

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO SOBRE O POTENCIAL AMIOLÍTICO DO MALTE DE MILHO

Daniele Farias*, Adriana Galon Saggiorato, Paulo Roberto Koetz, Luciane Maria Colla, Telma Elita Bertolin

*Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo
Email: danielufrgaucha@yahoo.com.br

RESUMO

O malte é fonte de enzimas para o processo de sacarificação do amido, etapa necessária da fermentação alcoólica a partir de materiais amiláceos. O milho, em função de seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, constitui-se em um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo. Objetivou-se estudar a influência da temperatura de incubação e concentração de substrato sobre a atividade amilolítica do grão de milho maltado através de um Planejamento Fatorial Completo 2^2 com três pontos centrais, onde as variáveis de estudo foram a temperatura de incubação e a concentração de substrato. O malte utilizado foi germinado por 5 d e submetidos à secagem em estufa com circulação de ar por 24 h na temperatura de 50°C apresentando umidade final de 7,9%. As enzimas amilolíticas foram extraídas através do processo de maceração do malte com tampão Tris-HCL pH 5,0 e o potencial enzimático foi determinado a partir de um sistema de reação contendo amido solúvel nas concentrações de 10%, 15% e 20%. O sistema foi submetido à incubação por 15min nas temperaturas de 30°C, 50°C e 70°C e os açúcares redutores foram quantificados pelo método colorimétrico do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Os resultados da atividade enzimática foram avaliados estatisticamente pelo módulo Experimental Design, do Software Statistica 6.0 através do método do erro puro. A máxima atividade enzimática para α -amilase foi de 2538,4 mgAR/g_{malte} e para amilases totais foi de 3283,8 mgAR/g_{malte}, ambas nas condições de 20% para concentração de substrato na temperatura de incubação de 70°C.

Palavras-chave: atividade enzimática, alfa-amilase, beta-amilase .

1 INTRODUÇÃO

O milho é um cereal amplamente cultivado na região nordeste do estado do Rio Grande do Sul e apresenta um excedente que pode ser aproveitado para a geração de produtos com alto valor agregado, como o álcool de milho.

Os grânulos de amido presentes são formados por dois polímeros da glicose, a amilose e a amilopectina, que se associam por meio de pontes de hidrogênio. Este amido é facilmente hidrolisado, parcial ou totalmente, via hidrólise ácida e/ou enzimática. Na hidrólise enzimática, as enzimas α -amilases atacam as ligações α -1,4 das regiões mais ramificadas e protegidas da amilopectina, com formação de dextrinas. As β -amilases começam a agir nos componentes do amido a partir da extremidade não-redutora, liberando unidades de maltose; são também denominadas amilases sacarificantes, uma vez que as maltoses resultantes são facilmente fermentescíveis (Lima, 2001).

A sacarificação é a hidrólise do amido presente em grãos em unidades de açúcares fermentescíveis e não fermentescíveis. O processo pode ser realizado com o uso de enzimas

comerciais, as quais tem altos custos econômicos e se constituem em uma dependência dos produtores às flutuações do mercado.

O uso de enzimas produzidas pelo processo de malteação é uma alternativa a viabilização da produção de álcool de cereais. O objetivo foi verificar as melhores condições de extração enzimática para otimizar ao máximo o processo de sacarificação.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

Os grãos de milho foram fornecidos pelo Centro de Pesquisa Agropecuária (CEPAGRO). Os mesmos foram submetidos a uma seleção manual, retirando-se grãos partidos, mofados e injuriados. As amostras foram lavadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, na proporção de 1:1. O milho passou pelo processo de maceração durante o período de dois dias, à 4°C. Foi utilizada água destilada estéril na proporção de uma parte de grão para três de água, e a troca da água foi realizada a cada doze horas. Para a obtenção de malte, o grão macerado foi germinado na forma de rolos com papel germinador, umedecido com água estéril sendo então conduzido para estufa na temperatura de 20°C no período de 5 d. A germinação dos grãos foi interrompida mediante secagem em estufa com circulação de ar na temperatura de 50°C por 24 h, obtendo-se malte com umidade de 7,9%. O malte foi moído em moinho de facas e embalado à vácuo sendo acondicionado em temperatura de congelamento.

A atividade enzimática do malte foi avaliada conforme o Planejamento Fatorial Completo 2^2 com três pontos centrais. As variáveis de estudo foram concentração de substrato (10%, 15% e 20%) e temperatura de incubação (30°C, 50°C e 70°C). Ensaio preliminares foram realizados para determinação das melhores condições para extração enzimática, encontrando-se pH ótimo de 5.

A extração das enzimas amilolíticas foi feita a partir de 1 g de malte de milho seco, adicionando-se 15 mL de tampão TRIS – HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em pH 5,0. Esta mistura foi triturada por 5 min com pistilo em gral de porcelana. (ARAGÃO, 2002). A solução enzimática foi filtrada e transferida para um balão de 25 mL, completando-se o volume com tampão TRIS – HCl. A solução enzimática foi conservada em banho de gelo até o momento da determinação da atividade.

A atividade enzimática das amilases totais foi medida em um sistema de reação contendo amido solúvel como substrato nas concentrações de estudo e 1 mL de solução de enzima. O sistema de reação foi incubado durante 15 min e para interromper a atividade enzimática adicionou-se 1 mL de NaOH 1 mol.L^{-1} . A solução foi diluída para a determinação dos açúcares redutores. Para a determinação da atividade enzimática das α -amilases procedeu-se da mesma forma, porém, antes da realização do ensaio foram inativadas outras amilases, à 70°C por 15 min. Os açúcares redutores foram quantificados através do método de 3,5 DNS.

Os resultados da atividade enzimática das α -amilases e amilases totais presentes no malte foram avaliados através do módulo Experimental Design, do Software Statistica 6.0 através do método do erro puro. A Tabela 1 apresenta a matriz das variáveis codificadas e os valores reais destas variáveis para o Planejamento Fatorial Completo 2^2 com três pontos centrais.

Tabela 1 Níveis e Valores Reais da Temperatura de Incubação e Concentração de Substrato

Experimentos	X ₁	X ₂	Temperatura de Incubação	Concentração de Substrato
1	-1	-1	30°C	10%
2	+1	-1	70°C	10%
3	-1	+1	30°C	20%
4	+1	+1	70°C	20%
5	0	0	50°C	15%
6	0	0	50°C	15%
7	0	0	50°C	15%

2.2 Resultados e Discussão

A Tabela 2 apresenta os valores de atividade enzimática (mg AR/g_{malte}) para os experimentos de 1 a 7 para o Planejamento Fatorial Completo 2² com três pontos centrais.

Tabela 2 Atividade Enzimática das α -amilases e amilases totais para os experimentos 1 a 7

Experimentos	α – amilase	Amilases totais
	(mgAR/gmalte)	(mgAR/gmalte)
1	1038,245 \pm 29,47	1243,175 \pm 8,84
2	2195,55 \pm 3,00	2254,825 \pm 16,83
3	1022,57 \pm 10,75	1682,665 \pm 21,80
4	2538,38 \pm 20,31	3283,765 \pm 38,07
5	1780,26 \pm 24,72	2281,815 \pm 22,63
6	1745,635 \pm 28,66	2172,805 \pm 6,38
7	1757,545 \pm 29,82	2097,07 \pm 27,67

O potencial amilolítico das amilases totais foi maior quando comparado às α -amilases. Este resultado concorda com Reguly (1996), que diz que as amilases são as principais enzimas constituintes do malte, sendo elas compostas pela soma de α -amilases e β -amilases, o que justifica os maiores valores encontrados para amilases totais.

A máxima atividade enzimática tanto para α -amilases como para amilases totais foi encontrada nas condições de concentração de substrato de 20% e temperatura de incubação de 70°C (experimento 4). A concentração de substrato de 20% foi ótima visto que em maiores concentrações de amido encontram-se teores de açúcares redutores que poderão ser liberados quando as enzimas presentes no malte agem sobre os mesmos.

Segundo Tull et al. (2002) após um período de incubação de 15 min, 50% da atividade enzimática para α -amilases ocorre com elevação da temperatura desde a temperatura ótima da enzima de 37°C até 68°C, sendo rapidamente inativada a 77°C.

Os valores superiores para atividade da α -amilase foram encontrados na temperatura de incubação de 70°C, quando extraídas em pH 5,0. Isto concorda com Nirmala e Muralikrishna (2003), que dizem que a temperatura de estabilidade para α -amilases situa-se na faixa 30°C a 75°C, quando extraídas em solução tampão pH 5,0 e incubados 15 min.

Na análise das amilases, considera-se um maior conteúdo de β -amilases, que são as principais enzimas presentes no malte. Segundo Eglinton et al (1998) a termoestabilidade da

β -amilase pode apresentar-se em diferentes níveis, dependendo do grão maltado e das condições de extração da enzima. Os diferentes níveis de termoestabilidade da β -amilase depende também das características intrínsecas da enzima ou de fatores secundários que poderiam interferir na estabilidade enzimática.

A inativação térmica pode ocorrer mais tardiamente quando se encontram em meios com elevadas concentrações de carboidrato e proteína. A β -amilase é a enzima limitante na degradação do amido e é mais termolábil quando comparada com as demais enzimas diastáticas presentes no malte. Quanto maior a termoestabilidade da enzima mais eficiente será a degradação do amido. O uso de concentrações elevadas de amido e de temperaturas elevadas aumenta o poder de ação diastático da enzima e amplifica a diferença das condições de estudo avaliadas, ou seja, a atividade enzimática aumenta quando passa de um nível inferior para um nível superior quando considera-se as concentrações de substrato de 10%, 15% e 20%, concordando com Eglinton et al (1998).

A análise estatística mostrou que as variáveis de estudo são significativas sobre o potencial amilolítico do grão de milho maltado, apresentando valores máximos de atividade enzimática em níveis superiores, ou seja, em maiores concentrações de amido e maiores temperaturas.

3 CONCLUSÃO

A máxima atividade enzimática tanto para α -amilase como para amilases totais foi encontrada para concentração de substrato de 20% e temperatura de incubação de 70°C.

4 REFERÊNCIAS

ARAGÃO, C.A.; DANTAS, B.F.; ALVES, E.; CATANEO, A.C.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J., Atividade amilolítica e qualidade fisiológica de sementes armazenadas de milho superdoce tratadas com ácido giberélico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, SP, 2002.

EGLINTON, J.K.; LANGRIDGE, P.; EVANS, D.E., Thermostability variation in alleles of barley beta-amylase, **Journal of Cereal Science**. Austrália, v. 28, p. 304-306, 1998.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W., **Biotecnologia industrial**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

NIRMALA, M.; MURALIKRISHNA, G., Properties of three purified α -amylases from malted finger millet (Ragi, *Eulesine coracana*, Indaf-15). **Carbohydrate Polymers**. Índia, v. 54, p. 43-50, 2003.

REGULY, J.C., **Biotecnologia dos processos fermentativos: fundamentos, matérias primas agrícolas, produtos e processos**. V.1. Pelotas: 1996.

TULL, D.; PHILLIPSON, B.A.; KHAMHOFT, B.; KNUDSEN, S.; OLSEN, O.; SVENSSON, B., Enhanced amilolytic activity in germinating barley through synthesis of a bacterial alpha-amylase. **Journal of Cereal Science**. v. 37, p. 75-76, 2002.

