. Evaluation of Cation Influence on the Formation and Extraction Capability of Ionic-Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems. **Journal of Physical Chemistry B**, v.113, n.15, p.5194-5199, 2009.
- PANDEY, A. Recent Process Development in Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**, v.27, p. 109-117, 1992.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. **Solid State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes**. In: Current Science, v. 77. n.1, p. 149-161, 1999.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p.1153-1169, 2000.

- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potencial of agro-industrial residue II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, V. 74, p. 81-87, 2000.
- PARIS, L. D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional**. Dissertação (Engenharia Química Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Toledo-PR, 127 p., 2008.
- PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Editora Manole Ltda, São Paulo, 2005.
- PIGNATA, M.C. **Estudo do equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos compostos por líquido iônico, sal e água**. Itapetinga – BA: UESB, 2014. 60p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos).
- PLECHKOVA, N.V.; SEDDON, K.R. Applications of ionic liquids in the chemical industry **Chemical Society Reviews**, v.37, p.123-150, 2008.
- RAWDKUEN, S.; PINTATHONG, P.; CHAIWUT, P.e BENJAKUL, S. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. **Food and Bioproducts Processing**. doi: 10.1016. 2010.
- ROBERTS, M.J.; BENTLEY, M.D.; HARRIS, J.M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 54, p. 459–476, 2002.
- ROGERS, R. D.; BOND, A. H.; BAUER C. B.; ZHANG, J.; GRIFFIN, S. T. Metal ion separations in polyethylene glycol-based aqueous biphasic systems: correlation of partitioning behavior with available thermodynamic hydration data. **Journal Chromatografia. B**, v. 680, p. 221-229, 1996.
- ROGERS, R. D.; BOND, A. H.; BAUER C. B.; ZHANG, J.; GRIFFIN, S. T. **Journal Chromatografia. B**, 1996.
- ROGERS, R.D.; SEDDON, K.R. Ionic Liquids--Solvents of the Future. **Science**, v.302, p. 792-793, 2003.
- RUTZ, F.; TORERO, A.; FILER, K. Fermentação em estado sólido: a evolução na produção de enzimas. **Reviews Aveworld**, v. 29, 2008.
- SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-pase

- systems: experiments and predictions. **Fluid Phase Equilibria**. 187-188. 2001.
- SANTANA, R. M., GONÇALVES, Z. S., BONOMO, R. C. F., FRANCO, M. Produção de amiloglucosidade utilizando como substrato a palma forrageira. **Revista Caatinga**, v.25, p.188–193, 2012.
- SANTOS, G. **Utilização de resíduos agroindustriais para produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus awamori***. 2006. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual e Ponta Grossa. Ponta Grossa, PR. 81p, 2006.
- SARUBBO, L. A. **Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de Campinas/UNICAMP, Campinas, 174 p., 2000.
- SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL W.; BORZANI, W.B.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Coord.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. 1. ed., v. 2 São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap. 2. p. 5-18.
- SIGMA-ALDRICH. Catálogo de 2001.
- SILVA, C. A. S. **Partição do glicomacropéptido usando sistemas aquosos bifásicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 57 p., 2007.
- SOCCOL, C. R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEAULT, J.M. Breeding and Growth of *Rhizopus* in Raw Cassava By Solid State Fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 41. 1994. p. 330-336.
- SOUZA JR, E. C, COIMBRA, J. S. R.; OLIVEIRA, E. B.; BONOMO, R. C. F. Recovery of casein-derived peptides with in vitro inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE) using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, 973, p. 84–88, 2014.
- SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase por fermentação no Estado sólido**. 2005. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR. 2005. 157p.
- SUBRAMANIAM, G. **Bioseparation and Bioprocessing**. New York, v.2, 1998

- TABOADA, M. E. Liquid-liquid and solid-liquid equilibrium of the 1-propanol+lithium + water system at 25, 35 and 45 °C. **Fluid Phase Equilibria**, v. 5111, p, 1-11. 2002.
- WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. Segunda Edição. Dekker. 1994.
- YU, C.; HAN, J.; WANG, Y.; YAN, Y.; HU, S.; LI, Y.; ZHAO, X. Liquid-liquid equilibrium composed of imidazolium tetrafluoroborate ionic liquids + sodium carbonate aqueous two-phase systems and correlation at(288.15, 298.15, and 308.15) K. **Thermochimica Acta**, v.523, p.221-226, 2011.
- ZANGIROLAMI, T. C. The influence of oxygen on growth and enzyme production in continuous cultures of *A. oryzae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 53, n. 3, p. 278-281, 2000.
- ZHAO, H.; XIA, S.Q.; MA, P.S. Use of ionic liquids as 'green' solvents for extractions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.80, n.10, p.1089-1096, 2005.

# CAPÍTULO 2

---

## ARTIGO

**Otimização da produção da enzima  $\alpha$ -amilase por fermentação em estado sólido do resíduo mandioca.**

**Optimization of the production of  $\alpha$ -amylase enzyme by solid state fermentation of cassava residue**

---

## RESUMO

Este trabalho analisa os efeitos do teor de umidade e do tempo de fermentação sobre a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase, produzidas durante a fermentação em estado sólido do resíduo de mandioca. Para determinar as melhores condições de produção da enzima, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR 2<sup>2</sup>). As fermentações foram conduzidas em incubadora bacteriológica a 30°C e a  $\alpha$ -amilase produzida, quantificada através da degradação da solução de amido solúvel, sendo os açúcares redutores produzidos quantificados através da reação com ácido dinitrosalicílico. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, onde obteve-se uma equação polinomial de segunda ordem com  $R^2 = 0,929$ . A partir desta equação foram determinadas as condições ótimas para a produção da enzima, observando-se que o ponto de máximo foi para 35 horas de fermentação e teor de água de 45,7%. Durante o processo fermentativo o fungo sintetizou e excretou a enzima sem a necessidade de qualquer outro indutor além do resíduo de mandioca, confirmando assim a viabilidade da utilização do mesmo como matéria-prima para a fermentação no estado sólido.

**PALAVRAS CHAVES:** *Aspergillus Níger*, resíduo, biotransformação.

## ABSTRACT

This paper analyzes the effects of moisture content and fermentation time on the activity of  $\alpha$ -amylase enzyme, produced during solid-state fermentation of cassava residue. To determine the best condition of enzyme production, there was a rotational central composite design (CCRD 2<sup>2</sup>). Fermentations were conducted in bacteriological incubator at 30 ° C and  $\alpha$ -amylase produced, quantified by degradation of soluble starch solution and the reducing sugars produced quantified by reaction with dinitrosalicylic acid. The results were subjected to statistical analysis, where we obtained a polynomial equation of second order with  $R^2 = 0.929$ . From this equation were determined the optimal conditions for the production of the enzyme, noting that the maximum point was for 35 hours of fermentation and 45.7% water content. During the fermentation process, the yeast enzyme synthesized and excreted without any addition of inducer cassava residue thus confirming the feasibility of using the same as raw material for solid state fermentation.

**KEYWORDS:** *Aspergillus Niger*, residue, biotransformation.

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de resíduos e subprodutos são inerentes a todos os setores produtivos. Com a melhoria da consciência ecológica até o final do século 20, tornou-se claro que o maior desafio da humanidade para as próximas décadas será equilibrar a produção de bens e serviços com o crescimento econômico, a igualdade social e sustentabilidade ambiental (GALEMBECK, et al., 2009; PELIZER, et al., 2007). Assim os avanços na biotecnologia industrial têm oferecido oportunidades potenciais para aproveitamento econômico destes resíduos.

Dentre as várias possibilidades para utilização dos mesmos, a Fermentação em

Estado Sólido (FES) têm se destacado como uma tecnologia para a produção de enzimas e outras substâncias de interesse industrial. Esta tecnologia é utilizada há bastante tempo na obtenção de produtos de grande importância comercial, principalmente no Oriente (PANDEY, 2000). A FES é uma técnica que consiste no crescimento de microrganismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas, as quais deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento e a atividade metabólica do microrganismo. (THOMAS, et al., 2013).

A seleção adequada do substrato é de fundamental importância para o sucesso de qualquer tipo de fermentação. No processo de fermentação sólida, os substratos são constituídos basicamente, de polímeros orgânicos que se caracterizam pela insolubilidade em água e pela capacidade de promover o crescimento microbiano. Dentre estes, o resíduo da mandioca representa uma parcela significativa dos resíduos agroindústrias, sendo portanto um importante subproduto para ser empregado na FES. Segundo PANDEY, et al. (2007), este é um material fibroso que contém cerca de 30-50% de amido em base seca. Esta informação é que o torna atraente como substrato para ser empregado na FES, uma vez que o microrganismo irá produzir seletivamente as enzimas necessárias para degradá-lo.

Na fermentação em estado sólido, os fungos filamentosos representam os microrganismos mais promissores, pela variedade de produtos de seu metabolismo e devido ao desenvolvimento das hifas que permite aos mesmos maior penetração no substrato e nas regiões porosas entre partículas da matéria-prima. Dentre estes, o *Aspergillus* representam o gênero de maior importância na bioconversão de resíduos, sendo capazes de excretar mais de 20 diferentes tipos de enzimas durante o seu crescimento (SILVEIRA et al., 2007). Várias enzimas extracelulares estão comercialmente disponíveis e vastamente utilizadas na indústria. Entre elas está a  $\alpha$ -amilase, a qual está envolvida na assimilação de materiais a base de amido (PENGTHAMKEERATI et al., 2011).

A  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D glucanohidrolase glucana, EC 3.2.1.1) é uma das enzimas mais importante para as indústrias de amido, alimentos, papel, têxteis, panificação e fabricação de cerveja (GUPTA et al., 2003). Pertence à família das hidrolases, que cliva aleatoriamente as ligações  $\alpha$ -1,4 entre unidades adjacentes de glicose no amido e polissacáridos relacionados para produzir principalmente maltose e maltodextrinas (SINGH & KAYASTHA 2014).

A necessidade de otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempos operacionais têm levado a uma enorme busca por técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos. A metodologia do planejamento composto central rotacional (DCCR) consiste em um grupo de procedimentos, estatísticos e matemáticos, que podem ser usados

no estudo das inter-relações entre uma ou mais respostas com inúmeros fatores. É uma técnica estatística baseada no emprego de planejamentos fatoriais, introduzida na década de 50, que, desde então, tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (BARROS NETO & SCARMINIO, 1996).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo otimizar a produção da enzima  $\alpha$ -amilase por fermentação em estado sólido do resíduo de mandioca utilizando o fungo filamentosso *Aspergillus Niger*.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Condições de cultivo do Microrganismos**

O fungo *Aspergillus niger* utilizado foi fornecido pelo Laboratório de Resíduos Agroindustriais (LABRA-UESB). O microrganismo foi inoculados em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) e incubado a 30°C em estufa bacteriológica (SL 222; Solab) durante 7 dias. Os esporos foram extraídos com uma solução 0,01% v/v de Tween 80 (Vetec, Brasil) e quantificados com o auxílio da câmara de Neubauer e microscópio binocular (L1000; Bioval).

### **2.2 Preparação das amostras**

O resíduo de mandioca utilizado no experimento foi obtido no comércio local de Itapetinga-Ba. Após serem lavados e higienizados, estes foram secos a 65 °C em estufa (SL 102; Solab) até atingir uma de umidade de 8%. Após a secagem, o resíduo foi triturado em triturador tipo Willey (EDB-5; DeLeo, POA) para a obtenção de partículas com 2 mm. Posteriormente, estes foram armazenados em sacos de polietileno de baixa densidade até o momento de serem utilizados.

### **2.3 Fermentação em estado sólido**

Dez gramas do resíduo previamente seco foram acondicionados em erlenmeyer de 125 mL e logo após autoclavados a 120°C por 15 minutos. Foi inoculado o volume de solução de esporos necessário para se atingir uma concentração de  $10^7$  esporos por grama de resíduo (TUNG et al., 2004). Inicialmente foi realizado um estudo para determinar as variáveis significativas no processo de produção da  $\alpha$ -amilase, sendo estudado o tempo de fermentação, a temperatura e a umidade. Foi observado nesse estudo preliminar que a variável temperatura não exerce influência na produção desta enzima. Desta forma com o objetivo de determinar as condições ótimas para produção da  $\alpha$ -amilase, foi realizado um

delineamento composto central rotacional (DCCR 2<sup>2</sup>) para as variáveis independentes: Umidade (U) e tempo de fermentação (T) conforme apresentado na Tabela 1. Foram realizados 11 ensaios, sendo 4 fatoriais (combinações entre os níveis -1 e +1), 4 axiais e 1 central com três repetições (Tabela 1).

**Tabela 1.** Níveis e variáveis estudadas no (DCCR 2<sup>2</sup>) para avaliação da umidade (U) e tempo de fermentação (TF) ótimos na produção da  $\alpha$ -amilase.

Variáveis	Níveis				
	-1,414	-1	0	1	1,414
TF (horas)	10,5	18	36	54	61,5
U (%)	34,3	38	47	56	59,7

#### 2.4 Preparo do extrato enzimático

Finalizado o respectivo tempo de fermentação, a cada ensaio foi adicionado 25 mL de água destilada estéril para a solubilização das enzimas. Esta suspensão permaneceu sob agitação orbital a 30° C por 30 minutos (QUIMIS-Q816M20) a 200 rpm. A remoção dos sólidos suspensos foi efetuada por prensagem mecânica e o líquido homogêneo centrifugado a 1107 G por 15 minutos (Centribio modelo 80-2B). Com o objetivo de concentrar o extrato enzimático bruto obtido, este foi desidratado em liofilizador à temperatura de -50°C por 48 horas.

#### 2.5 Determinação da atividade enzimática

A atividade da  $\alpha$ -amilase foi determinada como descrito por Okolo et al. (1995). A mistura de reação consistiu de 1,25 mL de amido solúvel a 1%, 0,25 mL de tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0), 0,25 mL de água destilada e 0,25 mL de extrato de enzimático. Após 10 minutos de incubação a 50 °C os açúcares redutores liberados foram estimados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) conforme MILLER (1959). Em seguida foi realizada a leitura em 575nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (BIOCHROM, modelo 570 Libra). O branco continham 0,5 mL de tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0), 1,25 mL de solução de amido 1% e 0,25 mL destilada água. Segundo GHOSE (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1 $\mu$ mol de açúcar redutor por mL de extrato por minuto. A partir da Equação 1 calculou-se a atividade enzimática, a qual foi expressa em U/mL.

$$U/mL = ART \times \frac{V_T}{0,18 \times V_C \times T_H} \quad (1)$$

Onde:

**ART:** Açúcares redutores totais produzidos na etapa de hidrólise (mg/mL);

**VT:** Volume total utilizado na hidrólise (volume do tampão + volume do caldo) (mL);

**VC:** Volume do caldo utilizado na hidrólise (mL);

**TH:** Tempo de hidrólise (min.);

**0,18:** 1 μmol de glicose (mg).

## 2.6 Teor de proteínas no extrato enzimático

A quantificação de proteínas totais no extrato enzimático foi realizada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando espectrofotômetro (BIOCHROM, modelo 570 Libra), com comprimento de onda fixado em 595 nm. A curva analítica foi construída utilizando como padrão a proteína Albumina do Soro Bovino (BSA).

## 2.7 Eletroforese em gel de poli-acrilamida em condições desnaturantes (SDS - PAGE)

A Eletroforese SDS-PAGE foi realizada em mini géis verticais (APELEX PS304). O gel de acrilamida foi preparado como um gel de separação a 12% e um gel de empilhamento a 5%. Alíquotas dos extratos pré-concentrados foram ressuspensos em tampão de desnaturação (Tris-HCl pH 6,8, 4% m / v de SDS, 4% v / v de 2-mercaptoetanol, 20% v / v de glicerol e azul de bromofenol). A eletroforese foi realizada a 250 V e 30 mA, durante 1 hora e 30 minutos. Depois, o gel foi corado com uma solução de nitrato de prata 0,1% m/ v durante 30 minutos sem a presença de luz. Após esta etapa adicionou-se ao gel a solução reveladora mantendo os géis nesta até o aparecimento das bandas.

## 2.8 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados no software Estatística versão 8.0, onde foi realizada uma estimativa dos efeitos das variáveis e sua interação sobre a resposta analisada, considerando o nível de significância de 5%. Com um modelo polinomial de segunda ordem (Equação 2), os coeficiente de regressão foram ajustadas a partir dos dados experimentais e coeficientes de regressão foram obtidos por regressão linear múltipla.

$$AE = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + e \quad (2)$$

Onde  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  e  $\beta_{ij}$  representam os efeitos, global, linear e quadrático e o efeito da interação entre  $X_i$  e  $X_j$  respectivamente.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados obtidos para a atividade específica (AE) da  $\alpha$ -amilase para o planejamento experimental proposto.

**Tabela 2.** Atividade específica da  $\alpha$ -amilase em função da umidade e tempo de fermentação.

Ensaio	Variáveis reais		Atividade	Proteína	AE
	Tempo (horas)	Umidade (%)	U/mL	mg/mL	(U/mg)
1	18	38	0,821	0,178	4,618
2	18	56	0,832	0,215	3,872
3	54	38	0,780	0,198	3,939
4	54	56	0,693	0,203	3,420
5	10,5	47	0,842	0,216	3,892
6	61,5	47	0,752	0,204	3,684
7	36	34,3	0,961	0,178	5,401
8	36	59,7	0,988	0,193	5,115
9	36	47	1,135	0,176	6,436
10	36	47	1,079	0,179	6,015
11	36	47	1,096	0,187	5,860

Os resultados obtidos para atividade específica (Tabela 2) foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e a significância do modelo verificada utilizando o teste estatístico de Fisher (test-F). Todos os termos que não foram significativos a 5% de probabilidade foram agrupadas ao erro e um novo modelo reduzido foi obtido pela análise de regressão. Os resultados das análises são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resultados da análise de regressão para a atividade específica da  $\alpha$ -amilase para DCCR 2<sup>2</sup>

Fonte	GL	SQ	QM	F	P	R <sup>2</sup>
Modelo	4	9,376	2,344	19,87	0,0013	0,929
Erro	6	0,708	0,118			

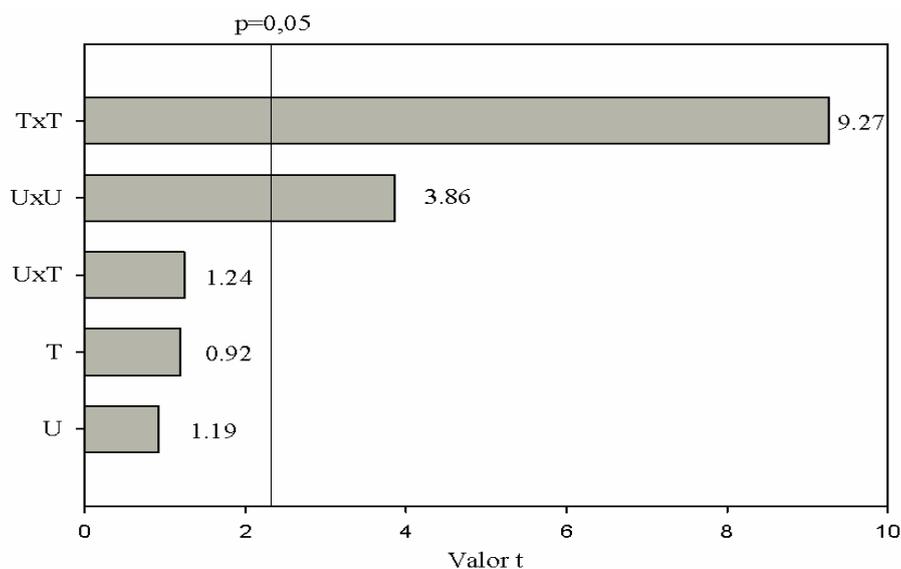
<b>Falta de ajuste</b>	4	0,509	0,127	1,43	0,450
<b>Erro puro</b>	2	0,178	0,089		
<b>Total</b>	10	10,084			

**GL** = Graus de Liberdade; **SQ** = Soma dos Quadrados; **QM** = Quadrado Médio; **F** = Teste de Fisher; **p** = Probabilidade; **R<sup>2</sup>**= Coeficiente de determinação.

Observando a tabela verifica-se que a regressão foi significativa (P= 0,0013) e não apresenta falta de ajuste (P=0,450).

O resultado da análise de variância da regressão pode ser visualizado no Gráfico de Pareto (Figura 1). Foram considerados significativos os termos cujos valores de  $t_{calculado}$  (representado pelas barras no gráfico de Pareto) apresentaram-se superiores ao valor de  $t_{tabelado}$  (representado pela linha traçada do gráfico).

**Figura 1.** Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis umidade (U) e tempo de fermentação (T) utilizada na produção da amilase



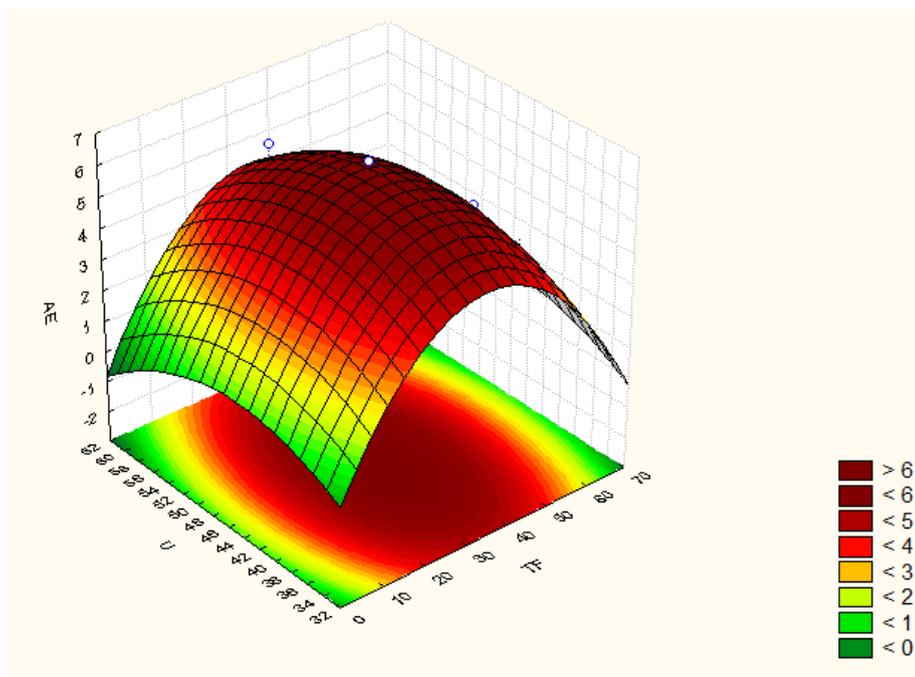
Analisando o gráfico de Pareto é possível observar que o efeito quadrático da umidade e o tempo de fermentação foram estatisticamente significativos. No entanto a interação entre as duas variáveis não foi significativa (P > 0,05). Na Equação 3 é apresentado o modelo matemático proposto para determinar a atividade específica da  $\alpha$ -amilase em termos de valores não codificados.

$$AE = -12,46127 + 0,60009U - 0,00655T + 0,27361U^2 - 0,00388T^2 \quad (3)$$

A partir do modelo proposto foi plotado um gráfico de superfície de resposta para

melhor visualização das respostas obtidas (Figura 2).

**Figura 2.** Superfície de resposta para a atividade específica da  $\alpha$ -amilase em função da umidade (U) e tempo de fermentação (TF).



Observa-se que as variáveis independentes tempo de fermentação e umidade exercem influência na produção da  $\alpha$ -amilase. Na Figura 2 são apresentados os efeitos da combinação destas variáveis sobre a atividade da mesma. A partir da derivada da Equação (3) pode ser observado que o ponto ótimo para a variável resposta foi em um tempo de 35 h e um teor de umidade 47,7%.

Como já descrito, a atividade específica da  $\alpha$ -amilase obteve um valor ótimo em um período de 35 horas de fermentação. Uma hipótese para esse resultado seria a de que a presença de nutrientes dispersos por todo o substrato pode ter contribuído para multiplicação do microrganismo, e a decadência desses nutrientes ao longo do tempo pode ter afetado o mesmo e conseqüentemente uma queda na produção da enzima.

Quanto a umidade, este é um fator crítico para o crescimento de fungos em substrato sólido, pois como a quantidade de água é sempre limitada, o controle desta é essencial para a otimização do processo. O elevado conteúdo de água provoca a diminuição da porosidade do substrato, reduzindo assim a troca de gases. Entretanto um baixo conteúdo de água pode resultar na redução da multiplicação do microrganismo e conseqüentemente a diminuição na produção da enzima (MAHANTA, et al. 2008; SANCHEZ, 2009). Neste estudo foi observado que o conteúdo de água ideal para a obtenção da  $\alpha$ -amilase situou-se em 45,7%,

ocorrendo um decréscimo na produção com o incremento neste valor. Esta redução possivelmente está associada a diminuição do crescimento do fungo, em virtude da extrapolação do nível de água ideal.

Estas duas condições podem ter influenciado o metabolismo responsável pela produção da enzima. Estas normalmente têm um mecanismo de controle de expressão que pode ser estimulada ou inibida por produtos do meio. Os produtos finais de uma determinada via metabólica são frequentemente inibidores de enzimas que catalisam os primeiros passos da via. Este mecanismo é conhecido como feedback negativo (SANTANA, et al. 2012).

SANTOS et al. (2012), estudando a produção de enzimas celulolíticas a partir da casca de batata observaram que a produção de enzimas no início é lenta, depois acelera até atingir o seu valor máximo; em seguida, a concentração de produtos gerados é inibida e a sua atividade é reduzida, o que também foi observado no presente estudo.

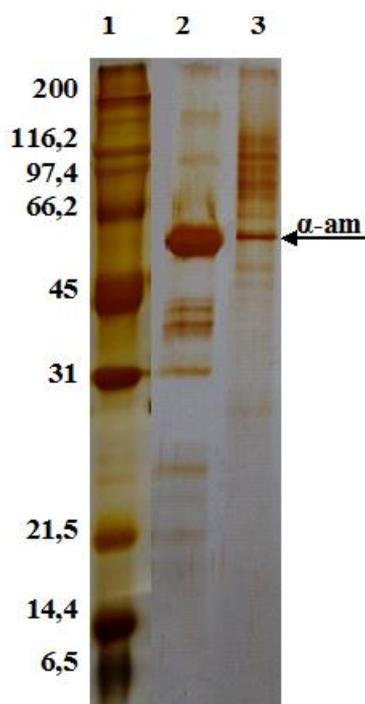
A literatura tem relatado a produção da  $\alpha$ -amilase por diferentes microrganismos e em diferentes substratos. FRANCIS et al. 2003, visando a otimização de três parâmetros (temperatura de incubação, umidade do substrato e volume do inóculo) para a produção da  $\alpha$ -amilase por *Aspergillus oryzae* NRRL6270, verificaram que a temperatura de incubação de 30 °C, umidade inicial de 70% e uma taxa de inóculo de  $1 \times 10^7$  esporo/g de substrato foram as melhores condições para produzir a enzima.

KUNAMNENI, et al. (2005), estudando produção de amilase extracelular pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* em diferentes substratos sólidos, tais como farelo de trigo, farelo de melão, farelo de arroz, farinha de milho, flocos de trigo, farelo de cevada, milho moído, sabugo de milho e trigo moído para produção de enzimas, verificaram que a fermentação do farelo de trigo apresentou a maior atividade amilásica.

### **Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS - PAGE)**

O perfil protéico para o extrato enzimático bruto obtido na eletroforese SDS-PAGE está apresentado na Figura 3. Esta análise foi realizada com o objetivo de comprovar a presença da  $\alpha$ -amilase no mesmo e também estimar a massa molar desta.

**Figura 3.** SDS-PAGE para a  $\alpha$ -amilase produzida por FES. Poço 1: marcador molecular de proteínas; 2: Padrão  $\alpha$ -amilase pura (>95%) 3: Extrato enzimático bruto.



Verificou-se que o extrato enzimático bruto obtido na FES apresenta diversas bandas em faixas com massas molares de cerca de 21,5 kDa até mais de 116,5 kDa. As bandas do marcador molecular utilizado foram de 6,5 até 200 kDa. Pode-se observar também a presença de uma banda de proteína com massa molar mais isolada, no intervalo de 45-66,2 kDa, indicando ser a enzima em estudo. Outras bandas na faixa de 66,2-97,4 kDa e entre 116,2-200 kDa também foram observadas.

DEY & BANERJEE (2014), estudando a purificação e caracterização bioquímica da enzima  $\alpha$ -amilase produzida por *Aspergillus oryzae* IFO30103, observaram que a massa molar para esta, foi de 51,3 kDa.

#### 4 CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que o ponto ótimo para a produção da  $\alpha$ -amilase de *Aspergillus niger* é de 35 horas de fermentação e umidade de 45,7 %. Durante o processo fermentativo o fungo sintetizou e excretou a  $\alpha$ -amilase sem a necessidade qualquer outro indutor além do resíduo de mandioca, demonstrando desta forma que o mesmo tem potencial para ser utilizado na produção desta enzima por fermentação sólida. Portanto a fermentação em estado sólido apresenta-se com uma tecnologia que pode propor caminhos alternativos para a reutilização de resíduos agroindustriais como o resíduo de mandioca, diminuindo

assim os possíveis problemas ambientais, além de agregar valor econômico para estes subprodutos.

## 5 REFERÊNCIAS

- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora Unicamp, 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248–254, 1976.
- DEY, T. B. & BANERJEE, R. Purification, biochemical characterization and application of  $\alpha$ -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.10.002>. 2014.
- FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K. M.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Biochemical Engineering Journal**, v.15 p. 107–115, 2003.
- GALEMBECK, F., BARBOSA, C. A. S., & SOUSA, R. A. Aproveitamento sustentável de biomassa e de recursos naturais na inovação química. **Química Nova**, v.32, p.571–581. 2009.
- GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities**. In: Pure and Applied Chemistry, v. 59, p. 257-268, 1987. Disponível em:< <http://pt.scribd.com/doc/16574469/Measure-of-Cellulase-Activity>>. Acessado em 20 jul. 2014.
- GUPTA, R; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.
- KUNAMNENI, A.; SINGH, S. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of maize starch for higher glucose production. **Biochemical Engineering Journal** v.27 p. 179–190, 2005.
- MAHANTA, N., GUPTA, A., & KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, p.1729–1735, 2008.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.

- Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities**. In: Pure and Applied Chemistry, v. 59, p. 257-268, 1987. Disponível em:<<http://pt.scribd.com/doc/16574469/Measure-of-Cellulase-Activity>>. Acessado em 20 jul. 2014.
- OKOLO, B. N.; EZEUGU, L. I.; MBA, C. N. Production of raw starch digestive amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 69, p.109-115, 1995.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Current Developments in Solid state Fermentation. **Asiantech Publishers**, v. 25, p.517, 2007.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochem**, v. 35:1153-69, 2000.
- PELIZER, L. H., PONTIERI, M. H., & MORAES, I. O. Utilização de Resíduos Agroindustriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, p.118–127, 2007.
- PENGTHAMKEERATI P, NUMSOMBOON S, SATAPANAJARU T, CHAIRATTANAMANOKORN P. Production of  $\alpha$ -amylase by *aspergillus oryzae* from cassava bagasse and wastewater sludge under solid-state fermentation. **Environmental Progust Energy**, v. 30, 2011.
- SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v.27, p.85-94, 2009.
- SANTANA, R. M., GONÇALVES, Z. S., BONOMO, R. C. F., FRANCO, M. Produção de amiloglucosidade utilizando como substrato a palma forrageira. **Revista Caatinga**, v.25, p.188–193, 2012.
- SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, n. 133, p. 1299–1304, 2012.
- SILVEIRA, C.M.; FURLONG, E.B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p.805-811, 2007

- SINGH, K., KAYASTHA, A. M.  $\alpha$ -amylase from wheat (*Triticum aestivum*) seeds: Its purification, biochemical attributes and active site studies. **Food Chemical**. n. 162, p.1-9. 2014
- THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation, **Biochemical Engineering Journal** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>
- TUNG, Q.T. MIYATA, N. IWAHORI, K. Growth of *Aspergillus oryzae* during treatment of cassava starch processing wastewater with high content of suspended solids. **Journal of bioscience and bioengineering**. v. 97, p.329-335. 2004.

# CAPÍTULO 3

---

## ARTIGO

**Estudo de partição da enzima  $\alpha$ -amilase proveniente da fermentação em estado sólido em sistemas aquosos bifásicos compostos por polietilenoglicol e sal inorgânico**

**Study partition of  $\alpha$ -amylase enzyme from the solid state fermentation in aqueous systems biphasic composed of polyethylene glycol and inorganic salt**

---

## RESUMO

Objetivou-se neste trabalho estudar o comportamento de partição da enzima  $\alpha$ -amilase em Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's), constituídos por polietilenoglicol (PEG) e tampão fosfato de potássio. Para a determinação das melhores condições de partição, foi realizado um delineamento composto central face centrada (CCF) com quatro variáveis independentes: Massa molecular do PEG, pH, temperatura e tempo de partição. Foram avaliados o coeficiente de partição da atividade amilásica ( $K_e$ ), o coeficiente de partição proteína ( $K_p$ ) e a seletividade ( $S$ ). Estes resultados foram obtidos por meio da determinação do conteúdo protéico e da atividade enzimática nas fases dos sistemas. Os resultados encontrados mostraram que o aumento da massa molar do polímero promove a redução da concentração da proteína total na fase superior (rica em polímero) aumentando sua concentração na fase inferior (rica em sal). Foi observado ainda que os coeficientes de partição aumentaram com o aumento dos valores do pH e com redução da temperatura. O tempo de partição foi significativo apenas para a variável  $K_e$ . Portanto, conclui-se que os SAB's apresentados neste estudo possui potencial para ser aplicado na pré-concentração da enzima  $\alpha$ -amilase, visto que estes proporcionam uma boa seletividade da  $\alpha$ -amilase proveniente da fermentação em estado sólido, sem a perda da atividade biológica da mesma.

**PALAVRAS CHAVES:** Sistemas Aquosos Bifásicos; partição;  $\alpha$ -amilase

## ABSTRACT

The objective of this work was to study the  $\alpha$ -amylase enzyme partition behavior in Aqueous Two-Phase Systems (ATPS) consisting of polyethylene glycol (PEG) and potassium phosphate buffer. To determine the best conditions of partition, there was a central composite design face-centered (CCF) with four independent variables: molecular weight PEG, pH, temperature and time of partition. We evaluated the partition coefficient of amylase activity ( $K_e$ ), the protein partition coefficient ( $K_p$ ) and the selectivity ( $S$ ). These results were obtained by determining the protein content and enzymatic activity phases of the systems. The results showed that increasing the polymer molecular weight promotes the reduction of the total protein concentration in the top phase (rich in polymer) increasing its concentration in the bottom phase (rich in salt). It was also observed that the partition coefficient increased with increasing pH values and reducing the temperature. The time partition was significant only for  $K_e$  variable. Therefore, it is concluded that the ATPS presented in this study had the potential to be applied to the pre-concentration of the  $\alpha$ -amylase enzyme, as these provide a good selectivity of  $\alpha$ -amylase derived from solid-state fermentation, without loss of biological activity of the same.

**KEYWORDS:** Two-Phase Aqueous Systems; partition;  $\alpha$ -amylase

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com o crescente desenvolvimento da área biotecnológica, tornou-se necessário o conhecimento de novas técnicas de separação e purificação de compostos obtidos em baixas concentrações através de bioprocessos. Deste modo, existe a necessidade de uma nova técnica eficiente e economicamente viável, que apresente alta pureza e alta recuperação, conservando intacta a atividade da molécula. Uma alternativa

promissora de separação, que tem ganhando destaque é a aplicação de Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB's) (DIAMOND & HSU, 1992).

Os SAB's são formados através da combinação de três ou mais espécies químicas que, em determinadas faixas de composição, pH e temperatura separam-se em duas fases distintas, cujo elemento majoritário, é a água. Tradicionalmente, estes sistemas são formados por polietileno glicol (PEG), pois este forma facilmente um sistema bifásico com sais inorgânicos e polímeros neutros (SALABAT, 2001).

Para aperfeiçoar o emprego dos SAB's na partição de biocompostos é necessário o estudo do comportamento destes sistemas em diferentes composições e em variadas condições de temperatura e pH. Assim, desde 1960 diversos estudos têm sido conduzidos com objetivo de encontrar os SAB's mais adequados e as melhores condições para a partição e/ou concentração de células animais ou vegetais, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, metais, entre outros (MAGESTE et al., 2012; ALCÂNTARA et al., 2014; SOUZA JR et al., 2014).

Dentre as enzimas a  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ - D glucanohidrolase glucana, EC 3.2.1.1) é a enzima mais importante para todas as indústrias de amido, alimentos, papel, detergentes, produtos farmacêuticos, têxteis, panificação e fabricação de cerveja (GUPTA et al., 2003). Pertence à família das hidrolases, que cliva aleatoriamente as ligações  $\alpha$ -1,4 entre unidades adjacentes de glicose no amido e polissacarídeos relacionados para produzir principalmente maltose e maltodextrinas (SINGH & KAYASTHA, 2014).

Esta enzima vêm sendo produzida por fermentação em estado sólido a partir de resíduos agroindustriais. A FES é uma técnica que consiste no crescimento de microrganismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas, as quais deve possuir umidade suficiente para suportar o crescimento e a atividade metabólica do microrganismo. A matriz sólida pode ser a fonte de carbono (e outros nutrientes), ou pode ser um material inerte para suportar o crescimento dos microrganismos (THOMAS, LARROCHE & PANDEY, 2013).

Portanto o objetivo deste trabalho foi estudar a partição da enzima  $\alpha$ -amilase em SAB's constituídos por polietilenoglicol, água e sal inorgânico em função da variação da massa molecular do polímero, do pH, da temperatura e do tempo de partição. Um delineamento composto central face centrada, juntamente com a metodologia de superfície de resposta foi utilizado para o estudo de partição com a  $\alpha$ -amilase pura, sendo avaliados o coeficiente de partição da proteína (Kp) e da atividade enzimática (Ke). As melhores condições de partição obtidas para estas respostas foram utilizadas para a separação da  $\alpha$ -

amilase presente do extrato bruto proveniente da FES, sendo calculados para estas condições além dos parâmetros citados a seletividade (S). O parâmetro (S) foi calculado com o objetivo de verificar a eficiência do processo de separação.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

A albumina do soro bovino (BSA), a  $\alpha$ -amilase, o ácido 3,5 dinitrosalicílico e o azul de coomassie foram adquiridos da Sigma Aldrich Brasil. O polietilenoglicol com massas moleculares de 2000, 4000 e 6000, fosfato de potássio monobásico e bibásico, amido solúvel, ácido clorídrico, ácido fosfórico e ácido acético, álcool etílico e tartarato de sódio e potássio foram adquiridos da Vetec, Brasil. Todos os demais reagentes empregados foram de grau analítico.

### **2.2 Fermentação em estado sólido**

O fungo *Aspergillus niger* utilizado no experimento foi fornecido pelo Laboratório de Resíduos Agroindustriais (LABRA-UESB). Os microrganismos foram inoculados em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) e incubados a 30°C em estufa bacteriológica (SL 222; Solab) durante 7 dias. Os esporos foram extraídos com uma solução 0,01% v/v de Tween 80 (Vetec, Brasil) e quantificados com o auxílio da câmara de Neubauer e microscópio binocular (L1000; Bioval). Dez gramas do resíduo previamente seco foram acondicionados em erlenmeyer de 125 mL e logo após autoclavados a 120°C por 15 minutos. Foi inoculado o volume de solução de esporos necessário para se atingir uma concentração de  $10^7$  esporos por grama de resíduos (TUNG et al., 2004). Foi empregado neste processo fermentação as condições do ponto de máximo encontrado no estudo de produção da  $\alpha$ -amilase. Posteriormente foram adicionados a estes resíduos fermentados, 25 mL de água destilada estéril para a solubilização das enzimas. Esta suspensão permaneceu sob agitação orbital a 30° C por 30 minutos (QUIMIS-Q816M20) a 200 rpm. A remoção dos sólidos suspensos foi efetuada por prensagem mecânica e o líquido homogêneo centrifugado a 1107 G por 15 minutos (Centribio modelo 80-2B). Com o objetivo de concentrar o extrato enzimático bruto obtido, este foi desidratado em liofilizador à temperatura de -50°C por 48 horas.

### **2.3 Preparação do Sistema Aquoso Bifásico (SAB)**

As composições dos sistemas (Tabela 1) formados por polietilenoglicol 4000 e 6000 (g/mol) e sais de fosfato de potássio foram obtidos a partir da literatura (PADILHA, 2011)

e os sistemas formados por polietilenoglicol 2000 (g/mol) e sais de fosfato de potássio foram determinados neste trabalho. As soluções estoque de polietilenoglicol (50% m/ m) e tampão fosfato de potássio (20% m/m) foram preparadas antes de realizar os experimentos. O pH das soluções do PEG foram ajustados para (6, 7 e 8), pela adição de ácido fosfórico e hidróxido de potássio e os das soluções de tampão fosfato de potássio utilizando fosfato de potássio dibásico e monobásico na proporção de 1: 1,82 (m/m). A fim de preparar SAB's com 45 g, quantidades correspondentes de PEG e tampão fosfato foram misturados e em seguida incubadas durante 12 horas para permitir a separação de fases. As fases dos SAB's pré-equilibrados foram coletados com auxílio de seringas de 20 mL e utilizadas na formação de novos sistemas de igual volume. Este procedimento foi realizado com o propósito de obter uma relação de volume de fase superior / volume da fase inferior igual à unidade. Os experimentos de partição foram realizados em tubos de centrífuga graduados, sendo adicionados 2,5 mL de cada uma das fases superior e inferior dos SAB's pré-equilibrados e 300 µm da enzima pura, em seguida foram misturados em agitador tipo vortex por 2min e centrifugados a 1400g por 10 min. Os tubos foram acondicionados em incubadora B.O.D e o experimento foi conduzido em diferentes tempos e temperaturas. O mesmo procedimento foi realizado para a partição da  $\alpha$ -amilase no extrato enzimático de maior atividade específica.

**Tabela 1.** Composição global dos sistemas aquosos bifásicos utilizados para a extração da  $\alpha$ -amilase, considerando-se as concentrações finais de PEG e sal fosfato de potássio

Sistema	Composição Total	
	PEG (m/m)	SAL (m/m)
PEG2000-pH6	17,5	12,7
PEG2000-pH7	19,1	12,5
PEG2000-pH8	17,7	12,0
PEG4000-pH6	16,7	13,3
PEG4000-pH7	16,2	13,5
PEG4000-pH8	19,5	11,0
PEG6000-pH6	19,0	12,3
PEG6000-pH7	21,0	11,6
PEG6000-pH8	23,7	10,5

#### 2.4 Ensaios de partição da $\alpha$ -amilase

Um Delineamento Composto Central Face Centrada (CCF) foi realizado de forma a

caracterizar o efeito da massa molecular do polímero ( $x_1$  -  $MM_{peg}$ ), o pH ( $x_2$ ), a temperatura ( $x_3$  - T (°C)) e o tempo de partição ( $x_4$  - TK(horas)) na partição da  $\alpha$ -amilase pura. A Tabela 2 apresenta o valor codificado e não codificado de cada fator. As variáveis respostas estudadas foram o coeficiente de partição da atividade enzimática (Ke), da proteína (Kp) e a seletividade (S). As combinações que apresentaram os melhores valores para as variáveis respostas (Ke e Kp) para a partição da  $\alpha$ -amilase pura foram utilizadas como referência, sendo portanto empregadas na partição do extrato enzimático produzido pela fermentação no estado sólido. Para estes, adicionalmente foram calculadas a seletividade, visando verificar a eficiência no processo de separação.

**Tabela 2.** Valores codificados e não codificados das variáveis pesquisadas no delineamento composto central face centrada.

Fator	Nível baixo (-1)	Ponto central (0)	Nível alto (+1)
$x_1$ $MM_{PEG}$	2000	4000	6000
$x_2$ pH	6	7	8
$x_3$ T (°C)	5	15	25
$x_4$ TK (horas)	6	12	18

## 2.5 Determinação da atividade enzimática

A atividade da  $\alpha$ -amilase foi determinada como descrito por Okolo et al. (1995). A mistura de reação consistiu de 1,25 mL de amido solúvel a 1%, 0,25 mL de tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> M (pH 5,0), 0,25 mL de água destilada e 0,25 mL das fases apropriadamente diluídas. Após 10 minutos de incubação a 50 ° C os açúcares redutores liberados foram estimados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) conforme MILLER (1959). Após a reação as amostras foram lidas em 575nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (BIOCHROM, modelo 570 Libra). O branco continham 0,5 mL de tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0), 1,25 mL de solução de amido 1% e 0,25 mL destilada água. Segundo GHOSE (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1µmol de açúcar redutor por mL de extrato por minuto.

## 2.6 Determinação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais nas fases superior e inferior foi realizada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando espectrofotômetro (BIOCHROM, modelo 570 Libra), com comprimento de onda fixado em 595 nm. Amostras

de 1 mL das fases superior e inferior foram coletadas com seringas de 3 mL e diluídas apropriadamente. Para evitar interferência dos componentes das fases, os brancos foram realizados contendo a mesma composição com adição de água em substituição às fases. A curva analítica foi construída utilizando como padrão a proteína Albumina do Soro Bovino (BSA).

## 2.7 Determinação dos parâmetros de partição

O coeficiente de partição foi utilizado para quantificar o grau de separação alcançado na extração. O coeficiente de partição para atividade enzimática ( $K_e$ ) definido como a atividade enzimática (U/mL) nas fases Superior ( $A_{sup}$ ) e Inferior ( $A_{inf}$ ) do sistema foi determinada conforme descrito pela Equação 1.

$$K_e = \frac{[A]_{sup}}{[A]_{inf}} \quad (1)$$

O coeficiente de partição da proteína ( $K_p$ ), o qual é a relação entre a concentração de equilíbrio (mg / mL) da proteína total na fase superior ( $C_{sup}$ ) e inferior ( $C_{inf}$ ) foi determinado como descrito na Equação 2.

$$K_p = \frac{[C]_{sup}}{[C]_{inf}} \quad (2)$$

A seletividade ( $S$ ) foi calculada como a razão entre coeficiente de partição da  $\alpha$ -amilase ( $K_e$ ) e o coeficiente de partição da proteína total ( $K_p$ ) (Equação 3).

$$S = \frac{[K_e]}{[K_p]} \quad (3)$$

## 2.8 Análises estatísticas

Um CCF com adicional de 4 repetições no ponto central foi utilizado, a fim de avaliar a influência das variáveis independentes em estudo. Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), análise de regressão e plotagem de superfície de resposta para obter as condições ótimas para a partição da  $\alpha$ -amilase. Inicialmente os dados obtidos experimentalmente foram submetidos a ANOVA e os efeitos foram considerados significativos em  $p < 0,05$ . Com um modelo polinomial de segunda ordem (Equação 4), os coeficientes de regressão foram ajustados e coeficientes de regressão foram obtidos por regressão linear múltipla. As análises foram realizadas no software estatístico

$$Kp, Ke = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j + e \quad (4)$$

Onde  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  e  $\beta_{ij}$  são os coeficientes de regressão para o intercepto, para o efeito linear, quadrático e de interação, respectivamente, e  $X_i$  e  $X_j$  são os fatores codificados.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 estão apresentados os valores experimentais para o coeficiente de partição da proteína (Kp) e da atividade enzimática (Ke) obtidos no delineamento composto central face centrada.

**Tabela 3.** Coeficiente de partição da proteína (Kp) e da atividade enzimática (Ke) para os experimentos realizados no CCF.

Ensaio	Variáveis reais				Kp	Ke
	PEG(MM)	pH	T(°C)	TK (horas)		
1	2000	6	5	6	1,070	1,455
2	2000	6	5	18	2,097	1,997
3	2000	6	25	6	1,075	1,558
4	2000	6	25	18	0,984	1,650
5	2000	8	5	6	4,000	4,028
6	2000	8	5	18	4,769	5,982
7	2000	8	25	6	1,496	3,497
8	2000	8	25	18	3,429	3,898
9	6000	6	5	6	0,312	0,338
10	6000	6	5	18	0,433	0,522
11	6000	6	25	6	0,108	0,190
12	6000	6	25	18	0,374	0,302
13	6000	8	5	6	0,227	0,709
14	6000	8	5	18	0,367	1,073
15	6000	8	25	6	0,383	0,589
16	6000	8	25	18	0,800	0,749
17	2000	7	15	12	3,879	3,140
18	6000	7	15	12	0,298	0,606

*Continuação. Tabela 3.* Coeficiente de partição da proteína (Kp) e da atividade enzimática (Ke) para os experimentos realizados no CCF.

19	4000	6	15	12	0,638	0,778
20	4000	8	15	12	0,545	0,822
21	4000	7	5	12	0,264	0,643
22	4000	7	25	12	0,500	0,525
23	4000	7	15	6	0,327	0,588
24	4000	7	15	18	0,437	0,830
25	4000	7	15	12	0,488	0,612
26	4000	7	15	12	0,443	0,631
27	4000	7	15	12	0,478	0,617
28	4000	7	15	12	0,477	0,582

A partir dos valores experimentais foram elaborados ajustes estatísticos com a finalidade de gerar modelos significativos. A ANOVA foi realizada e a significância dos modelos foram examinadas pelo teste estatístico de Fisher (teste-F). Foram realizados testes para a significância da regressão, a falta de ajuste e para o coeficiente de determinação múltipla ( $R^2$ ). Verificou-se que os modelos de segunda ordem completos não foram significativos e portanto foram melhorados por eliminação dos termos não significativos. Estes termos que não apresentaram significância a 5% de probabilidade foram agrupadas ao erro da regressão e um novo modelo reduzido foi obtido para as respostas. Os valores da análise de variância da regressão são listados da Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados da análise de regressão para o coeficiente de partição da proteína (Kp) e da atividade enzimática (Ke) para o CCF.

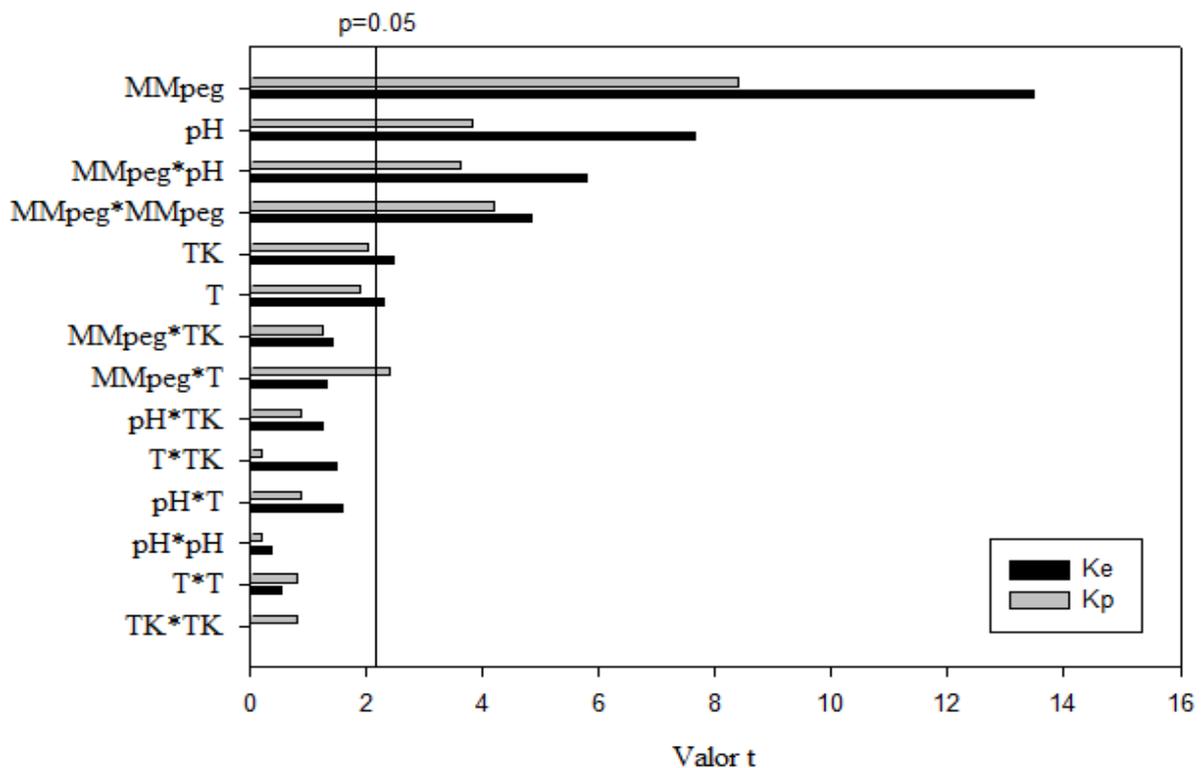
Fonte	GL	SQ	QM	F	P	$R^2$
<b><i>Kp</i></b>						
Modelo	6	38,6176	6,4363	19,51	<0001	0,8479
Erro	21	6,9276	0,3298			
Falta de ajuste	18	6,9262	0,3848	780,99		
Erro puro	3	0,0015	0,0005			
Total	27	45,5453				

<i>Ke</i>						
Modelo	6	50,9222	8,4870	51,07	<0001	0,9359
Erro	21	3,4896	0,1662			
Falta de ajuste	18	3,4883	0,1938	446,39		
Erro puro	3	0,0013	0,0004			
Total	27	54,4119				

**GL** = Graus de Liberdade; **SQ** = Soma dos Quadrados; **QM** = Quadrado Médio; **F** = Teste de Fisher; **p** = Probabilidade; **R<sup>2</sup>**=Coeficiente de determinação.

Observa-se que a análise de variância para regressão foi significativa ( $P < 0,05$ ). Os resultados da análise de variância pode ser visualizado no grafico de Pareto (Figura 1), em que o valor absoluto da amplitude do efeito estimado padronizado de cada um dos fatores é abordado e comparado com a magnitude mínima de um fator estatisticamente significativo com 95% de confiança ( $p = 0,05$ ), representada pela linha traçada verticalmente no gráfico.

**Figura 1.** Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis Massa molar do PEG (MMpeg), pH (pH), Temperatura (T) e tempo de partição (TK) para as variáveis *Ke* e *Kp*



A partir dos dados apresentados no gráfico de Pareto é possível visualizar os principais efeitos e interações significativas sobre as variáveis respostas  $Kp$  e  $Ke$ . Verificou-se que os fatores: massa molecular do polímero (efeito linear e quadrático), pH (efeito linear) e a interação entre a massa molecular e o pH foram estatisticamente significativos para ambas as respostas estudadas. Observou-se também que para as variáveis temperatura e tempo de partição, apenas a resposta  $Ke$  foi estatisticamente significativa. Notou-se ainda que houve uma interação em a massa molecular do polímero e a temperatura para a variável resposta  $Kp$ . Os demais termos estudados não foram significativos  $P > 0,05$ .

As Equações 5 e 6 apresentam o modelo matemático com as variáveis reais, propostos para representarem o coeficiente de partição da proteína e da atividade amilásica para as condições estudadas.

$$Kp = -2,4456 - 0,0010MM_{PEG} + 1,4854pH - 0,0904T - 0,00021MM_{PEG} * pH + 0,00002MM_{PEG} * T + 2,4836E-7MM_{PEG}^2 \quad (5)$$

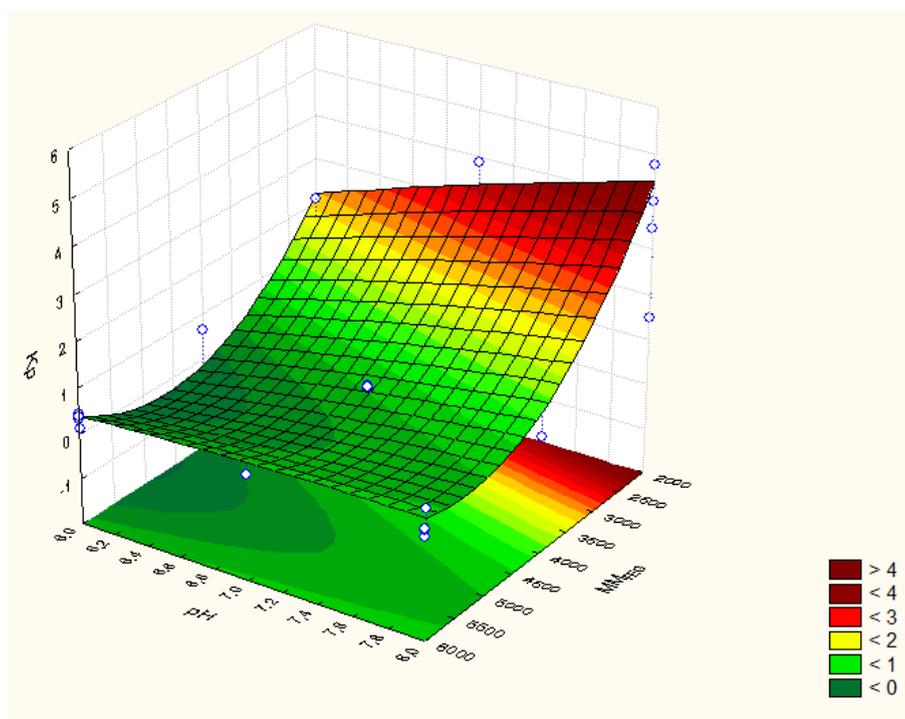
$$Ke = -5,2269 - 0,0009MM_{PEG} + 1,8196pH - 0,02105T + 0,0375TK - 0,0003MM_{PEG} * pH + 2,8271MM_{PEG}^2 \quad (6)$$

A partir destes modelos foram plotados gráficos de superfície de resposta para melhor visualização das respostas obtidas. As Figuras 2-6 ilustram os efeitos das combinações entre as variáveis independentes sobre o  $Ke$  e  $Kp$ .

O comportamento de partição dos solutos nos SAB's deve ser entendido em função das interações intermoleculares que ocorrem durante a transferência entre as fases. Estas interações são dependentes da estrutura polimérica, das concentrações de sal e do polímero, da hidratação das cadeias poliméricas e dos íons. Além disso, as interações de todos os componentes dos SAB's com o soluto particionante também determinam o comportamento de transferência. Essas interações são expressas no parâmetro termodinâmico denominado energia livre de Gibbs padrão ( $\Delta G^\circ$ ), a qual está em função de duas variáveis a entalpia  $\Delta H^\circ$  e entropia  $\Delta S^\circ$ , pela relação de Gibbs-Helmholtz (DA SILVA e LOH, 2006). Devido a partição das biomoléculas ser governada pela soma destas contribuições, quando uma sobrepõe a outra, esta é quem governa o mecanismo de partição.

Na Figura 2 é apresentada a superfície de resposta para o  $Kp$  em função da massa molecular do polímero e do pH.

**Figura 2.** Superfície de resposta para o coeficiente de partição da proteína ( $K_p$ ) em função da massa molar do polímero (MM<sub>peg</sub>) e do pH.



Os resultados mostram, que a  $\alpha$ -amilase possui uma forte tendência em se transferir para a fase rica em polímero quando este possui baixa massa molecular. Acredita-se que este fluxo é governado por aspectos de natureza entálpica, a qual pode ser devido a uma interação direta entre a proteína e a molécula do PEG. Entretanto observa-se também, que o efeito entálpico sobre a partição diminui com o aumento da cadeia polimérica, pois este incremento no grau de polimerização reduz a entropia configuracional da fase enriquecida pelo mesmo, reduzindo o valor da entropia de transferência da proteína para esta fase, ou seja há um aumento da diferença de entropia entre as fases do sistema, e seu efeito sobre a partição prevalece. ALBERTSSON (1986) relata que o aumento da cadeia do polietileno glicol reduz o grau de liberdade da molécula, diminuindo a entropia configuracional do sistema e o aumento desta, promove o enovelamento da cadeia da macromolécula, aumentando a entropia conformacional. Este processo de enovelamento resulta na diminuição do número de sítios disponíveis às interações, o que contribui para que a cadeia do polímero sature com menor quantidade do outro componente.

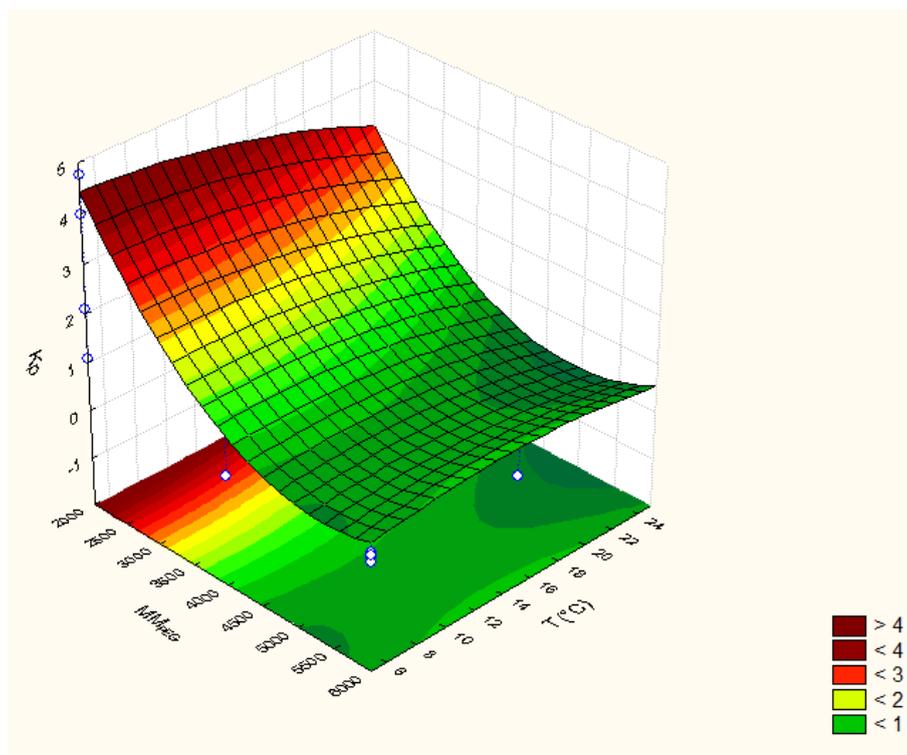
PERUMALSAMY & BATCHA (2011) também observam que o coeficiente de partição de BSA diminui com um aumento da massa molecular do PEG e atribuíram este efeito ao aumento da hidrofobicidade visualizada com o aumento da massa molecular.

RODRÍGUEZ-DURÁN et al. (2013) também verificaram que com o aumento da massa molar do PEG houve um redução do coeficiente de partição da enzima tenase produzida por *Aspergillus Niger*.

Com relação a influência exercida pelo pH, constatou-se que o coeficiente de partição aumenta com o acréscimo no valor do mesmo. Segundo SILVA & LOH (2006) a concentração hidrogeniônica afeta a transferência das proteínas, porque estes biopolímeros contêm uma grande variedade de grupos ácidos e básicos com diferentes valores de  $pK_a$ , resultando em cargas elétricas que são funções dos valores de pH. Ainda segundo os autores está densidade de carga elétrica na superfície da proteína pode modificar sua conformação, bem como processos de associação ou dissociação entre as macromoléculas presentes no sistema, alterando seu comportamento de partição. PORTO et al. (2011) observou que o pH apresentou efeito estatisticamente significativo para o coeficiente de partição da lecitina.

A Figura 3 apresenta o efeito da massa molecular do polímero e da temperatura sobre o  $K_p$ .

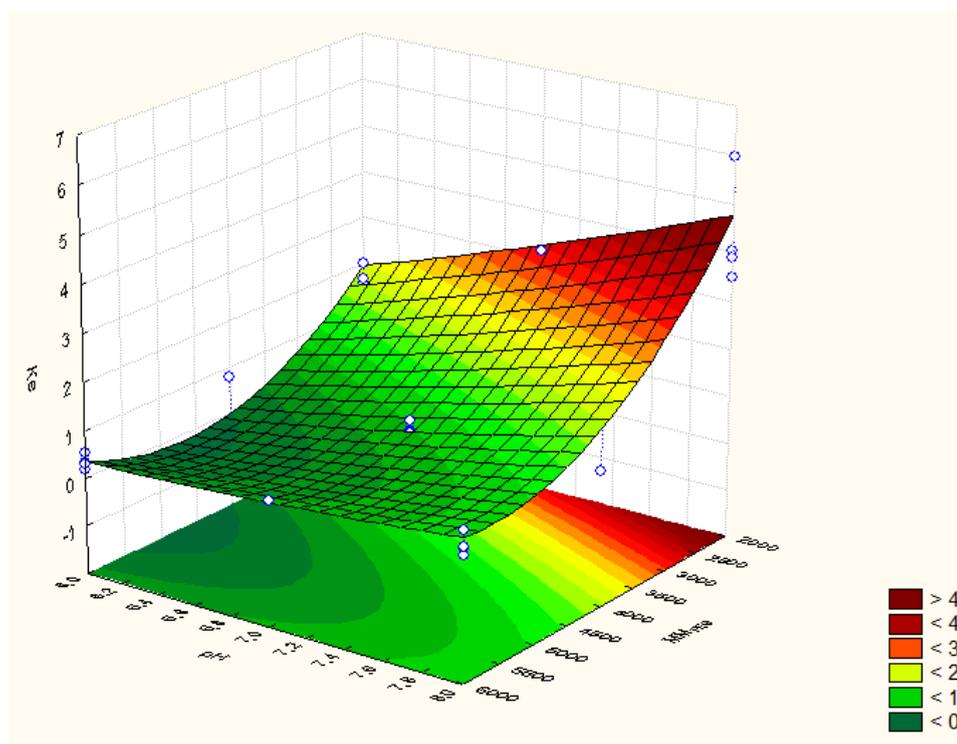
**Figura 3.** Superfície de resposta para o coeficiente de partição da proteína ( $K_p$ ) em função da massa molar do polímero (MMpeg) e da temperatura ( $T$  °C).



Nota-se que o coeficiente partição da proteína aumenta com a redução da temperatura. Quando fornecemos energia na forma de calor ao sistema a energia interna

aumenta, elevando a energia cinética média das moléculas, de modo que essas se tornam mais livres para se movimentarem na solução, alterando a entropia configuracional do sistema. Contudo a entropia conformacional do polímero também é alterada, pois o aumento da temperatura provoca o enovelamento da sua cadeia diminuindo o número de sítios ativos disponíveis para interações (CARVALHO, 2004). A redução destes sítios ativos promove o aumento da diferença de entropia entre as duas fases do sistema e a contribuição entrópica se torna mais pronunciada, conseqüentemente diminuindo o  $K$ . SARAVANAN et al (2008) estudando a separação das proteínas ovalbumina e mioglobina em sistemas formados por PEG e poli ácido acrílico também observaram que o aumento da temperatura possui efeito significativo sobre a partição destas proteínas. Na Figura 4 e 5 é exposta a influência da massa molecular do polímero em função do pH e temperatura para a variável resposta  $K_e$ .

**Figura 4.** Superfície de resposta para o coeficiente de partição da atividade enzimática em função da massa molar do polímero ( $MM_{PEG}$ ) e do pH.

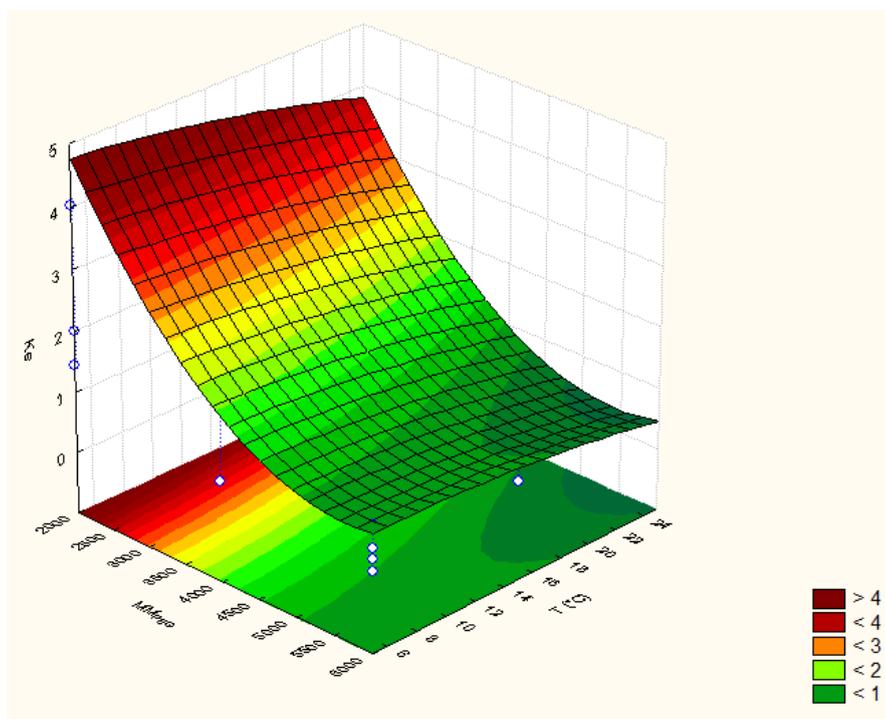


Analisando o gráfico (Figura 4) verifica-se um comportamento similar ao observado para o  $K_p$  (Figura 2). Isto indica que os SAB's formados por PEG e tampão fosfato de potássio são adequados para a separação da  $\alpha$ -amilase, uma vez que estes promoveram a partição desta biomolécula sem a perda significativa da atividade biológica.

ALCÂNTARA et al. (2013), estudando a extração e purificação de

amiloglucosidase com SAB's formados por polietilenoglicol e poliácrlato de sódio, observaram que o coeficiente de partição da atividade da amiloglucosidase diminui quando o pH é maior do que 6.5.

**Figura 5.** Superfície de resposta para o coeficiente de partição da atividade enzimática em função da massa molar do polímero ( $MM_{PEG}$ ) e do T ( $^{\circ}C$ ).



Quanto a temperatura também foi observado comportamento similar ao visualizado na Figura 3 reforçando que os SAB's estudados são adequados como técnica para pré-concentrar a enzima  $\alpha$ -amilase.

BASSANI et al. (2010), estudando a interação entre uma lipase de *Cândida rugosa* em sistemas aquosos bifásicos formados por fosfato de potássio e polietilenoglicol verificaram por meio de abordagens de fluorescência e dicroísmo circular que o polímero não afeta a estrutura secundária e terciária desta enzima e nem a sua atividade biológica.

### Partição da $\alpha$ -amilase produzida por Fermentação em Estado Sólido (FES)

Como apresentado no estudo de partição da  $\alpha$ -amilase pura, a massa molecular do polímero foi a variável que mais influenciou no processo de separação desta enzima. Assim, foram escolhidos um tratamento para cada massa molecular empregada no delineamento composto central face centrada, com o objetivo de estudar o comportamento de partição do extrato enzimático bruto obtido na fermentação no estado sólido. A escolha foi realizada

mediante a observação dos melhores valores de Ke e Kp para cada uma destas. Na Tabela 5 são apresentados os resultados encontrados para as variáveis Ke, Kp e S nestas condições.

**Tabela 5.** Resultados da determinação dos parâmetros de partição da  $\alpha$ -amilase proveniente da FES nas fases dos SAB's.

Ensaio	Ke	Kp	S
6	7,560	1,520	4,974
11	0,168	0,469	0,358
24	0,498	0,769	0,648

Analisando os dados apresentados para coeficiente de partição da proteína (Kp) de 1,520 e da atividade da enzimática (Ke) de 7,560 na Tabela 6 é possível verificar que o emprego do PEG 2000 influencia fortemente a partição das proteínas do extrato bruto para a fase superior. Verificou-se que a  $\alpha$ -amilase possui maior afinidade por esta fase que as outras proteínas, uma vez que o valor encontrado para a seletividade foi maior que a unidade (4,974). PORFIRI et al. (2011), estudando o particionamento da alfa-amilase de *Aspergillus oryzae* em sistemas PEG-fosfato também observaram que esta enzima possui maior afinidade pela fase superior quando se empregou polietilenoglicol com massa molecular 2000.

Com aumento da massa molar do polímero que é rico em uma fase acabou diminuindo a partição do extrato enzimático bruto para a mesma fase. Verificou-se uma maior migração da  $\alpha$ -amilase para a fase inferior (rica em sal) do que outras proteínas presente no extrato enzimático bruto, visto que os valores de seletividade foram significativamente menores que a unidade. Naturalmente, este aumento no grau de polimerização do polímero formador do SAB's acaba diminuindo a entropia configuracional da fase enriquecida neste polímero, reduzindo o valor da entropia de transferência da proteína para esta fase. ZUÑIGA et al. (2001), também observou que o aumento da massa molar do polímero, aumenta a concentração da proteína  $\alpha$ -lactoalbumina na fase inferior, ocasionando a diminuição do coeficiente de partição.

Desta forma é evidenciado que os SAB's apresentados neste estudo pode ser uma alternativa para pré-concentração da  $\alpha$ -amilase, tendo em vista que esta é uma técnica que utiliza matérias de baixo custo e apresentam boa seletividade para a separação desta enzima.

## 4 CONCLUSÕES

Os sistemas aquosos bifásicos analisados neste trabalho apresentam-se como uma alternativa para a partição da  $\alpha$ -amilase. Os resultados encontrados mostram que o aumento da massa molar do polímero promove a redução da concentração da enzima na fase superior (rica em polímero) aumentando sua concentração na fase inferior (rica em sal) e mantendo a atividade biológica da enzima em ambas as fases. Foi observado também que os coeficientes de partição aumentaram com o aumento dos valores do pH e com redução da temperatura. O tempo de partição foi significativo apenas para a variável  $K_e$ . Quanto aos resultados encontrados na partição da  $\alpha$ -amilase proveniente da FES, verificou-se que houve uma boa seletividade, evidenciando que está enzima possui maior afinidade por umas das fases nas condições estudadas que outras proteínas presentes no extrato enzimático bruto. Sendo assim conclui-se que os sistemas aquosos bifásicos analisados apresentam-se como uma boa alternativa para a pré-concentração da enzima  $\alpha$ -amilase.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ALBERTSSON, P.A. Aqueous Polymer-phase Systems Partition of Cell Particles and Macromolecules, 3rd edition, Wiley, New York, 1986.
- ALCÂNTARA, L. A. P.; AMARAL, I. V.; BONOMO, R. C. F.; SILVA, L. H. M.; SILVA, M. C. H.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Partitioning of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin from cheese whey in aqueous two- phase systems containing poly (ethylene glycol) and sodium polyacrylate. **Food Bioproducts Process**, v. 92, p. 409-415, 2014.
- ALCÂNTARA, L. A. P.; NASCIMENTO, K. S.; MOURÃO, C. A.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)–sodium polyacrylate system for amyloglucosidase purification: Equilibrium diagrams and partitioning studies. **Separation and Purification Technology**, v. 118, p. 888–894, 2013.
- BASSANI, G.; FUCIÑOS, P.; PICÓ, G.; FARRUGGIA, B. Candida rugosa lipase Lip1–polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 532–537, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical**

**Biochemistry**, V. 72 (1976) 248–254.

CARVALHO, C. **Estudo de Equilíbrio de Fases para Sistemas Aquosos Bifásicos Compostos por Polietileno Glicol, Sais e Água**. Viçosa, 2004. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV).

DA SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas, **Química Nova**. v. 29, p.1345-1351, 2006.

DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Aqueous Two Phase Systems for Biomolecule Separation. **Advances in Biochemical Engineering**, Fiechter, A. (ed.) Springer-Verlag, Berlin, v.47, p.89-135, 1992.

GUPTA, R; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, 2003.

MAGESTE, A. B.; SENRA, T. D. A.; SILVA, M. C. H.; BONOMO, R. C. F.; SILVA, L. H. M. Thermodynamics and optimization of norbixin transfer processes in aqueous biphasic systems formed by polymers and organic salts. **Separation and Purification Technology**, v.98, p. 69-77, 2012.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

OKOLO, B. N.; EZEUGU, L. I.; MBA, C. N. Production of raw starch digestive amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.69, p.109-115, 1995.

PADILHA, G. S. **Caracterização, purificação e encapsulamento de lipase de Burkholderia cepacia**. Campinas –SP 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

PERUMALSAMY, M.; BATCHA, I. M. Synergistic extraction of bovine serum albumin using polyethylene glycol based aqueous biphasic system. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 494-497, 2011.

PORFIRI, M. C.; PICÓ, G.; ROMANINI, D.; FARRUGGIA, B. *Aspergillus oryzae* alpha-amylase partition in potassium phosphate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.49, p.7–13, 2011.

- PORTO, C. S.; PORTO, T. S.; NASCIMENTO, K. S.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B.; FILHO, J. L. L. F.; PORTO, A. LF. Partition of lectin *Canavalia grandiflora* Benth in systems aqueous two-phase using factorial design. **Biochemical Engineering Journal**, V. 53, p.165-171, 2011.
- RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V.; SPELZINI, D.; BOERIS, V.; AGUILAR, C. N.; PICÓ, G. A. Partitioning in aqueous two-phase system: its application in the downstream processing of tannase from *Aspergillus Niger*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p.392-397, 2013.
- SALABAT, A. The influence of salts on the phase composition in aqueous two-phase systems: experiments and predictions. **Fluid Phase Equilibria**. 187-188. 2001.
- SARAVANAN, S.; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Poly-aqueous two-phase system (ethylene glycol) poly (acrylic) for protein partitioning: Influence of weight Molecular pH and temperature. **Process Biochemistry**, v.43, p.905-911, 2008.
- SINGH, K., KAYASTHA, A. M.  $\alpha$ -amylase from wheat (*Triticum aestivum*) seeds: Its purification, biochemical attributes and active site studies. **Food Chemical**. n. 162, p.1-9. 2014.
- SOUZA JR, E. C, COIMBRA, J. S. R.; OLIVEIRA, E. B.; BONOMO, R. C. F. Recovery of casein-derived peptides with in vitro inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE) using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, 973, p. 84–88, 2014.
- THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation, **Biochemical Engineering Journal** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>
- TUNG, Q.T. MIYATA, N. IWAHORI, K. Growth of *Aspergillus oryzae* during treatment of cassava starch processing wastewater with high content of suspended solids. **Journal of bioscience and bioengineering**. v. 97, n 5, p.329-335. 2004.
- ZUÑIGA, A. D. G.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Coeficientes de partição da  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\alpha$ -lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos: influência da massa molar do polímero. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**. México, 2001. pp. 149-155.

# CAPÍTULO 4

---

## ARTIGO

**Otimização da partição da enzima  $\alpha$ -amilase proveniente da fermentação em estado sólido em sistemas aquosos bifásicos formados por líquido iônico e sal**

**Optimization of the  $\alpha$ -amylase enzyme partition from the solid state fermentation in aqueous two-phase systems formed by ionic liquid and salt**

---

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar o coeficiente de partição da atividade da enzima  $\alpha$ -amilase (Ke) e a sua seletividade em sistemas aquosos bifásicos (SAB's), formados por líquido iônico, água e sal inorgânico em função da variação da temperatura e tempo de partição. Para a determinação das melhores condições de partição, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2<sup>2</sup>). As variáveis respostas estudadas foram determinadas por meio da quantificação do conteúdo protéico e da atividade enzimática nas fases dos sistemas. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, onde obtive-se uma equação polinomial de segunda ordem. A partir desta equação foram determinadas as condições ótimas para a resposta estudada. Verificou-se que as melhores condições de partição foi em uma temperatura de 5,9 °C e um tempo de partição de 9,3 horas, sendo o valor do ponto ótimo de 684,9. Notou-se ainda que  $\alpha$ -amilase do extrato bruto proveniente da Fermentação em Estado Sólido (FES) também possui maior afinidade pela fase rica em líquido iônico, no entanto foi verificado um baixo valor de seletividade para estes sistemas (S=1,020).

**PALAVRAS CHAVES:** Sistemas Aquosos Bifásicos; separação;  $\alpha$ -amilase.

## ABSTRACT

This study aimed to determine the partition coefficient of the activity of  $\alpha$ -amylase enzyme (Ke) and its selectivity in a aqueous two-phase systems (ATPS), formed by ionic liquid, water and inorganic salt as a function of temperature variation and time partition. To determine the best conditions of partition, an Outline Central Composite Rotational (CCRD 22) was performed. The variables studied responses were determined by quantifying protein content and enzymatic activity in the phases of the systems. The results were analysed statistically, where I got to a polynomial equation of second order. From this equation were determined the optimal conditions for the studied response. It was found that the best conditions partition has at a temperature of 5.9 °C and a time partition of 9.3 hours, and the optimum value of 684.9. It was also noted that  $\alpha$ -amylase of the crude extract from the showed (SSF) also has a higher affinity for rich phase ionic liquid but a low selectivity for these systems (S = 1.020) was observed.

**KEYWORDS:** Aqueous Two Phase Systems; separation  $\alpha$ -amylase.

## 1 INTRODUÇÃO

Os processos de separação e purificação de biomoléculas são de grande importância industrial. Isto deve-se ao fato de que, o custo final de obtenção destes produtos está diretamente relacionado com os processos de separação envolvidos. Deste modo a extração líquido-líquido tem se destacado com técnica de separação e purificação de uma grande variedade de compostos. Esta técnica oferece alta eficiência, produtividade, seletividade e maior grau de pureza combinado com simplicidade tecnológica e baixo custo. Por outro lado este método é normalmente implementado usando solventes orgânicos, que são voláteis e tóxicos, os quais ocasionam riscos à saúde humana e inúmeros problemas ambientais. Além

disto, estabelecem fortes interações com os compostos biológicos, tais como enzimas e proteínas, impedindo a sua aplicação para a separação deste tipo de composto (PEY et al., 2009; ZAFARANI-MOATTAR & HAMZEHZADEH, 2010). Como alternativa para estes problemas, proteínas e outros materiais de origem biológica podem ser purificados em sistemas bifásicos constituídos por duas fases aquosas imiscíveis. Uma das principais vantagens do sistema aquoso bifásico (SAB) é o ambiente aquoso, que oferece condições adequadas à distribuição das biomoléculas, tais como as proteínas, nas fases, sem que ocorram mudanças na sua conformação e consequente perda de atividade biológica (PESSOA & KILIKIAN, 2005; COIMBRA & TEIXEIRA, 2009).

Os SAB's são normalmente formados por polietilenoglicol e dextrana/sais, o que está relacionado, principalmente, à disponibilidade em grandes quantidades destes componentes no mercado (FERREIRA et al., 2011). No entanto na última década SAB's à base de líquidos iônicos tornaram-se uma nova técnica alternativa promissora para separação, purificação e análise de biomoléculas (VENTURA et al., 2012). Este crescente interesse é em grande parte justificado por suas propriedades únicas, tais como a sua pressão de vapor desprezível, alta estabilidade química e térmica, a sua não-inflamabilidade e alta capacidade de solubilização. De fato, estes compostos iônicos são normalmente conhecidos por suas propriedades ajustáveis, podendo desta forma ser empregados para um fim específico, pela seleção e combinação adequada de cátions / ânions (LOUROS et al., 2010; CLAUDIO et al., 2011).

Assim estes sistemas tem sido empregados na separação de diversas enzimas. Dentre estas, a  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D glucanohidrolase glucana, EC 3.2.1.1) é uma das enzima mais importante para as indústrias de amido, alimentos, papel, detergentes, produtos e panificação e fabricação de cerveja (GUPTA et al., 2003). Pertence à família das hidrolases, que cliva aleatoriamente as ligações  $\alpha$ -1,4 entre unidades adjacentes de glicose no amido e polissacáridos relacionados para produzir principalmente maltose e maltodextrinas (SINGH & KAYASTHA 2014). Embora possam ser obtidas de várias fontes derivadas, incluindo plantas, animais e microrganismos, as de origem microbianas em geral, tem satisfeito as necessidades industriais (PANDEY e al., 2000).

Tradicionalmente, as  $\alpha$ -amilases tem sido produzida por fermentação submersa, no entanto na última década, a fermentação em estado sólido (FES) têm sido cada vez mais utilizado para a produção desta enzima. A FES é uma técnica que consiste no crescimento de microrganismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas, as quais deve possuir

umidade suficiente para suportar o crescimento e a atividade metabólica do microrganismo (THOMAS, et al., 2013).

No presente trabalho foi realizado um estudo de otimização do comportamento de partição da enzima  $\alpha$ -amilase em diferentes SAB's em função dos fatores: temperatura e tempo de partição utilizando um delineamento composto central rotacional e metodologia de superfície de resposta. A partir desta estratégia, foram identificadas os efeitos das variáveis no comportamento de partição da enzima, bem como a obtenção de modelos matemáticos que consistentemente representam os processos utilizados permitindo a determinação dos melhores valores das variáveis respostas na faixa estudada. Assim sendo este estudo destina-se a compreender o comportamento de partição da enzima  $\alpha$ -amilase em SAB's constituídos por líquido iônico, água e sal inorgânico em função da variação da temperatura e do tempo de partição para a otimização do coeficiente de partição da atividade enzimática ( $K_e$ ) da  $\alpha$ -amilase pura. O melhor resultado obtido foi utilizado para o ensaio de partição da  $\alpha$ -amilase presente no extrato bruto obtido na FES, sendo avaliado para este, o coeficiente de partição da atividade enzimática ( $K_e$ ), o da Proteína ( $K_p$ ) e a seletividade ( $S$ ).

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Materiais**

O líquido Iônico (Cloreto de 1-etil-3-metilimidazolio), albumina do soro bovino (BSA), a  $\alpha$ -amilase, o ácido 3,5 dinitrosalicílico e o azul de coomassie foram adquiridos da Sigma Aldrich Brasil. O fosfato de potássio monobásico e bibásico, amido solúvel, ácido clorídrico, fosfórico e acético, álcool etílico e tartarato de sódio e potássio foram adquiridos da Vetec, Brasil.

### **2.2 Fermentação em estado sólido**

O fungo *Aspergillus niger* utilizado no experimento foi fornecido pelo Laboratório de Resíduos Agroindustriais (LABRA-UESB). Os microrganismos foram inoculados em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) e incubados a 30°C em estufa bacteriológica (SL 222; Solab) durante 7 dias. Os esporos foram extraídos com uma solução 0,01% v/v de Tween 80 (Vetec, Brasil) e quantificados com o auxílio da câmara de Neubauer e microscópio binocular (L1000; Bioval). Dez gramas do resíduo previamente seco foram acondicionados em erlenmeyer de 125 mL e logo após autoclavados a 120°C por 15 minutos. Foi inoculado o volume de solução de esporos necessário para se atingir uma concentração de  $10^7$  esporos por grama de resíduos (TUNG et al., 2004). Foi empregado neste processo fermentação as

condições do ponto de máximo encontrado no estudo de produção da  $\alpha$ -amilase. Posteriormente foram adicionados a estes resíduos fermentados, 25 mL de água destilada estéril para a solubilização das enzimas. Esta suspensão permaneceu sob agitação orbital a 30° C por 30 minutos (QUIMIS-Q816M20) a 200 rpm. A remoção dos sólidos suspensos foi efetuada por prensagem mecânica e o líquido homogêneo centrifugado a 1107 G por 15 minutos (Centribio modelo 80-2B). Com o objetivo de concentrar o extrato enzimático bruto obtido, este foi desidratado em liofilizador à temperatura de -50°C por 48 horas.

### **2.3 Experimentos com sistemas aquosos bifásicos**

As composições dos sistemas utilizados (Tabela 1) foram obtidos a partir da literatura (PIGNATA, 2014). Para a montagem dos sistemas foram utilizadas soluções estoque de líquido iônico (60% m / m) e tampão fosfato de potássio (40% m / m). O pH destas foram ajustados pela adição de ácido fosfórico e hidróxido de potássio e acompanhamento com um medidor de pH. A fim de preparar SAB's com 45 g, quantidades correspondentes de LI e tampão fosfato de potássio foram misturados de acordo com as composições de fases mencionadas. Estes foram suavemente misturadas e em seguida incubadas durante 12 horas para permitir a separação de fases. As fases dos SAB's pré- equilibrados foram coletadas com auxílio de seringas de 20 mL e utilizadas na formação de novos sistemas de igual volume. Este procedimento foi realizado com o propósito de obter uma relação de volume da fase superior / volume da fase inferior igual à unidade.

Os experimentos de partição foram realizados em tubos de centrífuga graduados, utilizando-se 2,5 mL de cada uma das fases superior e inferior dos SAB's pré-equilibrados. Inicialmente foi realizado um delineamento composto central face centrada para três variáveis: Temperatura, pH (7,5; 8,0 e 8,5) e tempo de partição. Foi observado nesse estudo preliminar que apenas o pH 7,5 era adequado para separar está enzima, uma vez que nas demais condições as atividades enzimáticas apresentaram valores próximos de zero. Desta forma, com o objetivo de determinar as melhores condições de partição da  $\alpha$ -amilase nesta região, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR 2<sup>2</sup>) para apenas duas variáveis independentes: Temperatura (X<sub>1</sub>) e Tempo de partição (X<sub>2</sub>) (Tabela 2) com o valor de pH fixado em 7,5. A combinação que apresentou a melhor condição de partição foi utilizado como referência, e portanto empregada na partição da  $\alpha$ -amilase produzida pela fermentação no estado sólido.

**Tabela 1.** Composição global dos sistemas aquosos bifásicos utilizados para a extração da  $\alpha$ -amilase, considerando-se as concentrações finais de Líquido iônico (LI) e sal fosfato de potássio

Sistema	Composição Total	
	LI (m/m)	SAL (m/m)
LI-pH 7,5	22	21
LI-pH 8,0	22	18
LI-pH 8,5	20	20

#### 2.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade da  $\alpha$ -amilase foi determinada como descrito por Okolo et al. (1995). A mistura de reação consistiu de 1,25 ml de amido solúvel a 1%, 0,25 ml de tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0), 0,25 ml de água destilada e 0,25 ml das fases apropriadamente diluídas. Após 10 minutos de incubação a 50 ° C os açúcares redutores liberados foram estimados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) conforme Miller (1959). Um espectrofotômetro UV-Vis (BIOCHROM, modelo 570 Libra) com comprimento de onda fixado em 575nm foi utilizado para a leitura das amostras. O branco continham 0,5 mL de tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0), 1,25 mL de solução de amido 1% e 0,25 mL destilada água. Segundo GHOSE (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por mL de extrato por minuto.

#### 2.5 Determinação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais nas fases superior e inferior foi realizada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando espectrofotômetro (BIOCHROM, modelo 570 Libra), com comprimento de onda fixado em 595 nm. Para evitar interferência dos componentes das fases, os brancos foram realizados contendo a mesma composição com adição de água em substituição à amostra. A curva analítica foi construída utilizando como padrão a proteína Albumina do Soro Bovino (BSA).

#### 2.6 Determinação dos parâmetros de partição

O coeficiente de partição foi utilizado para quantificar o grau de separação alcançado na extração. O coeficiente de partição para atividade enzimática ( $K_e$ ) definido como a atividade enzimática (U/mL) nas fases Superior ( $A_{sup}$ ) e Inferior ( $A_{inf}$ ) do sistema foi determinada conforme descrito pela Equação 1.

$$K_e = \frac{[A]_{\text{sup}}}{[A]_{\text{inf}}} \quad (1)$$

O coeficiente de partição da proteína (Kp), o qual é a relação entre a concentração de equilíbrio (mg / mL) da proteína total na fase superior (C<sub>sup</sub>) e inferior (C<sub>inf</sub>) foi determinado como descrito a Equação 2.

$$K_p = \frac{[C]_{\text{sup}}}{[C]_{\text{inf}}} \quad (2)$$

A seletividade (S) foi calculada como a razão entre coeficiente de partição da  $\alpha$ -amilase (Ke) e o coeficiente de partição da proteína total (Kp) (Equação 3)

$$S = \frac{[K_e]}{[K_p]} \quad (3)$$

## 2.7 Análises estatísticas

Os efeitos da temperatura e do tempo de partição sobre o coeficiente de partição da atividade enzimática foram avaliados por meio de um (DCCR 2<sup>2</sup>). Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), análise de regressão e plotagem de gráficos superfície de resposta para obter as condições ótimas de partição da enzima em estudo. As análises foram realizadas no software *Statistica* versão 8.0, sendo considerados significativos, os termos cuja significância foi menor que 5%. Com um modelo polinomial de segunda ordem (Equação 4), os coeficientes de regressão foram ajustadas e coeficientes de regressão foram obtidos por regressão linear múltipla.

$$K_e = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + e \quad (4)$$

Onde  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$  e  $\beta_{ij}$  representam os efeitos, global, linear e quadrático e o efeito da interação entre  $X_i$  e  $X_j$  respectivamente.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 são apresentados os resultados para o processo de otimização do coeficiente de partição da atividade enzimática obtidos no delineamento composto central rotacional.

**Tabela 2.** Coeficiente de partição da atividade enzimática para os experimentos realizados no DCCR em função da temperatura e tempo de partição.

Ensaio	Variáveis reais		Variáveis codificadas		Ke
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	
1	3	7	-1	-1	264,20
2	9	7	+1	-1	117,79
3	3	11	-1	+1	356,64
4	9	11	+1	+1	392,30
5	6	6,17	0	-1,414	69,84
6	6	11,83	0	+1,414	226,53
7	1,76	9	-1,414	0	94,81
8	10,24	9	+1,414	0	39,89
9	6	9	0	0	686,17
10	6	9	0	0	685,50
11	6	9	0	0	659,33

Os dados experimentais foram avaliados utilizando modelos quadráticos completos. Estes modelos foram testados pela análise de variância e suas significâncias verificadas usando o teste estatístico Fisher (teste-F). Os termos que não foram significativos a 5% de probabilidade foram agrupadas ao erro e novos modelos reduzidos foram obtidos pela análise de regressão. Os resultados das análise são apresentados na Tabela 3.

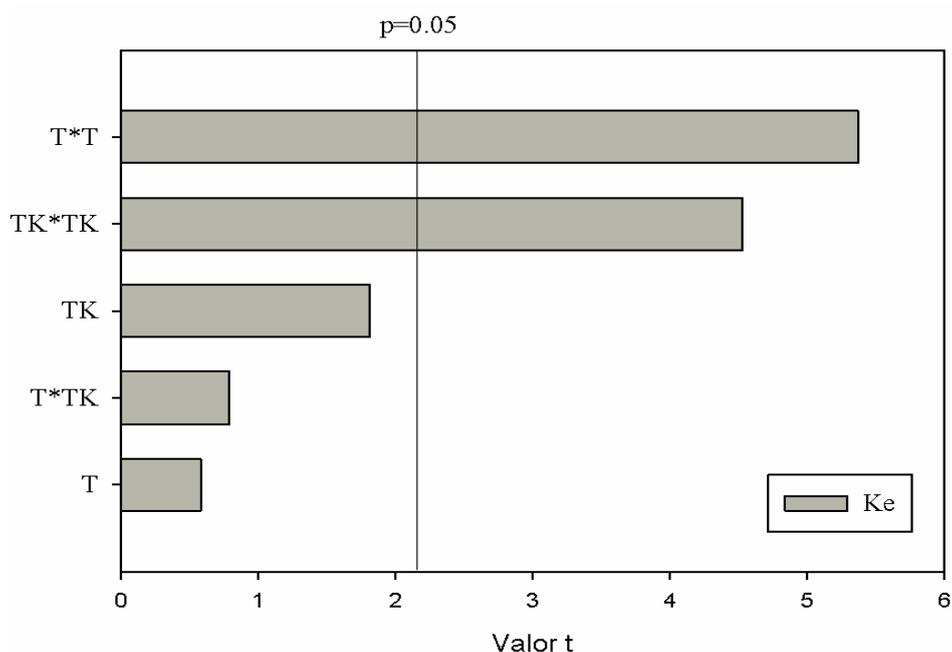
**Tabela 3.** Resultados da análise de regressão para o coeficiente de partição da atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase para DCCR 2<sup>2</sup>.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P	R <sup>2</sup>
<b>Ke</b>						
Modelo	4	565587	141397	12,51	0,0045	0,8929
Erro	6	67825	11304			
Falta de ajuste	4	67355	16838	71,63		
Erro puro	2	470,18	235,09			
Total	10	633413				

**GL** = Graus de Liberdade; **SQ** = Soma dos Quadrados; **QM** = Quadrado Médio; **F** = Teste de Fisher; **p** = Probabilidade; **R<sup>2</sup>**=Coeficiente de determinação.

Observou-se que a regressão foi significativa ( $P < 0,05$ ). Na Figura 1 podem ser visualizados os valores do teste t em gráfico de Pareto, onde a estimativa normalizada dos efeitos de cada um dos fatores são apresentados e comparados a magnitude mínima de um fator estatisticamente significativo com 95% de confiança ( $p = 0,05$ ), representada pela linha traçada verticalmente no gráfico.

**Figura 1.** Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis temperatura (T) e tempo de partição (TK) sobre o coeficiente de partição da atividade enzimática (Ke).



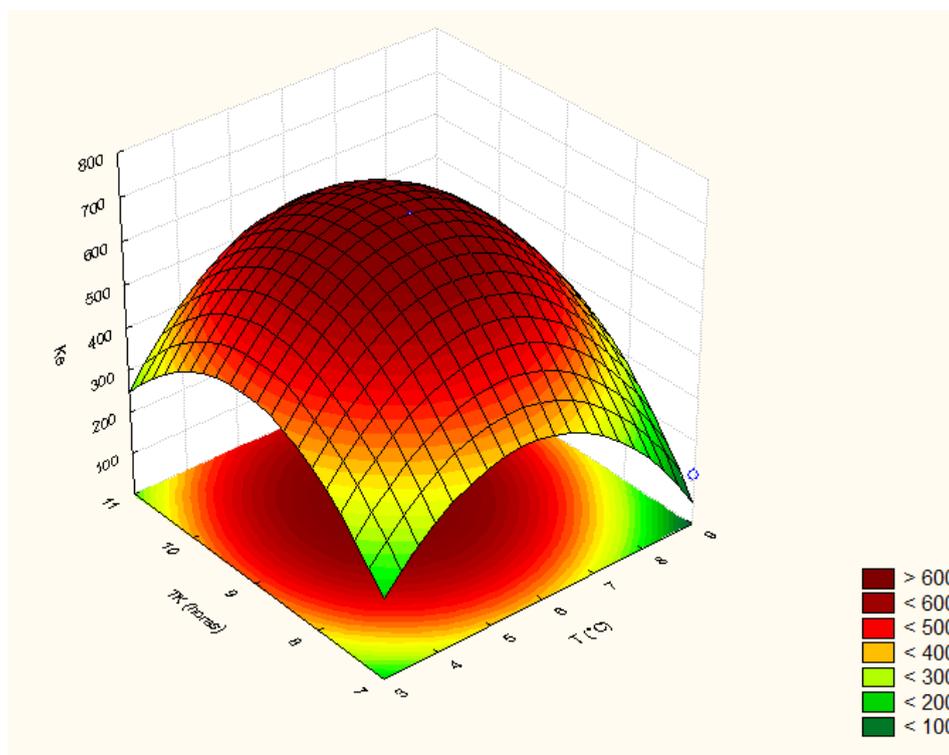
Analisando o gráfico de Pareto observa-se que o efeito quadrático da temperatura e do tempo de partição foram estatisticamente significativos ( $p < 0.05$ ) para a resposta Ke e que não houve interação entre as duas variáveis independentes estudadas.

Na Equação 5 é apresentado o modelo matemático em termos de valores não codificados, proposto para explicar o comportamento do Ke nos intervalos de temperatura e tempo de partição estudados.

$$Ke = - 5146,9207 + 335,5357T + 1039,2809TK - 28,6101T^2 - 55,6951 TK^2 \quad (5)$$

A partir do modelo foi plotado um gráfico de superfície de resposta para definir as melhores condições para maximizarem os valores da variável resposta. O gráfico de superfície de resposta é apresentado na Figura 2.

**Figura 2.** Superfície de resposta para o coeficiente de partição da atividade ( $K_e$ ) em função da temperatura ( $T$  °C) e do tempo de partição (TK).



Verificou-se que as melhores condições de partição da atividade enzimática foi em uma temperatura de 5,9 °C e um tempo de partição de 9,3 horas, sendo o valor do ponto ótimo de 684,9. A análise do gráfico evidencia que as condições impostas no estudo influenciaram fortemente na atividade da  $\alpha$ -amilase. Nota-se que nas menores temperaturas e tempos de partição há uma drástica queda no  $K_e$ , o que possivelmente está relacionado com o menor fluxo difusivo das proteínas entre as fases dos sistemas, uma vez que este processo é dependente da temperatura e do tempo. Isto ocorre por que quando retiramos energia na forma de calor de um sistema a energia interna diminui, reduzindo a energia cinética média das moléculas, de modo que essas se tornam menos livres para se movimentarem na solução. Entretanto foi observado que para os maiores valores TK e baixas temperaturas, também houve uma redução do  $K_e$ , o que mostra que um tempo mais prolongado de exposição das  $\alpha$ -amilase nos sistemas afetam a sua atividade. Observou-se ainda que em temperaturas maiores que 6 °C também há uma redução da atividade amilásica.

### Partição da $\alpha$ -amilase produzida por Fermentação em Estado Sólido (FES)

Na Tabela 3 são apresentados os resultados para os parâmetros de partição da  $\alpha$ -amilase proveniente da FES nas condições pré-determinadas.

**Tabela 3.** Resultados da determinação dos parâmetros de partição para a  $\alpha$ -amilase proveniente da FES nas fases dos SAB's.

Ensaio	Ke	Kp	S
9	21,962	21,524	1,020

Observa-se que a  $\alpha$ -amilase presente no extrato bruto proveniente da Fermentação em Estado Sólido (FES) possui maior afinidade pela fase rica em líquido iônico, tendo em vista o alto valor de Ke encontrado. Entretanto foi verificado um baixo valor de seletividade (s) para estes sistemas, evidenciando que as demais proteínas também possui maior afinidade por esta fase.

Alcântara et al. (2013), estudando a extração e purificação de amiloglucosidase com SAB's formados por polietilenoglicol e poliácido de sódio, obtiveram um valor ótimo para a seletividade de 1,6.

## 4 CONCLUSÕES

Sistemas aquosos bifásicos compostos por líquido iônico, sal e água foram usados para investigar o comportamento de partição da enzima  $\alpha$ -amilase. Os resultados mostram que as melhores condições de partição da atividade enzimática (Ke) foi em uma temperatura de 5,9 °C e um tempo de partição de 9,3 horas, sendo o valor do ponto ótimo de 684,9. Para a partição da  $\alpha$ -amilase presente no extrato enzimático bruto proveniente da FES no ponto ótimo do referido SAB foi observado que a mesma possui maior afinidade pela fase rica em líquido iônico, tendo em vista o alto valor de Ke encontrado (21,962). Entretanto foi verificado um baixo valor de seletividade (1,020) para estes sistemas, evidenciando que as demais proteínas também possui maior afinidade por esta fase. Assim novos estudos dos grupamentos iônicos do LI seriam necessários para melhorar e aumentar a seletividade  $\alpha$ -amilase pela fase rica em líquido iônico, bem como aumentar a exclusão do conteúdo protéico indesejável da mesma.

## 5 REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, L. A. P.; NASCIMENTO, K. S.; MOURÃO, C. A.; MINIM, V. P. R.; MINIM, L. A. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)–sodium polyacrylate system for amyloglucosidase purification: Equilibrium diagrams and partitioning studies. **Separation and Purification Technology**, V. 118, p. 888–894, 2013.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248–254, 1976.
- CLÁUDIO, A.F.M.; FREIRE, M.G.; FREIRE, C.S.R.; SILVESTRE, A.J.D.; COUTINHO, J.A.P. Extraction of Vanillin using Ionic-Liquid-Based Aqueous Two-Phase Systems. **Separation and Purification Technology**, v.75, p.39-47, 2011.
- COIMBRA, J.S. R.; TEIXEIRA, J. **Engineering Aspects of Milk and Dairy Products**. Boca-Raton, CRC Press, 2009.
- FERREIRA, L.A.; TEIXEIRA, J.A.; MIKHEEVA, L.M.; CHAIT, A. e ZASLAVSKY, B.Y. Effect of salt additives on partition of nonionic solutes in aqueous PEG sodium sulfate two-phase system. **Journal of Chromatography A**. v.1218, p.5031-5039. 2011.
- GUPTA, R; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -Amylases: Biotechnological Perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1599-1616, 2003.
- LOUROS, C.L.S.; CLÁUDIO, A.F.M; NEVES, C.M.S.S.; FREIRE, M.G.; MARRUCHO, I.M.; PAULY, J.; and COUTINHO, J.A.P. Extraction of Biomolecules Using Phosphonium-Based Ionic Liquids +  $K_3PO_4$  Aqueous Biphasic Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, n.4, p.1777-1791, 2010.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- OKOLO, B. N.; EZEUGU, L. I.; MBA, C. N. Production of raw starch digestive amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.69, p.109-115, 1995.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p.1153-1169, 2000.

- PEI, Y.; WANG, J.; WU, K.; XUAN, X.; LU, X. Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins. **Separation Purification Technology**, v.64, n.3, p.288-295, 2009.
- PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Editora Manole Ltda, São Paulo, 2005.
- PIGNATA, M.C. **Estudo do equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos compostos por líquido iônico, sal e água**. Itapetinga – BA: UESB, 2014. 60p. (Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos).
- SINGH, K., KAYASTHA, A. M.  $\alpha$ -amylase from wheat (*Triticum aestivum*) seeds: Its purification, biochemical attributes and active site studies. **Food Chemical**. n. 162, p.1-9. 2014.
- THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation, **Biochemical Engineering Journal** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>
- TUNG, Q.T. MIYATA, N. IWAHORI, K. Growth of *Aspergillus oryzae* during treatment of cassava starch processing wastewater with high content of suspended solids. **Journal of bioscience and bioengineering**. Vol. 97, 329-335, 2004.
- VENTURA, S. P. M.; BARROS, R. L. F.; BARBOSA, J. M. P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; COUTINHO, J. A. P. Production and purification of an extracellular lipolytic enzyme using ionic liquid-based aqueous two-phase systems. **Green Chemistry**, v. 14, p. 734-740, 2012.
- ZAFARANI MOATTAR, M. T.; HAMZEZHARDEH. S. Salting-out effect, preferential exclusion, and phase separation in aqueous solutions of chaotropic water-miscible ionic liquids and kosmotropic salts: effects of temperature, anions, and cations. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 55, p. 1598-1610, 2010.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de otimização da produção da enzima  $\alpha$ -amilase mostrou que as melhores condições de produção da mesma foi com um tempo de fermentação de 35,0 horas e com 45,7 % de umidade. Notou-se que houve uma produção expressiva desta enzima no decorrer do processo fermentativo, uma vez que o fungo à produziu utilizando apenas o resíduo de mandioca como substrato.

Os resultados obtidos para os SAB's formados por PEG-Sal mostram que a massa molecular do polímero foi a variável mais significativa, visto que a redução desta aumentou partição da enzima para a fase superior. O efeito inverso foi observado quando aumentou-se a massa do polímero. Foi observado também que os coeficientes de partição aumentaram com o aumento dos valores do pH e com redução da temperatura e que o tempo de partição foi significativo apenas para a variável  $K_e$ . Observou-se ainda que estes SAB's manteve a atividade biológica da enzima, mostrando desta forma ser adequados para realizar a pré-concentração da mesma. Quanto aos resultados encontrados na partição da  $\alpha$ -amilase proveniente da FES para este sistema, verificou-se que houve uma boa seletividade, evidenciando que está enzima possui maior afinidade por umas das fases nas condições estudadas que outras proteínas presentes no extrato enzimático bruto.

Quanto aos resultados encontrados para os SAB's formados por LI-sal verificou-se que as melhores condições para o coeficiente de partição da atividade enzimática foi em uma temperatura de 5,9 °C e um tempo de partição de 9,3 horas. Em relação a partição da  $\alpha$ -amilase proveniente da FES no ponto ótimo do referido SAB foi observado que a mesma possui maior afinidade pela fase rica em líquido iônico ( $K_e=21,962$ ;  $K_p=21,524$ ). Entretanto foi verificado que as demais proteínas também possui maior afinidade por esta fase, devido ao baixo valor de seletividade obtido ( $S=1,020$ ).

Portanto, conclui-se que o processo de produção da  $\alpha$ -amilase ocorreu de forma satisfatória, tendo em vista que, que o fungo sintetizou e à excretou sem a necessidade de qualquer outro indutor além do resíduo de mandioca, que SAB's formados por LI-sal apresenta baixa seletividade para a separação da  $\alpha$ -amilase proveniente da FES e que os SAB's formados por PEG-sal possui potencial para ser aplicado na pré-concentração da  $\alpha$ -amilase, em virtude da boa seletividade apresentada.