

Purificação de amilases de malte de milho por cromatografia de troca iônica em leito expandido e aplicação na produção de álcool de amido de mandioca

Amylase purification from corn malt by ion-exchange expanded bed chromatography and applying in alcohol production from manioc starch

Autores | Authors

✉ **José Carlos CURVELO-SANTANA**

Universidade Nove de Julho (UNINOVE)
Programa de Pós Graduação em
Engenharia de Produção
Centro de Pós-Graduação
Av. Francisco Matarazzo, 612
Prédio A, 2º andar, sala 10
CEP: 05001-100
Água Branca/SP - Brasil
e-mail: jccurvelo@uninove.br

João Baptista SEVERO JÚNIOR
Joana Paula Menezes BIAZUS
Roberto Rodrigues de SOUZA

Universidade Federal de Sergipe (UFS)
Centro de Ciências Exatas e Tecnologias
(CCET)
Departamento de Engenharia Química
e-mail: jb_ufs@yahoo.com.br
biazzusjp@gmail.com
rrsouza@ufs.br

Elias Basile TAMBOURGI

Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP)
Faculdade de Engenharia Química (FEQ)
Departamento de Engenharia de
Sistemas Químico (DESQ)
e-mail: eliasm@feq.unicamp.br

Resumo

Este trabalho teve como objetivo purificar as amilases do malte de milho em resina de troca iônica por cromatografia em leito expandido e, depois, usar essas enzimas na hidrólise do amido de mandioca para obter o álcool após a sua fermentação. As resinas iônicas usadas foram as Amberlites nas formas aniônica IRA410 e catiônica IRA120 e, para sua fluidização, utilizou-se o tampão fosfato 0,05 a pH 7, o qual expandiu o leito de 4 cm para 8, 12 e 16 cm. Estas enzimas foram usadas na hidrólise de uma solução a 3% de amido de mandioca, a pH 7 e 60 ± 5 °C. Este xarope foi fermentado sob ação das leveduras *S. cerevisae*. Os resultados mostraram que a resina aniônica é mais eficiente na purificação das amilases do malte de milho do que a catiônica, e a 8 cm de altura se obteve um fator de purificação maior do que 500. Durante a hidrólise do amido de mandioca observou-se um rendimento de apenas 9%, enquanto a fermentação teve um rendimento de 50%, o que é considerado bom, já que o máximo teórico é 51,11%; o que demonstra a viabilidade deste processo.

Palavras-chave: Malte de milho; Hidrólise; Amido de mandioca; Adsorção em leito expandido; Fermentação; Álcool.

Summary

In this work aimed to purify the amylases from corn malt by ion-exchange expanded bed chromatography and after, to use of these enzymes in hydrolysis and fermentation of manioc starch. The Amberlite 410 anion-exchange and 120 cation-exchange resins were used as an adsorbent and the 0.05 M phosphate buffer at pH 7 was used to fluidize the resin bed from 4 cm until 8, 12 and 16 cm. Purified enzymes were used to hydrolysis of a 3% starch solution at 7 and 60 ± 5 °C. This syrup was fermented by *S. cerevisae* yeast to obtain the alcohol. Results show that Amberlite IRA 410 anion-exchange resin obtained the higher purification factor than Amberlite IR 120 cation-exchange resin, where the 8 cm a purification factor value was more than 500 times. A yield of 9% could be obtained in hydrolysis process and a 50% of alcohol yield in fermentation process, this value is considered high due to maximum theoretical yield to be of 51.11%. This results show the viability of this process, expanded bed adsorption, fermentation, alcohol.

Key words: Corn malt; Hydrolysis; Manioc starch; Expanded bed adsorption; Fermentation; Alcohol.

Purificação de amilases de malte de milho por cromatografia de troca iônica em leite expandido e aplicação na produção de álcool de amido de mandioca

CURVELO-SANTANA, J. C. et al.

1 Introdução

Os crescentes reajustes que vêm sofrendo o preço do petróleo e a crise energética iminente anunciada pelo governo norte-americano desencadearam a busca por novas fontes de combustíveis que pudessem substituir o petróleo. No Brasil, a utilização do álcool combustível mostrou-se benéfica, tanto do ponto de vista ambiental como também pela eficiência na geração de trabalho mecânico, além de sua característica renovável e, portanto, praticamente inesgotável (FERREIRA et al., 2005). A produção de álcool por via fermentativa é uma tecnologia muito desenvolvida neste país, sua transferência renderia muitas divisas e colocá-lo-ia em condições muito favoráveis no panorama energético, principalmente se forem consideradas as constantes oscilações do preço do petróleo internacional.

Comumente utiliza-se a cana-de-açúcar (*Saccharae* spp.) para a obtenção do etanol, mas sua cultura exige solos com elevada pluviosidade e fertilidade, além de possuir um limitado período útil de industrialização (safra). Entretanto, qualquer produto que contenha carboidratos constitui matéria-prima para a obtenção de álcool. O amido, depois da celulose, é o carboidrato mais encontrado na natureza. Após hidrólise torna-se fermentável, possibilitando a produção de álcool (FERREIRA et al., 2005).

A maioria dos produtos biotecnológicos de importância comercial é produzida em meio fermentativo, como os biorreatores. Estes se encontram misturados a células, enzimas, sais e a produtos gerados durante a fermentação, necessitando de um tratamento que possibilite a sua isolamento destes materiais (muitas vezes indesejáveis), o que acaba elevando os custos na purificação destes produtos (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1990).

A adsorção em leite expandido (ALE) é originária da cromatografia de proteínas, e é baseada na fluidização do leite de adsorventes cromatográficos. O acréscimo de interstícios pelo aumento dos vazios no leite permite a aplicação direta de uma alimentação bruta contendo suspensão de material biológico (ex: células, detritos, substratos insolúveis, etc.). Isto reduz as etapas de purificação destes materiais diminuindo também seus custos. A fluidização do leite promove uma maior interação das partículas do leite e as moléculas alvo o que pode elevar a afinidade do meio cromatográfico, por uma maior exposição da área superficial das partículas do adsorvente (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1990; FERNANDEZ-LAHORE et al., 2001).

Em seu trabalho Chang e colaboradores (1994) purificaram a glicose 6-fosfatodehidrogenase produzida a partir da *S. cerevisiae* num biorreator, sendo este material biológico bruto alimentado diretamente na coluna de adsorção em leite expandido contendo o adsorvente

STREAMLINE™ vermelho H-E7B. Utilizaram dois padrões para fluidizar o meio, o tampão fosfato 0,05 M pH 6,0 e uma solução de glicerol a 25% no mesmo tampão fosfato anterior, sendo que este segundo propiciou uma maior expansão do leite, um fator de purificação de 12 vezes e uma recuperação de 86% da enzima alvo, após eluição em duas fases: a primeira com 10 mM de NADP em 0,1 M de TRIS/ HCl pH 8,0 e a segunda com 2 M de NaCl em 0,1 M TRIS/ HCl pH 8,0.

Dentre as enzimas utilizadas comercialmente, merecem destaque as α -amilase (EC 3.3.1.1; α -1,4 glicano, 4 - glicanohidroxilase) e β -amilase (EC 3.2.1.1, α -1,4, glicanomaltotransferase) por sua variada aplicabilidade em processos industriais, na hidrólise do amido (Aguilar et al., 2000; Nirmala e Muralikrishna, 2003). Tais enzimas são obtidas comumente de malte de cevada ou de microorganismos e seus preços, após purificação, alcançam US\$ 1500,00/g (SIGMA, 1996).

O milho (*Zea mays*) é um produto agrícola muito difundido no Brasil, comercializado *in natura* ou processado a baixo valor econômico. Sendo assim, a obtenção das enzimas α e β -amilases de malte de milho geraria um produto de alto valor agregado.

Este trabalho teve como objetivo purificar as amilases do malte de milho em resina de troca iônica por cromatografia em leite expandido e depois, usar essas enzimas na hidrólise do amido de mandioca para se obter o álcool após a sua fermentação. As resinas iônicas usadas foram as Amberlites nas formas aniônica (IRA410) e catiônica (IRA120).

2 Material e métodos

2.1 Materiais

Utilizou-se para fluidizar o leite de resinas adsorventes, o tampão fosfato 0,05 M a pH 7, preparado a partir da mistura de soluções preparadas com fosfatos de potássio mono básico e de sódio di básico, ambos fornecidos pela VETEC (Rio de Janeiro, Brasil); as resinas aniônica Amberlite IRA 410 e catiônica Amberlite IR 120, o ácido dinitro salicílico (DNS), o azul brilhante de comassie, o ácido fosfórico e o tartarato duplo de sódio e potássio foram fornecidos pela VETEC (Rio de Janeiro, Brasil); o álcool etílico foi fornecido pela Synth (São Paulo, Brasil); o hidróxido de sódio e o amido solúvel foram fornecidos pela Merck (Darmstedt, Alemanha).

2.2 Obtenção do malte de milho

As sementes foram selecionadas, pesadas, lavadas, postas à absorção de umidade entre 40 e 45% e colocadas em meio germinativo em escala laboratorial por aproximadamente 4 a 5 dias. O malte foi seco nas temperaturas do planejamento, triturado,

Purificação de amilases de malte de milho por cromatografia de troca iônica em leite expandido e aplicação na produção de álcool de amido de mandioca

CURVELO-SANTANA, J. C. et al.

armazenado e guardado a 5 °C (BIAZUS et al., 2006b; CURVELO-SANTANA, 2003).

2.3 Ensaios enzimáticos

A 20 mL de uma solução de amido solúvel a 2% em tampão acetato 0,1 M a pH 4,8 foram adicionados 500 µL de amostra enzimática e a concentração de glicose gerada foi medida após 10 min de incubação a 30 ± 2 °C. Uma unidade de atividade enzimática é dada como sendo a quantidade de glicose gerada em µmol por 1 min sob as condições do ensaio (BIAZUS et al., 2006a; b; NIRMALA e MURALIKRISHNA, 2003; REGULY, 1996). A atividade específica é dada pela atividade por mg de proteína. A concentração de proteína foi medida pelo método de Bradford (1976).

2.4 Purificação das amilases

Uma coluna de vidro com dimensões de 1 x 30 cm, contendo um pistão de altura ajustável foi usada na parte superior e uma tela de *mesh* 60 entre as junções inferiores da coluna e na parte inferior do pistão para evitar perda de adsorventes. Uma régua foi usada na lateral da coluna para possibilitar o ajuste da altura do leito. A adsorções de enzimas foram realizadas com o sistema em leito fixo (4 cm) e expandido (8, 12, 16 cm) em temperatura ambiente (22 °C) e pH 7. O leito de adsorventes foi pré-equilibrado na altura de trabalho (4, 8, 12 ou 16 cm) com o tampão fosfato 0,05 M, então, 5 mL da solução de malte de milho a 2% no tampão usado foram injetados abaixo do leito da coluna para promover a adsorção das enzimas sobre a resina Amberlite IRA 410. A eluição foi feita pelo uso de uma solução de NaCl 0,25 M a 14 mL.min⁻¹ de fluxo descendente (BIAZUS et al., 2006a; KALIL, 2000; SANTOS, 2001, YAMAMOTO et al., 2001) (Figura 1).

O rendimento do processo foi avaliado por dois parâmetros, dados pelas Equações 1 e 2. A primeira é a recuperação da atividade enzimática (RA) que compara a

atividade total no material purificado com a atividade total no material bruto (dado em porcentagem), e a segunda é o fator de purificação (FP) que compara a atividade enzimática específica total no material purificado com a atividade enzimática específica total no material bruto, como seguem:

$$RA = \frac{\text{AtividadeEnzimáticaRecuperada}}{\text{AtividadeEnzimáticaInicial}} * 100 \quad (1)$$

$$FP = \frac{\text{AtividadeEnzimáticaEspecíficaRecuperada}}{\text{AtividadeEnzimáticaEspecíficaInicial}} \quad (2)$$

2.5 Hidrólise do amido de mandioca

A escala de purificação de enzimas foi ampliada de forma a se obter um volume suficiente para ser utilizado na hidrólise em 1 L de solução de amido, no biorreator na proporção de 1 mL de enzimas para cada 25 mL de solução de amido. Neste processo, utilizou-se uma solução de amido de mandioca a 30 g.L⁻¹, em pH 7, na temperatura de 65 °C.

As concentrações de açúcares redutores (AR, dada em glicose) foram medidas de tempo em tempo para se obter a curva cinética para as devidas temperaturas e concentrações de amido usadas. O rendimento do processo de hidrólise (%R_{Hidrólise}) foi obtido pela concentração de amido hidrolisado (C_{AmidoHidrolisado}) e a concentração de amido inicial (C_{Amido}) ou a relação entre a glicose gerada (C_{Glicose}) e a concentração de glicose teórica (C_{GlicoseTeórica} = 1,111 * C_{AmidoInicial}), como segue na Equação 3 (CADOGAN e HANKS, 1995; FERREIRA et al., 2005):

$$\%R_{\text{Hidrólise}} = \left(\frac{C_{\text{AmidoHidrolisado}}}{C_{\text{Amido}}} \right) * 100 = \left(\frac{C_{\text{Glicose}}}{C_{\text{GlicoseTeórica}}} \right) * 100 \quad (3)$$

2.6 Fermentação do xarope de amido de mandioca

Ao xarope obtido da hidrólise do amido de mandioca no biorreator foram adicionados 1 g.L⁻¹ de NH₄H₂PO₄, 0,1 g.L⁻¹ de MgSO₄ e chaptalizados com até 100 g.L⁻¹ com sacarose, para facilitar adaptação da levedura. O mosto, com pH corrigido entre a faixa de 4-5, foi esterilizado por choque térmico (100 °C por 15 min e posterior resfriamento). Três diluições das dornas principais foram feitas para facilitar a adaptação da levedura (do gênero *Saccharomyces*) que foram inoculadas no menor destes recipientes. A cada dia de fermentação, todo o volume do recipiente fermentado foi transferido para o seguinte (do menor para o maior), até a inoculação na dorna principal, onde ficou até o final da fermentação. O teor alcoólico e de AR (em g glicose.100 mL⁻¹) foram medidos regularmente para acompanhar o desenvolvimento da fermentação (ASCAR, 1985; FERREIRA et al.,

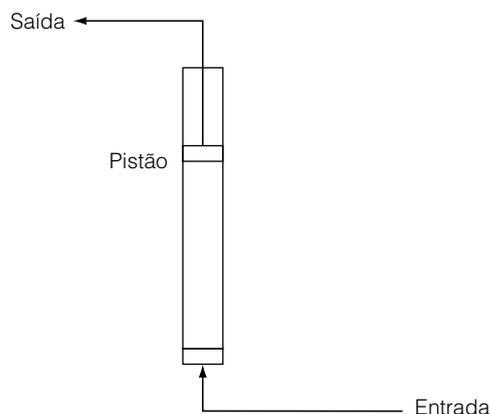


Figura 1. Esquema da coluna de ALE usada.

Purificação de amilases de malte de milho por cromatografia de troca iônica em leite expandido e aplicação na produção de álcool de amido de mandioca

CURVELO-SANTANA, J. C. et al.

2005; REGULY, 1996). O rendimento da fermentação foi obtido pela Equação 4 (FERREIRA et al., 2005).

$$\text{Rendimento} = \left(\frac{\frac{^\circ\text{GL ou \% (v/v) do fermentado}}{0,795(\text{g/mL})}}{\left(\frac{180}{162}\right) * (\text{gamido} / 100\text{mL}) + \left(\frac{2 * 180}{342}\right) (\text{g Sacarose} / 100\text{mL})} \right) * 100 \quad (4)$$

3 Resultados e discussão

3.1 Estudo da purificação das enzimas do malte

A seguir, nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados os resultados da purificação das amilases do malte de milho por adsorção em leite expandido, usando as resinas Amberlite IRA 410 e Amberlite IR 120, respectivamente, com tampão fosfato 0,05 pH 7 como fluidizador. Observou-se uma boa afinidade de adsorção entre a resina e as amilases, o que indica que o tampão fosfato não interferiu na interação entre as enzimas e as resinas.

Pela Tabela 1 percebe-se que houve um decréscimo do fator de purificação com a altura do leite expandido e que na altura do leite de 8 cm ocorreu a melhor condição de purificação destas enzimas usando a adsorção por leite expandido, sobre a resina de troca iônica IRA 410, em que um fator de purificação superior a 500 foi alcançado. O fator de purificação foi muito alto, o que comprova a

boa afinidade existente entre a resina usada e as amilases (MENDU et al., 2005; KALIL, 2000).

Pela Tabela 2, nota-se que à medida que se expandiu o leite (aumentando-se a altura), elevou-se o fator de purificação da enzima. Comportamento inverso ao obtido pela resina aniônica. Outro acontecimento que chamou a atenção foi que somente no maior grau de expansão o fator de purificação do processo cromatográfico usando adsorção em leite expandido superou o fator de purificação da cromatografia tradicional.

Comparando-se os fatores de purificação das amilases de malte de milho por adsorção em leite expandido utilizando-se a resina catiônica Amberlite IR 120 com os fatores de purificação das mesmas enzimas utilizando a resina aniônica Amberlite IRA 410, percebe-se que a resina aniônica é dez vezes mais eficiente que a resina catiônica. Isso pode ter acontecido, provavelmente, pelo fato das amilases possuírem metais em sua estrutura (Ca^{2+} para a α -amilase e Mg^{2+} para a β -amilase) (HALPERN, 1997; WISEMAN, 1987). Assim sendo, estas enzimas são carregadas negativamente, enquanto que a resina contém cátions derivados de amônio em suas estruturas, os quais possuem afinidade por ânions (BIAZUS et al., 2006a; MENDU et al., 2005; KALIL, 2000; TOLEDO et al., 2007).

Embora os fatores de purificação obtidos com a Amberlite IR 120 sejam considerados bons,

Tabela 1. Purificação das amilases de malte de milho por adsorção em leite expandido utilizando a resina catiônica Amberlite IRA 410, a pH 7 e 22 °C.

Leitos	H (cm)	Amostras	Atividade (U)	Proteína (μg)	Atividade específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Recuperação da atividade	Fator de purificação
Fixo	4,2	Malte	2087,0	885,43	2357,0	100	1
		Eluído	1229,0	8,7175	140980	58,89	59,81
Expandido	8,0	Malte	1894,5	893,28	2120,8	100	1
		Eluído	3905,5	3,2650	1196144	206,1	564,0
	12,0	Malte	36,500	832,49	43,844	100	1
		Eluído	38,500	18,128	2117,7	105,5	48,30
	16,0	Malte	36,500	832,49	43,844	100	1
		Eluído	32,500	16,658	1951,0	89,04	44,50

Tabela 2. Purificação das amilases de malte de milho por adsorção em leite expandido utilizando a resina catiônica Amberlite IR120, a pH 7 e 22 °C.

Leitos	H (cm)	Amostras	Atividade (U)	Proteína (μg)	Atividade específica ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Recuperação da atividade	Fator de purificação
Fixo	4,2	Malte	54,06	282,311	5222,374	100	1
		Eluído	0,9015	170,353	188963,2	60,34	36,18
Expandido	8	Malte	54,06	388,407	7185,002	100	1
		Eluído	1,922	191,387	99565,47	49,27	13,86
	12	Malte	54,06	143,663	2657,577	100	1
		Eluído	2,480	107,504	43351,98	74,83	16,31
	16	Malte	54,06	143,663	2657,577	100	1
		Eluído	0,7247	104,389	144035,3	72,66	54,20

Purificação de amilases de malte de milho por cromatografia de troca iônica em leite expandido e aplicação na produção de álcool de amido de mandioca

CURVELO-SANTANA, J. C. *et al.*

pois diversos autores obtiveram valores menores que estes (CURVELO-SANTANA, 2003; NIRMALA e MURALIKRISHNA, 2003), é perceptível que a Amberlite IRA 410 foi muito mais efetiva na purificação das amilases de malte de milho do que a primeira, já que na melhor condição o seu fator de purificação supera em dez vezes o da Amberlite IR 120. Assim sendo, indica-se que para se purificar as amilases de malte de milho deve-se usar o processo de adsorção em leite expandido com as Amberlites IRA 410 em uma altura que seja o dobro da altura do leito fixo, utilizando-se o tampão fosfato no pH 7, para expandir o leito.

3.2 Uso das enzimas purificadas na obtenção do álcool

As Figuras 2 e 3 são, respectivamente, as curvas de hidrólise de amido de mandioca pelas enzimas do malte de milho purificadas em Amberlite IRA 410 e leite fluidizado, e as curvas de álcool, açúcar redutor (AR) e redutor total (ART), obtidas durante o processo de fermentação do mosto oriundo do xarope obtido do amido de mandioca.

Pela primeira figura, nota-se que a hidrólise foi alta até a primeira hora, tornando-se constante e lenta, logo após. Esse comportamento pode ser traduzido como uma baixa resistência da enzima livre à temperatura a que foi exposta (65 °C) por um extenso tempo. O estudo de termo estabilidade apresentado para a enzima do malte de milho não imobilizada já havia comprovado a redução brusca da atividade enzimática com o tempo de exposição. Essa redução não foi percebida para as enzimas imobilizadas.

A partir da segunda figura, sobre a fermentação, nota-se a elevação do teor de AR no início da fermentação, mostrando que o amido continua sendo transformado, pelas amilases, em açúcares, hidrolisados pelas invertases presentes no meio, e que constantemente foram convertidos em álcool.

Durante a hidrólise do amido de mandioca observou-se um rendimento de apenas 9%, considerado baixo com relação aos citados pela literatura e bem menor do que foi obtido pelas enzimas do malte de milho nas formas livres ou imobilizadas. Entretanto, durante o processo de fermentação, observou-se que a hidrólise do amido, pelas enzimas purificadas, teve continuidade. Isso ocorreu porque à medida que sua massa celular aumentava as leveduras aumentavam o consumo de açúcares. E como estes açúcares são inibidores das amilases, a redução na sua concentração reativou as enzimas no meio. Em cinética, o produto inibe o catalisador quando a reação atinge o equilíbrio, por isso um valor de 100% de hidrólise é dificilmente alcançado.

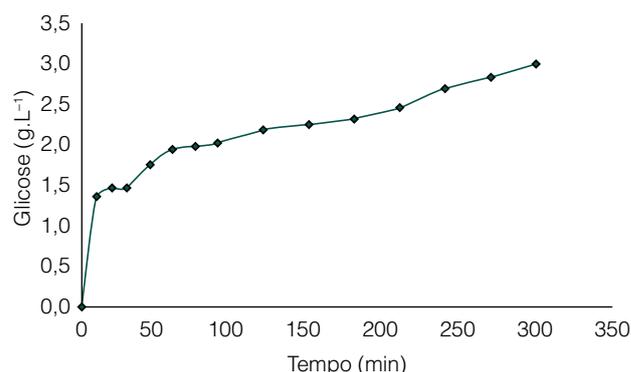


Figura 2. Ampliação de escala do processo de hidrólise do amido de mandioca utilizando amilases de malte de milho purificadas por adsorção em leite expandido. A hidrólise foi realizada em um biorreator de 1 L, com pH 7 e 65 °C.

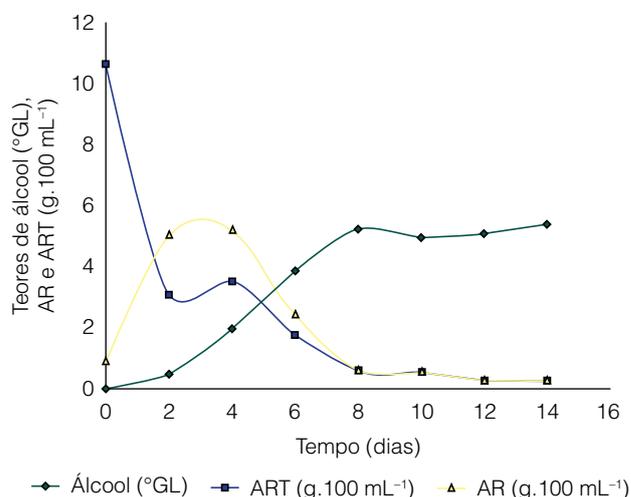


Figura 3. Curva de fermentação do mosto contendo amido de mandioca e hidrolisado por enzimas de malte de milho purificadas por adsorção em leite expandido.

Assim, as enzimas continuaram contribuindo durante o processo de fermentação e isso levou a um rendimento em produção de álcool maior do que 50%, o que foi considerado muito bom e o rendimento foi superior aos obtidos por Ferreira et al. (2005) e por Neves et al. (2006).

4 Conclusões

O tampão fosfato não interferiu na afinidade entre estas enzimas com a resina e a resina aniônica Amberlite IRA 410 possui dez vezes mais afinidades com as amilases do malte de milho que a resina catiônica Amberlite IR 120. Quando se expandiu o leito até 8 cm com as resinas de troca aniônica Amberlite IRA 410, obteve-se um fator de purificação superior a 500.

A hidrólise do amido de mandioca pelas enzimas purificadas alcançou um rendimento de apenas 9%, entretanto, a contribuição das enzimas continuou sendo

Purificação de amilases de malte de milho por cromatografia de troca iônica em leite expandido e aplicação na produção de álcool de amido de mandioca

CURVELO-SANTANA, J. C. *et al.*

dada durante o processo de fermentação, e isso levou a um rendimento em produção de álcool maior do que 50%. Assim, conseguiu-se obter as condições ótimas de purificação de amilases de malte de milho e demonstrou-se que o seu uso na produção de álcool a partir do amido de mandioca é viável.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (São Paulo - SP) e ao CNPq (Brasília).

Referências

- AGUILAR, G.; MORLON-GUYOT, M.; TREJO-AGUILAR, B.; GUYOT, J. P. Purific and charact. of an extrac. α -amylase produced by *L. manihotivorans* LMG 18010^T, an amylolytic lactic acid bacterium. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 27, n. 6, p. 406-413, 2000.
- AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. **Expanded bed adsorption handbook**: principles and methods. Uppsala, 1990. 160 p.
- ASCAR, J. M. **Alimentos**: aspectos bromatológicos e legais. Análise percentual. 1 ed. São Leopoldo: UNISINOS Editora, 1985. V. 01, p. 243-252.
- BIAZUS, J. P. M.; SEVERO Jr., J. B.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R.; TAMBOURGI, E. B. Study of amylases recovery from maize malt by ion-exchange expanded bed chromatography. **Process Biochemistry**, London, v. 41, n. 8, p. 1786-1791, 2006a.
- BIAZUS, J. P. M.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R.; TAMBOURGI, E. B. Caracterização da atividade amilásica do malte de milho (*Zea mays*). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 13-19, 2006b.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensit. method for the quantit. of mg quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHANG, Y. K.; McCREATH, G. E.; CHASE, H. A. Purific. of G6PDH from unclarified yeast call homog. using EBA with STREAMLINE™ red H-E7B. In: GALINDO, E.; RAMIREZ, O. T. (Eds.). **Advances in Bioprocess Engineering**. [S.L.]: Kluwer Academics Publisher, 1994. p. 519-525.
- CURVELO-SANTANA, J. C. **Recuperação das enzimas α - e β -amilases em sistema bifásico aquoso PEG/CaCl₂ para uso como biocatalizador amiláceos**. 2003. 232 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- FERREIRA, G. B.; MELO, V. V.; ALMEIDA, J. B. O.; EVANGELISTA, A. F.; SOUZA, R. R. Caracterização do processo de obtenção de uma aguardente de mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, n. 5, p. 2-7, 2005.
- FERNANDEZ-LAHOIRE, H. M.; LIN, D. Q.; HUBBUCH, J. J.; KULA, M. R.; THOMMES, J. The use of ion-selective electrodes for evaluation RTD in EBA systems. **Biotechnology Progress**, New York, v. 17, n. 6, p. 1128-1136, 2001.
- HALPERN, M. J. **Bioquímica**. 1 ed. Lisboa: Editora Lidel, 1997.
- KALIL, S. J. **Produção de inulinase por *K. marxianus* e purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em coluna de leite expandido**. Campinas: FEQ/UNICAMP, 2000. 132 p.
- MENDU, D. R.; RATNAM, B. V. V.; PURINIMA, A.; AYYANNA, C. Affinity chromatography of α -amylase from *Bacillus lincheniformis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 7, p. 712-717, 2005.
- NEVES, M. A.; KIMURA, T.; SHIMIZU, N.; SHIIBA, K. Production of alcohol by simultaneous saccharification and fermentation of low-grade wheat flour. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 3, p. 481-490, 2006.
- NIRMALA, M.; MURALIKRISHNA, G. Three α -amylase from malted finger millet (Ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15): purification and partial characterization. **Phytochemistry**, New York, v. 62, n. 1, p. 21-23, 2003.
- REGULY, J. C. **Biotechnologia dos processos fermentativos**. Pelotas: EDUFPEl, 1996. Vol. 1. 330 p.
- SANTOS, E. S. **Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção em leite expandido**. Campinas: FEQ/UNICAMP, 2001. 152 p.
- SIGMA CHEMICAL COMPANY CATALOGUE. **Biochemicals organic compounds and diagnostic reagents**. Saint Louis, 1996. p. 116-117.
- TOLEDO, A. L.; SEVERO Jr., J. B.; SOUZA, R. R.; CAMPOS, E. S.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Purification by expanded bed adsorption and characterization of an α -amylases FORILASE NTL® from *A. niger*. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 846, n. 1-2, p. 51-56, 2007.
- WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. 2 ed. New York: John Wiley Sons, 1987.
- YAMAMOTO, S.; OKAMOTO, A.; WATLER, P. Effects of adsorbent properties on zone spreading in expanded bed chromatography. **Bioseparation**, Dordrecht, v. 10, n. 1-3, p. 1-6, 2001.