

PRODUÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS A PARTIR DO GRÃO DE MILHO MALTADO

RODRIGUES, E.M. G.

*Fatec Piracicaba “Deputado Roque Trevisan” – Tecnologia em Alimentos/Biocombustíveis
eliana.goncalves@fatec.sp.gov.br*

Production of Amylolytic Enzymes from Malted Corn Grain

Eixo Tecnológico: Produção Alimentícia

Resumo

A obtenção de enzimas, se torna cada dia mais importante, pois irão atuar em diversas transformações, entretanto, para se alcançar a sustentabilidade, é necessário que sua produção seja a partir de fontes renováveis, tornando a tecnologia enzimática uma das áreas mais promissoras dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. A amilase, apresenta na hidrólise do amido, sua principal aplicação, sendo utilizada na indústria de panificação, nas indústrias de álcool, principalmente nas cervejarias, em indústria de processamento de farinhas, na fabricação de xarope de glicose e no preparo de gomas de dextrinas. Para se conseguir o malte, os grãos do cereal devem ser umedecidos a ponto de iniciarem a germinação, quando o embrião começa a germinar produz enzimas que quebram parcialmente o amido e as proteínas. Partindo deste contexto, o presente trabalho tem o intuito de produzir enzimas amilolíticas a partir da malteação do milho, uma vez que independente do gênero alimentício o processo de malteação é sempre similar. A metodologia proposta se baseia na produção de enzimas amilolíticas a partir da maceração dos grãos e controle da germinação, na determinação da atividade enzimática amilolítica, pelo método de Okolo e análise dos resultados através do Programa Action Stat. Os resultados nos permitem observar que, o maior valor da atividade enzimática amilolítica tanto para amilase total, quanto para α -amilase foi alcançado na concentração de amido de 4%, temperatura de incubação de 60°C e concentração de malte 12%.

Palavras-chave: Amilase, Malte de milho, Germinação, *Zea mays*.

Abstract

The obtaining of enzymes becomes increasingly important because they will act in several transformations, however, to achieve sustainability, it is necessary that their production is from renewable sources, making enzymatic technology one of the most promising areas within the new technologies for synthesis of compounds of high added value. Amylase presents in the hydrolysis of starch, its main application, being used in the bakery industry, in the alcohol industries, mainly in breweries, in the flour processing industry, in the manufacture of glucose syrup and in the preparation of dextrin gums. To obtain malt, the cereal grains must be moistened to the point of starting germination, when the embryo begins to germinate it produces enzymes that partially break down starch and proteins. Based on this context, the present work aims to produce amylolytic enzymes from the malting of corn, since, regardless of the foodstuff, the malting process is always similar. The proposed methodology is based on the production of amylolytic enzymes from grain maceration and germination control, the determination of amylolytic enzymatic activity, by the Okolo method and analysis of the results through the Action Stat Program. The results allow us to observe that the highest value of the amylolytic enzymatic activity for both total amylase and α -amylase was achieved at the starch concentration of 4%, incubation temperature of 60°C and malt concentration of 12%.

Keywords: Amylase, Corn malt, Germination, *Zea mays*.

1. Introdução

O estudo da aplicação de enzimas em processos biotecnológicos vem tendo um grande destaque a nível Mundial e entre estas, se destacam como as mais importantes, para a biotecnologia, as amilases, representando cerca de 25-33% do mercado mundial de enzimas [1]. Sendo seu uso fundamental na hidrólise do amido, utilizada na indústria de panificação; nas indústrias de álcool, principalmente nas cervejarias; em indústrias de processamento de farinhas; na fabricação de xaropes de glicose; no preparo de gomas de dextrinas, usadas para acabamento de papéis e tecidos; dentre outros [2].

Entre as diferentes classes de enzimas, as amilases pertencem ao grupo das hidrolases e são mundialmente conhecidas representando a maior parte do mercado mundial de enzimas. Podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e de microrganismos. Das produzidas a partir de origem vegetal destacam-se as proteases, como a papaína, bromelina e ficina, e o complexo amilolítico, malte de cereais que é utilizado na indústria cervejeira [3]. De uma maneira geral, as enzimas são utilizadas amplamente nos mais diversos processos industriais em razão da sua especificidade e do seu potencial catalítico. São utilizadas em vários processos fermentativos, entre eles a produção de cerveja, em sua maioria já presentes no malte de cevada que é o principal cereal utilizado na produção de cervejas, porém, muitas vezes, é preciso complementá-las com a utilização de enzimas exógenas, principalmente, no caso das cervejas artesanais, Low Carb e nas produzidas pelas grandes indústrias, neste caso, as enzimas ganham função dupla: ajudam o processo de maceração e fermentação e também na redução do consumo de água e energia, além do tratamento de efluentes. As principais classes de enzimas utilizadas no processo cervejeiro são as amilases, a amiloglucosidades, glucanases, proteases e alfa-acetato descarboxilase.

O milho (*Zea mays*) é um produto agrícola muito difundido no Brasil, comercializado *in natura* ou processado a baixo valor econômico. Tem sido utilizado em diferentes tipos de bebidas, como adjunto no preparo de diferentes formulações. A maltagem deste cereal pode ser usada como uma fonte de enzimas hidrolíticas, as quais são requeridas em proporções importantes na produção de álcool para a indústria química, farmacêutica e de alimentos [4]. Sendo assim, a obtenção das enzimas α e β -amilases de malte de milho geraria um produto de alto valor agregado. O milho é um dos cereais mais cultivados do mundo e sua importância está relacionada com sua diversidade de utilização, desde a alimentação até a indústria de alta tecnologia. É uma das mais eficientes plantas armazenadoras de energia existentes na natureza. De uma semente que pesa pouco mais de 0,3 g irá surgir uma planta com aproximadamente 2,0 m de altura, isto em cerca de nove semanas. E ainda, nos meses seguintes, essa planta produzirá cerca de 600 a 1.000 sementes similares aquela da qual se originou. Os grãos do milho são, geralmente, amarelos ou brancos, e o peso individual do grão varia de 250 a 300 mg. Sua composição média em base seca é 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra e 4% de óleo [5].

O processo de obtenção do malte ou malteação consiste nas etapas de maceração, germinação e secagem. A maceração consiste no fornecimento de oxigênio e água ao grão, despertando sua dormência, levando-o para a etapa seguinte. Na germinação, ocorrem as modificações físicas e química, que estimulam a produção de enzimas amilolíticas, α -amilases e β -amilases, que hidrolisam o amido. E na secagem ocorre a eliminação da umidade. O produto obtido denomina-se malte e caracteriza-se por seu alto poder diastásico (capacidade para hidrolisar o amido) e pelo conteúdo de substâncias tais como: açúcares, aminoácidos e peptídeos que posteriormente servirão de substrato para as leveduras no processo de fermentação. Na etapa inicial de umidificação dos grãos, denominado maceração, é seguido da

Anais da VII Mostra de Docentes em RJJ

etapa de controle da germinação onde se ativa o sistema enzimático do grão que irá agir sobre a reserva de amido do mesmo para fornecer carbono e energia para o desenvolvimento do embrião. Após o processo atingir um determinado ponto de germinação, o processo é interrompido pela secagem [6]. Um dos principais objetivos da malteação é a produção de enzimas, que irão atuar em diversas transformações nas substâncias de reserva do grão durante o processo de germinação. O processo de malteação é sempre similar independente do gênero alimentício que o malte será empregado.

Assim, o intuito deste trabalho foi realizar a produção de enzimas amilolíticas a partir do grão de milho maltado, determinando as melhores condições para a obtenção do malte de milho e a caracterização da amilase.

2. Materiais e métodos

2.1 Obtenção do malte

Os grãos de milho foram obtidos no comércio local da cidade de Piracicaba - SP e submetidos a uma seleção manual. As amostras foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio 2,5% com o objetivo de evitar contaminação por microrganismos. O milho foi macerado durante dois dias, para elevar a umidade do grão na faixa de 40 a 45% de seu peso inicial em umidade. Utilizou-se água destilada estéril na proporção de uma parte de grão para três de água, substituindo a água a cada 12 horas [7]. O grão macerado foi conduzido à germinação em temperatura ambiente, sendo interrompida mediante secagem em estufa com circulação de ar a 50°C por 24 horas.

2.2 Determinação da atividade amilolítica

A extração da enzima amilolítica foi realizada a partir de uma solução de malte de milho a pH 5 em tampão acetato de sódio 0,1 M. Essa solução foi triturada com pistilo em gral de porcelana e filtrada para determinação da atividade amilolítica, conforme [8].

A atividade da amilase total (α -amilase e β -amilase) foi determinada como descrito por [8] e os açúcares redutores liberados foram estimados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) conforme [9]. Para a determinação da atividade das α -amilases procedeu-se da mesma maneira, porém, antes da realização do ensaio foram inativadas outras amilases à 70°C por 15 minutos.

2.3 Avaliação do poder diastático do malte

As condições utilizadas para determinação do potencial amilolítico do malte de milho foram realizadas por meio de um planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais, sendo as variáveis de estudo a concentração de amido, a temperatura de incubação e a concentração do malte de milho. A matriz está apresentada na Tab. 1.

Anais da VII Mostra de Docentes em RJJI

Tab. 1: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais.

Ensaio	A	B	C
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

A = Amido (%) (-1 = 2; 0 = 3; 1 = 4); B = Temperatura (°C) (-1 = 40; 0 = 50; 1 = 60);
C = Malte de Milho (%) (-1 = 4; 0 = 8; 1 = 12)

Fonte: Elaboração própria

2.4 Planejamento Experimental

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente, de acordo com planejamentos predeterminados, para verificar o nível dos efeitos dos fatores em estudo. A análise estatística dos resultados foi realizada através do Programa Action Stat, onde foram feitas estimativas dos efeitos das variáveis e suas interações, considerando um nível de significância de 95%. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativa de efeitos, teste t de “Student” e ainda em tabelas de análise de variância.

3. Resultados e Discussão

Os resultados da avaliação do poder diastático do malte do milho, através da determinação da atividade enzimática das α -amilases e amilases totais presentes no malte de milho estão apresentados na Tab. 2. Os ensaios foram realizados nas diferentes concentrações de amido, temperatura e concentração de malte. A extração das enzimas amilolíticas foi feita a partir do preparo de uma solução de malte de milho seco em tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0. Esta mistura foi triturada com pistilo em gral de porcelana e em seguida a solução enzimática foi filtrada.

A atividade enzimática das amilases totais foi feita em um sistema de reação contendo amido solúvel como substrato nas concentrações de estudo e incubadas durante 10 minutos nas temperaturas de estudo. Para a determinação da atividade das α -amilases procedeu-se da mesma maneira, porém, antes da realização do ensaio foram inativadas outras amilases à 70°C por 15 minutos.

Anais da VII Mostra de Docentes em RJJ

Tab. 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais para avaliação do poder diastático do malte do milho.

Ensaio	A	B	C	Amilase total (U/g)	α -Amilase (U/g)
1	-1	-1	-1	0,12	0,02
2	+1	-1	-1	2,05	0,38
3	-1	+1	-1	0,16	0,03
4	+1	+1	-1	3,55	0,31
5	-1	-1	+1	0,90	0,08
6	+1	-1	+1	1,14	0,12
7	-1	+1	+1	1,98	0,12
8	+1	+1	+1	8,72	0,47
9	0	0	0	0,26	0,09
10	0	0	0	0,27	0,09
11	0	0	0	0,30	0,09
12	0	0	0	0,29	0,10

A = Amido (%) (-1 = 2; 0 = 3; 1 = 4); B = Temperatura (°C) (-1 = 40; 0 = 50; 1 = 60); C = Malte de Milho (%) (-1 = 4; 0 = 8; 1 = 12)

Fonte: Elaboração própria

Ao analisar a Tab. 2, nos experimentos 1 e 8, onde temos respectivamente, o menor e maior valor de atividade enzimática, tanto da Amilase Total como α -Amilase, percebe-se que todas as variáveis passam do menor para o maior nível, mantendo no experimento 8, todos os níveis no maior valor. Estes resultados podem ser comprovados pela Tab. 3. Além disso, o potencial amilolítico das amilases totais foi maior quando comparado as α -amilases, este resultado concorda com [10], que apresentam as amilases como as principais enzimas constituintes do malte.

Tab. 3: Efeitos estimados, valores do teste t de “Student” obtidos no planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais.

Efeitos	Estimativas	T	P
Média	1,645	-	-
A	1,538	2,28	0,05*
B	1,275	1,89	009*
C	0,858	1,27	0,238

A = Amido (%) (-1 = 2; 0 = 3; 1 = 4); B = Temperatura (°C) (-1 = 40; 0 = 50; 1 = 60); C = Malte de Milho (%) (-1 = 4; 0 = 8; 1 = 12); *Significativos

Fonte: Elaboração própria

Ao analisar a Tab. 3, percebe-se que as variáveis significativas porcentagem de amido e temperatura, apresentam sinais positivos, o que indica que, para haver aumento do rendimento em atividade, será preciso aumentar os valores destas variáveis. Estas observações podem ser comprovadas através da Tab. 4.

Anais da VII Mostra de Docentes em RJJ

Tab. 4: Análise da variância para o estudo da avaliação do poder diastático do malte do milho, no planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais.

Efeitos	QM	F	P
A	18,91	5,22	0,05*
B	13,00	3,59	0,09*
C	5,88	1,63	0,238

A =Amido (%); B = temperatura (%); C = Malte (%); QM = Média Quadrática;
*Significativos ao nível de 95% de confiança

Fonte: Elaboração própria

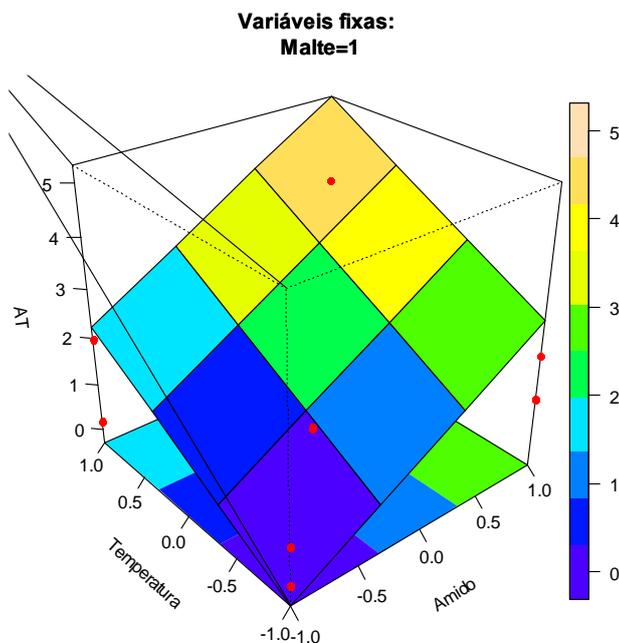
Como os resultados das análises demonstraram que o modelo se ajusta a um linear, então podemos representar o poder diastático do malte do milho, considerando os termos que realmente influenciam no rendimento em atividade, pela Eq. (1):

$$Y = 1,65 + 1,54A + 1,28B \quad (1)$$

Sendo que Y representa o rendimento em atividade, A a concentração do amido (%) e B a temperatura (°C).

A metodologia da superfície de resposta foi utilizada para otimizar as condições do poder diastático do malte do milho, fornecendo um modelo matemático adequado para a resposta em rendimento em atividade. A superfície de resposta do modelo e as linhas de contorno estão apresentadas na Fig. 1.

Fig. 1: Superfície de resposta que representa a atividade enzimática do malte de milho.



Fonte: Elaboração própria

4. Considerações finais

Os resultados mostraram que as variáveis de estudo são significativas sobre o potencial amilolítico do grão do milho maltado, dentro das condições estudadas, apresentando valores máximos de atividade enzimática em níveis superiores, ou seja, em maiores concentrações de amido e maior temperatura, sendo o maior valor da atividade enzimática amilolítica tanto para amilase total, quanto para α -amilase alcançado na concentração de amido de 4%, temperatura de incubação de 60°C e concentração de malte 12%.

Agradecimentos

Ao CPRJI, CPS e Governo do Estado de São Paulo.

Referências

- [1] SUNDARRAM, A.; MURTHY, T.P.K. Amilase: produção e aplicações: uma revisão. **Revista de Microbiologia Aplicada & Ambiental**, v.2, n.4, p.166-175, 2014.
- [2] KUMAR, S.S.; SANGEETA, R.; SOUMYA, S et al. Caracterizando a produção de amilase termófila de Taptapani. **Microbiology**, v.7, n.12, 2014.
- [3] MAITY, C. et al. Isozymes of α -amylases from newly isolated *Bacillus thuringiensis* CKB19: Production from immobilized cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.16, p. 312–319, 2011.
- [4] URIYO, M.; EIGEL, W. E. Duration of kilning treatment on α -amylase, β -amylase and endo- (1,3)- β -D-glucanase activity of malted sorghum (*Sorghum bicolor*). **Process Biochemistry**. v. 35, p. 433-436, 1999.
- [5] PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6p.
- [6] GEORG-KRAEMER, J.E. et al. Developmental expression of amylases during barley malting. *Journal of Cereal Science*, London, v.33, p.279-288, 2001.
- [7] SANTANA, J. C. C. **Recuperação das enzimas α -amilases em sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl₂ para uso como biocatalisador amiláceos**. Dissertação (Mestrado). FEQ/ UNICAMP, Campinas SP, 2003.
- [8] OKOLO, B. N. et al. 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.
- [9] MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- [10] FARIAS, D. et al. Malteação, sacarificação e obtenção de aguardente de milho. **In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**, 2007, Curitiba, PR. Anais. Curitiba, 2007.