

ODULIA LEBOREIRO NEGRÃO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
GLUCOAMILASE DE *Polyporus circinatus*

Tese de Mestrado apresentada
ao Departamento de Bioquí-
mica da Universidade Federal
do Paraná.

CURITIBA
1978

Tese orientada pela

Dra. Glaci T.Zancan

A
Alfredo, Esperança
e Olney.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	6
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	15
3 - RESULTADOS	22
4 - TABELAS E FIGURAS	25
5 - DISCUSSÃO	41
6 - RESUMO	44
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
8 - AGRADECIMENTOS	51

INTRODUÇÃO

A produção de enzimas amilolíticas por fungo é conhecida de muitos a nos, e entre estas aquelas que convertem o amido quase completamente em D - glucose receberam a denominação de glucoamilases e são de grande interesse industrial (28). A terminologia neste campo é muito confusa, e estas enzi - mas são também chamadas de amiloglucosidase, α -glucosidase e γ -amilase (15). Devido as controversias na terminologia, Okazaki em 1958 (39) sugeriu uma classificação para as amilases produtoras de D-glucose, em três grupos:

Grupo 1 - As Amilases que hidrolisam rapidamente ligações (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 6) tais como as do amido e alguns oligossacarídeos como a panose, con - vertendo-os completamente em D-glucose. A glucoamilase do Rhizopus delemar (50) é um exemplo deste grupo.

Grupo 2 - As Amilases produtoras de D-glucose mostrando fraca ativi - dade para cadeias internas, de modo que sua ação sobre o amido é somente de 70-80%; por exemplo amiloglucosidase do Aspergillus niger (21,42,43).

Grupo 3 - As Amilases anteriores hidrolizam amido e maltose, em con - trastes com γ -amilase do Aspergillus awamori sp. (28) a qual não tem ativi - dade maltásica, mas liberam D-glucose a partir do amido.

Somente em 1965, a União Internacional de Bioquímica (IUB) aprovou , para os nomes comuns glucoamilase, amiloglucosidase e γ -amilase, a nomencla - tura sistemática de α 1,4-glucan glucohidrolase (E.C.3.2.1.3) (9).

Nos últimos anos, a glucoamilase (α -1,4-glucan glucohidrolase, E.C . 3.2.1.3), tem assumido considerável importância por causa da sua habilidade em hidrolizar amido rapidamente para D-glucose com pouca formação de produ - tos de reversão quando comparada com a hidrólise ácido do amido.

As glucoamilases vem sendo empregadas extensivamente na indústria a - limentar, fotográfica, têxtil e do papel. As enzimas das mais variadas fon - tes vem sendo empregadas, mas especialmente aquelas de microorganismos(28).

As glucoamilases de muitos organismos tem sido estudadas, principal -

mente no que tange às condições de cultivo, sua purificação e especificidade pelo substrato.

A glucosidase do Clostridium acetobutylicum, foi estudada por French e Knapp 1950 (11). Sua principal ação catalítica e hidrolítica foi observada sobre amido, dextrina e oligossacarídeos, onde houve remoção de unidades de glucose a partir da extremidade final não redutora.

O estudo da ação de enzimas amilolíticas sobre polímeros purificados do amido amilose e amilopectina, tiveram início em 1951, simultaneamente com os estudos de Kerr et al (21) e de Phillips e Caldwell (50). Kerr et al (21) estudaram a ação da glucoamilase do Aspergillus niger sobre a amilose e obtiveram cerca de 60% de conversão em D-glucose enquanto sobre a amilopectina a conversão foi de 80%. Phillips e Caldwell (50) purificaram e caracterizaram uma amilase formadora de glucose, produzida pelo Rhizopus delemar, com alto grau de pureza e livre de α -amilase que aparecia no extrato cru. A ação da glucoamilase do Rhizopus delemar sobre amido converteu-o 90% em D-glucose, enquanto que sua ação sobre amilopectina produziu 84-90% de D-glucose, e como não havia formação de dextrina residual, a amilólise não era impedida pelas ligações (1 \rightarrow 6). Estudando a ação da glucoamilase do Rhizopus delemar sobre o amido e glicogênio, Phillips e Caldwell (51), obtiveram o rendimento em D-glucose de 95-96% e 92% respectivamente.

A glucoamilase do Saccharomyces diastaticus, estudada por Hopkins e Kulka em 1957 (18) tem em comum com a de outras fontes a formação rápida de D-glucose a partir do amido, amilopectina, amilose e pequenas cadeias de dextrinas preparadas da amilose. O Saccharomyces diastaticus secreta ainda uma enzima desramificante e maltase.

Barker e Fleetwood em 1957 (23) estudaram a glucoamilase de Aspergillus niger, purificando-a parcialmente e estudando algumas de suas propriedades. Quando estudaram a especificidade desta preparação observaram que apenas os oligossacarídeos da série da maltose foram completamente hidrolizados à D-glucose (23).

Pazur e Ando em 1959 (42), foram os primeiros a obter a glucoamilase na sua forma homogênea por cromatografia em DEAE-celulose de extrato do micélio do Aspergillus niger. Eles obtiveram duas formas de enzimas, entretanto estudaram somente a glucoamilase presente em maior quantidade e com habilidade para hidrolizar ligações glicosídicas α -D- (1 \rightarrow 4) no amido e malto oligossacarídeos. A enzima cataliza a hidrólise total do amido, amilose, amilopectina e amilodextrina para D-glucose.

Pazur e Ando em 1960 (43), demonstraram que a amiloglucosidase do Aspergillus niger é capaz de hidrolizar as ligações α -D-(1 \rightarrow 4) e α -D-(1 \rightarrow 6) de uma variedade de oligossacarídeos contendo D-glucose sendo a estrutura mínima necessária a de um dissacarídeo.

Pazur e Ando em 1961 (44) isolaram do Aspergillus niger, uma transglucosilase. A enzima purificada foi capaz de transferir unidades glucosil da maltose, metil α -D-maltosídeo, maltotriose, isomaltose, metil α -D-glucosídeo, e amido para moléculas aceptoras apropriadas. A transferência de unidades glucosil para carboidratos aceitadores resulta na produção de novos oligossacarídeos, enquanto que a transferência para a água, resulta na hidrólise.

Pazur e Kleppe em 1962 (45) observaram a hidrólise de ligações α -D- (1 \rightarrow 4), α -D-(1 \rightarrow 6) e α -D- (1 \rightarrow 3) por amiloglucosidase do Aspergillus niger, purificada por cromatografia de troca iônica (42). A hidrólise das ligações α -D-(1 \rightarrow 4), α -D-(1 \rightarrow 6) e α -D- (1 \rightarrow 3) por amiloglucosidase do Aspergillus niger, purificada por cromatografia de troca iônica (42). A hidrólise das ligações α -D-(1 \rightarrow 4) e α -D- (1 \rightarrow 6) pelo amiloglucosidase do Aspergillus niger já havia sido demonstrada nas ligações glicosídicas em amido e glicogênio, havendo entretanto uma diferença na razão de hidrólise entre os dois substratos (43). Os autores demonstraram que a amiloglucosidase era capaz de hidrolizar também ligações α -D-(1 \rightarrow 3), usando a nigerose como substrato. A enzima catalisa a hidrólise de outros glicosídeos mas há grande diferença na velocidade de hidrólise.

Pazur et al (47) observaram que as frações de glucoamilase do Aspergillus niger, preparadas cromatograficamente continham carboidratos e sugeriram então que a amiloglucosidase era uma glicoproteína.

Abdullah et al 1963 (1) estudaram a α -glucosidase extracelular do Aspergillus niger e estenderam suas investigações aos substratos não testados anteriormente por Pazur et al (43,45,46), obtendo alguns resultados quantitativos anteriormente não observados. Eles concluíram ser a enzima, uma exo-glucosidase, que quebra unidades de glucose em sequência partindo da extremidade final não redutora dos polímeros do tipo amido. A enzima que já era conhecida por possuir especificidade preferencial por ligações do tipo α -D-(1 \rightarrow 4), hidrolisa também ligações α -D-(1 \rightarrow 6) e α -D-(1 \rightarrow 3) desde que a isomaltose e nigerose são parcialmente hidrolisadas (45).

Smiley e Hensley 1964 (54) estudaram a produção de glucoamilase do Aspergillus sp. A enzima estudada foi parcialmente purificada por precipitação alcoólica e passagem através de coluna de DEAE. Foi estudado o efeito dos constituintes do meio e efeito de fatores físicos tais como pH, temperatura, aeração e agitação, a fim de obter-se produção máxima da enzima.

A natureza glicoproteica das glucoamilases já havia sido sugerida por Pazur et al em 1963 (47). Em 1965, Fleming e Stone (10), encontraram 35% de carboidratos na enzima precipitada do meio de cultura de Aspergillus niger. Por cromatografia em DEAE-celulose, usando um gradiente linear de NaCl eles separaram várias α glucosidases e duas amiloglucosidase: sendo uma com 15% de carboidratos, outra com 20% de carboidratos (D-manose, D-galactose e D-glucose).

Em 1966 Morita et al (33), e Ohga et al (37) isolaram, purificaram e caracterizaram a glucoamilase do Aspergillus oryzae, encontrando quatro frações. O limite de hidrólise para o amido solúvel foi de 60% numa mistura das frações obtidas. As quatro frações apresentaram propriedades semelhantes diferindo apenas na mobilidade eletroforética e no peso molecular. Quando feito o estudo cinético as quatro frações mostraram-se semelhantes as glucoami

lases anteriormente estudadas.

Pazur e Okada 1966 (48) fizeram a diferenciação dos produtos de hidrólise das α -1,4-glucanhidrolases, por um método baseado na cromatografia de maltooligosacarídeos- $1-^{14}\text{C}$. Fazendo o mapeamento com as variadas formas de isoenzimas de certos organismos. êles descobriram uma nova enzima, a α -1,4-glucan: α -1,4 glucan 4- maltosiltransferase detectada em preparações enzimáticas do Rhizopus delemar e Bacillus subtilis.

No estudo da cinética enzimática da glucoamilase de Rhizopus delemar dois substratos foram usados, a maltose e a panose que possuem ligações α - D-(1 \rightarrow 4) e α -D-(1 \rightarrow 6) respectivamente.

Hironi et al 1966 (17) demonstraram que a glucoamilase do Rhizopus delemar, embora tenha características semelhantes, difere da de outras fontes no que tange à especificidade pelo substrato.

Em cultura de Coniophora cerebella, contendo amido no meio de crescimento, King em 1967 (22) estudou a principal enzima amilolítica. A enzima purificada e caracterizada como uma glucoamilase (E.C.3.2.1.3). A ação da enzima sobre vários substratos foi estudada, mostrando através da hidrólise da amilopectina que ela catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) e α -(1 \rightarrow 6) a partir da extremidade final não redutora. Usando-se amilopectina como substrato a conversão em D-glucose foi maior que 95%, enquanto sobre amilose a conversão foi de 85-90%. A D-glucose foi o único produto encontrado na degradação destes substratos.

As ligações polipeptídeo-carboidratos, da glucoamilase extracelular do Aspergillus niger, foram estudadas por Lineback 1968 (24). Ficou evidenciado que as glucoamilases I e II do fungo contêm carboidratos que estão glicosídicamente ligados através da D-manose ao grupo hidroxil da serina e treonina - na cadeia polipeptídica da enzima.

Lineback et al 1969 (25) mostraram que as duas formas de glucoamilase extracelular (α -1,4-glucan glucohidrolase, E.C.3.2.1.3) do Aspergillus niger são idênticas em muitas propriedades físico-químicas. Somente encontra-

ram diferenças quanto à sua mobilidade eletroforética, ponto isoelétrico e estabilidade à temperatura ambiente por longos períodos.

Lineback e Baumann 1970 (26) purificaram a glucoamilase extracelular do Aspergillus phoenicis e separaram cromatograficamente duas formas da enzima. Uma delas foi isolada em forma homogênea e suas características proteicas analisadas.

Fukui e Nikuni (12) isolaram glucoamilase na forma cristalina do meio de cultura de Endomyces sp determinando seu peso molecular, sua composição em amino ácidos e sua estabilidade frente ao pH e a temperatura.

Pazur et al 1971 (49) purificaram, caracterizaram e estudaram a estrutura das duas formas (isoenzimas) de glucoamilase do Aspergillus niger. As duas formas são separáveis por eletroforese ou por cromatografia em DEAE-celulose e são designadas de glucoamilase I e II. Ambas as formas possuem resíduos de carboidratos ligados covalentemente, que são D-manose, D-glucose e D-galactose. O termo glicoenzimas tem sido sugerido e é recomendado como descrição apropriada para as enzimas deste tipo.

A cinética das duas glucoamilases de uma Aspergillus sp foi feita por Smiley et al 1971 (55), demonstrando que as duas formas não diferem em suas propriedades cinéticas. A diferença é mais pronunciada quando o glicogênio é usado como substrato e menos pronunciada quando o substrato usado é oligossacarídeo.

Fazendo o estudo das endo carboidrases, particularmente na presença de exo enzimas, sobre alguns substratos, Marshall e Whelan em 1971 (32), mostraram que as glucoamilases do Aspergillus niger e do Rhizopus niveus diferem na ação sobre amilose parcialmente oxidada. A enzima do Rhizopus niveus libera D-glucose da extremidade final não redutora da cadeia da amilose oxidada, até que sua ação é bloqueada, presumivelmente pela presença de unidade de D-glucose oxidada. A glucoamilase do Aspergillus niger, entretanto, não parece ser bloqueada pelas unidades oxidadas na cadeia da amilose; isto foi atribuído como contaminação de glucoamilase com α -amilase, a qual rom

pe as ligações D-glucosídicas internas da amilose oxidada, e produz novos grupos finais para o ataque da glucoamilase.

Tsuboi et al 1974 (59) separam as duas formas (isoenzimas) de glucoamilase do micélio de Mucor rouxianus, às quais foi dada a designação de glucoamilase I e glucoamilase II. As glucoamilases I e II do Mucor rouxianus, são separáveis por eletroforese em gel de poliacrilamida ou SP-Sephadex C-50.

As condições de cultura para obtenção de três tipos de glucoamilase produzidas pelo Aspergillus awamori var. Kawachi, foram descritas por Hayashida 1975 (16). Os três tipos de glucoamilase, tipo I, I' e II foram separados e classificados baseando-se nas diferenças das curvas de hidrólise para vários substratos.

O Penicillium oxalicum produz duas formas (isoenzimas) de glucoamilase I e II, as quais foram isoladas do micélio e purificadas por Yamasaki et al 1976 (63). Em 1977 Yamasaki et al (64) caracterizaram as duas glucoamilases do Penicillium oxalicum. Ambas as glucoamilases I e II hidrolizam glicogênio, amilopectina, amido solúvel, amilose, maltotriose e maltose, mas não hidrolizam isomaltose e isomaltotriose. D-glucose foi o único produto encontrado na digestão destes substratos. Ambas as enzimas hidrolizam fenil α maltosídeo à glucose, e fenil α glucosídeo. Tanto a glucoamilase I quanto a II são glicoproteínas e contem 3,93% e 3,22% de açúcar neutro respectivamente. A glucoamilase II contem D-manose, D-galactose e D-glucose como açúgar neutros constituintes.

A estabilidade térmica da glucoamilase (α -1,4:1,6-glucan-4:6 glucohidrolase, E.C.3.2.1.3) do Rhizopus niveus, foi investigada por Moriyma, et al 1977 (34) em relação à cinética, na presença e ausência de vários ligantes. Eles observaram que em presença de D-glucose, lactose, gluconolactona, e glicerol, a termoestabilidade da enzima aumentava grandemente, enquanto que em presença de solventes orgânicos havia uma diminuição.

As duas formas de glucoamilases I e II de culturas de Mucor rouxianus

isoladas e cristalizadas em 1974 (59) foram caracterizadas por Yamasaki et al em 1977 (65). Ambas as formas apresentam propriedades semelhantes apesar de diferirem quanto ao peso molecular e a capacidade de degradar grãos de amido.

Yamasaki et al em 1977 (66), separaram três das múltiplas formas (isoenzimas) de α -glucosidases do micélio de Aspergillus awamori de uma glucoamilase. As três α -glucosidases isoladas foram designadas como α -glucosidases I, II e III; as três hidrolizam maltose, maltotriose, fenil α -maltoside, isomaltose, panose, fenil α -glucosideo e amilose liberando D-glucose, mas não atuam sobre sacarose. A glucoamilase hidroliza amido solúvel, amilose, amilopectina, glicogênio, maltotriose, fenil α -maltoside e maltose sendo que na hidrólise de todos os substratos, a D-glucose foi o único produto formado.

Taylor et al (57) descreveram a presença de duas glucoamilase no meio de cultura de Humicola lanuginosa. Os autores purificaram e caracterisaram uma delas que apresenta um pH ótimo de 6,6, distinto dos descritos para enzimas de outros fungos (22,33,38).

Estas conclusões tem significado prático, desde que a importância econômica das glucoamilases vem aumentando face a seu emprego nos processos fermentativos industriais (61).

Dentro da filosofia do desenvolvimento da tecnologia nacional, está se procurando encontrar novas fontes de amilase que possam ser utilizadas posteriormente para fins industriais. Para tanto se faz necessário encontrar o microorganismo produtor, as condições fisiológicas de produção da enzima e caracterização da enzima produzida.

Oliveira e Zancan em 1977 (40) verificaram nos extratos livres de células do fungo Polyporus circinatus a presença de uma atividade amilolítica, acusada pelo aumento do poder redutor. Esta atividade amilolítica foi caracterizada como endoamilásica.

No meio de cultura do Polyporus circinatus, foi detectada a presença de atividade amilolítica variando-se a fonte de carbono. A produção e a ca-

racterização da atividade amilolítica extracelular do Polyporus circinatus constitui objeto do presente trabalho.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 - MICROORGANISMO PRODUTOR DA ENZIMA

O microorganismo usado foi o Polyporus circinatus isolado e classificado no Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Paraná (IBPT). Embora a sua classificação tenha sido contestada por Nobles e Madhosina em 1963 (36) e por Kemmelmeier e Zancan em 1976 (20), o nome Polyporus circinatus foi usado em trabalhos anteriores e será mantido no presente trabalho.

2 - MEIOS, CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO E CULTIVO DO FUNGO

a) - Meio sólido

A cultura do Polyporus circinatus foi repicada em meio sólido de agar Sabourand-glucose, pH 6,0-6,5, contendo: glucose 2%; peptona 1%; extrato de levedura 0,5%, e agar 1,5%. A cultura foi colocada em estufa a 28°C, observando-se um crescimento satisfatório em 36 h. Após este tempo a cultura foi mantida entre 0 a 4°C, fazendo-se repiques quinzenais.

b) - Meio líquido (pré-inóculo)

Para o presente trabalho, o fungo foi pré-inoculado no meio mínimo mineral recomendado por Markus et al (30), tendo tiamina na concentração de 5 µg/ml e o seu pH sido ajustado para 6,0. A fonte de carbono utilizada foi a D-glucose, usada na concentração de 0,5%. Para frascos de cultivo foram utilizados erlenmeyers com capacidade de 1.000 ml, contendo 300 ml de meio e autoclavados a 1 atm. por 20 min. A D-glucose foi autoclavada separadamente em vapor fluente, por 20 min. Após a semeadura, os frascos foram colocados em estufa a 28°C, com agitação rotatória, regulada para 100 rpm. O crescimento do fungo prolongou-se por 48 h.

c) - Meio líquido (inóculo)

Após crescimento do pré-inóculo, o fungo foi inoculado em meio mínimo contendo várias fontes de carbono, para indução da atividade amilolítica. O meio mínimo mineral utilizado foi o de Markus et al (30), anteriormente modi-

ficado e a fonte de carbono utilizada como indutor foi amido na concentração de 0,2%. Os frascos de cultivo utilizados, foram erlenmeyers com capacidade de 2.000 ml, contendo 500 ml de meio. As diferentes fontes de carbono foram autoclavados separadamente em vapor fluente, por 20 min. Após inoculação, os frascos foram colocados em estufa a 28°C, com agitação rotatória, regulada para 100 rpm.

d) - Avaliação do crescimento do fungo

Para obtenção do micélio seco, nos diversos tempos de crescimento, foram usados, discos de papel de filtro, previamente pesados em balança analítica Mettler, mantidos em placas de Petri, na estufa a 60°C até peso constante. O micélio úmido foi coletado no papel de filtro por filtração do meio, à vácuo em funil de Büchner. Os discos de papel de filtro contendo o micélio foram novamente colocados a 60°C. até novo peso constante. O peso do micélio foi calculado por diferença.

3 - OBTENÇÃO DA ENZIMA

O meio de cultura de 48 horas em amido 0,2% foi coletado em erlenmeyer por filtração em gaze e mantido em banho de gelo. Como protetor adicionou-se ao meio mercaptoetanol na concentração de 1 mM. Em etapa preliminar foram determinadas as condições ótimas para a precipitação da enzima com etanol. Assim a 1000 ml de meio foi acrescentado, com agitação alcohólica absoluta, previamente gelado, até obter a concentração final de 47 % em etanol, mantendo-se a temperatura da mistura entre 0°C - 5°C. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 10.000 g por min. à temperatura de 0°C. A centrífuga usada foi Beckman, modelo J-21B. O sobrenadante alcoólico foi desprezado e o precipitado foi suspenso em tampão imidazol 0,05 M pH 7,2. O precipitado suspenso em tampão foi dialisado contra água destilada à temperatura de 4°C durante 4 horas.

Após a diálise o material foi aplicado em coluna de DEAE - celulose -

(1,5 x 15 cm) previamente equilibrada com tampão imidazol 10 mM pH 7,2. Em coletor (UltraRac Fraction Collector LKB 7000), frações de 4,0 ml foram coletadas durante a eluição com um gradiente de NaCl (0-0,5 M) em tampão imidazol 10 mM, com o fluxo de 10 gotas/min. Frações com alta atividade específica obtidas em 0,39 M de NaCl foram reunidas para posterior caracterização. A concentração de NaCl foi medida em condutivímetro Metrohm modelo E 527.

4 - MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A medida da atividade amilásica foi efetuada em um sistema enzimático constituído de: 4 mg de amido solúvel, 15 μ moles de tampão HEPES (ácido N 2 Hydroxietil piperazine N'-2-etanol sulfônico) pH 7,2 e quantidades variáveis de proteínas para volume final de 1,5 ml. A incubação prolongou-se por 90 min à temperatura de 57^oC e em seguida efetuou-se a dosagem dos açúcares redutores, pela técnica de Somogyi (56) e Nelson (35).

Conforme os casos indicados a α -glucose foi determinada pela técnica da glucose oxidase (5).

Uma unidade de enzima, foi definida como número de μ moles de açúcar redutor ou α -D-glucose liberados por minuto, nas condições de ensaio. A atividade específica foi expressa em unidades de enzima por mg de proteína.

5 - CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE AMILÁSICA

A caracterização da atividade amilásica, foi feita pelo método de Drummond et al (8), modificado por Buonocore et al (4). As experiências foram efetuadas em pH 5,0 e em pH 7,2, usando-se em ambos os casos amilose oxidada e não oxidada.

Para caracterização da atividade endo amilásica o sistema de incubação continha 15 μ moles de tampão HEPES pH 7,2; 0,75 mg das respectivas amiloses e 3 μ g de proteína para volume final de 1,5 ml. Incubou-se à temperatura de 35^oC e para fins comparativos, efetuou-se o mesmo ensaio utilizando-se α -amilase salivar. A incubação efetuou-se por 3 h. e amostras eram retiradas nos diferentes tempos dosando-se açúcares redutores pela téc -

nica de Somogyi (56) e Nelson (35).

Para caracterização da atividade exo amilásica o ensaio foi realizado de modo semelhante ao descrito acima, substituindo o tampão da mistura de reação por 15 μ moles de tampão acetato pH 5,0. Eram efetuadas dosagens de açúcares redutores pelo método de Somogyi (56) e Nelson (35) e dosagens de D-glucose pelo método da glucose oxidase (6), nas amostras retiradas nos diferentes tempos. Efetuou-se o mesmo ensaio utilizando-se β e γ amilases (Sigma), para fins comparativos.

6 - CROMATOGRAFIA DO PRODUTO DE HIDRÓLISE

A ação enzimática sobre o amido foi mostrada em pH 5,0 e em pH 7,2. A enzima foi previamente dialisada contra tampão HEPES 10 mM pH 7,2 e tampão acetato 10 mM pH 5,0 durante 4 horas. O sistema de incubação 3 mg de amido, 3,8 μ g de proteína, 2 μ moles de tampão em volume final de 1,0 ml. Incubou-se a mistura a 57°C e amostras eram retiradas em diferentes tempos. Após a incubação, a reação foi interrompida por aquecimento em banho fervente durante 10'. O amido não hidrolizado foi precipitado por adição de 4 volumes de etanol a 95% seguido de centrifugação a 1.500 g durante 10'. O sobrenadante alcoólico foi desionizado em coluna de Amberlite MB-3 conforme técnica utilizada por Glymph e Stutzenberger (14). O sobrenadante assim dessalinado foi concentrado à vácuo e o resíduo foi solubilizado em 50 μ l de água desionizada. O cromatograma foi efetuado sobre papel Whatman n° 1 pela técnica descendente, durante 40 h usando-se como solvente a mistura, benzeno:butanol:piridina:água, na proporção de 1:5:3:3 (13). A revelação do cromatograma foi feita com nitrato de prata alcalino (58). Foram usados como padrões D-glucose e maltose.

7 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A proteína das frações coletadas durante a eluição da coluna cromatográfica, foi acompanhada pelo método de Warburg e Cristian (60) determinan-

do-se a absorbancia ultravioleta a 260 e 280 nm em um espectrofotômetro (Varian Techtron-635 UV-Visible Spectrophotometre. Para a determinação da atividade específica a proteína foi dosada pelo método de Lowry et al (27), tendo sido usado como padrão, a albumina bovina. A medida da absorbancia foi feita a 660 nm em espectrofotometro Coleman Jr.

8 - DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES

Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi (50) e Nelson (31), usando-se α -D-glucose como padrão. A medida da absorbância foi feita a 540 nm em espectrofotometro Coleman Jr.

9 - DOSAGEM DA D-GLUCOSE

A α -D-glucose foi determinada pela glucose oxidase, peroxidase e o-dianisidina, utilizando-se tampão Tris-HCl, pH 8,0 como inibidor de glucosidases (6). A medida da absorbância foi a 420 nm em espectrofotômetro Coleman Jr., sendo usado α -D-glucose como padrão.

10 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A fração eluida da coluna de DEAE celulose (200 μ g) foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% com 0.065 M Tris-borato pH 9,0. A eletroforese foi realizada a 5 m A por tubo durante 90 minutos em equipamento ORTEC modelo 4200. Após completado o experimento, o gel foi retirado do tubo e deixado por 12 h com o corante amido black e descorado por difusão durante 48 h com solução de ácido acético a 10% (7).

11 - REAGENTES

A - ORIGEM

a) - Produtos químicos

Os reagentes gerais eram pró análise, provenientes de várias fontes : Sigma, Merck, Carlo Erba, Calbiochem, Eastman Kodak, etc; todos tidos como quimicamente puros.

u) - Enzimas

D-glucose oxidase, peroxidase, β amilase e γ amilase, eram produtos da Sigma Chem.Co. Louisiana, USA.

c) - Substratos

Glicogênio de marisco tipo II, glicogênio de fígado de coelho tipo III, amilose e amilopectina, eram da Sigma. O amido foi fornecido da Merck (Darmstadt). Metil glucosídeo foi fornecido pela Sigma Chemical Co. Rafinose (O- α -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 6)-O- α -D-glucopiranosil β -D-frutofuranosídeo); Maltose (4-O- α -glucopiranosil-D-glucopiranosídeo); Celobiose (4-O- β -D-glucopiranosil-D-glucopiranosídeo); Trealose (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosídeo); Gentibiose (6-O- β -D-glucopiranosil-D-glucopiranosídeo), Lactose (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranosídeo); Turanose (3-O- α -D-glucopiranosil- β -D-frutofuranosídeo); Sacarose (α -D-glucopiranosil- β -D-frutofuranosídeo); Melizitose (D- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-frutofuranosil-(2 \rightarrow 1)- α -D-glucopiranosídeo); todos foram fornecidos pela Calbiochem, Los Angeles, USA.

d) - Tampões

Imidazol, MES (Ácido 2 {N-morfolino }etano sulfônico), HEPES (Ácido 2 N-hidroxí etil piperazina N'-2-etano sulfônico), todos eram da Sigma.

B - PREPARO DOS SUBSTRATOS

a) - Amido solúvel

O amido foi dissolvido em água bidestilada, com aquecimento brando e agitação, até transparência. Em seguida foi completado o volume com água bidestilada, à temperatura ambiente. A fim de verificarmos a integridade do polissacarídeo, foi realizado teste com solução de lugol, verificando-se a cor azul característica.

b) - Amilose

A amilose foi dissolvida à quente em NaOH 0,1N, com agitação. A se -

guir foi neutralizada com HCl à temperatura ambiente e o volume foi completado com H₂O destilada. Após essa operação efetuou-se teste com solução de lugol, verificando-se a cor azul característica.

c) - Amilose oxidada

A amilose na concentração de 0,5% preparada do modo anteriormente descrito, foi oxidada por adição de periodato de sódio 0,1 M, (5:100 v/v), com agitação ao abrigo da luz por 1 h à temperatura ambiente. Terminada a oxidação, efetuou-se a diálise contra água destilada à temperatura ambiente por 24 h, trocando a água de diálise cada 6 h, seguindo a técnica descrita por Drummond et al (8).

d) - Amidos

Os amidos de batata, de milho e de mandioca foram preparados de acordo com Schoch (52). Para as determinações do percentual de hidrólise enzimática o conteúdo em D-glucose dos polissacarídeos foi determinado por hidrólise com ácido sulfúrico 1 N por 2 horas a 100°C, aplicando-se o fator de correção para perda de D-glucose (31).

RESULTADOS

1 - CONDIÇÕES PARA PRODUÇÃO MÁXIMA DE AMILASE

a) - Efeito do pH

O pH requerido pelo fungo para produção da enzima no meio mínimo mineral, enriquecido com tiamina, está ilustrado na Tabela I. A produção máxima da enzima foi observada em pH 6,0.

b) - Efeito da fonte de carbono

Conforme ilustra a Tabela II, as atividades máximas foram obtidas quando foi usado o glicogênio de fígado de coelho e amido solúvel, como fonte de carbono indutora, sendo este último utilizado como fonte de carbono e energia nas experiências de obtenção da enzima.

c) - Efeito do tempo de crescimento

O máximo de produção da enzima no meio de cultura contendo amido na concentração de 0,2% como indutor, e em pH 6,0 foi obtido com 48 h de crescimento, conforme mostra a Figura 1. O aumento da atividade amilásica no meio de cultura foi observado como sendo proporcional ao crescimento do fungo, diminuindo na fase de autólise.

2 - OBTENÇÃO DA ENZIMA

Um sumário dos resultados do isolamento da amilase extracelular do Polyporus circinatus é dado na Tabela III.

A atividade amilolítica da fração de DEAE celulose é estável por 4 meses a 4°C, perdendo a atividade por congelamento. A atividade foi mantida entre pH 5,0 e 7,0, perdendo a atividade por diluição da proteína, quando a concentração era inferior a 0,05 mg/ml.

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida da fração obtida da coluna DEAE celulose mostrou a presença de 4 bandas de proteína.

3 - CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE AMILÁSICA

A caracterização da atividade amilolítica, foi feita pelo método de

Drummond (8), o qual utiliza amilose oxidada e não oxidada como substrato. O método se baseia na natureza da ação enzimática sendo ou exo amilolítica. A ação endo amilolítica hidroliza essencialmente ao acaso as ligações glucosídicas, enquanto na ação exo amilolítica os polissacarídeos são degradados sequencialmente a partir das extremidades não redutoras. Uma vez que a amilose oxidada tem suas extremidades não redutoras modificadas pela ação do periodato, as exo enzimas (β e γ amilases) vão apresentar pouca ou nenhuma atividade sobre esse substrato, enquanto as endo enzimas (α amilases) apresentam atividade similar sobre a amilose oxidada e não oxidada. As Figs. 2 e 3 mostram a ação da amilase extracelular do Polyporus circinatus em pH 5,0 e 7,2, sobre a amilose oxidada e não oxidada.

4 - CROMATOGRAFIA DO PRODUTO DE HIDRÓLISE

Os resultados da análise cromatográfica dos produtos de hidrólise sobre amido solúvel, se encontram na Fig. 4. Observa-se que o amido foi convertido a α -D-glucose desde os primeiros estágios de hidrólise e não havendo formação de oligossacarídeos em pH 5,0 e 7,2, nos tempos analisados.

5 - EFEITO DO TEMPO NA HIDRÓLISE DO AMIDO

Dosando-se açúcar redutor e D-glucose, nas mesmas condições de ensaio obtivemos uma relação média de 1:0,86, sugerindo tratar-se de uma glucoamilase, com a conversão do amido a D-glucose, conforme mostra a Fig.5.

6 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA

Há uma relação linear entre a concentração de proteína e a atividade, conforme mostra a Fig. 6 nas condições de ensaio.

7 - pH ÓTIMO E DE INATIVAÇÃO

Nas condições do sistema de ensaio, o pH ótimo da enzima variou de 5,0 - 7,2, conforme mostra a Fig. 7.

Quando a enzima foi pré-incubada em pH variável de 4,0 a 10 durante 6 horas a 37°C não houve alteração da atividade nos pH 6,0 a 8,5.

8 - TEMPERATURAS ÓTIMA E DE INATIVAÇÃO

A temperatura ótima para atividade enzimática, vista na Fig.8, foi de 60°C. Em 70°C há um considerável decréscimo, perdendo totalmente a atividade à temperatura de 100°C. Na ausência de substrato a atividade foi reduzida à metade em 30 minutos a 60°C, e a inativação ocorreu em 120 minutos, conforme a Fig.9. À temperatura de 65°C, na ausência de substrato, a enzima foi totalmente inativada em 20 minutos conforme a Fig. 10.

9 - ESPECIFICIDADE PELO SUBSTRATO

A atividade da glucoamilase foi examinada com vários polissacarídeos, conforme mostra a Tabela IV. A velocidade relativa de hidrólise do amido solúvel, amilopectina, amilose, glicogênios de marisco e de fígado de coelho foi de 100, 94,7,57,53 e 39% respectivamente. Todos os substratos foram hidrolizados tendo como produto de conversão D-glucose.

Quando se determinou a especificidade da fração enzimática frente a vários oligossacarídeos constatou-se que a fração apresentava atividade hidrolítica inespecífica, apenas não hidrolisando lactose (Tabela V).

10 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

O efeito da concentração do amido, está indicada na Fig. 11. O V_{max} demonstrado é de 33,3 μ moles de açúcar redutor/min/mg de proteína, enquanto o K_m aparente é de 2,85 mg nas condições de ensaio.

11 - % DE HIDRÓLISE DE POLISSACARÍDEOS

A capacidade de hidrólise frente a grãos de amido comparativamente a polissacarídeos solúveis é indicada na Tabela VI observando que a hidrólise obedece a seguinte ordem: amido solúvel > amilopectina > amilose > glicogênio > amido de mandioca > amido de milho > amido de batata.

TABELA I
EFEITO DO pH NA PRODUÇÃO DA ENZIMA

pH do meio	Atividade (U/ml)	Proteína (µg/ml)	Atividade específica (µmol/mg/min)
pH 6,0	7,62	9,60	6,64
pH 7,0	4,00	8,70	3,81

Fonte de carbono amido 0,2%. Tempo de crescimento 48 horas.

TABELA II
EFEITO DA FONTE DE CARBONO NA PRODUÇÃO DA ENZIMA

Fonte de Carbono	Atividade específica (µmol de açúcar redutor/mg/min)
Glicerol	0,00
Glucose	0,01
Celobiose	0,28
Melibiose	0,37
Maltose	3,40
Trealose	6,00
Amido Solúvel	8,29
Glicogênio de Fígado	13,28

TABELA III

ISOLAMENTO DA FRAÇÃO ENZIMÁTICA

Fração	Unidades totais ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Proteínas totais (mg/ml)	Atividades específicas ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
Meio	19,00	17,64	1,08
Etanólica 47%	20,40	7,72	2,64
DEAE celulose	22,50	4,42	5,10

TABELA IV
ESPECIFICAÇÃO PARA POLISSACARÍDEOS

SUBSTRATOS	VELOCIDADE RELATIVA
Amido Solúvel	100
Amilopectina	94,7
Amilose	57
Glicogênio de Marisco	53,6
Glicogênio de Fígado de Coelho	39

Sistema de incubação: 15 μ moles de tampão HEPES pH 7,2; 4 mg do respectivo substrato; 3 μ g de proteína. Incubação: 90' a 57°C.

TABELA V
ESPECIFICIDADE PARA OLIGOSSACARÍDEOS

SUBSTRATO	Glucose (nmoles/min)
Trealose	5,70
Gentibiose	1,79
Maltose	0,92
Celobiose	0,66
Sacarose	0,64
Melizitose	0,44
Turanose	0,33
Rafinose	0,27
Metil glucosídeo	0,09
Lactose	0,00

Sistema de incubação: 100 μ moles de oligossacarídeo; 9,8 μ g de proteína ;
15 μ moles de tampão HEPES pH 7,2 para volume final de 0,5 ml. Incubação por
90 min a 50⁰C.

TABELA VI

PERCENTAGEM DE HIDRÓLISE DOS POLISSACARÍDEOS

SUBSTRATO	37 ^o	50 ^o
Amido Solúvel	25,98	33,47
Amilopectina	12,89	26,77
Amilose	11,91	21,79
Glicogênio	3,24	9,27
Amido de Batata	0,00	0,00
Amido de Milho	2,75	8,50
Amido de Mandioca	4,19	17,84

Sistema de incubação: 1 mg de polissacarídeo; 9,8 µg de proteína; 30 µmoles de tampão HEPES pH 7,2. Volume final de 1 ml. Tempo de incubação 24 horas nas temperaturas indicadas.

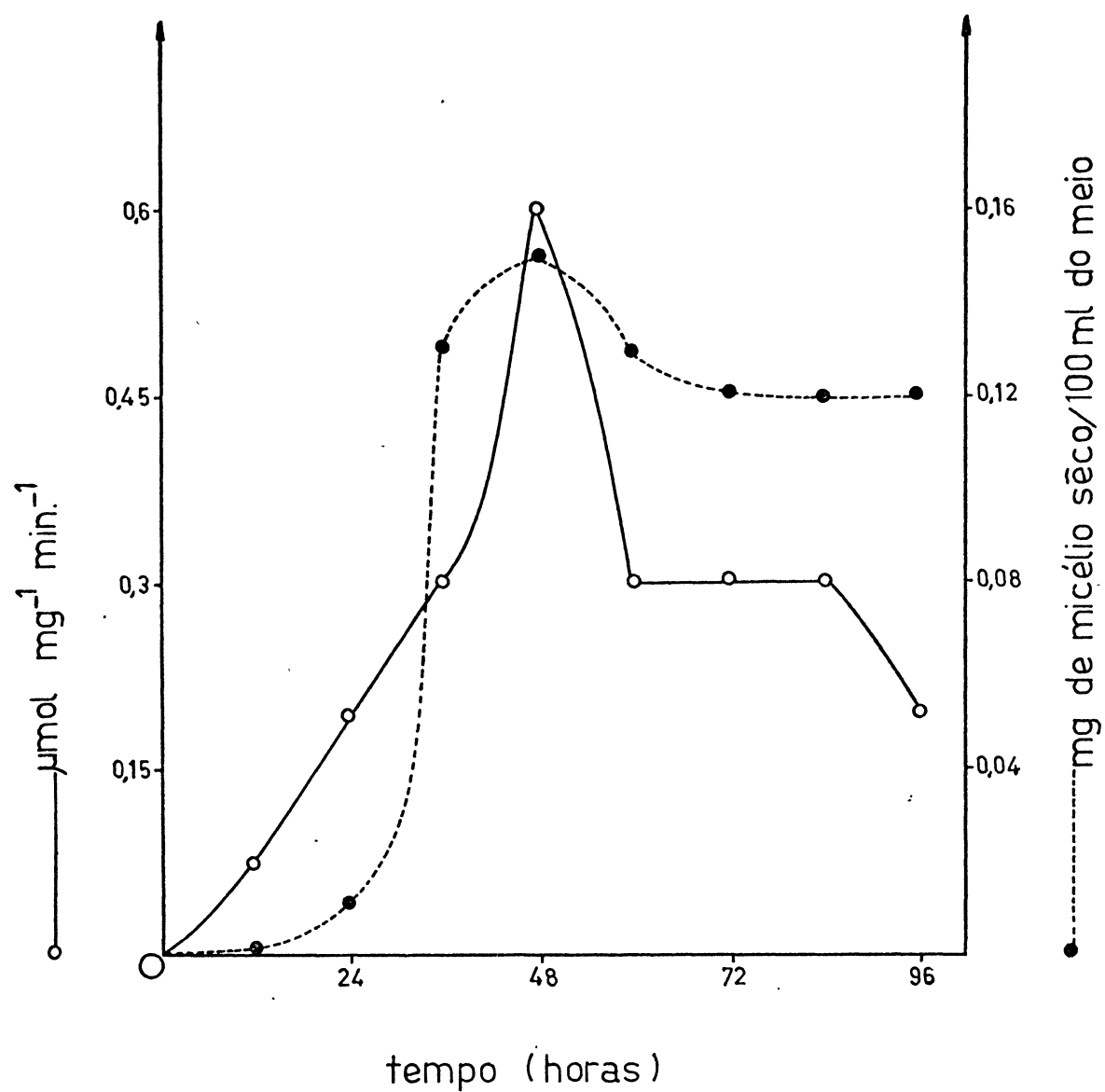


Fig.1 _Efeito do tempo de crescimento na produção da enzima.

Meio mineral mínimo contendo 0,2% de amido, pH 6,0, temperatura de 28°C com agitação. (Atividade específica expressa em μmol de açúcar redutor/min/mg de proteína).

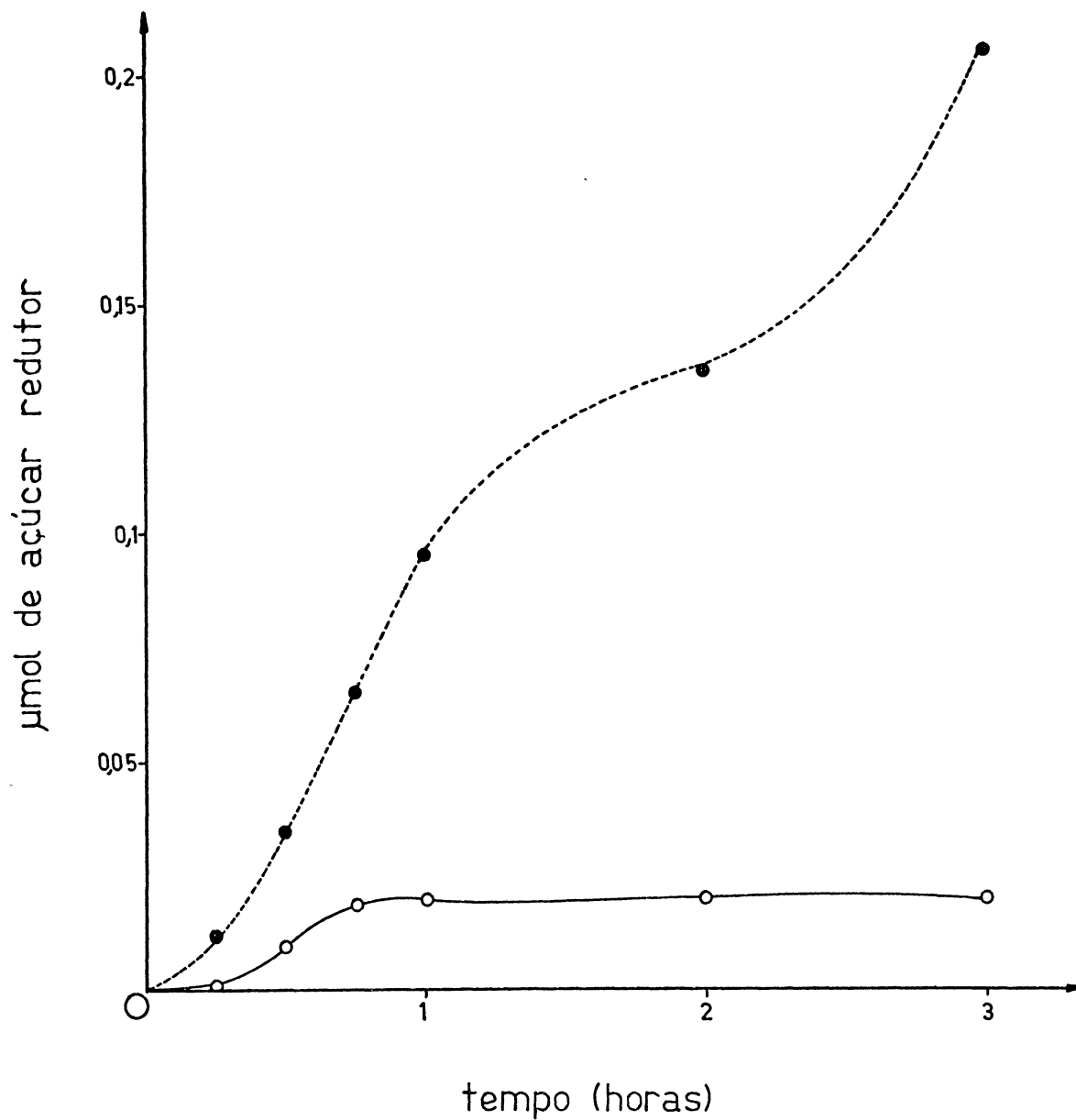


Fig.2 - Caracterização da atividade amilolítica a
pH 5,0

Sistema de incubação: 15 μmoles de tampão acetato pH 5,0; 0,75 mg da respectiva amilose e 3 μg de proteína. Incubação à temperatura de 35°C.

○ — amilose oxidada.

● — amilose não oxidada.

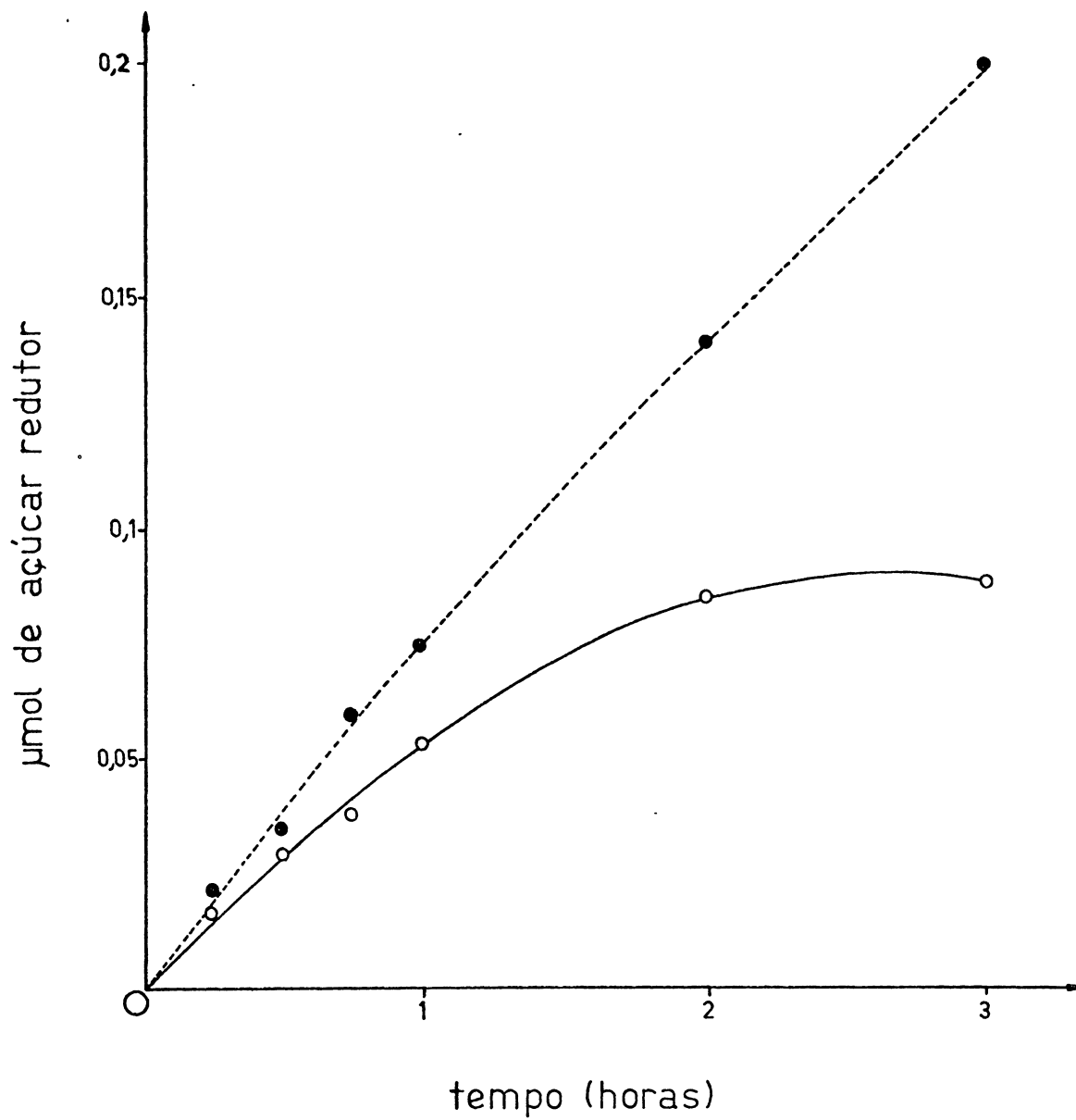


Fig.3 - Caracterização da atividade amilolítica a pH 7,2

Sistema de incubação: 15 μmoles de tampão HEPES pH 7,2; 0,75 mg da respectiva amilose e 3 μg de proteína. Incubação à temperatura de 35°C.

- — amilose oxidada.
- — amilose não oxidada.

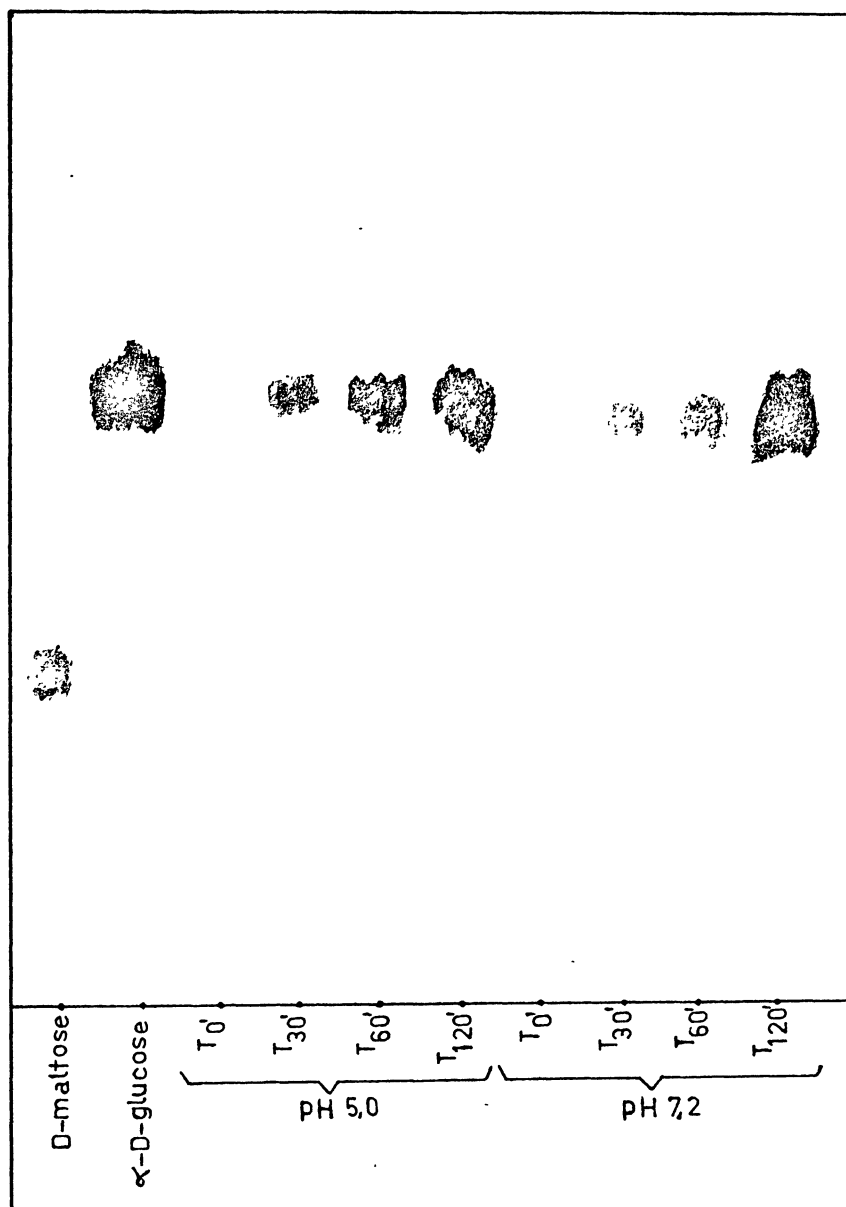


Fig.4 -Cromatografia do produto de hidrólise

Sistema de incubação: 3 mg de amido; 3,8 µg de proteína e 2 µmoles do respectivo tampão para volume final de 1,0 ml (pH 5,0 tampão acetato e pH 7,2 tampão HEPES). Incubação a 57⁰C, nos diferentes tempos. Cromatograma: efetuado pela técnica descendente, durante 40 horas. Solvente: Mistura de benzeno: butanol : piridina: água (1:5:3:3).

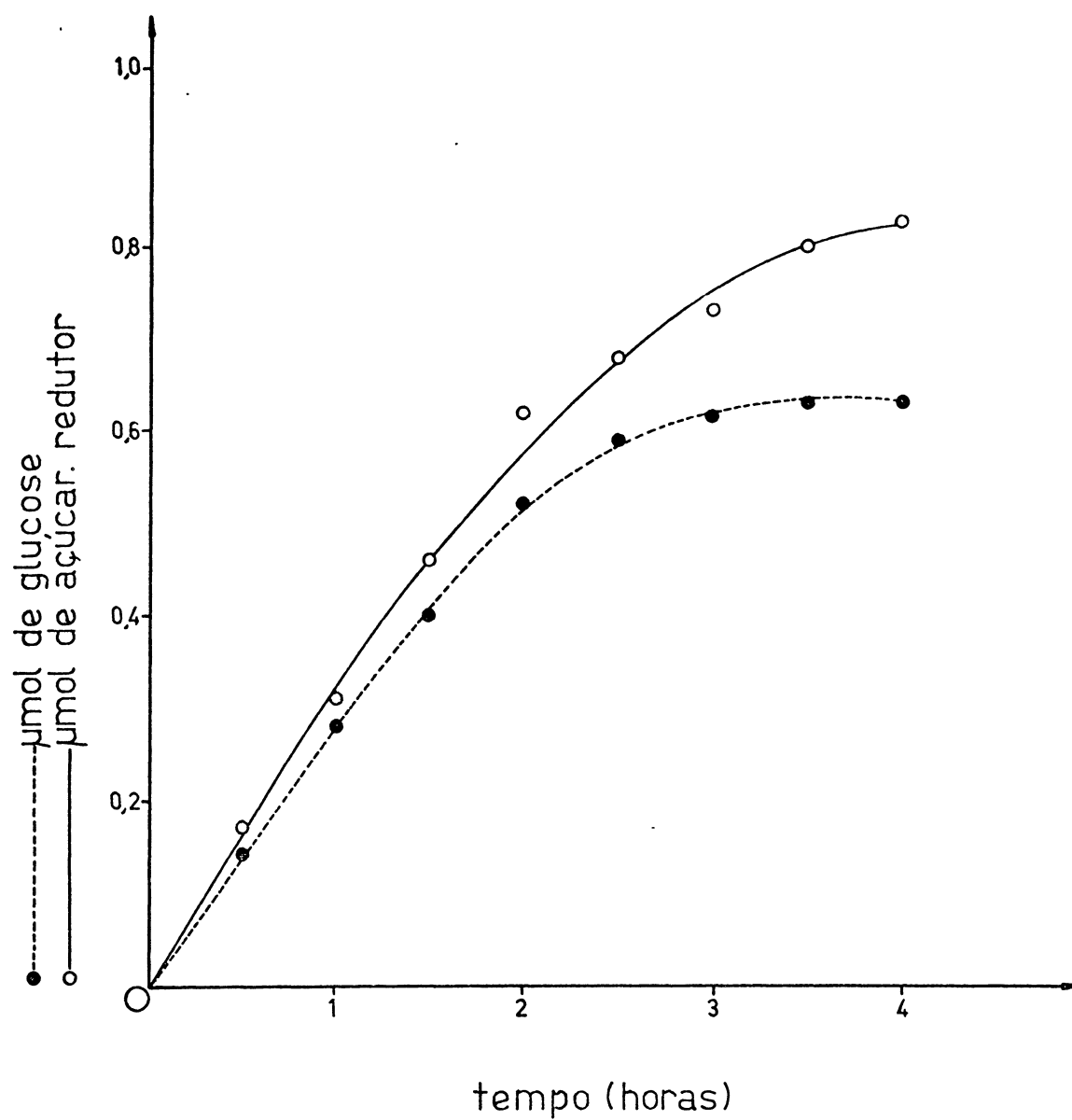


Fig.5 - Efeito do tempo na hidrólise do amido

Sistema de incubação: 15 μmoles de HEPES pH 7,2; 4,0 mg de amido e 3,3 μg de proteína, para volume final de 15 ml. Incubação a 57°C.

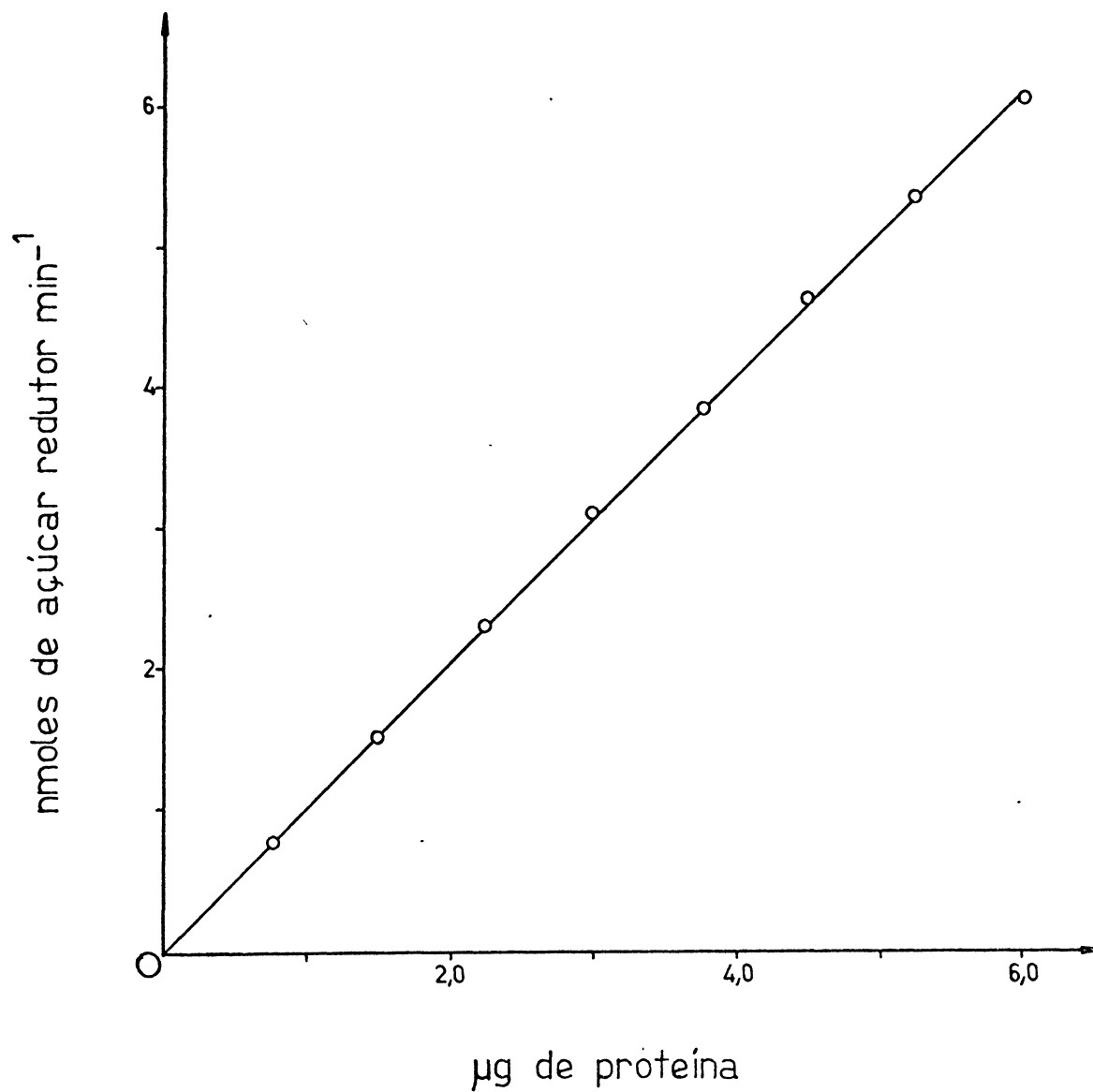


Fig.6 - Efeito da concentração da enzima

Sistema de incubação: 15 µmoles de tampão HEPES pH 7,2;
4,0 mg de amido e concentração variáveis de proteína. In-
cubação por 90' à temperatura de 57^o C.

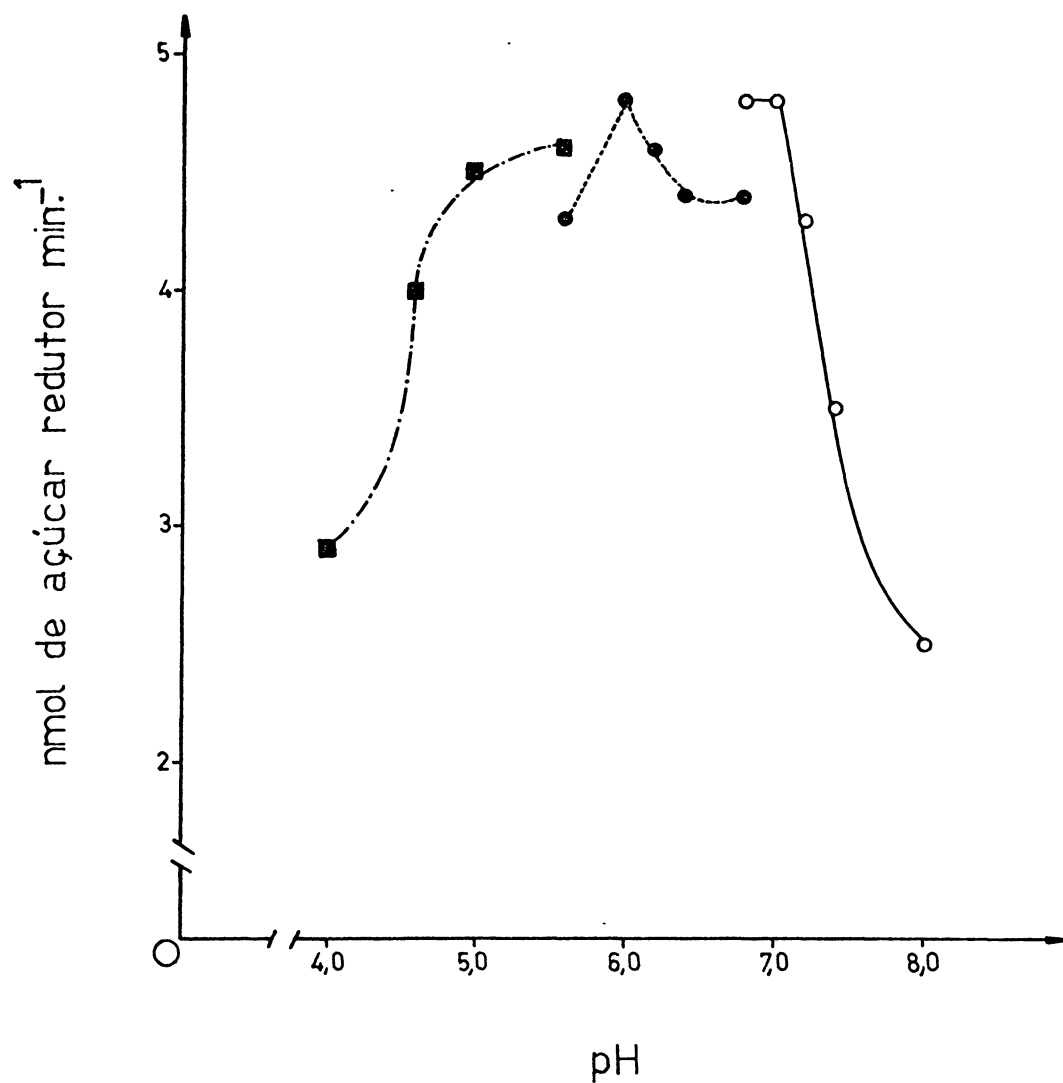


Fig.7 -Efeito do pH

Sistema de incubação: 15 μ moles do respectivo tampão; 4,0 mg de amido e 3,0 μ g de proteína para volume final de 1,5 ml. Incubação de 90 minutos a 57^oC para cada pH.

■----- tampão acetato (pH 3,7 - 5,6)

●----- tampão MES (pH 5,5 - 7,0)

○----- tampão HEPES (pH 6,8 - 8,2)

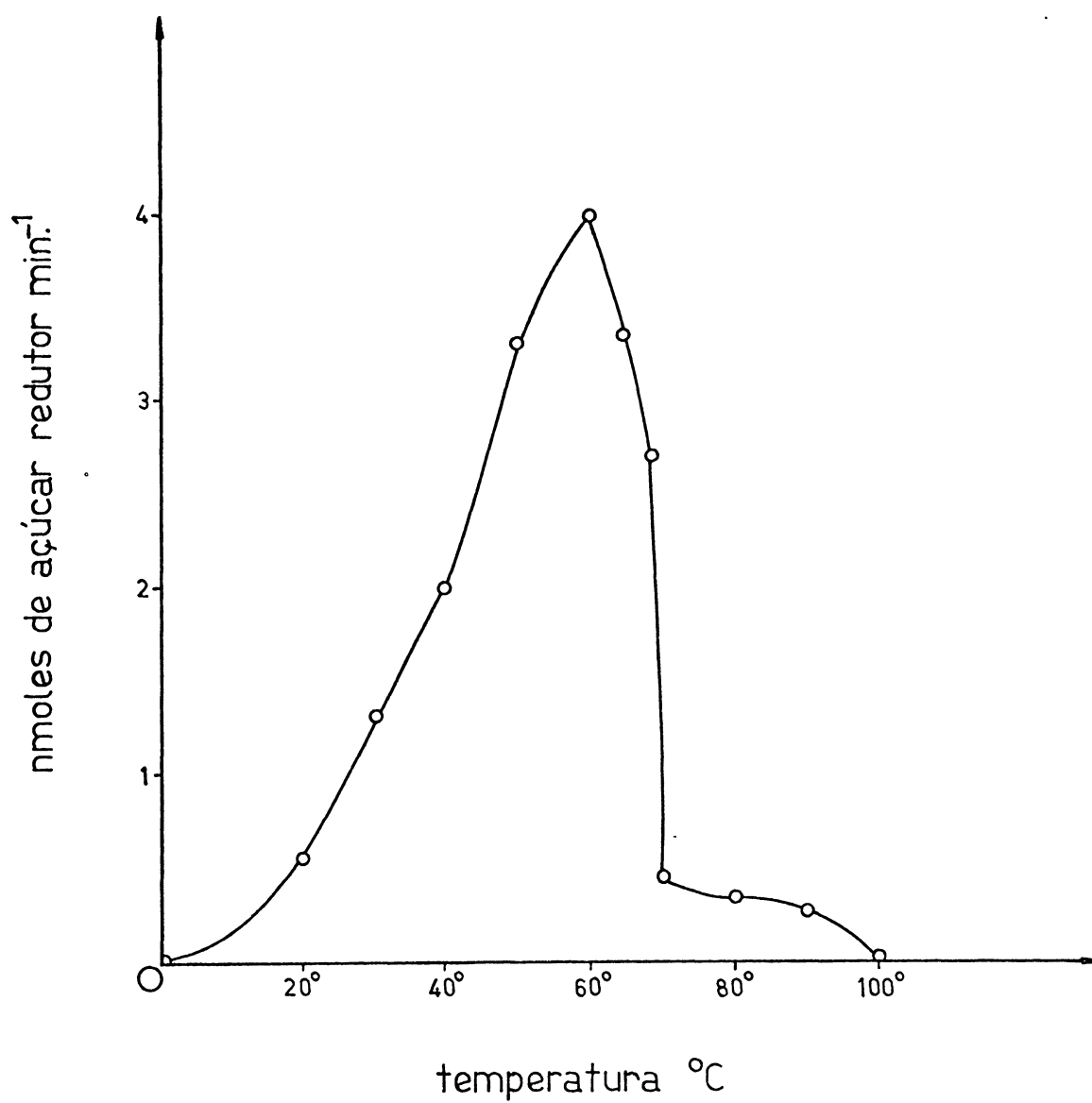


Fig. 8 - Efeito da temperatura

Sistema de incubação: 15 μ moles de tam
pão HEPES pH 7,2; 4,0 mg de amido e 3 μ g
de proteína, para volume final de 1,5 ml.
Incubação de 90 minutos para cada tempera
tura.

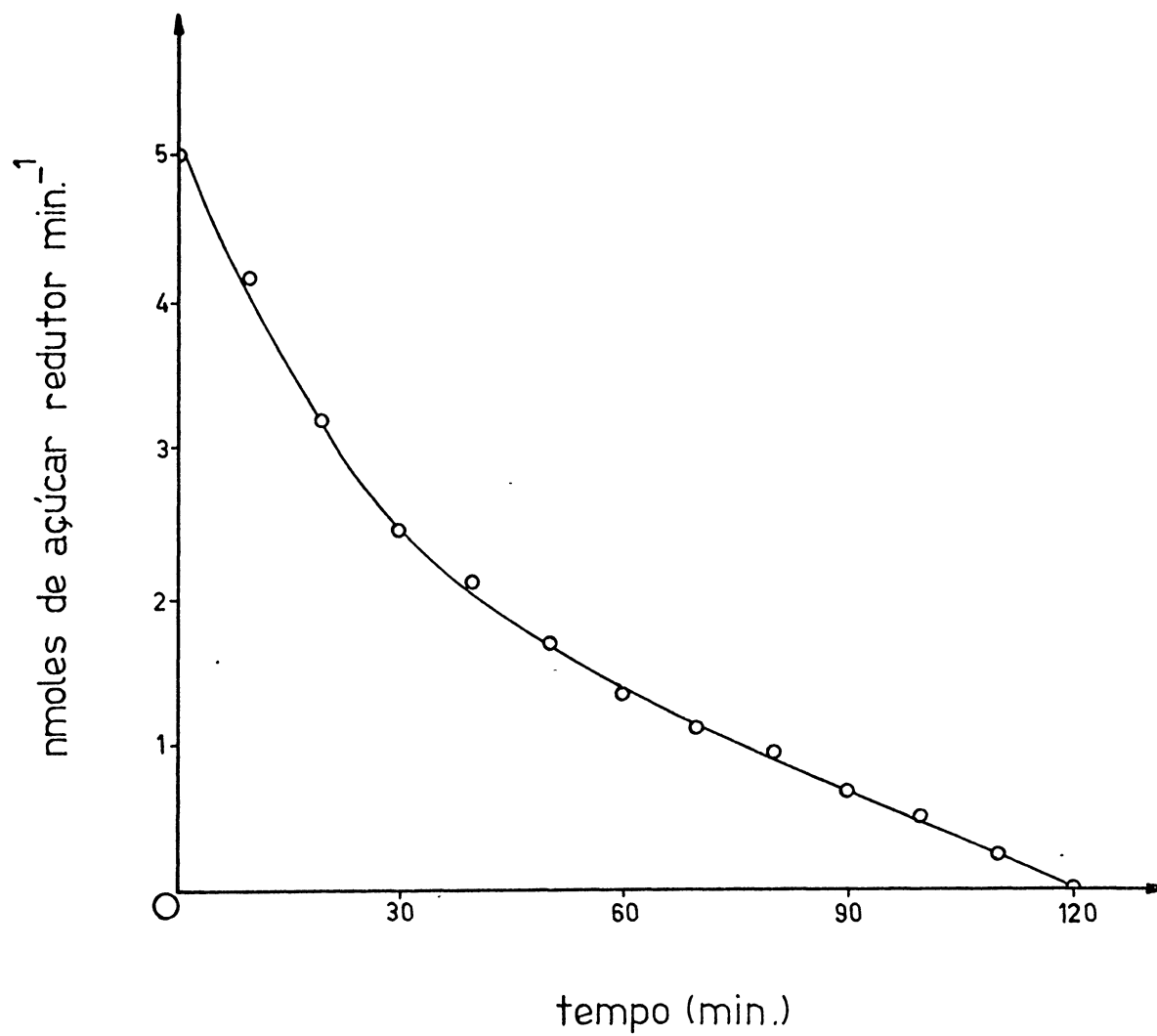


Fig. 9 - Inativação térmica a 60°C

Sistema de incubação: 3 μg de proteína e 15 μmoles de tampão HEPES pH 7,2 em um volume de 1,5 foram incubados a 60°C nos tempos determinados. Após resfriamento da mistura foi adicionado 4,0 mg de amido e reincubado a 57°C por 90 minutos.

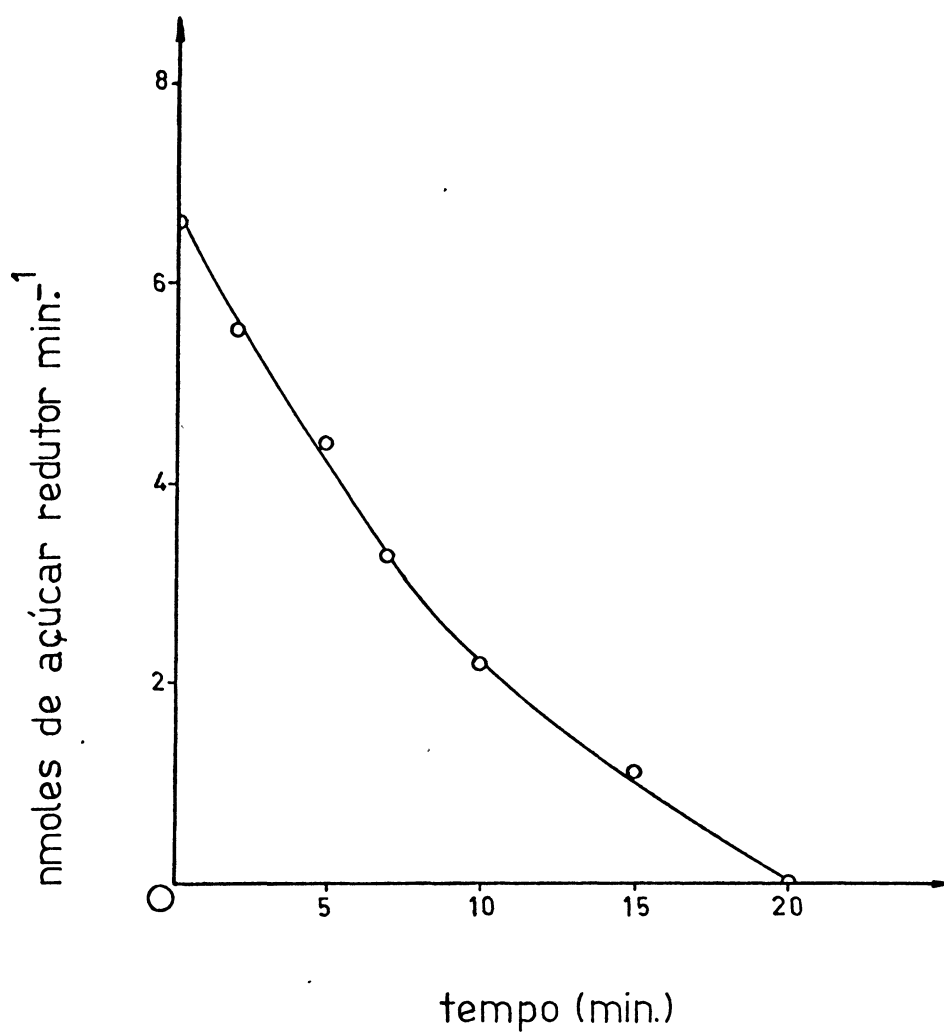


Fig.10 _Inativação térmica a 65°C

Sistema de incubação: 15 μ moles de tampão HEPES pH 7,2 e 3 μ g de proteína para volume final de 1,5 ml, foram incubados a 65°C nos tempos determinados. Após resfriamento da mistura foi adicionado 4,5 mg de amido e reincubado por 90 minutos à temperatura de 57°C.

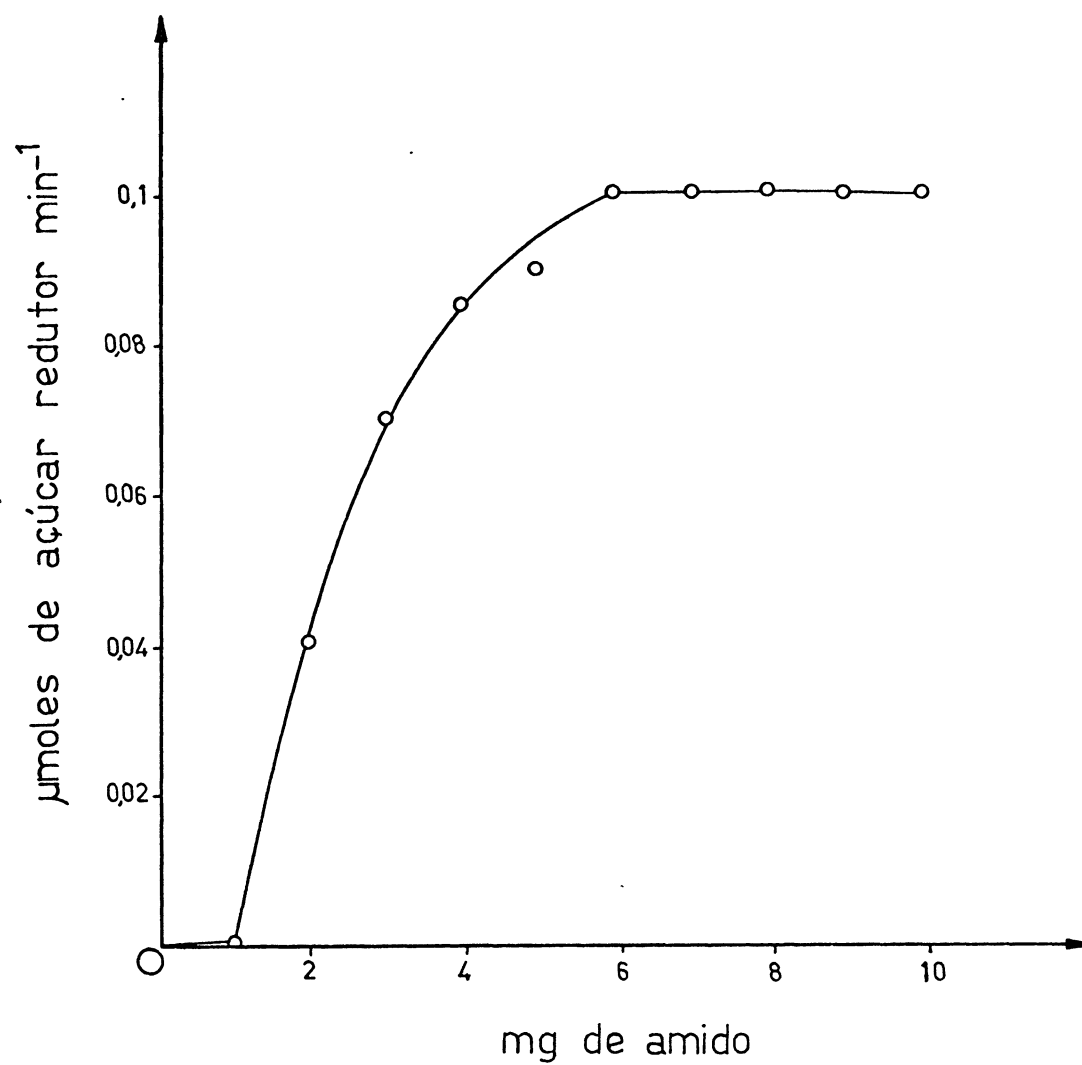


Fig.11 -Efeito da concentração do substrato

Sistema de incubação: 15 µmoles de tampão HEPES pH 7,2 e 3 µg de proteína e amido em concentrações variáveis, para volume final de 1,5 ml. Incubação por 90 minutos a 57^oC.

DISCUSSÃO

O aparecimento de atividade amilolítica no meio de cultura do fungo - produtor de galactose oxidase (5) é maior a pH 6,0 do que em pH 7,0, ao contrário do que ocorre com a secreção de galactose oxidase (53). No entanto, é sabido que a produção de glucoamilases é maior em pHs ácidos (16) (Tab.I).

Como se pode observar na Tab.II a produção de atividade amilolítica é induzida pela presença de sacarídeos no meio, uma vez que quando o fungo foi crescido em glicerol não houve o aparecimento daquela atividade. Quando o ensaio da atividade amilolítica foi realizado medindo-se simultaneamente açúcar redutor e glucose liberados, verificou-se que os resultados eram idênticos, sugerindo que estava sendo induzida uma atividade glucoamilolítica. Desde os trabalhos de Le Mense (23), o amido vem sendo usado nos meios de cultura para a produção de glucoamilase (16,22,39,54,57). Apenas em Corynebacterium diphteriae (19) se observou ser a maltose o melhor indutor. No presente caso quando o glicogênio foi a fonte de carbono e de energia foi que se observou a maior produção de enzima. Os dados indicam que a presença de compostos contendo ligação glucosídica são importantes para a indução.

Os estudos de crescimento mostraram que a enzima era liberada ao meio durante a fase exponencial de crescimento (Fig. 1), indicando ser a mesma secretada e não liberada pela lise celular. O decréscimo na atividade após 48 horas de crescimento poderia ser explicado pela liberação de proteases ao meio, uma vez que a partir deste momento havia um decréscimo da massa micelial indicando a autólise das células. A atividade amilolítica foi precipitada do meio de cultura com etanol a 47%, obtendo-se um rendimento de 107%. A enzima parcialmente purificada em coluna de DEAE celulose, quando analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida mostrou a presença de quatro bandas de proteínas.

Quando a caracterização da atividade amilolítica foi realizada pelo método de Drummond et al (8) observou-se que a pH 5,0 (Fig.2) quantidades limi-

tadas de glucose eram liberadas, indicando que a ação da enzima era bloqueada pelos locais oxidados na cadeia da amilose. No entanto a pH 7,2 (Fig.3) continuava haver liberação de glucose até 2 horas de incubação sugerindo a presença de uma atividade endoamilásica. Oliveira (40) detectou e caracterizou uma endoamilase intracelular no fungo. Esta atividade, no entanto, não aumentou quando o fungo foi crescido em amido, como se observou com a atividade extracelular.

A análise dos produtos de hidrólise revelou a presença de apenas D-glucose nos tempos iniciais de reação (Fig.4). A pH 7,2 após 90 minutos de incubação a análise cromatográfica demonstrou a presença de traços de oligossacarídeos, comprovando a presença de atividade amilásica contaminante, provavelmente presente em menor concentração do que a glucoamilase induzida.

Considerando que a reação é linear até 120 minutos (Fig.6) e que a relação açúcar redutor : glucose é de aproximadamente 1:1 (Fig.5) e que somente após 90 minutos apareceram oligossacarídeos como produto de reação, a atividade de glucoamilase foi avaliada medindo-se o açúcar redutor.

Embora a maioria das glucoamilases de fungo tenham o pH ótimo na faixa de 4,0-5,0 (2,22,25,26,42,50,63,65) a enzima de Humicola lanuginosa (57) apresenta um pH ótimo de 6,6. Como se pode observar da Fig.7 a enzima em estudo tem sua atividade máxima na faixa de 5,0 a 7,2 semelhante ao observado com as isoenzimas 2A e 2B de Aspergillus oryzae (37).

Quanto à estabilidade ao pH a enzima comporta-se de maneira semelhante as enzimas de P.oxalicum (63), Mucor rouxianus (65), A.awamori (66) e Humicola lanuginosa (57) sendo inativada a pHs inferiores a 3,0.

Com relação a temperatura ótima (Fig.8) o comportamento da glucoamilase do fungo P.circinatus é semelhante as demais descritas na literatura (12,26,50,57,63,65).

A enzima é totalmente inativada por aquecimento 20 min a 65^oC (Fig. 10) mantendo 50% da atividade quando aquecida por 30 minutos a 60^o C (Fig. 9). A enzima apresenta maior estabilidade térmica do que as enzimas de A.

oryzae (37), Endomyces sp.(12), P.oxalicum (63) e M.rouxianus (65) sendo menos estável, no entanto, que as enzimas de A.niger (25) e H.lanuginosa (57) que são estáveis por 30 minutos a 60^oC. Saliente-se que por suas propriedades de estabilidade térmica a enzima de A.niger é a utilizada em processos industriais (61).

O perfil de hidrólise dos glucanos pelas diferentes glucoamilases isoladas, seja de um mesmo organismo ou de organismos distintos é peculiar a cada enzima (21,39,42,50,55,64,66). No presente caso observa-se que o glicogênio (Tabelas IV e VI) foi o pior substrato entre os glucanos ensaiados, semelhante ao observado com a glucoamilase II de A.niger (55).

A análise da Tabela V mostra que além da atividade amilolítica, foi secretada ao meio atividade de glucosidase provavelmente distinta da glucoamilase. As glucoamilases altamente purificadas apresentam atividade para maltose, isomaltose e nigerose (1,17,22,45). Normalmente em fungos a glucoamilase está presente associada a glucosidase, α -amilase e transglucosidase (18,38,39,46, 62,66).

Quando se estudou a capacidade da preparação em degradar grãos de amido se observou uma nítida preferência, pelos grãos de amido isolados da mandioca. O fato dos grãos de amido isolados da batata não serem degradados é similar ao observado com glucoamilases de outras fontes (64,65,66).

O percentual de hidrólise do amido solúvel pela fração de DEAE- celulose seja a 37^oC ou 50^oC estão na mesma ordem de grandeza que o observado pela preparação de Barker (2). No entanto o valor é extremamente baixo quando comparado com outras preparações que degradam totalmente o amido à glucose (12,22,31, 42,51,64,65).

Pelo baixo rendimento obtido poder-se-ia excluir a possibilidade do emprego industrial da enzima extracelular de Polyporus circinatus. A obtenção de uma preparação enzimática de maior pureza se faz necessária a fim de que se possa avaliar com exatidão a sua potencialidade industrial.

RESUMO

Variando a fonte de carbono foi possível detectar a presença de atividade amilolítica no meio de cultura de Polyporus circinatus, atividade esta, induzida preferencialmente por glucanos. O pH ótimo para secreção da enzima foi de 6,0 e o tempo ideal 48 horas. A atividade amilolítica foi concentrada por precipitação etanólica a 47% e parcialmente purificada usando DEAE celulose. A atividade foi caracterizada como sendo predominantemente uma glucoamilase pela análise dos produtos de reação e pelo comportamento face a amilose oxidada. A temperatura ótima da glucoamilase foi de 60^o C sendo a reação linear por 180 minutos. A enzima foi totalmente inativada em 20 minutos a 65^o C e perde 50% da atividade quando aquecida por 30 min a 60^oC na ausência de substrato. A velocidade relativa de hidrólise do amido solúvel, da amilopectina, amilose e glicogênio de marisco e de fígado de coelho foi de 100%, 94, 57%, 53% e 39% respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ABDULLAH, M., FLEMING, I.D., TAYLOR, P.M. & WHELAN, W.J. Substrate specificity of the amyloglucosidase of Aspergillus niger. Biochem. J., 89: 35p, 1963.
- 2 - BARKER, S.A. & FLEETWOOD, J.G. Studies on Aspergillus niger. Part. VIII. The purification of glucoamylase. J.Chem.Soc., 4857-64, 1957.
- 3 - BARKER, S.A., BOURNE, E.J., FLEETWOOD, J.G. Studies on Aspergillus niger. Part. IX. Mechanism of glucoamylase. Action J.Chem.Soc., 4865-71, 1957.
- 4 - BUONOCORE, V., POERIO, E., SILANO, V. & TOMASI, M. Physical and catalytic properties of α amylase from Tenebrio molitor L.larvae. Biochem. J., 153:621-625, 1976.
- 5 - COOPER, J.A.D., SMITH, W., BACILA, M. & MEDINA, H. Galactose oxidase from Polyporus circinatus Fr. J.Biochem.Chem., 234:445-448, 1959.
- 6 - DAHLQVIST, A. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose oxidase reagent. Biochem.J. 80:547-51, 1961.
- 7 - DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. Part. II. Ann.N.J.Acad.Sci. 121:404-427, 1964.
- 8 - DRUMMOND, G.S., SMITH, E.E., & WHELAN, W.J. A general method for distinguishing between endo and exo actions of carbohydrases. Febs Letters. 15: 302-4, 1971.
- 9 - "Enzyme Nomenclatura", Internacional Union of Biochemistry, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1965.
- 10 - FLEMING, I.D. & STONE, B.A. Fractionation of Aspergillus niger. Amyloglucosidase. Biochem.J., 97: 13p, 1965.
- 11 - FRENCH, D. & KNAPP, D.W. The maltase of Clostridium acetobutylicum. Its specificity range and mode of action. J.Biochem.Chem., 187:463-471, 1950.

- 12 - FUKUI, T. & NIKUM, Z. Preparation and properties of glucoamylase from Endomyces Species II 00111. Agr.Biol.Chem., 33:884-91, 1969.
- 13 - GAILLARD, B.U.E. Use of unneutralized hidrolysates in paper chromatography of sugars. Nature, 171: 1160, 1951.
- 14 - GLYMPH, J.L. & STUTZENBERGER. Production, purification, and Characterization of α -amylase from Thermononospora curvata. Appl. Environ. Microbiol., 34:391-397, 1977.
- 15 - GREENWOOD, C.T. & MILNE, U.A. Starch degrading and synthesizing enzymes: a discussion of their properties and action pattern. Adv.Carbohydr . Chem., 23:281-366, 1968.
- 16 - HAYASHIDA, S. Seletive submerged productions of three types of Gluco - amylases by a Black-Koji Mold. Agr.Biol.Chem., 39:2093-2099, 1975.
- 17 - HIROMI, K., TAKAHASHI, K., HAMAUZU, Z. & ONO, S. Kinetic studies on glucamylase III. The influence of pH on the rates of hydrolysis of Maltose and Panose. J.Biochem. (Tokyo), 59:469-475, 1966.
- 18 - HOPKINS, R.H. & KULKA, D. The glucamylase and Debrancher of S.diastaticus. Arch.Biochem.Biophys., 69: 45-55, 1957.
- 19 - HOWINGTON, L.R. & LARSON, A.D. Characterization of the starch degrading enzyme of Corynebacterium diphteriae type gravis. Antonie Van Leeuwenhoek. 38: 265-280, 1972.
- 20 - KEMMELMEIER, C. & ZANCAN, G.T. Taxonomy of galactose oxidase producer fungi strain. Arq.Biol.Tecnol., 19:25-30, 1976.
- 21 - KERR, R.W., CLEVELAND, F.C. & KATZBECK, W.J. The action of Amylo-gluco- sidase on amylose and amylopectin. J.Am.Chem.Soc., 73:3917-21, 1951.
- 22 - KING, N.J. The glucoamylase of Coniophora cerebella. Biochem.J., 105 : 577-83, 1967.
- 23 - LE MENSE, E.H., CORMAN, J-, VAN LANEN, J.M., LANGLYKKE, A.I. Production of mold amylases in submerged culture. J.Bacteriol., 54:149-59, 1947.
- 24 - LINEBACK, D.R. The carbohydrate polypeptide linkages in a fungal glucoamilase. Carbohydr.Res., 7:106-108, 1968.

- 25 - LINEBACK, D.R., RUSSEL, I.J. & RASMUSSEN, C. Two forms of the glucoamilase of Aspegillus niger. Arch.Biochem.Biophys. 134:539-553, 1969.
- 26 - LINEBACK, D.R. & BAUMANN, W.E. Properties of a glucoamylase from Aspergillus phoenicis. Carbohydr.Res., 14:341-353, 1970.
- 27 - LOWRY, O.H., ROSEMBROUGH, A., FARR, A.L. & RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193:265-75, 1951.
- 28 - MANNERS, D.J. The metabolism of starch and glycogen. Adv.Carbohydr.,17: 371-430, 1962.
- 29 - MANNERS, D.J. & MERCER, G.A. Observations on the possible presence of α -(1 \rightarrow 3)glucosidic linkages in starch-type polysaccharides. Biochem. J., 89:34p, 1963.
- 30 - MARKUS, Z., MILLER, G. & AVIGAD, G. Effect of culture conditions on the production of α D-galactose oxidase by Dactylium dendroides. Appl. Microbiol., 13:686-693, 1965.
- 31 - MARSHALL, J.J. & WHELAN, W.J. Incomplete conversion of glycogen and starch by crystalline amyloglucosidase and its importance in the determinations of amylaceous polymers. FEBS Letters. 9:85-8, 1970.
- 32 - MARSHALL, J.J. & WHELAN, W.J. Detection of endo-acting carbohydrases, particularly in the presence of exo enzymes acting on the same substrate. Anal.Biochem., 43:316-320, 1971.
- 33 - MORITA, Y., SHIMIZU, K., OHGA, M. & KORENAGA, T. Studies on amylases of Aspergillus oryzae cultured on rice. Part.I. Isolation and purification of glucoamylase. Agr.Biol.Chem., (Tokyo), 30:114-121, 1966.
- 34 - MORIYAMA, S., MATSUNO, R. & KAMIKUBO, T. Influence of dielectric constants and ligand binding on thermostability of glucoamylase. Agr.Biol.Chem., 41:1985-1993, 1977.
- 35 - NELSON, N.A. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J.Biol.Chem., 153:375-80, 1944.

- 36 - NOBLES, M.F. & MAJHOSINGH, C. Dactylium dendroides (Bull.)Fr. Misnamed as Polyporus circinatus Fr. Biochim.Biophys.Res.Comm., 12:146-7, 1963.
- 37 - OHGA, M., SHIMIZU, K. & MORITA, Y. Studies on amylases of Aspergillus oryzae cultured on rice. Part.II. Some properties of glucoamylase. Agr.Biol.Chem., (Tokyo), 30:967-972, 1966.
- 38 - OKAZAKI, H. Joint action of a dextrinogenic amylase a glucose producing amylase and transglucosidase upon starch in the presence or absence of yeast. Arch.Biochem.Biophys., 63:322-333, 1956.
- 39 - OKAZAKI, H. Proc.Intern.Symposium Enzyme Chem., Tokyo and Kyoto. 1957, 494-99, 1958.
- 40 - OLIVEIRA, M.B.M. & ZANCAN, G.T. Degradação do endopoliglucoose de Polyporus circinatus. Resumos do 6º Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica. p 105, 1977.
- 41 - OLIVEIRA, M.B.M. Metabolismo degradativo do glucano de reserva de Poly - porus circinatus. Departamento de Bioquímica da UFPR. Tese de Mestrado Fls. 50, 1977.
- 42 - PAZUR, J.H. & ANDO, T. The action of an amyloglucosidase of Aspergillus niger on starch and malto-oligosaccharides. J.Biochem.Chem., 234: 1966-1970, 1959.
- 43 - PAZUR, J.H. & ANDO, T. The hydrolysis of glucosil oligosaccharides with α -D-(1 \rightarrow 4) and α -D-(1 \rightarrow 6) bondes by fungal amyloglucosidase. J. Biochem.Chem., 235:297-302, 1960.
- 44 - PAZUR, J.H. & ANDO, T. The isolation and mode of action of a fungal transglucosylase. Arch.Biochem.Biophys., 93:43-49, 1961.
- 45 - PAZUR, J.H. & KLEPPE, K. The hydrolysis of α -D-glucosides by amylo - glucosidase from Aspergillus niger. J.Biochem.Chem., 237:1002-1006, 1962.
- 46 - PAZUR, J.H., KLEPPE, K. & ANDERSON, J.S. The application of density-gradient centrifugation for the isolation of enzymes. Biochem. Biophys.Acta., 65:369-372, 1962.

- 47 - PAZUR, J.H., KLEPPE, K. & BALL, E.M. The glycoprotein nature of some fungal carbohydrases. Arch.Biochem.Biophys., 103:515-516, 1963.
- 48 - PAZUR, J.H. & OKADA, S. A novel method for the action patterns and the differentiation of α -1,4-glucan hydrolases. J.Biochem.Chem., 241:4146-4151, 1966.
- 49 - PAZUR, J.H., KNULL, H.R. & CEPURE, A. Glycoenzymes: Structure and properties of the two forms of glucoamylase from Aspegillus niger. Carbohyd.Res., 20:83-96, 1971.
- 50 - PHILLIPS, L.L. & CALDWELL, M.L. A study of the purification and properties of a glucose-forming amylase from Rhizopus delemar, glucoamylase. J.Am.Chem.Soc., 73:3559-63, 1951.
- 51 - PHILLIPS, L.L. & CALDWELL, M.L. A study of the action of glucoamylase, a glucose-producing amylase, formed by the mold, Rhizopus delemar. J.Am.Chem.Soc., 73:3563-68, 1951.
- 52 - SCHOCH, T.J. Preparation on starch and the starch fractions.. In.Colowick SP and Kaplan, N.O. (ed). Methods in Enzymology. New York. Academic Press, vol.III, p.5-17, 1957.
- 53 - SHATZMAN, A.R. & KOSMAN, D.J. Regulation of galactose oxidase synthesis and secretion in Dactylium dendroides. Effects of pH and culture density. J.Bacteriol. 130:455-63, 1977.
- 54 - SMILEY, K.L. & HENSLEY, D.E. Production and characterization of amyloglucosidase from Aspergillus niger. Bacteriol.Proc., 12,1964.
- 55 - SMILEY, K.L., HENSLEY, D.E., SMILEY, M.J. & GASDORF, H.J. Kinetic patterns of glucoamylase isoenzymes isolated from Aspergillus species. Arch.Biochem.Biophys., 144:694-699, 1971.
- 56 - SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. J.Biol.Chem., 160:61-68, 1945.
- 57 - TAYLOR, P.H., NAPIER, E.J., FLEMING, I.D. Some properties of a gluco - amylase produced by the thermophilic fungus Humicola lanuginosa. Carbohyd.Res. 61:301-8, 1978.

- 58 - TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166:444-45, 1950.
- 59 - TSUBOI, A., YAMASAKI, Y. & SUZUKI, T. Two forms of glucoamylase from Mucor rouxianus. I. Purification and crystallization. Agr.Biol.Chem., 38:543-550, 1974.
- 60 - WARBURG, O. & CRISTIAN, W. Isolierung und kristallisation des garungsferments enolase. Biochem.Z., 310, 384-421, 1941.
- 61 - WISEMAN, A. Enzyme utilization in industrial processes In: Wiseman, A. Handbook of enzyme biotechnology. Chichester. Ellis Horwood Ltda. p. 272, 1975.
- 62 - YAMASAKI, Y., MIYAKE, T. & SUZUKI, Y. Purification and crystallization of α -glucosidase from Mucor javanicus. Agr.Biol.Chem., 37:131-137, 1973.
- 63 - YAMASAKI, Y., SUZUKI, Y. & OZAWA, J. Purification and properties of two forms of glucoamylase from Penicillium oxalicum. Agr.Biol.Chem., 41:755-762, 1977.
- 64 - YAMASAKI, Y., SUZUKI, Y. & OZAWA, J. Properties of two forms of glucoamylase from Penicillium oxalicum. Agr.Biol.Chem., 41:1443-1449, 1977.
- 65 - YAMASAKI, Y., TSUBOI, A. & SUZUKI, Y. Two forms of glucoamylase from Mucor rouxianus. II. Properties of the two glucoamylases. Agr.Biol.Chem., 41:2139-2148, 1977-
- 66 - YAMASAKI, Y., SUZUKI, Y. & OZAWA, J. Three forms of α -glucosidase and a glucoamylase from Aspergillus awamori. Agr.Biol.Chem., 41:2149-2161, 1977.

Meus agradecimentos

De modo especial a Dra. Glaci T.Zancan, pela orientação e assistência prestadas, que se constituíram em fatores indispensáveis à execução desta tese.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

A FINEP (Contrato 380/TC) pelo apoio financeiro.

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da UFPR.

Ao Corpo docente, discente e administrativo da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFBA., e do Departamento de Bioquímica da UFPR.

Minha gratidão ao Prof. Dr. Carlos Alfredo Marcílio de Souza pelo permanente incentivo em todas as fases dos meus estudos e pesquisas.