

Caracterização da atividade amilásica do malte de milho (*Zea mays* L.)

Joana Paula Menezes Biazus¹, José Carlos Curvelo Santana², Roberto Rodrigues de Souza¹ e Elias Basile Tambourgi^{2*}

¹Departamento de Engenharia Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de Sergipe, Rosa Else, São Cristóvão, Sergipe, Brasil. ²Departamento de Engenharia e Sistemas Químicos, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Av. Albert Einstein, 500, Cx. Postal 6066, 13083-970, Barão Geraldo, Campinas, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: eliamtam@feq.unicamp.br

RESUMO. Este trabalho objetivou estudar o processo de germinação e a caracterização da atividade bioquímica das amilases do malte de milho (*Zea mays* L.) para gerar uma fonte de amilase de baixo custo e boa atividade enzimática. A atividade enzimática foi monitorada todos os dias durante a germinação das sementes para se obter a melhor condição de produção do malte. Os resultados mostraram que a atividade enzimática nas sementes foi maior no 4º dia de germinação. A caracterização bioquímica mostrou que as amilases do malte apresentam faixa ótima de pH entre 4,3 e 6, com temperaturas ótimas a 50°C e 80°C e os valores de K_m e V_{max} para hidrólise do amido foram de $7,69 \cdot 10^{-2}$ g/L e $7,69 \cdot 10^2$ g/L.min, respectivamente.

Palavras-chave: *Zea mays*, germinação, malte de milho, caracterização, α e β -amilases, atividade enzimática.

ABSTRACT. Characterization of amylase activity from maize (*Zea mays* L.) malt.

This work aimed to study the germination process and characterization of the amylolytic activity of the maize (*Zea mays* L.) malt aiming to obtain source amylases at lower cost. Enzymatic activity was monitored all days during the seed germination, for obtaining the best condition of malt production. Results showed that the enzymatic activity from maize seeds was larger in 4th germination day. Enzymes characterization showed that the maize malt amylases have optimal zone of pH between 4.3 and 6, with optimal temperatures of 50°C and 80°C. The K_m and V_{max} values for starch hydrolysis were $7.69 \cdot 10^{-2}$ g/L and $7.69 \cdot 10^2$ g/L.min, respectively

Key words: *Zea mays*, germination, maize malt, characterizing, α e β -amylases, enzymatic activity.

Introdução

Enzimas são substâncias de natureza proteica com atividade catalítica específica, e ainda, apresentam elevada especificidade em relação aos reagentes cujas transformações químicas catalisam (Halpern, 1997). Por serem economicamente viáveis, o emprego de enzimas em diversos setores industriais vem crescendo há vários anos. Algumas enzimas merecem destaque como, por exemplo, as α e β -amilases devido às suas amplas aplicações, como na produção de cervejas, pães, biscoitos, em indústrias têxteis, dentre outras (Forgaty e Kelly, 1979; Wiseman, 1987; Jesus, 2002).

A atividade de uma enzima pode ser determinada com base na velocidade de conversão de um reagente adequado (substrato) e está estritamente vinculada com os agentes desnaturantes, isso pelo fato da sua função catalítica depender da conformação na qual a enzima se apresenta (Riegel, 2003). A temperatura, por exemplo, é um dos

agentes críticos sobre a atividade das enzimas. Quando se eleva a temperatura, a atividade aumenta, todavia, o processo de desnaturação cresce devido à ação do calor (Halpern, 1997). O pH é outro parâmetro que exerce grande influência na manutenção da atividade enzimática. O efeito deste fator se dá devido a alterações no estado de ionização dos componentes do sistema, em consequência da variação da concentração de H^+ (Ricardo e Teixeira, 1993).

Aguilar *et al.* (2000) purificaram e caracterizaram amilases de *Lactobacillus manihotivorans* e obtiveram como pH e temperatura ótimos 5,5°C e 55°C, respectivamente, sendo que esta enzima apresentou um ponto isoelétrico próximo de 3,8 e foi estável entre os valores de pH 5 e 6 e a temperatura de 55°C por uma hora. Entretanto, Wanderley *et al.* (2004) purificaram a α -amilase de *C. flavus* e encontraram pH e temperatura ótimos de 5,5°C e 50°C, respectivamente. Nirmala e Muralikrishna (2003) purificaram e caracterizaram 3 amilases de uma

variedade de milho e detectaram atividades ótimas em uma faixa de pH entre 4 a 5,5 e temperatura entre 30°C a 70°C, semelhantes às amilases de cereais. Isso evidenciou uma resistência das amilases à desnaturação e que esta difere conforme sua origem ou biossíntese (Reguly, 1996).

Amilases purificadas chegam a alcançar valores comerciais próximos a U\$ 1500/g, o que torna a busca por novas fontes e processos de produção e purificação destas enzimas a custos baixos e viáveis (Biazus *et al.*, 2005). Assim, o presente trabalho objetivou estudar o processo de obtenção do malte de milho, bem como a sua caracterização quanto à sua atividade amilolítica. Para se produzir uma nova fonte de amilases e obter as suas melhores condições de emprego em processos bioquímicos.

Material e métodos

O secador utilizado neste trabalho foi da Fento (São Paulo, Brasil) do tipo de bandeja, com circulação de ar. Uma balança analítica digital modelo BG 200 fornecida pela Tecnal (São Paulo, Brasil) foi usada nas medições de peso. O malte foi moído em moinho de bola, modelo BM da VIATEST (Berlim, Alemanha). As sementes de milho foram adquiridas junto a Embrapa (Tabuleiros Costeiro), sediada em Aracaju, Estado de Sergipe. Os reagentes: ácido o-fosfórico PA adquirido junto a Synth (Diadema, Estado de São Paulo, Brasil), acetato de sódio PA, ácido acético PA, ácido di-nitrosalicílico (DNS), álcool etílico PA, dextrina branca PA, iodeto de potássio PA, iodo ressublimado PA foram adquiridos da VETEC (São Paulo, Brasil) e o azul brilhante de Comassie-G foi adquirido da Merck (Berlim, Alemanha).

Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi efetuada pelo método do Miles Laboratory (método do DNS) (Miller, 1959) e pelo método de Wohlgenuth modificado por Sandstedt, Kneen, Blich apresentado em Reguly (1996). Uma unidade de atividade enzimática específica (U/mg) foi definida como a quantidade de açúcares redutores (em μmol de glicose) liberada por min por mg de proteína total detectada pelo método do DNS e uma unidade SKB é o número de gramas de amido que é dextrinizado por grama de amilase em uma hora (Reguly, 1996; Biazus *et al.*, 2005). Estes dois métodos são os mais empregados para a determinação da atividade amilásica e aconselhados pela FAO, sendo o primeiro, um método não específico e o outro específico para atividade da α -amilase (Reguly, 1996).

Proteína total

A determinação da concentração de proteína total nas amostras foi desenvolvida pelo método de Bradford (1976).

Obtenção do malte

As sementes de milho foram selecionadas, pesadas, lavadas, postas em béquer contendo água para que estas absorvessem entre 40% a 45% de seu peso inicial em umidade. Depois as sementes úmidas foram colocadas em meio germinativo em escala laboratorial em condições ambientais de temperatura e pressão (27°C e 1 atm), por aproximadamente 4 a 5 dias. O malte foi seco na temperatura de 55°C, triturado, armazenado em sacos plásticos e guardado a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ (Santana, 2003; Biazus *et al.*, 2005). Aproximadamente, 1 g de mostras de sementes de milho foram coletadas diariamente, maceradas, ressuspendidas em solução constituída de 0,3 g de CaCl_2 e 0,6 g NaCl. A atividade enzimática foi determinada usando-se o método SKB. O tempo total de monitoramento da atividade enzimática das sementes durante a germinação foi de 8 dias (Santana, 2003).

Estudo do efeito do pH e da Temperatura

Para obtenção do pH ótimo, soluções de amido a 2% foram preparadas em diversos tampões: para a faixa de pH entre 3 e 4,8 usou-se o tampão acetato 0,1 M, para faixa de pH entre 5 e 8 usou-se o tampão fosfato 0,1 M e para a faixa de pH entre 8,5 e 10 usou-se o tampão amônio 0,1 M. Todas as soluções foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Morita e Assumpção (1995) e a atividade enzimática do malte foi medida nestes valores de pH a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Para obtenção da temperatura ótima usou-se a solução de amido a 2% em tampão acetato 4,8 e as atividades enzimáticas foram determinadas nas temperaturas entre 10°C e 100°C, variando-se de 10°C em 10°C (Aguilar *et al.*, 2000; Nirmala e Muralikrishna, 2003; Wanderley *et al.*, 2004). O método de atividade enzimática empregado foi o do Miles Laboratory (Miller, 1959). A energia de ativação da hidrólise de amido pelas enzimas foi obtida pela regressão linear do logaritmo natural da velocidade de reação (mol/min.g de enzima) versus o inverso da temperatura (K), seguindo o método de Arrhenius (Aguilar *et al.*, 2000).

Cinética da hidrólise do amido

O estudo da cinética da hidrólise do amido foi realizado a pH 4,8°C e $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Para tanto, uma solução estoque de amido a 40 g/L em pH 4,8 foi preparada em tampão acetato 0,1 M, e a partir desta

foram feitas as diluições. Usou-se como base matemática para obtenção dos modelos cinéticos a equação de Michaelis-Menten (equação 1).

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

na qual $V_{máx}$ ($V_{máx} = k_{cat} \cdot [E]_0$) é a velocidade máxima da reação, K_m é a constante de Michaelis-Menten, $[S]$ é a concentração do substrato, k_{cat} é a constante cinética da reação de hidrólise do amido e $[E]_0$ é a concentração total de enzimas. Seus parâmetros são encontrados pelo modelo M-M linearizado (equação 2), de acordo com Lineweaver-Burk (Halpern, 1997; Morris, 1979; Peter *et al*, 1986).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{máx}} + \frac{K_m}{V_{máx}} \frac{1}{[S]} \quad (2)$$

Resultados e discussão

Estudo da germinação das sementes de milho

Na Tabela 1, encontram-se os dados de atividade enzimática das sementes de milho durante a germinação em escala laboratorial. Foram realizados três ensaios em um mesmo período com as sementes de uma mesma safra.

A Figura 1 mostra o aumento da atividade (AE) das amilases no decorrer 8 dias, para três ensaios com amostras de uma mesma variedade de milho, de mesma época de colheita, germinadas no mesmo período, com umidade controlada e nas condições ambientais de temperatura e pressão.

Tabela 1. Dados experimentais de atividade enzimática durante a germinação das sementes de milho (*Zea mays*).

| Tempo (Dias) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 8 |
|---------------------------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|
| Atividade (SKB) - Ensaio1 | 0,157 | 0,234 | 2,182 | 5,714 | 21,818 | 6,667 | 5,714 |
| Ensaio2 | 0,117 | 0,234 | 2,074 | 5,648 | 24,242 | 8,386 | 7,480 |
| Ensaio3 | 0,0762 | 0,250 | 1,959 | 5,581 | 26,667 | 10,105 | 8,727 |

Nesta figura pode-se observar que a atividade enzimática aumentou durante a germinação em proporções semelhantes para todos os ensaios. O aumento foi lento inicialmente, aumentando exponencialmente a partir do terceiro dia, após as sementes serem postas a germinar. No quarto dia foi atingido o valor máximo de produção de enzimas tendo, a seguir, uma queda no quinto dia e a partir deste, se observa um valor praticamente constante da atividade enzimática.

É de se esperar inicialmente, uma taxa de atividade enzimática baixa nas sementes (quase que exclusivamente devido à presença das β -amilases), já

que estas ainda estão em estado de dormência. Quando a água penetra na semente, facilita o transporte de glicerídeos (formadas pela β -amilase) e do ácido giberélico (AG) para as camadas de aleurona sendo que os primeiros fornecerão energia para alimentar as células, enquanto que o segundo, ativa os genes do DNA responsáveis pela formação das α -amilases.

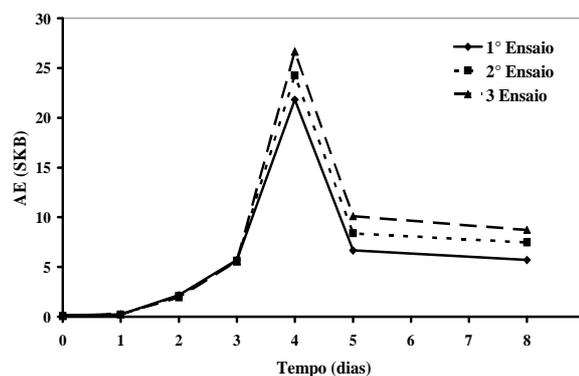


Figura 1. Atividade amilásica (AE) na germinação das sementes de *Zea mays* a pH 4,8°C e $30 \pm 2^\circ\text{C}$, durante oito dias.

Com isto, percebe-se que esta geração de enzimas, a princípio, é lenta, acelerando posteriormente até alcançar seu valor máximo no quarto dia, quando a concentração de produtos gerados pelas enzimas faz com que parte destas sejam inibidas e sua atividade reduza a um valor constante (Dantas, 2002; Santana, 2003).

É perceptível quando observa-se a Figura 1 que há um comportamento semelhante a uma curva do tipo exponencial (na etapa de crescimento enzimático) do tipo $y = y_0 e^{\mu x}$. Então, para provar que esta analogia é válida foram feitas as seguintes denominações: AE será a simbologia usada para a atividade enzimática (neste caso em unidade SKB); AE_0 é a atividade enzimática das sementes *in natura* ou a atividade inicial das sementes (SKB); t , o tempo de germinação das sementes (em dias); e μ é a taxa de crescimento da atividade enzimática da semente (característica para cada variedade). Desta forma, o modelo será escrito na forma:

$$AE = AE_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

A partir de um ajuste exponencial dos dados de atividades enzimáticas (valores médios) da Tabela 1, foram encontrados os valores dos parâmetros AE_0 e μ e estes estão apresentados nas equações (4), (5) e (6). Pode-se observar que a taxa de crescimento enzimático (μ) apresenta um valor próximo de $1,362$ (dias) $^{-1}$ (0,133 de desvio, 9,8% de erro), mostrando

que esse valor é característico para a variedade estudada. Contudo, mesmo em amostras de uma mesma safra a atividade dessas sementes no estado natural (atividade inicial, AE_0) não pode ser considerada como constante, já que seu valor médio ficou em torno de 0,110 SKB e sua variação foi de 44% (0,048 de desvio padrão), ou seja, esse valor é característico das amostras, embora seus genótipos sejam parecidos.

$$AE_1 = 0,1643.e^{1,2197.t} \quad R = 0,9986 \quad (4)$$

$$AE_2 = 0,0944.e^{1,3851.t} \quad R = 0,9902 \quad (5)$$

$$AE_3 = 0,0727.e^{1,4821.t} \quad R = 0,9958 \quad (6)$$

Efeito do pH e da temperatura

A Figura 2 mostra o efeito da variação do pH sobre a atividade das amilases de malte de milho. Os resultados permitem afirmar que a atividade amilásica foi afetada na faixa de pH estudada. Observou-se que a faixa de pH ótimo das amilases do malte de milho ficou entre 4,3 e 6,0 (máximo de atividade). Essa região corresponde a faixa de pH ótimos das α e β -amilases citadas por Agular *et al.* (2000), Nirmala e Muralikrishna (2003) e Wanderley *et al.* (2004). De acordo com Reguly (1996), os pH ótimos da α e β -amilases estão compreendidos entre 5,0-7,0 e 4,5-5,0, respectivamente. Após a faixa ótima de pH ocorre uma redução significativa da atividade até se estabilizar próximo dos 10% da atividade ótima. Uma provável explicação para essa diferença de comportamento parece estar relacionada ao grau de ionização das moléculas e as mudanças conformacionais que podem ocorrer na estrutura protéica da enzima (Ricardo e Teixeira, 1993; Halpern, 1997).

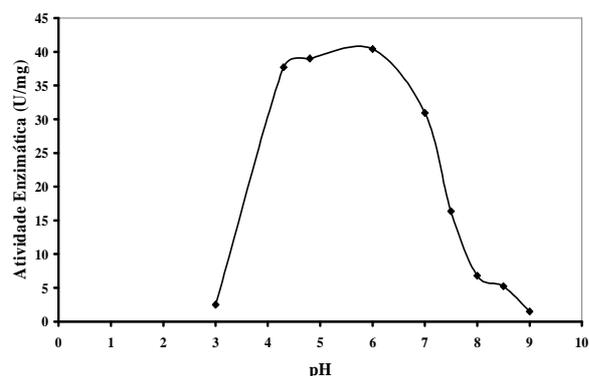


Figura 2. Efeito do pH sobre atividade amilásica do malte de milho em solução de amido a 2% e a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 10min.

Esses dados são de extrema importância na estratégia de purificação dessas amilases, evitando a perda de atividade pelo uso de faixas de pH agressivos

às enzimas e à redução da afinidade do método empregado. A faixa de pH de trabalho das amilases de malte de milho foi maior do que as do milho estudadas por Nirmala e Muralikrishna (2003).

A Figura 3 descreve o perfil de atividade amilásica no malte de milho em diferentes temperaturas. Percebe-se que a atividade foi baixa e estável de 10°C até 40°C . A 50°C houve uma elevação significativa da atividade, que decresceu em seguida. Isso ocorreu, provavelmente, por ter sido atingida a temperatura ótima da β -amilase do malte de milho, pois de acordo com Reguly (1996), essas enzimas apresentam temperaturas ótimas entre 50°C e 57°C . A partir dos 60°C há uma queda na atividade enzimática, que é explicada pelo fato da β -amilase sofrer desnaturação acima dessa temperatura (Reguly, 1996; Santana, 2003).

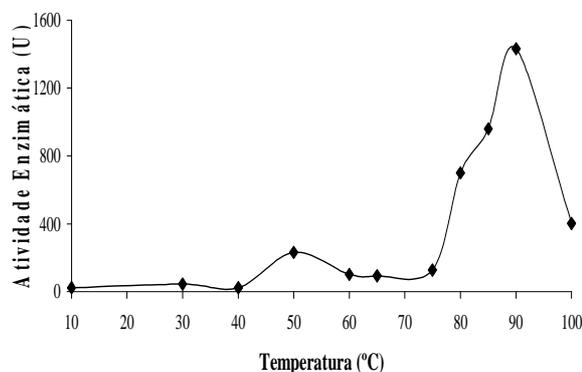


Figura 3. Efeito da temperatura sobre a atividade amilásica no malte de milho em solução de amido a 2% e em pH 4,8, por 10min.

A seguir, percebe-se que a atividade elevou-se bruscamente após os 75°C , chegando ao seu valor máximo nos 90°C , caindo acima dessa temperatura. Isso ocorre porque essa faixa de temperatura é a faixa ótima das α -amilases. Reguly (1996) relatou que existem amilases com temperaturas ótimas variando entre 70°C a 100°C e até superando esta última temperatura, dependendo da origem. Nirmala e Muralikrishna (2003) obtiveram amilases de milho germinado (malte) por cromatografia em gel. Durante a caracterização bioquímica das frações eluídas, eles observaram que as temperaturas ótimas estavam entre 30°C e 70°C , provavelmente, estas frações fossem compostas por uma mistura de β e α -amilases, já que a primeira, de acordo com Forgy e Kelly (1979) e Reguly (1996), possui temperatura ótima bem menor que a segunda. Já Agular *et al.* (2000) e Wanderley *et al.* (2004) relataram valores mais baixos de temperatura ótima para a α -amilase. Em processos industriais, o amido é comumente

hidrolisado a temperaturas altas, o que indica que a aplicação do malte de milho pode ser mais viável que as demais fontes, pois suas enzimas podem trabalhar a temperaturas mais elevadas.

De modo geral, a literatura afirma que temperaturas elevadas de uma ou duas dezenas de graus acima da temperatura do meio natural das enzimas, levam freqüentemente, à perda de atividade (Halpern, 1997). Entretanto, é notório que aos 90°C houve um aumento muito significativo da atividade enzimática, mais precisamente da atividade da α -amilase, mostrando que essa temperatura é a ótima para essa enzima. Entretanto, não é aconselhável o emprego dessa temperatura por um longo período de tempo no processo, pois acarretaria a perda da atividade das amilases e, conseqüentemente, em uma baixa eficiência da hidrólise do substrato desejado. A faixa de temperatura ótima para utilização das amilases do malte analisado em questão, situa-se entre 30°C a 80°C. As amilases de malte de milho possuem uma faixa de temperatura de trabalho muito maior que as do milho estudadas por Nirmala e Muralikrishna (2003). Esses dois efeitos opostos combinados sugerem o seu emprego nas proximidades dos 30°C, temperatura na qual as enzimas do malte de milho apresentaram termoestabilidade (o malte manteve 90% da atividade enzimática por 30 minutos).

A Lei de Arrhenius para obtenção da energia de ativação da hidrólise de amido por amilase de malte de milho está apresentada na Figura 4.

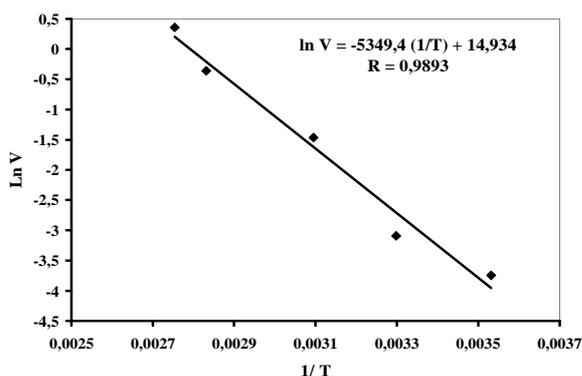


Figura 4. Determinação da energia de ativação da hidrólise do amido pelas amilases de malte de milho a pH 4,8.

Como o valor do coeficiente de correlação (R) está próximo da unidade e considerando-se o valor da constante dos gases ideais igual a 8,31451 J/mol.K, pode-se dizer que o valor da energia de ativação dessa reação está próxima dos 44,5 kJ/mol. Aguilar *et al.* (2000) em seu trabalho de purificação e caracterização das amilases de *Lactobacillus*

manihotivorans LMG 18010^T obtiveram um valor próximo ao encontrado neste trabalho (32,6 kJ/mol).

Cinética de hidrólise do amido

A determinação dos parâmetros cinéticos foi realizada a pH 4,8 em uma temperatura de 30°C e os dados obtidos experimentalmente permitiram a obtenção da curva de cinética conforme está indicada na Figura 5.

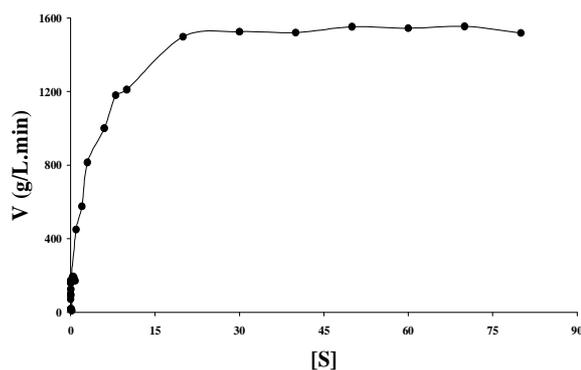


Figura 5. Influência da concentração do substrato na velocidade de hidrólise do amido por amilases de malte milho a pH 4,8°C e 30±2°C.

A Figura 6 é a linearização dos dados de cinética de acordo com a metodologia de Lineweaver-Burk. Pela equação 7, a qual apresenta o modelo que mais se ajustou aos dados experimentais, tem-se que o valor da constante K_m foi 7,69.10⁻² g/L de, e o valor de V_{max} foi 7,69.10² g/L.min (ou 2,48.10⁴ U/mg).

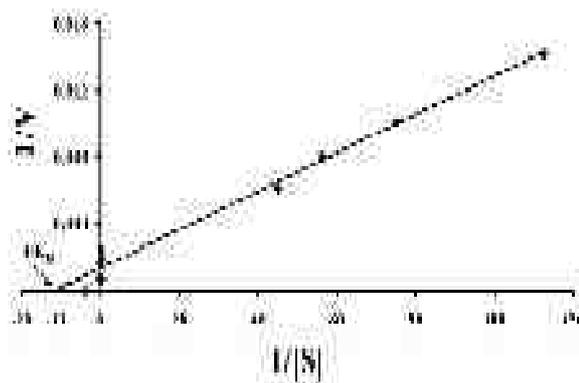


Figura 6. Gráfico de Lineweaver-Burk para a hidrólise do amido de malte de milho a pH 4,8°C e 30±2°C.

$$\frac{1}{V_0} = 0,0013 + 0,0001 \frac{1}{[S]} \quad R = 0,9915 \quad (7)$$

A concentração de proteínas totais medidas pelo método de Bradford (1976) foi de 58,032 mg/L (média de 6 análises), então, considerando-se essa concentração como sendo $[E]_0$, tem-se que

a constante cinética (k_{cat}) é de $1,32 \cdot 10^5 \text{ min}^{-1}$. O valor de V_{max} das amilases de malte de milho chegam a ser 2,1 a 2,6 vezes maior que os apresentados pelas amilases de milheto ($4,76 \cdot 10^3$ - $5,88 \cdot 10^3 \text{ U/mg}$) e a constante K_m está entre 69 a 186 vezes menor que os valores das mesmas constantes apresentadas para o milheto (5,3-14,3 g/L), mostrando que a primeira tem mais afinidade por amido que a segunda. Como a velocidade máxima das amilases de malte de milho foi muito maior e a constante de M-M foi muito menor que as do milheto e outros cereais, então, o malte de milho possui uma alta atividade enzimática, o que potencializa o seu uso pelas indústrias de diversos ramos (Nirmala e Muralikrishna, 2003).

Efeito do tempo e temperatura de armazenamento

A Figura 7 mostra a variação da atividade enzimática do malte de milho durante seu armazenamento à temperatura ambiente e a 10°C . Embora o espalhamento da medida seja grande, é razoável admitir-se que até a 19ª semana os maltes ainda mantêm mais de 50% da atividade enzimática original, para ambas as temperaturas de armazenamento. No entanto, após a vigésima semana segunda semana de armazenamento, ambos reduzem suas atividades a valores próximos de 6% da atividade inicial, indicando que o tempo limite de prateleira desse produto, conservado a 10°C ou 28°C é de aproximadamente 19 semanas. Isso mostra que não há influência da temperatura de armazenagem sobre a atividade enzimática do malte de milho, nas condições estudadas.

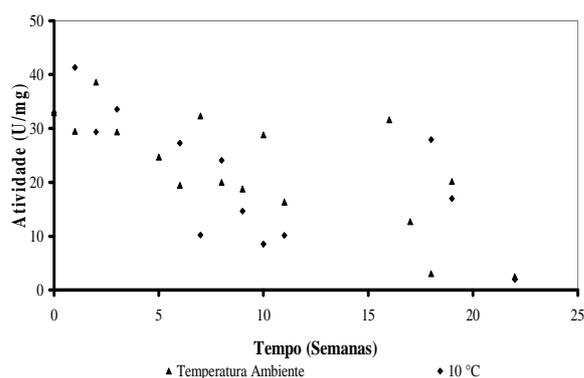


Figura 7. Acompanhamento da atividade durante o armazenamento do malte.

Tümturk et al. (1999) conseguiram armazenar α -amilases em hidrogel poli (N-vinil 2-pirolidina/ácido itacônico) por cerca de 30 dias, sem perdas significativas de atividade com relação às enzimas em

tampão fosfato 10 mmol/L, mostrando que seu método foi mais eficiente que a enzima no seu meio natural, já que a redução da atividade de água no meio previne a degradação de materiais biológicos como o estudado neste trabalho.

Conclusão

A análise dos resultados permite afirmar que a faixa de pH e temperatura ótimas das amilases de malte de milho se encontra entre 4,3-6 e 50°C - 80°C , respectivamente. A constante K_m teve valor próximo a $7,69 \cdot 10^{-2} \text{ g/L}$, com V_{max} de $7,69 \cdot 10^2 \text{ g/L.min}$ e k_{cat} de $1,32 \cdot 10^5 \text{ min}^{-1}$. Como a velocidade máxima das amilases de malte de milho foi muito maior que as amilases de outros cereais, pode-se afirmar que o malte de milho possui um alto potencial para ser empregado nos diversos ramos industriais. Assim, este trabalho proporcionou condições de se obter as amilases de malte de milho com valores elevados de atividade enzimática, podendo-se aplicá-las em indústrias têxteis, de biscoitos, de cerveja e de fármacos, dentre outras.

Referências

- AGUILAR, G. et al. Purification and characterization of an extracellular α -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amyolytic lactic acid bacterium. *Enzyme Microb. Technol.*, New York, v 27, p. 406-413, 2000.
- BIAZUS, J.P M. et al. Optimization of drying process of *Zea mays* malt to use as alternative source of amyolytics enzymes. *BABT*, Curitiba, v. 48, (Special), n. 6, p. 185-190, 2005.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.
- DANTAS, B.F. *Atividade amilolítica e qualidade de sementes de milho (Zea mays L.) submetidas ao alagamento*. 2002. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2002.
- FORGATY, W.M.; KELLY, C.T. *Topics in enzyme and fermentation*. Biotechnology. Chichester: G. Howood - J. Wiley & Sons, 1979.
- HALPERN, M.J. *Bioquímica*. 1. ed. Lisboa: Lidel Edições Técnicas, 1997.
- JESUS, S.S. *Desenvolvimento e análise do processo de secagem de α -amilase por microondas à vácuo*. 2002. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, Washington, D.C., v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. *Manual de soluções*,

- reagentes e solventes. Padronização–preparação–purificação. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1986.
- MORRIS, J.G. Cinética de reações catalisadas por enzimas. In: *Físico-química para biólogos*. 1. ed. São Paulo: Edusp, 1972. cap. 7, p. 323-367.
- NIRMALA, M.; MURALIKRISHNA, G., Three α -amylases from malted finger millet (ragi, *Eleusine coracana*, Indaf-15) purification and partial characterization. *Phytochemistry*, Oxford, v. 62, p. 21-30, 2003.
- REGULY, J.C. *Biotecnologia dos processos fermentativos*. Pelotas: Edufpel, 1996.
- RICARDO, C.P.; TEIXEIRA, A. *Enzimas*. 4. ed. Lisboa: Plátano Editora S.A., 1993.
- RIEGEL, R.E. *Bioquímica*. 3. ed. São Leopoldo: Edunisinos, 2003.
- PETER, H.W. et al. *Cinética enzimática*. 1. ed. Fortaleza: EDUFC, 1987.
- SANTANA, J.C.C. *Recuperação das enzimas α e β -amilases em sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl_2 para uso como biocatalizador amiláceos*. 2002. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002.
- TÜMTÜRK, H. et al. Adsorption of amylase onto poly (N-vinyl 2-pyrrolidone/ itaconic acid) hydrogel. *Nuclear Instr. Meth. Phys. Res. B*, Amsterdam, v. 151, p. 238-241, 1999.
- WANDERLEY, K. et al. Biochemical characterizing of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v. 231, p. 165-169, 2004.
- WISEMAN, A. *Handbook of enzyme biotechnology*. 2. ed. New York: John Wiley Sons, 1987.

Received on October 07, 2005.

Accepted on June 05, 2006.