

JOSÉ DOMINGOS FONTANA

POLISSACARÍDEO DE RESERVA
DE Polyporus circinatus, Fr.

Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade
Federal do Paraná

CURITIBA - 1975

Tese Orientada pela
Dra. GLACI THEREZINHA ZANCAN

À minha esposa, com amor, pela compreensão e incentivo que permitiram as
muitas e necessárias horas de ausência.

A meus pais, com gratidão, pelos inúmeros sacrifícios que permitiram a
instrução universitária.

Í N D I C E

INTRODUÇÃO	1
1. MATERIAIS E MÉTODOS	
1.1 Microrganismos	
1.2 Meios e Condições de Manutenção e Cultivo	5
1.2.1 <u>P. circinatus</u>	
1.2.2 <u>P. pullulans</u>	6
1.2.3 <u>A. aerogenes</u>	
1.3 Obtenção do Endopolissacarídeo de Reserva de <u>P. circinatus</u>	
1.3.1 Extração	
1.3.2 Purificação da Fração Endopolissacarídica	
1.3.3 Fracionamento da Fração Endopolissacarídica em DEAE-celulose	7
1.4 Técnicas Analíticas	
1.4.1 Carboidratos Totais	
1.4.2 Açúcares Redutores	
1.4.3 Glucose	
1.4.4 Proteínas	8
1.4.5 Ácidos Nuclêicos	
1.4.6 Espectrofotometria dos Complexos Iodo-Polissacarídeos	
1.4.7 Espectrofotometria no Infra-Vermelho	
1.4.8 Espectroscopia no Ultra-Violeta	9
1.4.9 Polarimetria	
1.4.10 Eletroforese	
1.4.11 Hidrolises Ácidas	10
1.4.12 Cromatografias	11
1.4.13 Interação com a Concanavalina A e Turbidimetria	12
1.4.14 Oxidação com Periodato e Acidimetria do Ác. Fôrmico com Barita	
1.4.15 Depolimerizações Enzimáticas	13
1.5 Reagentes	
1.5.1 Polissacarídeos	16
1.5.2 Enzimas	
1.5.3 Drogas	17
1.6 Manipulação dos Polissacarídeos	
1.7 Abreviaturas	18
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
2.1 Efeito da Variação da Fonte de Carbono no Acúmulo do Endopoliglucose	
2.2 Obtenção do Endopolissacarídeo de Reserva de <u>P. circinatus</u>	19
2.3 Eletroforese em Acetato de Celulose	
2.4 Curva de Hidrólise	
2.5 Polarimetria do Endopoliglucose de <u>P. circinatus</u>	20

2.6	Espectrofotometria no Infra-Vermelho	22
2.7	Interação com a Concanavalina A e Turbidimetria	23
2.8	Espectrofotometria Diferencial dos Complexos Iodo-Polissacarídeos	
2.9	Hidrólise Ácida Parcial	24
2.10	Oxidação com Periodato e Determinação do \overline{CL}	25
2.11	Hidrólise Enzimática com α -Amilase e Cálculo de $P_{1,6}$ e \overline{CL}	26
2.12	Hidrólise Enzimática com β -Amilase	28
2.13	Determinação do \overline{CL} pela Depolimerização com β -Amilase e Pululanase	29
2.14	Depolimerização por Ação Sucessiva de β e α -Amilases e Pululanase	30
	SUMÁRIO	34
	TABELAS	
	Tabela I	21
	Tabela II	22
	Tabela III	23
	Tabela IV	25
	Tabela V	26
	Tabela VI	28
	Tabela VII	30
	Tabela VIII	31
	Tabela IX	32
	FIGURAS	
	Figura 1	35
	Figura 2	36
	Figura 3	37
	Figura 4	38
	Figura 5	39
	Figura 6	40
	Figura 7	41
	Figura 8	41
	Figura 9	42
	Figura 10	43
	Figura 11	44
	Figura 12	45
	Figura 13	46
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

AGRADECIMENTOS

- À Dra. Glaci Therezinha Zancan, pela confiança inicial, apoio constante e orientação segura.
- Ao Dr. João Batista Chaves Corrêa, sobretudo pela amizade imposta quando de guia de meus primeiros passos de iniciação científica.
- Ao colega A.L.M.Murta e ao Prof. Olavo Romanus, pela confecção dos espectros de infra-vermelho junto ao Departamento de Química da UFPr.
- Aos Professores, Pós-Graduandos e Funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPr, pela contribuição parcelada que em muito facilitou a feitura deste trabalho.
- À Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Convênio com Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico/Fundo Técnico Científico (BNDE/FUNTEC) pelo suporte financeiro propiciado.

* * *

INTRODUÇÃO

O ser vivo, independentemente do nível de organização que o situa dentro dos reinos vegetal ou animal, exibe uma notável e versátil capacidade de aproveitamento dos mais diferenciados tipos de alimentos, particularmente daqueles que, por um metabolismo adequado, se constituam em fonte de carbono, indispensável aos processos de crescimento e multiplicação celular, característicos do estado vital.

Se por um lado é vasta a variedade de compostos químicos possíveis de serem utilizados como fonte carbonada, mais simples é a natureza das formas de reserva ou armazenamento que operadas pelo organismo lhe garantam o processo de sobrevivência quando da limitação ou carência de novo alimento extracelular.

Dentro desta natureza algo limitada, o mais comum dos monossacarídeos, a D-glucose, é representativa da forma mais disseminada de reserva, desde que convenientemente organizada, seja como um simples dissacarídeo como a trealose ou seja por uma polimerização em que centenas ou milhares de resíduos glucosil são condensados para originar homomacromoléculas dos tipos da amilose, amilopectina e glicogênio.

A par dos animais superiores, cuja reserva por excelência é o glicogênio, alinham-se outros organismos menos desenvolvidos, cobrindo toda escala biológica vegetal inferior, como as bactérias (100, 128), fungos (44) e algas (20), nos quais a natureza da reserva é a mesma ou similar.

Restritamente quanto aos fungos, a detecção de glicogênio, em trabalho pioneiro, já alcança quase um século e mesma verificação vem se repetindo para numeroso fungos e leveduras (118, 44).

A presença de glicogênio está descrita em vários gêneros de leveduras, sendo o primeiro isolamento relatado a partir de células desintegradas (114). A levedura Torula histolytica (49) libera no meio de cultura, além de amilose e pentosano, um polissacarídeo do tipo glicogênio. Recentemente, Yamaguchi et al. (115) mostraram que o glicogênio de Candida albicans tem características semelhante ao de fígado de mamífero.

No ascomiceto Neurospora crassa (44), o glicogênio não foi detectado apenas nas pontas das hifas ou sítios de crescimento. No basidiomiceto Polyporus giganteus (14) constatou-se a ocorrência de glicogênio nos corpos de frutificação, situação semelhante à dos esporos de Aspergillus e sorocarpos de Dictyostellium (44). Do basidiomiceto Pleurotus ostreatus (22) foi isolado um glicogênio que interage com a concanavalina A de maneira análoga ao glicogênio de fígado de coelho. O esclerócio do deuteromiceto parasita do algodão, Phymatotrichum omnivorum (32) apresenta uma elevada reserva de glicogênio, correspondendo a 37% do peso seco.

A ocorrência de polissacarídeos do tipo do glicogênio é citada por Bartnick-Garcia (10) como constituindo parte da parede celular de fungos taxonomicamente afastados dos basidiomicetos. Assim, trabalhos nos fungos de lodo Dictyostellium (120) e Polysphondilium (112), atestam a ocorrência de glicogênio na parede celular, em associação com a celulose.

Os glucanos de reserva das algas e plantas superiores são biossintetizados nos plastídeos (79) e também no caso raro do glicogênio sintetizado por estruturas celulares especializadas ("Müllerian bodies") do vegetal superior Cecropia peltata (94), é requerido este tipo de organela celular.

De diferente modo, os fungos, que são carentes de plastídeos, devem contar com outros sítios celulares para a síntese e depósito deste material de reserva, como as paredes celulares das hifas, asci e esporos; é o que ocorre, por exemplo, com o amido presente nas paredes das hifas do fungo Hericium (79).

O glicogênio acumulado, além de ser considerado um produto de reserva de carbono e energia responsável pela manutenção da integridade e viabilidade celular de microrganismos nas épocas de privação de alimento exógeno (92), se presta a outras funções, tais como a mobilização de íons K^+ (98, 109) e ejeção de esporos, como no basidiomiceto Sphaerobolus (118, 3), isto à custa da força osmótica proveniente da conversão em açúcares redutores.

No processo de metamorfose de insetos, o glicogênio tem como principal destino o suprimento de fonte de carbono para a biossíntese de material de revestimento, a quitina (124), sendo que este polissacarídeo amino-acetilado é também o constituinte principal da parede celular de basidiomicetos (10), daí a possibilidade do desempenho de finalidade semelhante nos fungos.

Em levedura estabeleceu-se que parte do glicogênio é convertido em trealose, quando o microrganismo é submetido à dessecação (114).

Na bactéria Arthrobacter (128) o glicogênio é tido como fonte de carbono para a síntese de proteínas.

Dentre os fungos basidiomicetos, o gênero Polyporus, com suas numerosas espécies, é considerado como um eficiente predador de madeiras e esta atividade é explicável pela variada habilidade de degradar os polímeros constituintes da madeira: lignina; celulose, hemiceluloses e pectinas, que são transformados em substratos mais simples através das respectivas hidrolases (43; 23, 31, 84, 89). Dentre estes polímeros, pelo menos a celulose poderia fornecer, de forma imediata, o monômero básico para a síntese de um glucano de reserva.

Pinotti e Zancan (90) estudando uma amostra de Polyporus circinatus, Fr., monocariótica, com crescimento tipicamente filamentoso, investigaram a influência da concentração da fonte de carbono (D-glucose) e do tempo de cultivo sobre o acúmulo de polissacarídeos endo e exocelulares e constaram que, a partir de 48 horas de cultivo, ocasião em que a glucose do meio já se encontrava praticamente exaurida, havia um declínio apreciável dos endopolissacarídeos antes acumulados e particularmente quanto ao teor de glucose dos mesmos.

Aventaram então a possibilidade da ocorrência, dentre os endopolissacarídeos, de um material de reserva, possivelmente um glucano com ligações glicosídicas do tipo (1 → 3), em vista da não labilidade frente à α -amilase salivar.

Embora não se exclua a possibilidade da ocorrência deste tipo de polissacarídeo, já que em corpos de frutificação de Polyporus betulinus (30) foi constatado um glucano α (1 → 3) ligado, é também cogitável a ocorrência de polissacarídeo de reserva de tipo distinto, por exemplo, um glucano α (1 → 4) ligado, face à tecnologia usada, dirigida aos objetivos imediatos do trabalho e que não teria permitido sua constatação, considerando-se que:

- a) a fração endopolissacarídica foi extraída com água quente a partir do micélio intacto, o que poderia não ter solubilizado completamente os endopolissacarídeos (32);
- b) a massa micelial foi previamente desidratada em estufa a 28°C até peso constante, podendo o polissacarídeo de reserva ter sido metabolizado;

c) não tendo sido tentado o fracionamento da fração endopolissacarídica total, a glucose poderia estar integrando diferentes heteropolissacarídeos.

O presente trabalho foi então dedicado à investigação da possibilidade do fungo basidiomiceto Polyporus circinatus, Fr., poder acumular, em condições de excesso de fonte de carbono como D-glucose e outros monossacarídeos, um glucano de reserva, o qual, nos tempos de limitação ou privação de fonte carbonada exógena, pudesse suprir as necessidades metabólicas do fungo.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Microrganismos

A amostra de Polyporus circinatus, Fr., fungo apodrecedor de madeiras, pertencente à classe dos Basidiomicetos, foi isolada e classificada no Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas (IBPT) do Estado do Paraná.

As amostras de Pullularia pullulans e de Aerobacter aerogenes foram respectivamente cedidas pelo Instituto Zimotécnico da Universidade de São Paulo (USP) e pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná (UFPr).

1.2. Meios e Condições de Manutenção e Cultivo

1.2.1. Polyporus circinatus foi mantido em ágar-Sabouraud glicosado inclinado e após crescimento em estufa a 28°C por 24-36 h, a cultura foi estocada em geladeira (4°C), retendo um aspecto alvo e filamentososo, seguindo-se o aparecimento de uma pigmentação avinhada na superfície de contacto com o meio sólido. Os repiques foram trimestrais. Para o cultivo em meio líquido, usou-se o meio descrito por Markus (77) com a seguinte composição: (NH₄)₂SO₄ 0,2g%, NH₄NO₃ 0,1g%, extrato de Levedura (Difco) 0,1g%, KH₂PO₄ 0,9%, Na₂HPO₄ 0,8%, MgSO₄.7H₂O 0,4g^o/_{oo}, MnSO₄.H₂O 0,002^o/_{oo}, CuSO₄.5H₂O 0,0025g^o/_{oo} e D-glucose a 2,0g%, ajustando-se o pH para 5,8.

Quando se variou a fonte de carbono, D-glucose foi substituída por D-galactose ou L-arabinose, mantendo-se as concentrações citadas.

O meio foi distribuído em frascos Erlenmeyer de 1 e 2 litros, para autoclavação por 20 minutos a 1 atmosfera de pressão. As soluções de D-glucose e outros monossacarídeos sofreram autoclavação a vapor fluente, por 15 minutos.

Aliquotas de 1,0 e 2,0 ml de suspensão micelial foram retiradas dos pré-inóculos com auxílio de pipeta invertida e transferidas para os frascos de cultivo de 1 e 2 litros de capacidade, contendo respectivamente 300 e 600 ml de meio. A cultura prolongou-se por 48 h, a 28°C, em agitador regulado para 100 rotações por minuto, ao abrigo da luz. No experimento com variação de fonte de carbono, os tempos de coleta de massa micelial foram fixados em 24, 48 e 72 h.

Nestas condições de cultivo, a amostra comportou-se segundo o heterotalismo habitual da classe dos basidiomicetos (106), com permanente ausência de corpos de frutificação.

O crescimento do fungo foi medido pela pesagem da massa micelial desidratada com acetona.

1.2.2. P. pullulans foi mantida em ágar-Sabouraud glicosado inclinado e cultivada no meio líquido descrito por Sowa (104). O cultivo foi abreviado para 108 h, ao invés das 120 h recomendadas pelo autor, em vista do início de aparecimento de pigmentação escura, correlacionada à maturação do microrganismo (18). Nesta fase o aspecto celular era predominantemente leveduriforme através de exame microscópico a fresco e por tintura com lugol.

1.2.3 A. aerogenes foi mantido em ágar simples glicosado e cultivado no meio descrito por Bender e Wallenfelds (12), observando-se concentrações de 0,8g% de peptona e 0,5g% de maltose, que asseguram melhor rendimento de proteína no meio e menor ocorrência de exopolissacarídeos contaminantes do pululano.

1.3 Obtenção do Endopolissacarídeo de Reserva de P. circinatus

1.3.1 Extração

A massa micelial de 48 h do fungo foi coletada por filtração, seguindo-se imediata lavagem da massa micelial com 3 porções de água gelada para remoção do material mucilaginoso aderente às paredes miceliares, sendo o excesso de água removido. O exame microscópico da massa micelial exibiu exclusivamente uma formação morfológica filamentosa, constituindo o emaranhado de hifas.

A massa micelial úmida foi imediatamente suspensa em acetona gelada e desagregada com bastão de vidro para posterior filtração por papel, em Buchner, à vácuo. Este tratamento com acetona foi repetido por mais duas vezes. O micélio desidratado foi triturado em Omni-Mixer (Sorvall), constituindo o pó cetônico.

Dentre os numerosos métodos indicados para a extração dos endopolissacarídeos, foi selecionado o fenol (66), a frio (121), na concentração final de 50%. Para a extração fenólica uma partida de pó cetônico foi suspensa em água destilada (10 volumes) formando uma pasta que recebeu então a adição de fenol até a concentração final de 50%. A suspensão foi deixada em agitação,

em câmara fria a 4°C, por uma noite, e depois por mais 1 h, à temperatura ambiente. Após transferência deste material para uma proveta munida de rolha, foi aplicada uma vigorosa agitação manual, por 10 minutos, produzindo uma massa pastosa esbranquiçada, que centrifugada a 9.000 x g por 15 minutos, gerou a formação de 4 camadas distintas (62); a fase superior, opalescente, foi coletada e o restante do material submetido a mais duas re-extrações aquosas.

O combinado das fases aquosas foi concentrado em evaporador rotatório a 35-40°C até 1/4 do volume inicial e tratado com 4 volumes de etanol a frio, durante a noite. O precipitado resultante, colhido por centrifugação e seco com acetona e éter, constituiu a fração endopolissacarídica, com um teor de proteínas de 0,9%.

1.3.2. Purificação da Fração Endopolissacarídica

A desproteínização foi executada com a mistura de Sevag(107), durante 12 h, à temperatura ambiente e repetida por mais 3 h. O conteúdo da fase aquosa foi recuperado por precipitação etanólica.

A remoção dos ácidos nucléicos foi feita pela adição de $MnCl_2$ à fração endopolissacarídica desproteínizada, até uma concentração final de 0,05 M (24); o precipitado formado pelo repouso de 12 h foi eliminado por centrifugação a 1.000 x g por 5 minutos, lavando-se o mesmo com a mesma solução salina antes de ser descartado. A fração endopolissacarídica parcialmente purificada foi concentrada, precipitada com 4 volumes de etanol e seca com acetona e éter.

1.3.3. Fracionamento da Fração Endopolissacarídica em DEAE-celulose

40,0 g de DEAE-celulose (0,95 meq/g, Sigma) foram convertidas à forma formiato ($HCOO^-$), eliminando-se a suspensão mais fina por decantação, e acondicionadas numa coluna de vidro, resultando após o empacotamento, numa camada de 2,8 x 78,0 cm. A coluna foi então lavada com água deionizada até não mais se detectar carboidratos no eluato.

2,0 g da fração endopolissacarídica solubilizadas em 50 ml de água deionizada foram aplicadas à coluna, que foi inicialmente eluída com 1.800 ml de água deionizada e depois com 500 ml de $HCOOH$ 0,1 N, ao fluxo de 1 ml/minuto. Frações de 20 ml foram coletadas num coletor automático G-M e a determinação de carboidratos totais no eluato foi feita pelo método do fenol-ácido sulfúrico (28).

Frações da eluição aquosa mostrando forte opalescência e mesmo um aspecto leitoso no pico máximo de eluição de carboidratos foram combinadas, concentradas até 1/10 do volume e precipitadas com 3 volumes de etanol, o precipitado, redissolvido em água, foi dializado contra água destilada durante a noite e reprecipitado com etanol (3 x vol.) e depois de seco com acetona e éter, constituiu um pó branco designado de "ENDOPOLISSACARÍDEO DE Polyporus circinatus" (G_{pc}).

As frações da eluição ácida foram também combinadas, concentradas e precipitadas com etanol (4 x vol.).

1.4 Técnicas Analíticas

1.4.1 Carboidratos totais

Os carboidratos totais foram determinados pelo método do fenol-ácido sulfúrico (28), adotando-se os comprimentos de onda de 490 e 480 nm, respectivamente para a avaliação das hexoses e pentoses. Para igual finalidade também foi utilizado o método modificado da antrona (33).

Soluções de D-glucose, D-galactose e L-arabinose em ácido benzóico semi-saturado serviram como padrões, para as determinações.

1.4.2 Açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi - Nelson (103, 83), fixando-se o tempo de fervura em 20 minutos. Soluções de D-glucose e maltose serviram como padrões.

1.4.3 Glucose

Este monossacarídeo foi determinado pelo sistema glucose oxidase, peroxidase e o-dianisidina (52), contendo tris 25 mM como inibidor de glicosidases (59, 58), a pH 8.0.

1.4.4 Proteínas

As proteínas foram determinadas pelos métodos do biureto (45) e de Lowry (71). Soluções de soroalbumina bovina a 5 mg/ml e 50-100 µg/ml serviram como padrões.

A leitura das dosagens de carboidratos e proteínas foram efetuadas em espectrofotômetro Coleman Jr., modelo 6-A.

1.4.5 Ácidos Nuclêicos

Estes ácidos foram detectados qualitativamente pelas reações do orcinol (25) e da difenilamina (26), respectivamente para RNA e DNA, e por espectroscopia a 260 nm.

1.4.6 Espectrofotometria dos Complexos Iodo-Polissacarídeos

Nos ensaios com lugol apenas, o volume final de 4,0 ml continha de 300 a 2.000 µg de polissacarídeo e 20 µl da solução iodo-iodetada (2,6-26,0g%). Nos ensaios em que se incluiu a solução saturada de CaCl₂, o volume final de 3,0 ml continha de 150 a 800 µg de polissacarídeo mais 2,6 ml do reagente completo de Krisman (64).

Os espectros foram verificados contra um "branco" dos reagentes na faixa de 370 a 700 nm, em espectrofotômetro Perkin-Elmer, modelo 202, calibrado com lâmina de óxido de hólmio e em "fast scan" (2 minutos).

No estudo dos polissacarídeos resultantes da variação da fonte de carbono, cada fração endopolissacarídica bruta oriunda da extração fenólica tinha seu λ máximo de absorção com I₂-KI-CaCl₂ determinado e como este λ máximo correspondeu ao do endopolissacarídeo purificado resultante do crescimento em D-glucose por 48 h, este foi usado como padrão para a determinação quantitativa dos demais.

1.4.7 Espectrofotometria no Infra-Vermelho

Os polissacarídeos desidratados por alto vácuo e banho com vapor de metanol, foram veiculados em pastilhas de KBr, contendo cada uma delas 2-3 mg de polissacarídeo e 150-170 mg de sal, através de trituração em gral de ágata e prensagem em prensa Carver, modelo C. As pastilhas, conservadas em dessecador com P₂O₅ por 48 h, foram examinadas num espectrofotômetro Beckman, modelo IR-18, calibrado com filme de poliestireno, na faixa de 600 a 4.000 cm⁻¹, em "fast scan" (1.200 cm⁻¹/min.).

1.4.8 Espectroscopia no Ultra-Violeta

Para acompanhamento da purificação do endopolissacarídeo de *P. circinatus*

soluções do mesmo foram gradativamente examinadas em espectrofotômetro Beckman modelo DB, para detecção de proteínas, ácidos nucleicos e fenóis. (280, 260 e 220nm)

1.4.9 Polarimetria

A medida polarimétrica foi efetuada a partir de soluções aquosas a 5 mg/ml dos polissacarídeos em polarímetro Perkin-Elmer, modelo 141, com a raia D de sódio e caminho óptico de 0,1 dm.

1.4.10 Eletroforese

a) dos polissacarídeos: foi feita em tiras de acetato de celulose com tampão borato 0,05 M pH 10,0, nas seguintes condições: 200-250 V, 22-28 mA, 5-6 minutos. Os polissacarídeos foram previamente submetidos à coloração com Azul Procion (Cia. Imperial) (29). A fim de eliminar as múltiplas bandas apresentadas pelo próprio corante, os polissacarídeos corados foram precipitados com etanol e lavados com acetona.

b) dos dissacarídeos: foram eletroforetizados em papel Whatman nº 1 com tampão borato de sódio 0,1 M pH 10,0 (35), a 1.100 V, 85-90 mA por 240 minutos.

Parte dos dissacarídeos foram submetidos ao tratamento com NaBH_4 , peso a peso, durante uma noite (9, 57), seguindo-se a destruição do excesso de redutor com ácido acético diluído; o borato de sódio presente na mistura foi modificado a ácido bórico com um "batch" de resina Dowex-50-X8 (forma H^+) e eliminado com metanol, por evaporação. Os alditóis resultantes foram eletroforetizados em papel Whatman 3MM, com tampão molibdato de sódio 0,1 M pH 5,0 (17), a 870 V, 85 - 90 mA por 105 minutos.

A revelação dos eletroforetogramas foi conseguida respectivamente com os reagentes reveladores A e F, adiante discriminados.

1.4.11 Hidrólises Ácidas

a) Total

As frações e sub-frações das etapas de obtenção do endopolissacarídeo do fungo foram hidrolizadas com HCl 1 N ou com ácido trifluoroacético 1 N (2), por 3-6 h, em banho-maria fervente. Para a fração ácida da coluna de DEAE - celulose usou-se HCOOH 90%. Para a curva de hidrólise do endopolissacarídeo purificado adotou-se ampolas âmbar, borbulhadas com N_2 e seladas ao Bunsen.

b) Parcial

Para a hidrólise ácida parcial por 9 horas em banho-maria fervente, a concentração do glicogênio de marisco e do endopolissacarídeo do fungo era de 2g% e a do HCl 0,05 N (125, 111).

Os hidrolizados resultantes de 100 mg de cada polissacarídeo foram tratados com 2 volumes de etanol e algum resíduo não hidrolizado foi eliminado por centrifugação. Os sobrenadantes foram concentrados até *secura* e dissolvidos em pequeno volume aquoso.

Cada hidrolizado foi repartido em 2 porções e cada uma delas foi aplicada a uma pequena coluna de carvão ativo (126) de 3 x 2 cm, montada dentro de um pequeno funil de Buchner e previamente lavada com água e etanol a 50% (v/v).

Após a aplicação do hidrolizado, as colunas foram lavadas com água (150 ml) e este eluato foi descartado. A eluição seguinte foi com etanol, respectivamente a 10% e 50% (v/v) (88) para cada uma das colunas de cada hidrolizado. O eluato com menor concentração de álcool foi concentrado e recromatografado preparativamente em papel, com 3 desenvolvimentos ascendentes, no solvente I. Duas zonas com migrações iguais às dos padrões de maltose e isomaltose foram recortadas do cromatograma preparativo e re-eluídas com água. Estas duas frações, após concentração, foram submetidas à eletroforese e recromatografia analítica em papel e camada delgada, com múltiplos desenvolvimentos nos solventes I e II e revelação com os reagentes D e E.

Em cromatoplaça de sílica, desenvolvida com o solvente I por múltiplas vezes e revelada com o sistema metanol-H₂SO₄-fenol 5% (7:2:1), além das duas frações citadas, incluiu-se também os maltossacarídeos lineares e ramificados de cada polissacarídeo, contidos no eluato com etanol a 50%.

1.4.12 Cromatografias

1) Suportes

Para as cromatografias analíticas em papel usou-se Whatman nºs. 1 e 4 e para as preparativas 3 MM.

Para as cromatografias analíticas em camada delgada usou-se cromatoplaças de celulose e sílica-gel (Merck). Para a verificação de oligossacarídeos superiores e dextrinas preparou-se placas de Kieselghur G (Merck) (99).

2) Solventes

Os sistemas de solventes usados nos múltiplos desenvolvimentos ascendentes foram:

a) para mono e oligossacarídeos neutros:

I: benzeno-butanol-piridina-água (1:5:3:3) (40)

II: acetato de etila-piridina-água (10:4:3) (5)

III: butanol-piridina-água (6:4:3) (99)

b) para açúcares ácidos

IV: acetona-isopropanol-etanol-tampão borato 0,05M pH 10,0 (3:1:1:2) (81)

3) Reagentes Visualizadores de Imersão e Nebulização

A: nitrato de prata alcalino (113)

B: ftalato e cloridrato de p-anisidina (51)

C: anisaldeído- H_2SO_4 (99)

D: difenilamina-urêia-ácido fosfórico (6)

E: difenilamina-anilina-ácido fosfórico (97)

F: tetracetato de chumbo-fucsina (96)

Para revelação das cromatoplasmas de sílica, conseguiu-se razoável melhoria na sensibilidade do reagente de metanol-ácido sulfúrico pela inclusão de fenol a 5%, observando-se a proporção final de 7:2:1.

No preparo do reagente D, substituiu-se água por metanol na dissolução da urêia.

1.4.13 Interação com a Concanavalina A e Turbidimetria (21, 85)

O experimento que resultou na melhor identificação entre os glicogênios de referência e o endopolissacarídeo estudado, distinguindo-os convicentemente da amilopectina, constava, num volume final de 2,5 ml, de 1.200 µg de Con A (com NaCl), quantidades variáveis de polissacarídeo desde 600 até 3.000 µg, 0,2 ml de tampão Hepes-NaOH 0,5 M pH 7,0 e 0,2 ml de $MnCl_2$ 0,01 M. O NaCl da preparação proteica não foi eliminado, visto não interferir com a reatividade da Con A (101). O tampão fosfato foi substituído em vista da incompatibilidade química com o ativador Mn^{+} (27), causando uma turvação interferente. A absorbância foi lida em 420 nm, após 30 minutos de interação proteína-polis-

sacarídeo, à temperatura ambiente.

A dissolução da Con A foi facilitada pela adição de 1 gota de NaOH 0,05N e 1 gota de álcool isoamílico.

A relação Con A : polissacarídeo na faixa de 1:0,5 a 1:3 foi selecionada após verificação do aumento proporcional de proteína no precipitado obtido por centrifugação.

Os valores de G.V. ("glycogen value") obtidos (21, 22) correspondem à absorbância resultante da interação de Con A com 1.000 µg de polissacarídeo, correlacionada com a absorbância proporcionada por igual peso de glicogênio de fígado de coelho (GV = 1,00). O valor de G.V. de cada polissacarídeo resulta da interpolação dos valores iniciais da curva turbidimétrica, cujas absorbâncias correspondem de maneira linear ao aumento da quantidade de polissacarídeo no ensaio.

1.4.14 Oxidação com periodato e Acidimetria do Ácido fórmico com barita

Para avaliação do comprimento médio de cadeia (\bar{CL}) dos polissacarídeos, utilizou-se o método de oxidação com periodato de Fales (34), que envolve a simples medida do ácido fórmico liberado pelo IO_4^- a partir das pontas não redutoras terminais (α, β, γ -triois) do polissacarídeo, comparativamente a um carboidrato padrão (α -metil-D-glucopiranosídeo).

As determinações por microtécnica foram feitas em duplicata e o doseamento dos carboidratos totais (como glucose) pelo método da antrona, recomendado pelo autor, foi paralelamente acompanhado pelo método do fenol-ácido sulfúrico, de execução mais simples e adotado como rotina.

1.4.15 Depolimerizações enzimáticas

a) A α -amilólise foi medida segundo o método de Manners e Wright (75), sendo que os ensaios individuais para cada tempo de incubação, num volume final 0,5 ml, continham: 0,2 ml da solução de polissacarídeo a 10 mg/ml; 0,1 ml de tampão citrato 0,1 M pH 6,9; 0,05 ml de NaCl 0,1 M e 0,1 ml da solução de enzima a 1 mg/ml (100 unidades).

Nos ensaios com inibidores de dissacaridases incluiu-se 0,05 ml da solução de eritritol 85,5 mM e 0,05 ml de tampão tris-HCl 3,2 mM pH 7,0 substituindo o

tampão citrato (59, 60, 58).

Os tempos de incubação de 2, 5, 9, 15 e 25 h à temperatura ambiente (21-22°C) foram analisados.

b) A β -amilólise foi medida pelo método de Walker e Whelan (117), sendo que os ensaios individuais para cada tempo de incubação, num volume final de 0,5 ml, continham: 0,2 ml da solução de polissacarídeo a 10 mg/ml; 0,05 ml de glutathion reduzido 5 mM; 0,05 ml de soroalbumina bovina 0,5g%; 0,1 ml de tampão acetato 0,3 M pH 4,8 e 25 μ g de enzima.

Os tempos de incubação de 1/2, 1, 2, 5 e 9 h à temperatura ambiente (21-22°C) foram analisados.

Igual ensaio em duplicata foi repetido para o tempo de incubação de 6 h, para se apurar os valores definitivos dos índices β -amilolíticos dos polissacarídeos.

Nos experimentos com α e β -amilases (curvas de hidrólise), a reação era interrompida pela adição de 0,05 ml de $ZnSO_4$ 5g% e 0,05 ml de $Ba(OH)_2$ 0,3 N previamente à análise dos açúcares redutores, sofrendo o padrão de maltose igual tratamento.

c) A pululanólise foi conduzida segundo Bender e Wallenfels (12) e o sistema de incubação para o tempo único de 30 minutos, a 27°C, com agitação, num volume final de 1,0 ml, continha: 0,2 ml da solução de polissacarídeo a 10 mg/ml; 0,4 ml de tampão citrato-fosfato 0,01-0,02 M pH 5,0 e 4 mg de enzima.

No teste prévio de atividade da pululanase frente ao pululano, adotou-se iguais condições, salvo a quantidade de enzima, reduzida à metade, que acarretava um desdobramento de 50% do polissacarídeo não purificado, como maltotriose.

d) Na depolimerização através da ação concomitante da β -amilase e pululanase, para determinação do \bar{CL} segundo Lee e Whelan (68), os ensaios em duplicata para cada polissacarídeo, num volume final de 1,0 ml, continham: 0,2 ml da solução de polissacarídeo a 10 mg/ml; 0,1 ml de glutathion reduzido 5 mM; 0,1 ml de soroalbumina bovina 0,5g%; 0,25 ml de eritritol 4 M; 0,1 ml de tampão citrato-fosfato 0,01-0,02 M pH 5,0; 1,25 mg de β -amilase e 2 mg de pulula -

nase.

Em uma série igual para controle da β -amilase, a pululanase foi omitida.

Os tempos de incubação de 72 e 96 h a 30°C, com agitação, foram analisados, pela glucose-oxidase, quanto à glicose liberada.

Os sistemas de incubação envolvendo apenas a β -amilase ou sua combinação com a pululanase foram analisados diretamente, sem prévia desnaturação das enzimas.

e) No experimento para total desdobramento dos polissacarídeos através da ação sucessiva de β -amilase, α -amilase e pululanase, o sistema inicial de incubação, num volume final de 0,65 ml, continha: 0,2 ml de solução de polissacarídeo a 10 mg/ml; 0,25 ml de eritritol 4 M; 0,1 ml de tampão acetato 0,03M pH 4,8; 0,05 ml de glutation reduzido 5 mM; 0,05 ml de soroalbumina bovina 0,5 g% e 25 μ g de β -amilase. Após incubação por 6 e 1/2 h à temperatura ambiente (21-22°C), seguiu-se fervura por 5 minutos.

A seguir cada ensaio recebeu a adição de 0,1 ml de tampão tris-HCl 0,2M pH 7,0; 0,05 ml de NaCl 0,2 M e 5 μ l da solução de α -amilase a 10 mg/ml, completando-se o volume para 1,0 ml. A incubação prolongou-se por 50 h, a 27°C, com agitação, seguindo-se fervura por 5 minutos.

Alíquotas foram retiradas para análise de açúcares redutores e glicose.

Finalmente, 0,5 ml de cada sistema de incubação acima, foi adicionado de 0,25 ml de tampão citrato-fosfato 0,01-0,02 M pH 5,0 e 2,5 mg de pululanase, perfazendo um volume final de 1,0 ml. A mistura foi novamente incubada por 72 h a 27°C, com agitação.

Alíquotas do sistema final de incubação foram diretamente analisadas para determinação do incremento de poder redutor, como maltose.

Em todos experimentos de depolimerização com enzimas, a porcentagem de desdobramento como maltose foi correlacionada com o teor de açúcares totais co glicose.

Soroalbumina bovina e glutation reduzido (117) foram utilizados como preservativos e estabilizadores de β -amilase.

Nos ensaios à temperatura ambiente, as incubações foram realizadas em atmosfera de tolueno e naqueles com temperatura determinada usou-se um banho-maria

rotativo da Brunswick, modelo G-76 e vedação dos tubos com papel aluminizado para evitar evaporação.

Os sobrenadantes da precipitação com 3 volumes de etanol de todos sistemas de incubação foram cromatografados nos solventes I e II para verificação e confirmação dos di e oligossacarídeos liberados, além da glucose.

1.5. Reagentes

1.5.1 Polissacarídeos

Como glucanos α (1 \rightarrow 4) ligados e ramificados através de α (1 \rightarrow 6), para fins de análise comparativa, foram utilizados glicogênio de fígado de coelho tipo III e glicogênio de marisco tipo II, ambos da Sigma Chem. Co.

Com igual finalidade foi preparada amilopectina de arroz (50), mediante fracionamento do amido com ciclohexanol a quente (16), seguindo-se resfriamento lento.

Amido de arroz comercial foi inicialmente tratado com a mistura clorofórmio - metanol (2:1), em Soxhlet por 3 horas, seguindo-se a desproteíntização com a mistura de Sevag (107). Uma pasta a 1,5g% do amido obtido foi dispersada com NaCl 0,1g% a quente e autoclavada por 20 minutos a 1 atmosfera. A goma quente recebeu então a adição de ciclohexanol previamente aquecido, na razão de 2,5ml /100 ml de goma. O resfriamento lento, por 48 h, provocou a formação de um volumoso precipitado que foi descartado, coletando-se o sobrenadante por decantação, do qual foi ainda eliminado novo precipitado obtido por centrifugação a 1.000 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi então precipitado com 2 volumes de etanol, a frio, e colhido por centrifugação, foi redissolvido em água quente para novo tratamento com o ciclohexanol, a fim de se eliminar alguma amilose residual. O sobrenadante final, tratado com 2 volumes de etanol, a frio, forneceu um primeiro precipitado colhido a 1.000 x g por 5 minutos e um segundo colhido a 10.000 x g. Ambos mostraram um mesmo λ máximo de absorbância quando ensaiados com lugol na presença de CaCl_2 sat. (64). Estas duas frações devem diferir apenas quanto à faixa de peso molecular, dada a capacidade de fracionamento do álcool usado na precipitação (61, 91). Combinadas, constituíram a amilopectina de arroz, com coloração avinhada ao lugol.

O pululano foi obtido a partir do meio de cultura de P. pullulans, isento de células, conforme a técnica de Sowa et al. (104), mediante precipitação com 2 volumes de acetona gelada. O precipitado resultante foi dissolvido em água quente (80-85°C) e tratado, após resfriamento, com 1/5 do volume de cetavlon 5g%; a elevação do pH até 10-11 produziu um precipitado cinza, coletado por centrifugação, do tipo poliglucose, constatado por análise cromatográfica do hidrolisado com ácido trifluoracético 1 N. O segundo precipitado resultante da precipitação alcoólica do sobrenadante anterior, composto de glucose, manose e galactose, foi descartado. A fração poliglucose, assumida como pululano, não foi submetida a purificação (13).

1.5.2 Enzimas

D-glucose oxidase, peroxidase, α -amilase de B. subtilis (tipo II, cristalina, liofilizada, 1.000-1.100 un/mg proteína), β -amilase de batata-doce (tipo I-B, suspensão cristalina em sulfato de amônio 2,3 M, 20 un/ μ l) eram produtos de Sigma Chem.Co..

Pululanase foi obtida a partir do meio de cultura de A. aerogenes, isento de células, através de precipitação com acetona gelada (12). O precipitado foi extraído com as precauções que permitem a obtenção de uma única atividade enzimática (1, 68), comprovada pela liberação exclusiva, quando atuando sobre o pululano, de um único componente com migração cromatográfica compatível com a de maltotriose (solvente II). O dializado final, contendo 10 mg proteína/ml, serviu de preparação enzimática, assumindo-se toda proteína como pululanase.

1.5.3 Drogas

Os reagentes gerais provenientes de várias fontes (Merck, Reagen, Riedel e Carlo Erba) traziam a especificação de quimicamente puros.

Os carboidratos simples usados como padrões procediam da Pfansthiel Chem. Co..

O corante Azul Procion era da Cia. Imperial.

Concanavalina A (tipo III, pó liofilizado, contendo 85% de NaCl) e α -metil-D-glucopiranosídeo eram de Sigma Chem. Co..

Tetracetato de chumbo foi preparado a partir do mênio (87) e antrona

previamente ao uso, foi recristalizada de ligroina.

1.6 Manipulação dos polissacarídeos

Os glucanos envolvidos em tomadas gravimétricas foram previamente desidratados com vácuo e banho de vapor de metanol, por 6 horas.

As soluções dos mesmos foram preservadas com gotas de tolueno e as pipetas usadas foram inseridas com algodão para impedir eventual contato com a saliva.

1.7 Abreviaturas

Grl = glicogênio de fígado de coelho ("rabbit liver")

Gsf = glicogênio de marisco ("shell-fish")

Gpc = endopolissacarídeo de reserva de Polyporus circinatus

Ar = amilopectina de arroz

\overline{CL} = comprimento médio de cadeia ("average chain length")

\overline{ECL} = comprimento médio de cadeia externa ("average exterior chain length")

\overline{ICL} = comprimento médio de cadeia interna ("average interior chain length")

P_m = % aparente de conversão em maltose (α -amilólise)

$P_{1,6}$ = % de ligações α (1 \rightarrow 6)

Con A = Concanavalina A

Tris = tris(hidroximetil)amino-metano

Hepes = ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-etanosulfônico

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Efeito da Variação da Fonte de Carbono no Acúmulo de Endopolissacarídeo

Os dados da fig. 1 confirmam os dados anteriores de Pinotti e Zancan (90), quanto ao cultivo de P. circinatus com D-glucose como fonte de carbono e mostram também que o endopolissacarídeo é acumulado a partir de D-galactose ou L-arabinose, com eficiência semelhante comparativamente à D-glucose, desde que o fungo seja previamente cultivado em meio sólido contendo cada um destes monossacarídeos.

No experimento com D-glucose, em que a fonte de carbono exógena estava quase que completamente esgotada já a partir de 48 h de cultivo, pode-se notar o consumo do endopolissacarídeo, que funcionaria então, como material de reserva.

A natureza similar dos glucanos de reserva elaborados a partir das hexoses e pentose testadas ficou evidenciada pela mesma faixa de absorção dos complexos iodo-polissacarídeos em presença de CaCl_2 sat., que foi de 380-400 nm para as frações endopolissacarídicas derivadas dos diversos tempos de cultivo em cada monossacarídeo, excetuando-se unicamente a fração derivada do cultivo em D-glucose por 24 h, que apresentou um valor pouco superior (420-440 nm). Outra evidência neste sentido foi a rápida degradação apresentada por todas as frações endopolissacarídicas frente à α -amilase salivar.

2.2 Obtenção do Endopolissacarídeo de Reserva de P. circinatus

Na obtenção do endopolissacarídeo de reserva do fungo foi usado fenol (122) como agente extrator, por apresentar vantagem em relação aos meios drásticos como KOH a quente e ácido tricloroacético, que degradam a molécula de glicogênio, o mesmo ocorrendo com a extração com água quente (108). A água fria (0-4°C) (86), que também permite a extração de glicogênio com elevado peso molecular, foi excluída, dada a restrição da aplicação deste método ao micélio de basidiomicetos, cujas paredes maciças são constituídas de quitina e glucanos insolúveis (10).

Além do micélio total, a extração com fenol a frio (121) também foi aplicada às paredes celulares, obtidas da ruptura das hifas em Prensa Francesa (French Pressure Cell Press, American Instruments Co.) e não resultou na obtenção significativa de poliglucose na fase superior do centrifugado, o que sugere a inexistência de glicogênio ligado às paredes, já que Laskow e Margoliash (66) afirmam ser extratível, com fenol, o glicogênio ligado às paredes.

A fração endopolissacarídica extraída com fenol, após redesperoneização pelo Sevag (107), ficou livre da maior parte do principal contaminante arrastado, o RNA (62), mediante precipitação do mesmo com $MnCl_2$.

A análise cromatográfica da fração endopolissacarídica total, após hidrólise total, acusou a presença de glucose (+++), galactose e manose (traços) e ribose (+).

O fracionamento da fração endopolissacarídica em DEAE-celulose, forma formiato (fig. 2), por eluição aquosa produziu como maior componente um polissacarídeo neutro, eluído como pico único (pico I), que deve corresponder ao endopolissacarídeo neutro total, pois a resolução de polidispersão, isto é, o subfracionamento em componentes de mesma natureza mas com faixas de peso molecular crescentes, requereria o emprego de gradiente de $LiCl_2$ (15), por exemplo, como eluente. A análise cromatográfica do hidrolisado do polissacarídeo neutro eluído com água (pico I) revelou ser o mesmo constituído exclusivamente de glucose.

A eluição seguinte, com $HCOOH$ 0,1 N, produziu uma segunda fração (pico II), ácida (fig. 2), em cujo hidrolisado constatou-se, por cromatografia no solvente IV, um componente com migração igual à do ácido glucurônico.

Estes dados confirmam a natureza heterogênea da fração endopolissacarídica de *P. circinatus*, citada por Pinotti e Zancan (90).

O teor de proteínas na fração endopolissacarídica antes do fracionamento era da ordem de 0,9 g%, tornando-se imperceptível na fração neutra (pico I), a qual também acusou resultados negativos para os testes qualitativos do orcinol (RNA) e da difenilamina (DNA). O uso da coluna trocadora aniônica permitiu pois, a obtenção do glucano neutro isento de contaminantes carregados como proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos ácidos.

2.3 Eletroforese em Acetato de Celulose

A eletroforese do endopoliglucoose neutro eluído da coluna de DEAE-celulose, corado com Azul Procion, produziu uma banda única de migração, o mesmo ocorrendo com o glicogênio de fígado de coelho e amilopectina de arroz, igualmente corados (fig. 3), sugerindo ser o glucano do fungo uma preparação homogênea ou cujo grau de polidispersão não poder ser evidenciado neste tipo de procedimento eletroforético (29).

2.4 Curva de Hidrólise

O endopoliglucoose de P. circinatus, quando submetido à hidrólise ácida total (HCl 1 N, 100°C, 1 hora), acusou um desdobramento de 96% como açúcares redutores e de 90% como glucose (fig. 4).

Em condições semelhantes, Laskow e Margoliash (66) e Manners (72) relatam percentuais de desdobramento equivalentes para os glucanos do tipo glicogênio e amilopectina.

A cromatografia do hidrolisado, nos solventes I e II, evidenciou a presença de componentes com migrações coincidentes com as de glucose, maltose e isomaltose, o que explica a maior % de hidrólise na análise como açúcares redutores.

2.5 Polarimetria do Endopoliglucoose de P. circinatus

Os dados da Tabela I indicam a alta dextrorrotação apresentada pelo glucano do fungo (+ 182°), aproximadamente igual à apurada para o glicogênio de

TABELA I

Polarimetria do Endopoliglucoose de P. circinatus

polissacarídeo	conc. (g/%)	leitura	$[\alpha]_D^{21^\circ C}$	literatura
Ar	0,558	+ .098°	+ 176°	192°, 200° (36)
Gr1	0,508	+ .100°	+ 197°	198°, 200° (72)
Gsf	0,522	+ .096°	+ 184°	192° (72)
Gpc	0,516	+ .094°	+ 182°	-

marisco (+ 184⁰) e se enquadra na faixa de + 179 a + 233⁰ (72) característica dos glucanos correlatos ao glicogênio, constituindo-se em indício da existência de configuração alfa nas ligações glicosídicas.

2.6 Espectrofotometria no Infra-Vermelho

A fig. 5 mostra o espectro de absorção na região do infra-vermelho do endopoliglucose de P. circinatus.

Embora uma determinada banda de absorção não possa ser assumida como particular de um certo açúcar e nem se possa prever um espectro de absorção de um homopolissacarídeo a partir da unidade monomérica (65), a exemplo do que aconselha Speding (105), o exame do material, paralelamente a outros definidos e eleitos de referência, permitiu observar serem os espectros de infra-vermelho semelhantes para o endopoliglucose do fungo e os demais glucanos de referência examinados, apresentando bandas de absorção comuns.

Dentre estas, particularmente a da faixa de 835-840 cm⁻¹ é típica do anel α-D-glucopiranosídeo, correspondendo ao tipo 2-a de absorção, descrito por Neely (82).

TABELA II

Espectrofotometria do Endopoliglucose de P. circinatus no Infra-Vermelho

Polissacarídeo	bandas de absorção (cm ⁻¹)					
	experim. literat.*		experim. literat.*		experim. literat.*	
Ar	760	756 ^a	845-850	840 ^a	930	931 ^a
Gr1	760	762	845	835	930	928
Gsf	755-760	758 ^b	845	840 ^b	925	925 ^b
Gpc	755	-	845	-	925	-

(*) referência (8); (a) amilopectina de batata; (b) glicogênio de mexilhão = (Mytilus sp.)

Verifica-se na Tabela II, além desta absorção referida, uma estreita semelhança entre os glucanos ramificados de referência e o endopoliglucoose do fungo no tocante às demais absorções dos tipos 1 e 3 (8, 82), que segundo Manners (72) são comuns dos glucanos α (1 \rightarrow 4) ligados. Em todos espectros está ausente a banda do tipo 2-b (82), na faixa de $881 \pm 7 \text{ cm}^{-1}$, característica de β -D-glucose.

Ficou também comprovada a purificação do glucano neutro do fungo mediante a cromatografia em DEAE-celulose, pois está ausente a banda de absorção na faixa de $1.700-1.760 \text{ cm}^{-1}$, típica de ácido urônico (65, 102, 110).

2.7 Interação com a Concanavalina A e Turbidimetria

O endopoliglucoose de P. circinatus interage com a Con A, conforme se verifica na fig. 6, da mesma maneira que os glicogênios de fígado de coelho e de marisco, enquanto que para amilopectina de arroz observou-se baixa reatividade. Estes dados estão de acordo com a literatura (22, 76, 42) e sugerem que o $\bar{C}L$ governa o grau de interação, conforme demonstram Manners and Wright (76).

TABELA III

Interação Concanavalina A : Endopoliglucoose de P. circinatus

polissacarídeo	G.V. ("glycogen values")	
	experimental	literatura
Ar	0,57	0,0 (76); 0,23 ^a (42)
<u>Gr1</u>	<u>1,00</u>	<u>1,00</u> (76)
Gsf	1,11	1,15 ^b (22)
Gpc	1,05	(*)

(a) amilopectina de batata; (b) glicogênio de ostra com $\bar{C}L$ semelhante ao de marisco usado; (*) G.V. = 1,00 para o glicogênio de Pleurotus ostreatus, fungo sub-classe dos Homobasidiomicetos, que também inclui o gênero Polyporus.

O valor de G.V. ("glycogen value") do poliglucoose do fungo (Tabela III) é muito próximo daqueles dos glicogênios de referência.

Goldstein et al. (42) admitem uma correlação entre a % de ligações α (1 \rightarrow 6) e o valor de G.V. enquanto Manners e Wright (76) mostram tal correla-

ção com os valores de \overline{CL} , \overline{ECL} e \overline{ICL} para diversos glucanos, daí que valores aproximados de G.V. indicariam arquiteturas moleculares similares (42). Os dados obtidos da interação do endopoliglicose de P. circinatus com Con A indicam pois, que o mesmo tem uma estrutura altamente ramificada ou razoavelmente diminuída quanto ao \overline{ECL} , dada a maior reatividade apresentada pelas β -dextrinas (76) e as ϕ -dextrinas (63), comparativamente aos glicogênios que lhes dão origem.

2.8 Espectrofotometria Diferencial dos Complexos Iodo-Polissacarídeos

Os gráficos das figs. 7 e 8 mostram que na ausência e presença de $CaCl_2$ sat. os complexos iodo-glucanos ramificados apresentam λ máximos de absorção decrescentes com o grau de ramificação, em acôrdo com os dados de Manners (72).

Para os glicogênios de referência e o endopoliglicose do fungo, na presença $CaCl_2$ sat., os λ máximos de absorção sofrem um deslocamento para valores menores, em acordo com os resultados anteriores de Krisman (64). Estas absorções menores, na faixa de 400 nm, estão correlacionadas com valores menores de \overline{CL} (4, 62) e sugerem também valores menores de \overline{ECL} (119, 20), decorrentes de ramos externos curtos.

Comparativamente aos glucanos de referência ensaiados, o endopoliglicose de P. circinatus tem comportamento mais aproximado do glicogênio de marisco, confirmando os dados de \overline{CL} , respectivamente de 12 e 11, obtidos pela oxidação com periodato (Tabela IV).

2.9 Hidrólise Ácida Parcial Branda

Este tipo de hidrólise foi conduzido em condições que evitam os inconvenientes da reversão ácida a partir do monômero (125, 111) e promovem a acumulação de isomaltose relativamente à de maltose, em vista da maior labilidade deste segundo dissacarídeo frente à condição ácida (125).

O exame cromatográfico do hidrolisado parcial (fig. 9) mostra a separação de uma dezena de componentes, cujas migrações são análogas tanto

para o glicogênio de marisco quanto para o glucano do fungo, sugerindo semelhança na natureza dos maltossacarídeos lineares e ramificados.

Destes componentes, adsorvidos em carvão ativo, a eluição com etanol a 10 % permitiu a desorção seletiva de dissacarídeos (88, 126), cuja recromatografia preparativa forneceu 2 componentes provenientes de cada glucano e cujas migrações cromatográficas são coincidentes com as de maltose e isomaltose, no solvente I (fig. 9).

A verificação do tipo de ligação glicosídica, como sendo respectivamente do tipo (1 → 4) e (1 → 6) para estes dois componentes foi feita pelos reagentes D e E, específicos para esta finalidade. As cores distintas resultantes foram as mesmas exibidas pelos padrões de maltose e isomaltose co-cromatografados. Contudo, como pelo menos os homólogos de β-configuração, isto é, celobiose e gentiobiose mostram mesma migração cromatográfica no solvente usado e também os mesmos matizes de revelação com os reagentes citados, lançou-se mão da eletroforese em papel (fig. 10), na qual os dissacarídeos isolados mantiveram migrações idênticas aos padrões de maltose e isomaltose, diferenciando-os claramente de celobiose e gentiobiose.

A identificação dos dois dissacarídeos comuns ao glicogênio de marisco e ao endopoliglucose de P. circinatus foi ainda confirmada pela eletroforese dos alditóis derivados (fig. 11), cujas migrações foram coincidentes com as de maltitol e isomaltitol.

2.10 Oxidação com Periodato e Determinação do \bar{CL}

Os dados da Tabela IV indicam os valores de comprimento médio de cadeia obtidos mediante oxidação com IO_4^- , segundo a técnica de Fales (34).

TABELA IV

<u>Determinação do Comprimento Médio de Cadeia do Endopoliglucose com Periodato</u> polissacarídeo	<u>\bar{CL}^a (comprim. médio de cadeia)</u>
Ar	19,8
Gr1	15,7
Gsf	10,9
Gpc	11,9

(a) média de 2 determinações, comparativamente ao α-metil-D-glucopiranosídeo

Os valores de \overline{CL} dão uma indicação do grau de ramificação dos polissacarídeos do tipo glicogênio e amilopectina e são proporcionais ao percentual de ligações $\alpha(1 \rightarrow 6)$, que oscilam de 6 a 10% nos glicogênios e de 4 a 5% nas amilopectinas, correspondendo então a \overline{CL} de 16-10 e 25-20 resíduos glicosil, respectivamente (19).

O valor de \overline{CL} do endopoliglucose de P. circinatus indica um grau de ramificação mais aproximado daquele do glicogênio de marisco.

Dos dados experimentais calculou-se para o glicogênio de marisco (referência) uma liberação de ácido fórmico de 0,074 moles/mol de resíduo de glicose anidra, valor que está em estreito acordo com o de 0,076 moles obtido por Ishak e Painter (56) para um glicogênio análogo de ostra, em condições que garantem completa oxidação das pontas não redutoras fornecedoras de ácido fórmico.

2.11 Hidrólise Enzimática com α -Amilase e Cálculo de $P_{1,6}$ e \overline{CL}

Os dados da fig. 12 mostram que o endopoliglucose de P. circinatus é degradado por α -amilase de B. subtilis, mas até um percentual que é inferior aos obtidos para os α glucanos de referência, sugerindo então a presença de um grau maior de ramificação, visto que as ligações $\alpha(1 \rightarrow 6)$ são um obstáculo à ação da enzima (47).

Conforme Manners (37) demonstrou, há uma correlação linear entre os valores de α -amilólise e as % de ligações $\alpha(1 \rightarrow 6)$.

TABELA V
Cálculo de $P_{1,6}$ e \overline{CL} a partir dos valores de P_m

Polissacarídeo	P_m^a	$P_{1,6}^b$	\overline{CL}^c
Ar	85,2	5,4	18,5
Gr1	77,6	7,0	14,3
Gsf	55,9	11,6	8,6
Gpc	52,4	12,3	8,1

(a) P_m = % aparente de conversão em maltose em 25 h; (b) $P_{1,6}$ = % de ligações $\alpha(1 \rightarrow 6) = 23,3 - (0,21 \cdot P_m)$; (c) $\overline{CL} = 100 / P_{1,6}$.

Os índices de α -amilólise salivar (P_m) foram inicialmente utilizados por Manners e Wright (75) para dedução da porcentagem de ligações tipo α (1 \rightarrow 6) ($= P_{1,6}$) e do comprimento médio de cadeia (\overline{CL}), mediante as formulações: $P_{1,6} = 23,3 - (0,21 \cdot P_m)$ ou $P_{1,6} = 23,4 - (0,20 \cdot P_m)$ (63) e ... $\overline{CL} = 100 / P_{1,6}$.

Recentemente, Yamaguchi et al. (115), a partir de α -amilólise com enzima de Aspergillus, determinaram o \overline{CL} de glicogênio de Candida albicans pelo uso das mesmas equações.

Os valores de \overline{CL} da Tabela V, deduzidos a partir de $P_{1,6}$ obtidos com a α -amilase de B. subtilis, são inferiores àqueles resultantes da oxidação com periodato (Tabela IV) e basicamente devem decorrer da fonte de enzima, a qual afeta o percentual máximo de α -amilólise bem como a natureza quali e quantitativa dos açúcares simples e ramificados produzidos na α -amilólise (47).

A concentração de enzima empregada deve ter sido suficiente para atingir o "segundo estágio de hidrólise" (75), já que os percentuais de α -amilólise obtidos (Tabela V) estão de acordo com os anteriormente descritos na literatura para os polissacarídeos de referência (37, 46). Nestas condições de "segundo estágio", α -amilase de B. subtilis (53) produz como menor dextrinalímite um pentassacarídeo ramificado, o 6^2 - α -maltosilmaltotriose, equivalendo a um menor poder redutor nos incubados [comparativamente ao produto da α -amilase salivar (75, 53)], equivalendo por sua vez a um valor menor de P_m , que origina um valor maior de $P_{1,6}$, o qual finalmente corresponde a um valor menor de \overline{CL} .

Em presença de inibidores de dissacaridases o teor de glucose nos incubados não foi substancialmente alterado, sugerindo a ausência de atividade maltásica na α -amilase de B. subtilis usada, devendo então a glucose provir da cissão hidrolítica de oligossacarídeos e dextrinas (95,75,47) pela ação da própria α -amilase. Diferentemente, para α -amilase salivar, Walker e Whelan (116) constataram uma atividade maltásica na preparação dialisada e não submetida à cristalização, etapa esta justamente omitida por

Manners e Wright (70, 75) e que poderia gerar valores superiores de α -amilólise, com os quais estabeleceu-se as equações citadas.

O exame cromatográfico dos incubados, em papel com os solventes I e II e reveladores A e B, acusou uma composição comum a todos glucanos : glucose, maltose e oligossacarídeos com menor mobilidade.

2.12 Hidrólise Enzimática com β -Amilase

De acordo com as curvas de hidrólise da fig. 13 e com os dados da Tabela VI, o endopoliglucose de P. circinatus deve apresentar cadeias externas bem mais curtas que os demais α glucanos de referência, o que se traduz pelo seu baixo índice β -amilolítico (23%) comparativamente aos valores mais elevados (55%, 44% e 30%) obtidos para a amilopectina e glicogênios, estes em razoável acordo com as citações da literatura (100, 47, 41).

TABELA VI

Índice de β -Amilólise do Endopoliglucose de P. circinatus

Polissacarídeo	% de β -Amilólise ^a
Ar	55,2
Gr1	43,8
Gsf	29,9
Gpc*	23,0

(a) Média de quadruplicatas, com 6 h de incubação; (*) Os endopoliglucozes purificados provenientes do cultivo em D-galactose e L-arabinose (22 h) apresentaram %s de β -amilólise respectivamente de 15,6 e 23,0%.

Diferentemente das demais características determinadas, mais a proximadas daquelas exibidas pelo glicogênio de marisco, esta ocorrência de ramos externos muito curtos (\overline{ECL}) é particular do endopoliglucose do fungo. Outros relatos de glicogênios dotados de \overline{ECL} inusualmente curtos são os de molusco bivalvo Cardium (\overline{ECL} = 3-4) (70) e de corpos de frutificação de P. giganteus (\overline{ECL} = 5-6) (14).

Este baixo valor de β -amilólise foi apurado pela mesma técnica simultaneamente aplicada aos α glucanos de referência, mas cabe a lembrança da observação levantada por French e citada por Manners (73) de que um pequeno número de cadeias externas possam estar ocluídas no interior da molécula, tornando-se menos acessíveis à ação da enzima. Esta possibilidade é cogitável em vista do método de preparação com fenol render polímero de maior peso molecular e com estrutura mais aproximada da nativa (66).

White e Sussman (123) relatam um caso extremo de ineficácia de β -amilase frente a um glicogênio de Dictyostellium discoideum, que se torna susceptível à mesma enzima após um tratamento com álcali a quente.

Não se constatou variação do grau de β -amilólise a partir de 6 h de incubação, embora se tenha utilizado uma concentração de enzima inferior à proposta na técnica utilizada (117) e o exame cromatográfico dos incubados acusou a presença de maltose, como único componente, excluindo a participação, se presente, de alguma contaminação maltásica, a qual já foi admitida mesmo em preparações de β -amilase cristalizada por duas vezes (67).

2.13 Determinação do \overline{CL} pela Depolimerização Simultânea com β -Amilase e Pululanase

Os dados da Tabela VII, referentes a \overline{CL} obtidos por depolimerização simultânea com β -amilase e pululanase, diferem daqueles obtidos pelo periodato (Tabela IV), diferença esta já relatada por Lee e Whelan (68) em valores numéricos semelhantes, quando estabeleceram igual comparação.

Banks e Greenwood (7) alegam que a correção dos resultados de Lee e Whelan (68) são decorrentes de uma compensação de erros, isto é, a subestimação da glicose devido à interferência do glutation reduzido é contrabalançada por uma porcentagem extra de monossacarídeo proveniente da atividade maltásica contaminante que não fora totalmente inibida pelo eritritol.

Diferentemente de Lee e Whelan (68), constatou-se no presente caso, a liberação de glucose no ensaio de controle contendo apenas a β -amilase em alta concentração e assim, efetuou-se sua dedução do total de glucose liberada pela

ação conjunta das duas enzimas empregadas.

Por outro lado, computadas as diluições dos incubados, para fins de análise pela glucose-oxidase, reduziu-se o teor de glutathion para 0,05 mM, abaixo portanto do limite de concentração citado como interferente por Banks e Greenwood (7).

TABELA VII

Determinação do \overline{CL} do Endopoliglucoose de *P. circinatus* com β -Amilase e Pululanase em Ação Simultânea

Polissacarídeo	\overline{CL} ^a
Ar	17
Gr1	13
Gsf	11-12
Gpc	10

(a) valor médio de 2 determinações (72 e 96 h), arredondado para nº inteiro.

Comparativamente aos valores de \overline{CL} obtidos por α -amilólise (Tabela V), os resultados obtidos pela combinação de β -amilase e pululanase são mais concordantes com os anteriores obtidos com o periodato (Tabela IV).

2.14 Depolimerização do Endopoliglucoose por Ação Sucessiva de β e α -Amilases e Pululanase

O endopoliglucoose de *P. circinatus*, sob a ação direta de pululanase sofreu uma depolimerização de 13,2%, expressa como maltose, enquanto que o resultado para o glicogênio de marisco, em iguais condições, foi de 14,5%. Estes dados são coerentes com o de 16,9% relatado por Hara et al. (48) para um glicogênio de *Chromatium* (bactéria), também altamente ramificado ($\overline{CL} = 11$).

O exame dos produtos da incubação, por cromatografia em camada delgada com o solvente III e revelador C, não acusou a presença de glucose nem de maltose.

Os dados da Tabela VIII retratam a depolimerização completa do poliglucoose do fungo bem como dos demais α glucanos de referência, mediante a

ação sucessiva das amilases e pululanase, observando-se que o incremento de poder redutor causado pela pululanase é mais pronunciado nos α glucanos com maior grau de ramificação.

TABELA VIII

Depolimerização do Endopoliglucose de *P. circinatus* por β e α -Amilases e Pululanase em Ação Sucessiva

Polissacarídeo	% de hidrólise ^a	
	β e α -Amilases	β e α -Amilases + Pululanase
Ar	79	103
Gr1	69	101
Gsf	52	103
Gpc	56	97

(a) em açúcares redutores, como maltose.

A possibilidade do ataque direto da pululanase a glicogênios é limitada e varia com a origem dos polissacarídeos, sendo passíveis de desdobramento as β -dextrinas derivadas, devido ao encurtamento dos ramos externos (12, 11, 80).

Quanto às α -dextrinas, a pululanase exige como requerimento estrutural mínimo um tetrassacarídeo em que a ligação α (1 \rightarrow 6) seja mediana a dois resíduos maltosil (1, 12, 38, 69). α -Amilase de *B. subtilis* produz como menor α -dextrina-limite um pentassacarídeo (75, 53), que é substrato para a pululanase.

O incremento de poder redutor observado após a ação da pululanase excede a faixa teórica que poderia provir exclusivamente da cisão de ligações α (1 \rightarrow 6), sugerindo então que a ruptura destas ligações tenha tornado as dextrinas e oligossacarídeos ramificados passíveis de novo ataque pela α -amilase, dada a estabilidade e capacidade de renaturação desta enzima após curtos tempos de aquecimento. (78).

TABELA IX

Propriedades e Características Estruturais do Endopoliglucoose de *Polyporus circinatus*, Fr. (Gpc)

	p o l i s s a c a r i d e o			
	Ar	Gr1	Gsf	Gpc
$[\alpha]_D^{21^\circ C}$	+ 176 ^o	+ 197 ^o	184 ^o	182 ^o
G.V. ^a	0,57	<u>1,00</u>	1,15	1,05
λ m \bar{a} x. com I ₂ +KI (nm)	540-545	500-505	430-435	450-455
idem + CaCl ₂ sat.	530-535	455-460	395-400	400-405
% de α -amil \bar{o} lise ^b	85	78	56	52
% de β -amil \bar{o} lise ^b	55	44	30	23
\overline{CL}^c	20	16	11	12
\overline{ECL}^d	13-14	9	6	5
\overline{ICL}^e	6-5	6	4	6
depolimeriza $\bar{c}\tilde{a}$ o com $-\beta$ e α -amilase + pululanase ^b	103	101	103	97
dissacar \bar{i} deos isolados	maltose isomaltose	maltose isomaltose (nigerose) ^f	-	maltose isomaltose

(a) = "glycogen value" = medida turbidimétrica da interação com Con A; (b) = % de conversão em maltose; (c) obtidos pelo 10^{-4} ; (d) $ECL = (\% \beta\text{-amil}\bar{o}l. / 100) \times CL + 2,5$ - refer. (94, 95); (e) $ICL = CL - 4 ECL = 1$ - refer. (94, 95); (f) provenientes de algumas ligações $\alpha(1 \rightarrow 3)$ em glicogênio de fígado novilho.

A Tabela IX sumariza as características estruturais do endopoliglucoose de reserva de *Polyporus circinatus* comparativamente à amilopectina de arroz e glicogênios de fígado de coelho e de marisco.

Os valores encontrados para os polissacarídeos de referência correspondem à - aqueles descritos na literatura (72; 22, 76, 63, 42; 64; 46; 47, 41; 34; 111, 125, 126).

O endopolissacarídeo do fungo apresenta características muito próximas das descritas por Liddle e Manners (70) para a glicogênio de fígado de coelho do tipo I, dentro dos limites extremos encontrados nas diferentes amostras de glicogênios de mesma origem.

O endopoliglucose de P. circinatus foi isolado no momento em que sua concentração no micélio era máxima, correspondendo a 20% do micélio seco (fig. 1), em condições fisiológicas de início de fase estacionária, quando se admite que haja a máxima velocidade de síntese dos polissacarídeos de reserva (92, 93).

O fato do fungo crescido em D-galactose e L-arabinose acumular o mesmo tipo de poliglucose sugere que estes dois monossacarídeos seriam previamente convertidos em derivados de D-glucose, seja através da via de Leloir (127) para D-galactose ou do ciclo das pentoses (39) para L-arabinose. Os poliglucozes isolados nestes casos também apresentam valores baixos de índices β -amilolíticos e λ máximos de absorção com o I_2 em tudo comparáveis aos do poliglucose isolado do fungo crescido em D-glucose por 48 h (Tabela VI e ítem 2.1), o que indicaria a existência de um precursor comum, independente mente da fonte de carbono metabolizada.

Por apresentar cadeias externas curtas, comparáveis às de dex - trinas-limite de fosforilase ou ϕ -dextrinas (37, 117, 74, 69), poder-se-ia admitir que nestas células a degradação do endopoliglucose é limitada pela bai - xa atividade do sistema desramificante, comparável à observada nas limite-dex - trinoses (54, 74, 55) ou por alteração do sistema responsável pela síntese.

RESUMO

Uma amostra monocariótica do fungo basidiomiceto apodrecedor de madeira Polyporus circinatus, Fr., com crescimento exclusivamente micelial e carente dos corpos de frutificação, quando cultivado em meio contendo excesso de D-glucose, D-galactose ou L-arabinose como única fonte de carbono, acumula um ENDOPOLIGLUCOSE.

O polissacarídeo obtido da massa micelial do cultivo em D-glucose a 2 g% , por 48 horas, tem as seguintes características:

1. é altamente dextrorrotatório ($[\alpha]_D^{21} = +182^{\circ}$) e a reatividade com a concanavalina A é de G.V. = 1,05.
2. por hidrólise ácida branda fornece dois dissacarídeos: maltose e isomaltose.
3. os λ máximos de absorção com iodo são de 450-455 e 400-405 nm, respectivamente na ausência e presença de CaCl_2 saturado.
4. apresenta índices α - e β -amilolíticos de 52 e 23%, respectivamente.
5. é completamente depolimerizado pela ação sucessiva de β -, α -amila-se e pululanase.
6. apresenta comprimento médio de cadeia ($\overline{\text{CL}}$) = 12, comprimento médio de cadeia externa ($\overline{\text{ECL}}$) = 5 e comprimento médio de cadeia interna ($\overline{\text{ICL}}$)=6.

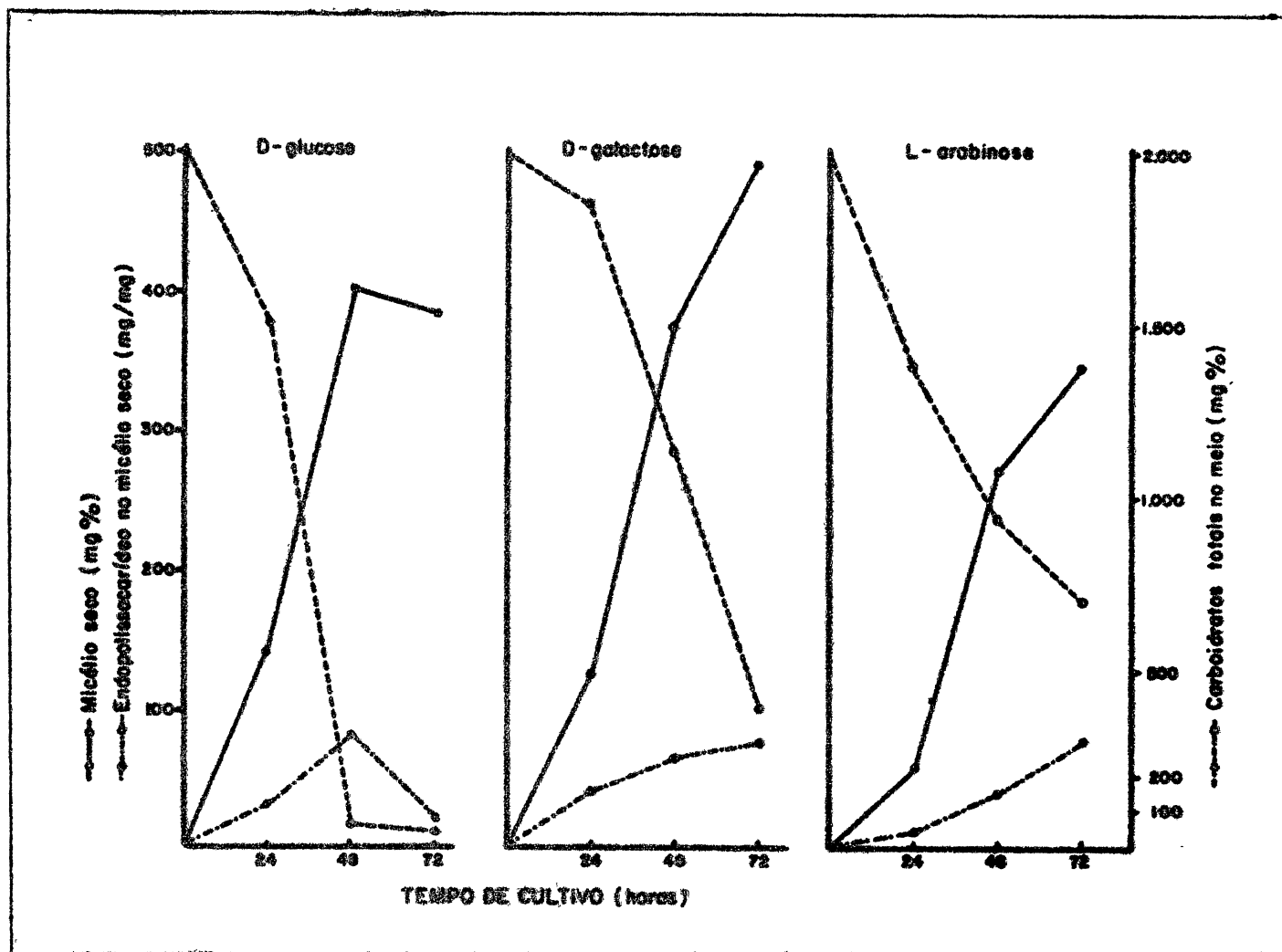


FIG. 1 - EFEITO DA VARIAÇÃO DA FONTE DE CARBONO SOBRE O ACÚMULO DE ENDOPOLIGLUCOSE DE *Polyporus circinatus*.

Cada tempo de cultivo (24, 48 e 72 h) (200 ml de meio) continha o monossacarídeo em uma concentração inicial de 2,0 g%. O micélio seco foi avaliado por pesagem após desidratação com acetona e a fração endopolissacarídica extraída com fenol, sendo seu conteúdo de endopoliglucose quantificado colorimetricamente conforme descrito em *Materiais e Métodos*. (pg.9).

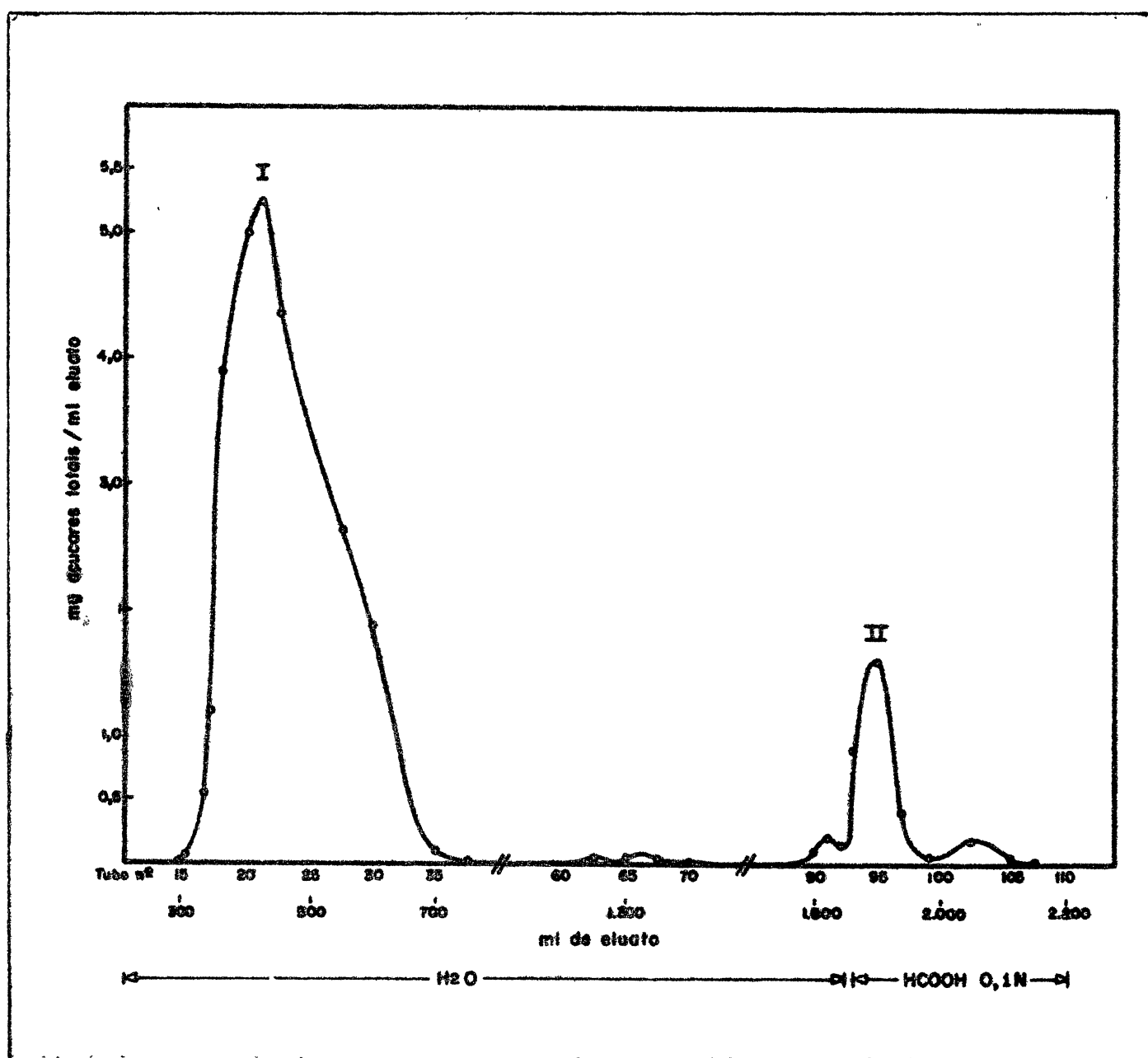


FIG. 2 - DIAGRAMA DO FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ENDOPOLISSACARÍDICA DE Polyporus circinatus EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE (forma HCOO⁻).

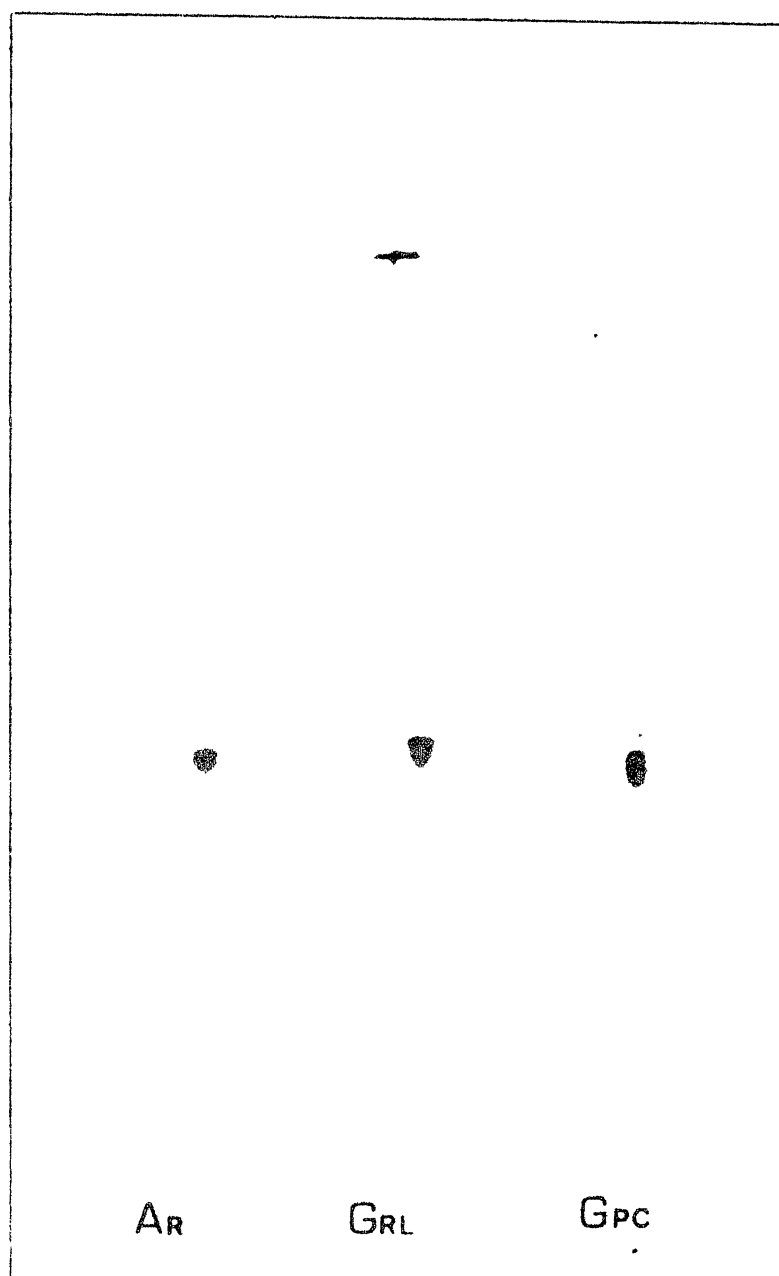


FIG. 3 - ELETROFORESE DO ENDOPOLIGLUCOSE DE Polyporus circinatus EM ACETATO DE CELULOSE
condições: coloração prévia com Azul Procion; 250 V; 22 mA; 5 minutos.

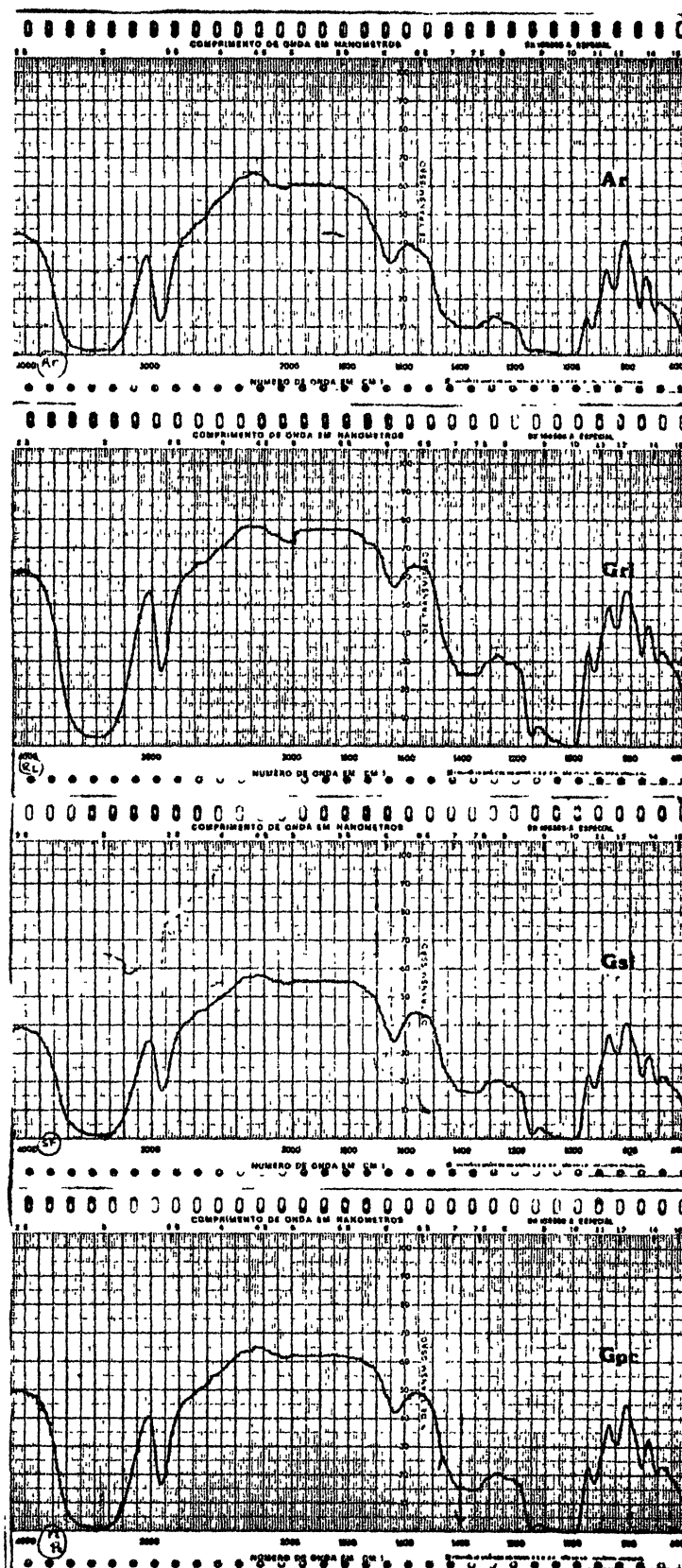


FIG. 5 - ESPECTROFOTOMETRIA DO ENDOPOLIGLUCOSE DE Polyporus circinatus NO INFRA-VERMELHO.

As pastilhas contendo 150-170 mg de KBr e 2-3 mg de glucano (Ar = amilopectina de arroz; Gsf = glicogênio de marisco ; Grl = glicogênio de fígado de coelho; Gpc = endopoliglucose do fungo) foram examinadas nas condições descritas em Materiais e Métodos.

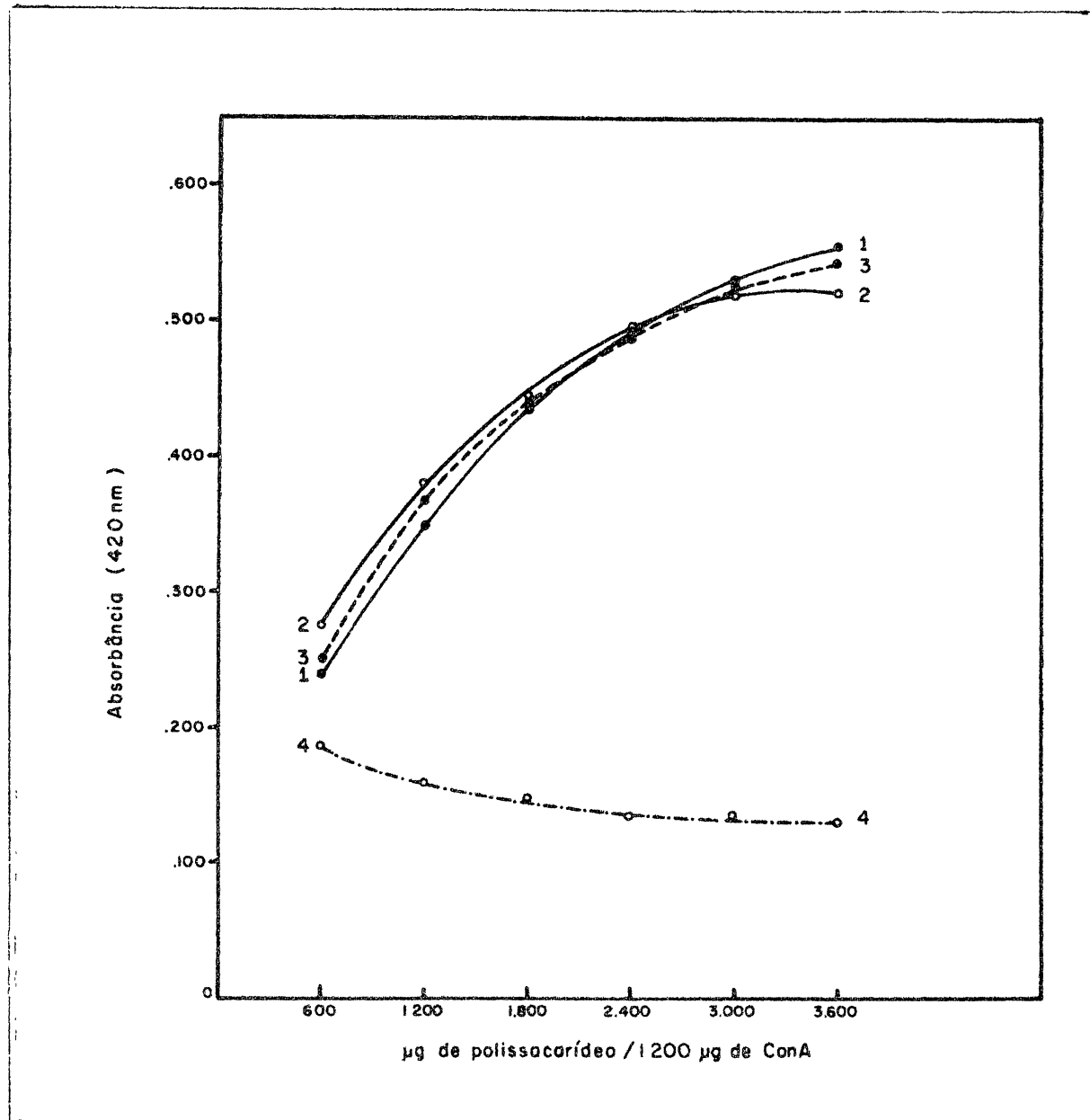


FIG. 6 - TURBIDIMETRIA DA INTERAÇÃO CONCANAVALINA A : ENDOPOLIGLUCOSE DE Polyporus circinatus.

1 = glicogênio de fígado de coelho; 2 = glicogênio de marisco; 3 = endopoliglucose do fungo; 4 = amilopectina de arroz. As condições experimentais são as descritas em Materiais e Métodos.

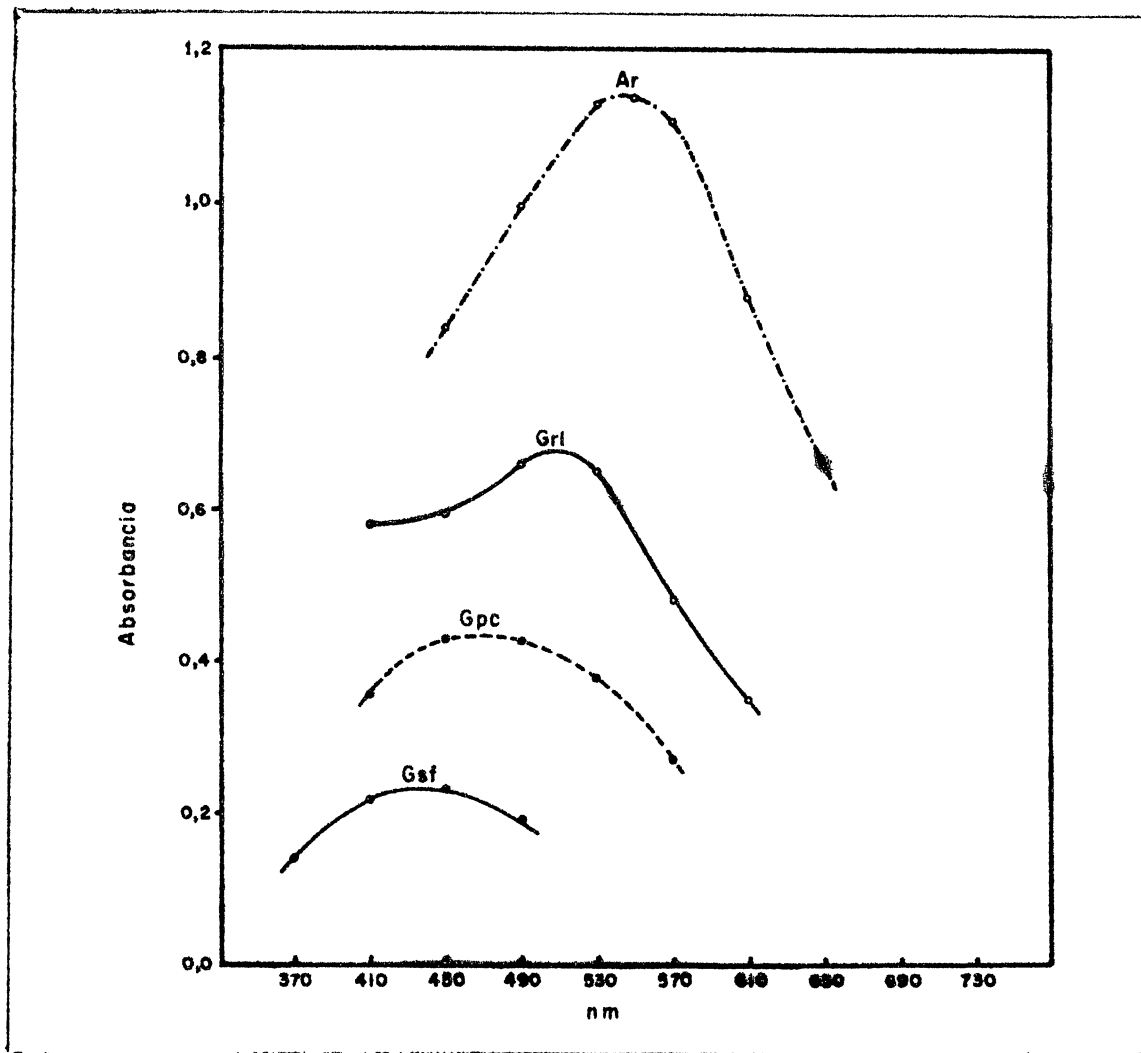


FIG. 7 - ESPECTROFOTOMETRIA DO COMPLEXO IODO-ENDOPOLIGLUCOSE DE Polyporus circinatus NA AUSÊNCIA DE CaCl_2 SATURADO.
 Condições: amilopectina de arroz (Ar) $750\mu\text{g}$; glicogênio de fígado de coelho (Grl) $1500\mu\text{g}$, de marisco (Gsf) $2000\mu\text{g}$; endopoliglucose (Gpc) $2000\mu\text{g}$.

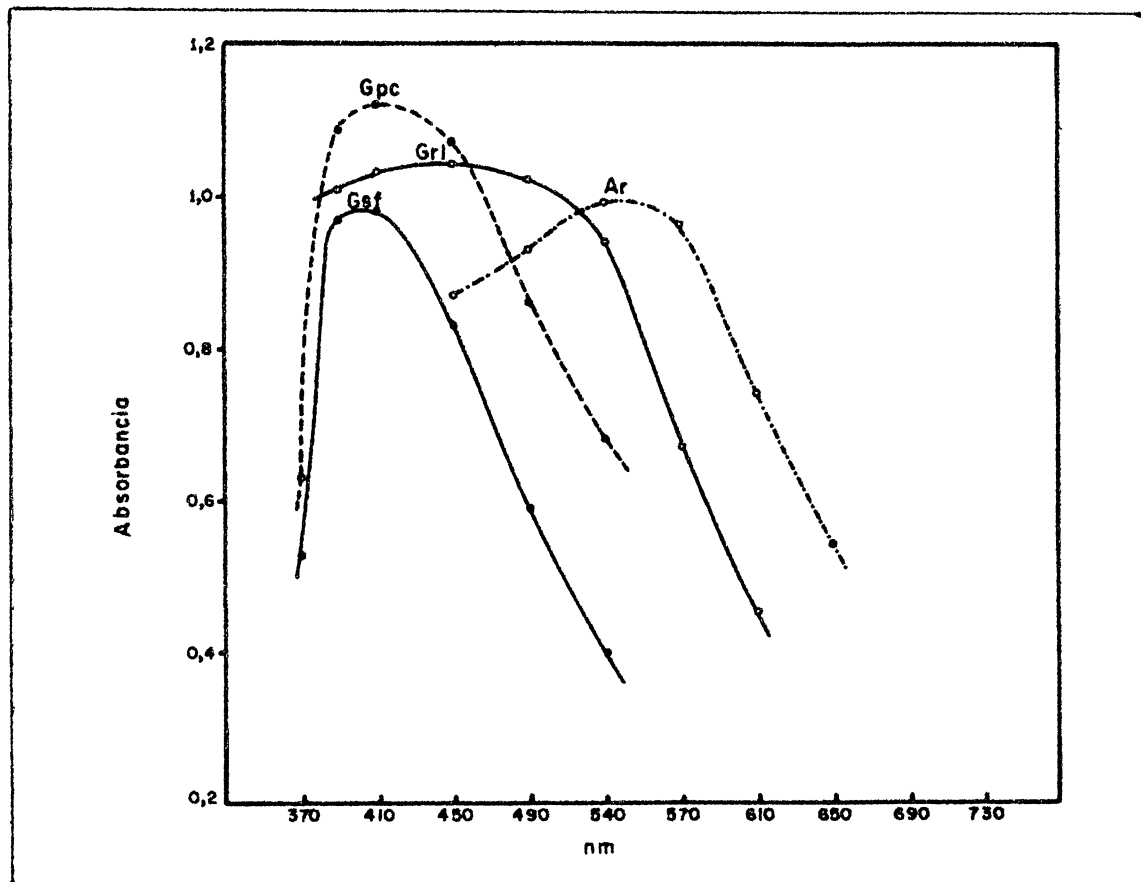


FIG. 8 - ESPECTROFOTOMETRIA DO COMPLEXO IODO-ENDOPOLIGLUCOSE DE Polyporus circinatus NA PRESENÇA DE CaCl_2 SATURADO.

Condições: amilopectina de arroz (Ar) $300\mu\text{g}$; glicogênio de fígado de coelho (Grl) $500\mu\text{g}$; glicogênio de marisco (Gsf) $800\mu\text{g}$; endopoliglucose do fungo (Gpc) $800\mu\text{g}$. Demais condições descritas em Materiais e Métodos.

FIG. 9 - CROMATOGRAMA (TLC) DO HIDROLISADO PARCIAL DO
ENDOPOLIGLUCOSE de Polyporus circinatus.

Gsf = glicogênio de marisco; Gpc = endopoliglucoose de P. circinatus; Hidr. t = eluato da coluna de carvão com etanol a 50%; M, I = t frações dos dissacarídeos do eluato da coluna de carvão com etanol a 10%, separados preparativamente em papel. S gluc, malt, isomalt = padrões de glucose, maltose e isomaltose. A cromatoplaca de sílica, desenvolvida por 3x com o solvente I, foi revelada com a mistura $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{SO}_4-\text{H}_2\text{O}$ 5% (7:2:1), com aquecimento a 90°C.

FIG. 10 - ELETROFORETOGRAMA DOS DIS-
SACARÍDEOS DA HIDRÓLISE
PARCIAL DO ENDOPOLIGLUCOSE DE Poly-
porus circinatus.

M, I = frações (eluídas da coluna de
carvão com etanol a 10%) dos hidro-
lisados do glicogênio de marisco (SF)
e do endopoliglucoze do fungo (Pc).
Pgluc, malt, isom, cel, gent = padrões
de glucoze, maltose, isomaltose, celo-
bioze e gentiobioze. Condições: 1100
V; 85-90 mA; 240 minutos. Revelador:
nitrato de prata amoniaca1 (A).

FIG. 11 - ELETROFORETOGRAMA DOS ALDITÓIS DE DISSACARÍDEOS DA HIDRÓLISE PARCIAL DO ENDOPOLIGLUCOSE DE Polyporus circinatus. -

i, m = frações (eluídas da coluna de carvão com etanol a 10%) dos hidrolisados do glicogênio de marisco (SF) e do endopoliglucose do fungo (Pc), reduzidas com boridreto de sódio. Psorb,malt,isom. = padrões de sorbitol, maltitol e isomaltitol. Condições: 870 V; 85-90 mA; 105 minutos. A revelação foi efetuada com tetracetato de chumbo-fucsina.

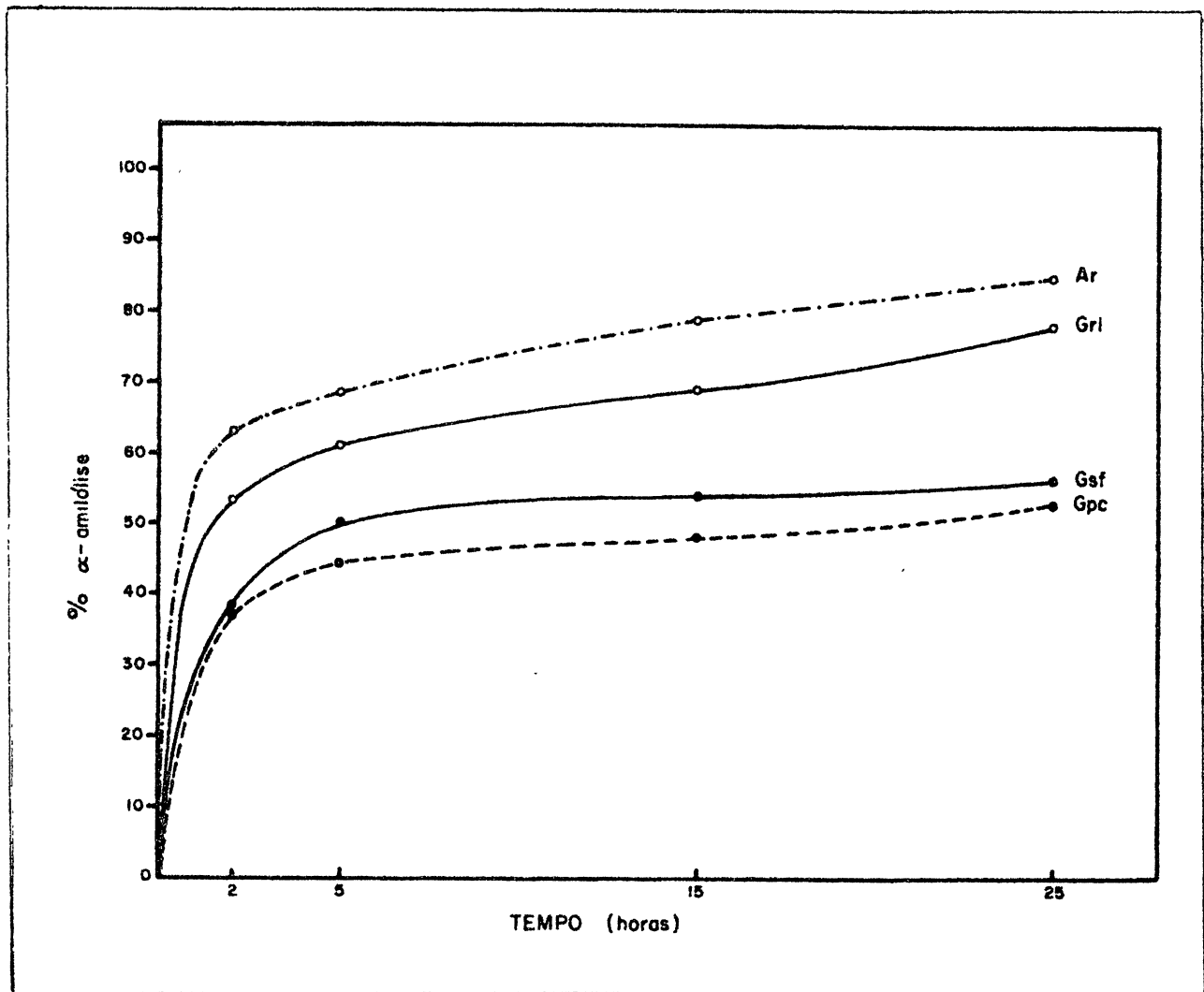


FIG. 12 - CURVA DE HIDRÓLISE DO ENDOPOLIGLUCOSE DE *Polyporus circinatus* COM α -AMILASE.

As condições de ensaio e de análise do curso da reação estão descritas em Materiais e Métodos.

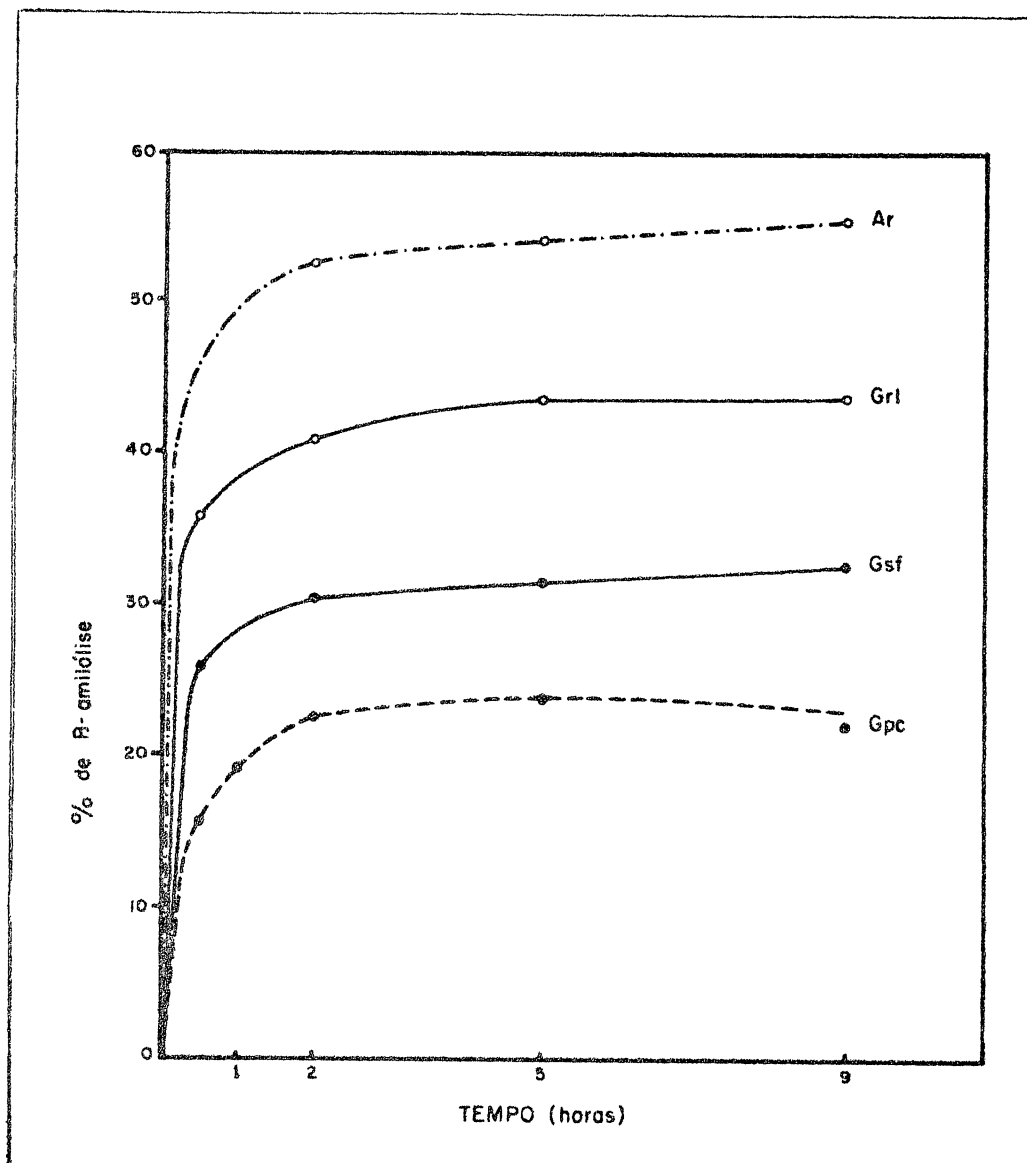


FIG. 13 - CURVA DE HIDRÕLISE DO ENDOPOLIGLUCOSE DE Polyporus circinatus COM β -AMILASE.

As condições de ensaio e de análise são descritas em Mat. Métodos

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDULLAH, M., CATLEY, B.J., LEE, E.Y., BOBYT, J., WALLENFELDS, K. & WHELAN, W.J. II. Pullulanase, an enzyme specific for the hydrolysis of alpha 1,6 bonds in amilaceous oligo and polysaccharides. Cereal Chem., 43:111-118, 1966.
2. ALBERSHEIM, P., NEVINS, D.J., ENGLISH., P.D. & KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carbohyd. Res., 5 : 340-345, 1967.
3. ALEXOPOULOS, C.J. Sub-class homobasidiomycetidae. In: _____, Introductory Mycology, 2nd ed., N.Y.London, J.Wiley, 1962. p.492-531.
4. ANDERSON, D.M.W. & GREENWOOD, C.T. Physicochemical studies on starch. Part III. The interaction of starches and branched α -1,4 glucosans with iodine and a valve microvoltmeter for differential potentiometric titrations. J. Chem. Soc., 3016-3023, 1965.
5. ARCHIBALD, A.R. & MANNERS, D.J. Studies on carbohydrate-metabolizing enzymes. 2. Trans- α -glucosylation by extracts of *Tetrahymena pyriformis*. Biochem. J., 73 : 292-295, 1959.
6. BAILEY, R.W. Colour reactions between sugars and diphenylamine-urea and diphenylamine-p-anisidine on paper chromatograms. J. Chromatogr., 44 : 57-62, 1962.
7. BANKS, W. & GREENWOOD, C.T. Comments on "Enzymic methods for the determination of glycogen and amylopectin and their unit chain-lengths". Arch. Biochem. Biophys., 136 : 320-322, 1970.
8. BARKER, S.A., BOURNE, E.J. & WHIFFEN, D.H. Use of infrared analysis in the determination of carbohydrate structure. In: GLICK, D. (ed) Methods Biochem. Anal., III : 213-245, 1956.
9. BARKER, S.A., BOURNE, E.J., O'MANT, D.M. & STACEY, M. Studies of *Aspergillus niger*. Part VI. The separation and structures of oligosaccharides from nigeran. J. Chem. Soc., 2448-2454, 1957.
10. BARTNICK-GARCIA, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Ann. Rev. Microbiol., 22 : 87-108, 1968.

11. BATHGATE, G.N. & MANNERS, D.J. The specificity of yeast $\alpha(1,6)$ glucosidases (Isoamilase). Biochem. J., 107 : 443-445, 1968.
12. BENDER, H. & WALLENFELDS, K. Pullulanase (an amylopectin and glycogen debranching enzyme) from *Aerobacter aerogenes*. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. (ed) Methods in Enzymol., VIII, N.Y.-London, Acad. Press., 1966. p. 555-559.
13. BERNIER, B. The production of polysaccharides by fungi active in the decomposition of wood and forest litter. Can. J. Microbiol., 4 : 195-204, 1958.
14. BHAVANANDAN, U.P., BOUVENG, H.O. & LINDBERG, B. Polysaccharides from *Polyporus giganteus*. Acta Chem. Scand., 18 : 504-512, 1964.
15. BOBROVA, L.N. & STEPANENKO, B.N. Chromatographic fractionation of glycogen. Biokhimiya, 37 : 697-705, 1972, apud: Carb. Metabol, Abstr., 1, n^o 2, p. 106, 1973.
16. BOURNE, E.J., DONNISON, G.H., HAWORTH, N. & PEAT, S. Thymol and ciclohexanol as fractionating agents for starch. J. Chem. Soc., 1687-1693, 1948.
17. BOURNE, E.J., HUTSON, D.H. and WEIGEL, H. Paper ionophoresis of carbohydrates in molybdate solutions. Chem. Ind., 1047-1048, 1959.
18. BOVENG, H.O., KIESSELING, H., LINDBERG, B. & MCKAY, J. Polysaccharides elaborated by *Pullularia pullulans*. Part. I. The neutral glucan synthesised from sucrose solutions. Acta Chem. Scand., 16, 615-622, 1962.
19. CARTER, J.H. & LEE, E.Y.C. An enzymic method for the determination of the average chain length of glycogens and amylopectins. Anal. Biochem., 39: 373-386, 1971.
20. CHAO, L. & BOWEN, C.C. Purification and Properties of glycogen isolated from a blue-green alga, *Nostoc muscorum*. J. Bacteriol., 105 : 331-338, 1971.
21. CIFONELLI, J.A. & SMITH, F. Turbidimetric method for the determination of yeast mannan and glycogen. Anal. Chem., 27 : 1639-1641, 1955.
22. CIFONELLI, J.A., MONTGOMERY, R. & SMITH, F. The reaction between concanavalin A and glycogen. J. Am. Chem. Soc., 78 : 2485-2488, 1956.

23. COCHRANE, V.W., Carbon Nutrition and Carbon Metabolism. In: _____, Physiology of Fungi, Tokyo, Toppan Co., 1958. p.65,78,83,115.
24. DAVIS, B.D., GILVARG, C. & MITSUHASHI, S. Enzymes of aromatic biosynthesis. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. (ed) Methods Enzymol., II, N.Y. Acad. Press, 1955. p.301-311.
25. DISCHE, Z. Color reactions of pentoses. In: WHISTLER, R.L. & WOLFROM, M.L. (ed) Methods Carbohyd. Chem., I, N.Y.-London, Acad. Press, 1962. p. 484-488.
26. DISCHE, Z. Color reactions of 2-deoxy-sugars. In: WHISTLER, R.L. & WOLFROM M.L. (ed) Methods Carbohyd. Chem., I, N.Y.-London, Acad. Press, 1962. p. 503-507.
27. DOYLE, R.J., PITZ, E.P. & WOODSIDE, E.E. Carbohydrate-Protein complex formation. Some factors affecting the interaction of D-glucose and polysaccharide with concanavalin A. Carbohyd. Res., 8 : 89-100, 1968.
28. DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. and SMITH, F. Colorimetric method for determination of Sugars and related substances. Anal. Chem., 28 : 350-356, 1956.
29. DUDMAN, W.F. & BISHOP, C.T. Electrophoresis on dyed polysaccharides on cellulose acetate. Can. J. Chem., 46 : 3079-3084, 1968.
30. DUFF, R.B. The constitution of a glucosan from the fungus *Polyporus betulinus*. J. Chem. Soc., 2592-2594, 1952.
31. EDDY, B.P. Microbial spoilage. In: RAINBOW, C. & ROSE, A.H. (ed) Biochemistry of industrial micro-organisms, London-N.Y., Acad. Press, 1963. p. 489-507.
32. ERGLE, D.R. The glycogen content of *Phymatotrichum sclerotia*. J. Am. Chem. Soc., 69 : 2061-2062, 1947.
33. FALES, F.W. The assimilation and degradation of carbohydrates by yeasts. J. Biol. Chem., 193 : 113-124, 1951.
34. FALES, F.W. A reproducible periodate oxidation method for the determination of glycogen end-groups. Anal. Chem., 31 : 1898-1900, 1959.
35. FOSTER, A.B. Ionophoresis of some disaccharides. J.Chem. Soc., 982-986, 1.953.

36. FOSTER, J.F. Physical properties of amylose and amylopectin in solution. In: WHISTLER, R.L. & PASCHALL, E.F. (ed) Starch: chemistry and technology, I, N.Y.-London, Acad. Press, 1965. p.350, 367.
37. FRENCH, D. Rapport: Determination of starch structure by enzymes (Discussion). Bull. Soc. Chim. Biol., 42 : 1677 - 1700, 1960.
38. FRENCH, D. & ABDULLAH, M. Specificity of pullulanase. Biochem. J., 100 : 6 e 7-P, 1966.
39. FUNAYAMA, S., comunicação pessoal.
40. GAILLARD, B.D.E. Use of unneutralized hydrolysates in paper chromatography of sugars. Nature, 171 : p.1160, 1953.
41. GOLDEMBERG, S.H. Glucan biosynthesis in *Bacillus stearothermophilus*. I. Properties of the polysaccharide. Arch. Biochem. Biophys., 149 : 252-258, 1972.
42. GOLDSTEIN, I.J., HOLLERMAN, C.E. & MERRICK, J.M., Protein-carbohydrate interaction. 1. Interaction of polysaccharides with concanavalin A. Biochim. Biophys. Acta, 97 : 68-76, 1965.
43. GOODMAN, R.N., KIRÁLY, Z. & ZAITLIN, M. The biochemistry and physiology of infectious plant disease, Princeton, N.J., D.van Nostrand, 1967. p. 109,119,121,138,141,142.
44. GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.F.T. Structural chemistry of fungal polysaccharides. Advan. Carbohyd. Chem., 23 : 367-417, 1963.
45. GORNALL, A.G., BARDAWIEL, C.J. & DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem., 177 : 751-756, 1.949.
46. GOSH, H.P. & PREISS, J. The isolation and characterization of glycogen of *Arthrobacter* sp. NRRL B1973. Biochim. Biophys. Acta, 104 : 274-277, - 1965.
47. GREENWOOD, C.T. & MILNE, E.A. Starch degrading and synthesizing enzymes: a discussion of their properties and action pattern. Advan. Carbohyd. Chem., 23 : 281-366, 1968.

48. HARA, F., AKAZAWA, T. & KOJIMA, K. Glycogen biosynthesis in *Chromatium s-*train D. I. Characterization of glycogen. Plant Cell Physiol., 14 : 737-745, 1973.
49. HEHRE, E.J., CARLSON, A.S. & HAMILTON, D.M. Crystalline amylose from cultures of a pathogenic yeast (*Torula histolytica*). J. Biol. Chem., 177: 289-293, 1949.
50. HONEYMAN, J. & PARSONS, M.A. Molecular structure of cellulose and starch. In: HONEYMAN, J. (ed) Recent advances in the chemistry of cellulose and starch, N.Y., Interscience Publ., 1959. p.65.
51. HOUGH, L., JONES, J.K.N. & WADMAN, W.H. Quantitative analysis of mixtures of sugars by the method of partition chromatography. Part V. Improved method for the separation and detection of the sugars and their methylated derivatives on the paper chromatogram. J. Chem. Soc., 1702-1706, 1950.
52. HUGGET, A.S.G. & DIXON, D.A. Enzymic determination of blood glucose. Biochem. J., 66 : 12-P, 1957.
53. HUGHES, R.C., SMITH, E.E. & WHELAN, W.J. Structure of a pentasaccharide α -limit dextrin formed from amylopectin by *Bacillus subtilis* α -amylase. Biochem. J., 88 : 63-64-P, 1963.
54. ILLINGWORTH, B. & CORI, G.T. Structure of glycogens and amylopectins. III. Normal and abnormal human glycogens. J. Biol. Chem., 199 : 653-660, 1952.
55. ILLINGWORTH, B. & BROWN, D.H. Glycogen storage diseases types III and IV. In: WHELAN, W.J. & CAMERON, M.D. (ed) Control of glycogen metabolism (Ciba symposium foundation), London, J.&A.Churchil, 1964. p.336-353.
56. ISHAK, M.F. & PAINTER, T. The origin of the periodate-resistant D-glucose residues in starches and glycogens. Carbohydr. Res., 32 : 227-237, 1974.
57. JONES, J.K.N. & PAINTER, T.J. The hemicelluloses of Loblolly pine (*Pinus taeda*) wood. Part.I. The isolation of five oligosaccharide fragments. J. Chem. Soc., 669-673, 1957.
58. JØRGENSEN, B.B. & JØRGENSEN, O.B. Inhibition of barley malt α -glucosidase tris (hydroxymethyl)aminomethane and erythritol. Biochim. Biophys. Acta, 146 : 167-172, 1967.

59. JØRGENSEN, O.B. Barley malt α -glucosidase. II. Studies on substrate specificity. Acta. Chem.Scand., 17 : 2471-2478, 1963.
60. KELEMEN, M.V. & WHELAN, W.J. Inhibition of glucosidases and galactosidases by polyols. Arch. Biochem. Biophys., 117 : 423-428, 1966.
61. KERR, R.W. The heterogeneity of amylose and amylopectin. Arch. Biochem., 7 : 377-392, 1945.
62. KIRBY, K.S. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. Biochem. J., 64 : 405-408, 1956.
63. KJØLBERG, O. & MANNERS, D.J. α -1,4 glucosans. Part XV. Structural analysis of glycogens on a milligram scale. J. Chem. Soc., 4596-4600, 1962.
64. KRISMAN, C.R. a method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. Anal. Biochem., 4 : 17-23, 1962.
65. KUHN, L.P. Infrared spectra of carbohydrates. Anal. Chem., 22 : 276-283, 1950.
66. LASKOW, R. & MARGOLIASH, E. Properties of high molecular weight glycogen from rat liver. Bull. Res. Council. of Israel, vol 11-A-4 : 351-362, 1963.
67. LEE, E.Y.C. & WHELAN, W.J. A enzymic impurity in crystalline sweet-potato β -amylase. Biochem. J., 95 : p.27-P, 1965.
68. LEE, E.Y.C. & WHELAN, W.J. Enzymic methods for the determination of glycogen and amylopectin and their unit-chain length. Arch. Biochem. Biophys. 116 : 162-167, 1966.
69. LEE, E.Y.C. & WHELAN, W.J. Glycogen and starch debranching enzymes. In: BOYER, P.D. (ed) The Enzymes, 3th ed, vol V, N.Y.-London, Acad. Press, 1971. p.191-234.
70. LIDDLE, A.M. & MANNERS, D.J. α -1,4 glucosans. Part VI. Further studies on the molecular structure of glycogens. J. Chem. Soc., 3432-3436, 1957.
71. LOWRY, O.H., ROSENBOUGH, N.J., FARR, L. & RANDALL, R.J. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265-275, 1961.
72. MANNERS, D.J. The molecular structure of glycogens. Advan. Carbohydr. Chem. 12 : 261-298, 1957.

73. MANNERS, D.J. Enzymic synthesis and degradation of starch and glycogen. Advan. Carbohyd. Chem., 17 : 371-430, 1962.
74. MANNERS, D.J. & WRIGHT, A. A case of limit dextrinosis. Biochem. J., 79 : p. 18-P, 1961.
75. MANNERS, D.J. & WRIGHT, A. α -1,4 glucosans. Part XIII. Determination of the average chain length of glycogens by α -amylolysis. J. Chem. Soc., 1597-1602, 1962.
76. MANNERS, D.J. & WRIGHT, A. α -1,4 glucosans. Part XIV. The interaction of concanavalin A with glycogens. J. Chem. Soc., 4592-4595, 1962.
77. MARKUS, Z., MILLER, G. & AVIGAD, G. Effect of culture conditions on the production of D-galactose oxidase by *Dactylium dendroides*. App. Micro - biol., 13 : 686-693, 1965.
78. MARUYAMA, T., NYWA, M., YAMAMOTO, T., NISHIDA, A. & FUKUMOTO, J. Immuno - chemical studies on the renaturation of heat-inactivated α -amylase of *Bacillus subtilis*. J. Biochem., 60 : 286-294, 1966.
79. MEEUSE, B.J.D. Studies on the cell wall starch of *Herichium*. In: FREDRICK, J.F. (ed) Storage Polyglucosides, Ann. N.Y. Acad. Sci., vol. 210, 1973. p. 39-45.
80. MERCIER, C. & WHELAN, W.J. The fine structure of glycogen from type IV gly cogen-storage disease. Eur. J. Biochem., 16 : 579-583, 1970.
81. MUKERJEE, H. & SRI RAM, J. A new solvent system for paper chromatographic separation of glucuronic and galacturonic acids. J. Chromatogr., 14 : 551-552, 1964.
82. NEELY, W.B. Infrared spectra of carbohydrates. Advan. Carbohyd. Chem., 12: 13-33, 1957.
83. NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determi nation of glucose. J. Biol. Chem., 153 : 375-380, 1944.
84. NELSON, T.E., SCALETTI, J.V., SMITH, F. & KIRKWOOD, S. The specificity of an exo- β -D-(1 \rightarrow 3)-glucanase that hydrolyses a β -D-(1 \rightarrow 3)-xylan. Fed. Proc. 22 : p.297, 1963.

85. OLSON, M.O.J. & LIENER, I.E. Some physical and chemical properties of Con canavalin A, the phytohemagglutinin of the jack-bean. Biochemistry, 6 : 105-111, 1967.
86. ORELL, Jr., S.A. & BUEDING, E. Sedimentation characteristics of glycogen. J. Am. Chem. Soc., 80 : p.3800, 1958.
87. PARKES, G.D. Silicon, Tin and Lead and other elements of group IV. In: _____ (ed) Mellor's Modern Inorganic Chemistry, London, Longmans, 1961. p.801.
88. PEAT, S., WHELAN, W.J. & EDWARDS, T.E. Polysaccharides of baker's yeast. Part I. Glycogen. J. Chem. Soc., 355-359, 1955.
89. PETERSON, G., COWLING, E.B. & PORATH, J. Studies on cellulolytic enzymes. I. Isolation of a low molecular weight cellulase from Polyporus versicolor. Biochim. Biophys. Acta, 67 : 1-8, 1963.
90. PINOTTI, M.H. & ZANCAN, G.T. Polysaccharides production by Polyporus circinatus, Fr.. Rev. Microbiol., 3 (1) : 35-38, 1972.
91. POTTER, A.L. & HASSID, W.Z. Starch. V. The Uniformity of the degree of branching in amylopectin. J. Am. Chem. Soc., 73 : 997-998, 1951.
92. PREISS, J. The regulation of the biosynthesis of the α 1,4 glucans in bacteria and plants. In: HORECKER, B.L. & STADMAN, E.R. (ed) Current Topics in Cellular Regulation, vol 1, N.Y.-London, Acad. Press, 1969. p.125-160.
93. PREISS, J., OZBUN, J.L., HAWKER, J.S. GREENBERG, E. & LAMMEL, C. ADPG synthetase and ADPG- α -glucan 4-glucosyl transferase: Enzymes involved in bacterial and plant starch synthesis. In: FREDRICK, J.F. (ed) Storage Polyglucosides, Ann. N.Y. Acad. Sci., vol. 210 : 265-278, 1973.
94. RICKSON, F.R. Review of glycogen plastid differentiation in Müllerian body cells of Cecropia peltata. In: FREDRICK, J.F. (ed) Storage Polyglucosides, Ann. N.Y. Acad. Sci., vol. 210 : 104-114, 1973.
95. ROBERTS, P.J.P. & WHELAN, W.J. The mechanism of carbohydrase action. 5. Action of human salivary α -amylase on amylopectin and glycogen. Biochem. J., 76 : 246-253, 1960.

96. SAMPSON, K., SCHILD, F. & WICKER, R.J. An improvement to the lead tetra-acetate detection of sugar alcohols in paper electrophoresis. Chem. Ind., p.82, 1961.
97. SCHWIMMER, S. & BEVENUE, A. Reagent for differentiation of 1,4 and 1,6 linked glucosaccharides. Science, 123 : 543-544, 1956.
98. SCOTT, G.T., JACOBSON, M.A. & RICE, M.E. The influence of glycolytic factors on the potassium and sodium content of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem., 30 : 282-291, 1951.
99. SHANNON, J.C. & CREECH, R.G. Thin-Layer chromatography of malto-oligosaccharides. J. Chromatogr., 44 : 307-314, 1969.
100. SIGAL, N., CATTANEO, J. & SEGEL, I.H. Glycogen Accumulation by wild-type and uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase-negative strains of *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys., 108 : 440-451, 1964.
101. SO, L.L. & GOLDSTEIN, I.J. Protein-carbohydrate interaction. IV. Application of the quantitative precipitin method to polysaccharides-concanavalin A interaction. J. Biol. Chem., 242 : 1617-1622, 1967.
102. SOLMS, von J., DENZLER, A. & DEUEL, H. Über Polygalakturonsäureamide. Helv. Chim. Acta, 37 : 2153-2160, 1954.
103. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem., 160 : 61-68, 1945.
104. SOWA, W., BLACKWOOD, A.C. & ADAMS, G.A. Neutral extracellular glucan of *Pullularia pullulans* (de Bary) Berckout. Can. J. Chem., 41 : 2314-2319, 1.963.
105. SPEDDING, H. Infrared spectroscopy. Methods Carbohyd. Chem., 1 : 539-550, 1.962.
106. STANIER, R.Y., DOUDOROFF, M. & ADELBERG, E.A. The higher protists: Fungi. In: _____, The Microbial World, Englewood Cliffs, N.J., Prentice-Hall, 4th ed, 1961. p.83,88,89.
107. STAUB, A.M. Removal of Proteins. Sevag Method. In: WHISTLER, R. (ed) Methods Carbohyd. Chem., V, N.Y.-London, Acad. Press, 1965. p.5-6.

108. STETTEN, M.R., KATZEN, H.M. & STETTEN Jr., D. Metabolic Inhomogeneity of glycogen as a function of molecular weight. J. Biol. Chem., 222 : 587-599, 1956.
109. VILLAR-PALASI, C. & LARNER, J. Glycogen metabolism and glycolytic enzymes. Ann. Rev. Biochem., 39 : 639-672, 1970.
110. THE SADTLER STANDARD SPECTRA - Sadtler Res. Labor. (Publishiers), Philadelphia, 1967. Vols. 1 (ref. 1037) e 8 (ref. 8951).
111. THOMPSON, A., WOLFROTH, M.L. & QUINN, E.J. Acid reversion in relation to isomaltose as a starch hydrolytic product. J. Am. Chem. Soc., 75 : 3003-3004, 1953-
112. TOAMA, M.A. & RAPER, K.B. Microcysts of the cellular slime mold Polysphondylium pallidum. II. Chemistry of the microcysts walls. J. Bacteriol., 94 : 1150-1153, 1967.
113. TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166 : 444-445, 1950.
114. TREVELYAN, W.E. Synthesis and degradation of cellular carbohydrates by yeasts. In: COOK, A.H. (ed) The Chemistry and Biology of Yeasts, N.Y. Acad. Press, 1958. p.369-436-
115. YAMAGUCHI, H., KANDA, Y. & YWATA, K. Macromolecular structure and Morphology of native glycogen particles from Candida albicans. J. Bacteriol., 120 : 441-449, 1974.
116. WALKER, G.J. & WHELAN, W.J. The Mechanism of carbohydrase action. 7. Stages in the salivary α -amylolysis of amylose, amylopectin and glycogen. Biochem. J., 76 : 257-263, 1960.
117. WALKER, G.J. & WHELAN, W.J. The mechanism of carbohydrase action: 8. Structure of the muscle phosphorylase limit dextrins of glycogen and amylopectin. Biochem. J., 76 : 264-268, 1960.
118. WALKER, L.B. & ANDERSEN, E.N. Relation of glycogen to spore-ejection. Mycologia, XVII (4) : 154-159, 1925.
119. WANSON, J.C. & DROCHMANS, P. Rabbit skeletal muscle glycogen. A morphological and biochemical study of glycogen β -particles isolated by the precipitation-centrifugation method. J. Cell Biol., 38 : 130-150, 1968.

120. WARD, C. & WRIGHT, B.E. Cell wall synthesis in *Dictyostellium discoideum*.
I. In vitro synthesis from uridine diphosphoglucose. Biochemistry , 4 :
2021-2027, 1965.
121. WESTPHAL, V.O., LÜDERITZ, O. & BISTER, F. Über die Extraktion von Bakte -
rien mit Phenol/Wasser. Z. Naturforsch., 7-b :148-155, 1952.
122. WESTPHAL, O. & JANN, K. Bacterial tyopolysaccharides. Extraction with
Phenol-water and further applications of the procedure. In: WHISTLER, R.
Methods Carbohyd. Chem., V, N.Y.-London, Acad. Press, 1965. p.83-91.
123. WHITE, G.J. & SUSSMAN, M. Polysaccharides involved in slime-mold develop -
ment. I. Water-soluble glucose polymer(s). Biochem.Biophys. Acta, 74 :
173-173, 1963.
124. Wimer, L.T., LUMB, R.H. & TATE, L.G. Glycogen changes during metamorpho -
sis of *Phormia regina*. Exp. Physiol. Biochem., 3 : 365-415, 1970.
125. WOLFROM, M.L., LASSETTRE, E.N. & O'NEIL, A.N. Degradation of glycogen to
isomaltose. J. Am. Chem. Soc., 73 : 595-599, 1951.
126. WOLFROM, M.L. & THOMPSON, A. Degradation of glycogen to isomaltose and ni -
gerose. J. Am. Chem. Soc., 79 : 4212-4215, 1957.
127. ZANCAN, G.T. Leloir's pathway in *Polyporus circinatus*. Can J. Microbiol.,
17 : 563-565, 1971.
128. ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. Formation and function of the glycogen-like polysac -
charide of *Arthrobacter*. Antonie van Leeuwenhoek, 32 :356-372, 1966.