

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos

Estudo das Características Bioquímicas da
Pululanase de Klebsiella sp e sua Aplicação

SATO

Hélia Harumi Sato *et al.*

Orientador : Prof. Dr. Yong Kun Park

09/91

Processo

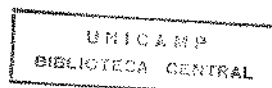
Este exemplar corresponde
a versão final da tese
degradada por Hélia Harumi
Sato e aprovada pela
comissão julgadora em
27.03.91.

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências de Alimentos.

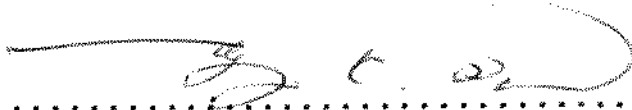
8C/1103423

Park, Yong Kun

Y. K. Park



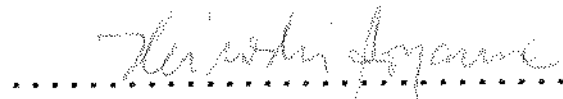
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Yong Kun Park
(orientador)



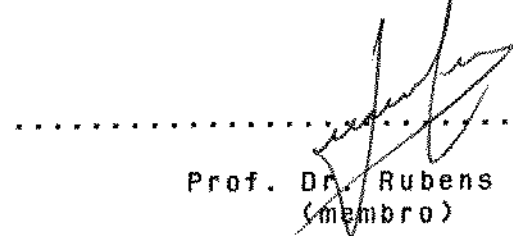
Prof. Dra. Iracema Oliveira de Moraes
(membro)



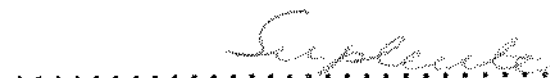
Prof. Dr. Hiroshi Aoyama
(membro)



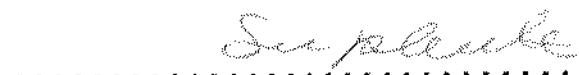
Prof. Dr. Raul Jorge H. Castro Gomez
(membro)



Prof. Dr. Rubens Cruz
(membro)



Prof. Dra. Lucia Regina Durrant
(membro)



Prof. Dr. Valtter Robert Linardi
(membro)

Campinas, 27 de maio de 1991

Aos meus irmãos e ao meu pai,

pela união e compreensão constantes.

Aos meus sobrinhos com carinho.

AGRADECIMENTOS :

Ao Prof. Yong K. Park, pela orientação dedicada, confiança e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À D. Lucy, Sr. Douglas Stach e filhas, pelo carinho e apoio.

À Maria Regina, Maura, Célia e Beth, pela amizade, apoio e harmonia.

À Prof. Gláucia Maria Pastore, pelas sugestões apresentadas na redação final da tese, pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Vanderlei Perez Canhos, pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Frederick Carl Strong III, pela boa vontade e gentileza para a aquisição de reagentes e materiais no exterior.

À Maria das Dores de Oliveira, pela amizade e grande cooperação em todos estes anos.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Ciências de Alimentos, pela ajuda valiosa e amizade.

Ao Sr. Remolo Ciola de Instrumentos Científicos C.G., por permitir a utilização de equipamentos e à Sonia Salcedo, pela cooperação e auxílio técnico.

À Esmeralda Zanchetta Borghi, pela confecção dos desenhos.

Ao Celso Roberto, Márcia Marini e Evelyn Crespo, pelos serviços de datilografia.

À Gícera, Jardette, Marcos e Franceli, da Secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos, pela gentileza e constante atenção.

Aos amigos do Departamento de Ciências de Alimentos e do Laboratório de Bioquímica de Alimentos que, de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho.

À Telma Sílvia T.A. Sallum e Cristiane Alfredo, da Secretaria de Pós-Graduação, pela constante atenção.

À todos aqueles que, com apoio e compreensão tornaram possível esta pesquisa.

À ABIA, Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, pela edição deste trabalho.

ÍNDICE :

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS	71
3.1. Materiais	71
3.1.1. Reagentes e Materiais Específicos	71
3.1.2. Equipamentos	73
3.2. Métodos.....	74
3.2.1. Isolamento e Seleção de Microrganismos Produtores de Enzimas Amilolíticas Desramificantes	74
3.2.1.1. Coleta de Amostras	74
3.2.1.2. Isolamento de Microrganismos	75
3.2.1.3. Seleção Preliminar de Microrganismos Produtores de Enzimas Amilolíticas Desramificantes	76
3.2.1.4. Seleção do Microrganismo Melhor Produtor de Pululanase	76

3.2.1.5. Determinação da Atividade de Enzimas Amilolíticas	77
3.2.1.5.1. Determinação da Atividade de Pululanase	77
3.2.1.5.1.a. Determinação da Atividade de Pululanase	
Utilizando-se Substrato Pululana	77
3.2.1.5.1.b. Determinação da Atividade de Pululanase	
Utilizando-se Substrato Amilopectina	78
3.2.1.5.2. Determinação da Atividade de Isoamilase	79
3.2.1.5.3. Determinação da Atividade de alfa-Amilase	80
3.2.1.5.4. Determinação da Atividade de beta-Amilase	81
3.2.1.5.5. Determinação da Atividade de Amiloglicosidase	81
3.2.1.6. Cromatografia de Açúcares em Papel	83
3.2.1.7. Cromatografia Líquida de Alta Pressão dos	
Produtos de Hidrólise do Amido	83
3.2.2. Identificação e Conservação da Linhagem Produtora	
de Pululanase	84
3.2.3. Produção de Pululanase pela Linhagem de	
Klebsiella sp em Diferentes Meios de Cultura	84
3.2.4. Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação, Al-	
teração de pH do Meio de Cultura, Crescimento do	
Microorganismo e Produção de Enzima a 28, 30 e 35oC	85
3.2.4.1. Preparação do Inóculo	86
3.2.4.2. Fermentação	86
3.2.4.3. Determinação de Crescimento do Microorganismo	87
3.2.4.4. Determinação da Amilopectina Residual no Meio de	
Cultura	87
3.2.5. Produção e Purificação de Pululanase	88
3.2.5.1. Produção da Pululanase	88

3.2.5.2. Purificação da Pululanase	89
3.2.5.2.1. Fracionamento da Pululanase com Sulfato de Amônio	89
3.2.5.2.2. Cromatografia da Pululanase em Coluna de DEAE-celulose	89
3.2.5.2.3. Cromatografia da Pululanase em Coluna de CM-celulose	90
3.2.6. Fracionamento das Preparações Comerciais de alfa- Amilase e Amiloglicosidase com Sulfato de Amônio ..	92
3.2.6.1. Fracionamento das Preparações Comerciais de Alfa-Amilase com Sulfato de Amônio	92
3.2.6.2. Fracionamento da Preparação Comercial de Amiloglicosidase com Sulfato de Amônio	93
3.2.7. Caracterização da Pululanase Purificada	93
3.2.7.1. Efeito do pH na Atividade Enzimática	94
3.2.7.2. Efeito do pH na Estabilidade da Enzima	94
3.2.7.3. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática	95
3.2.7.4. Estabilidade Térmica da Pululanase	95
3.2.7.5. Efeito de Sais Minerais e Outros Compostos Inorgânicos na Atividade Enzimática	96
3.2.7.6. Efeito de Inibidores na Atividade Enzimática	97
3.2.7.7. Efeito da Concentração de Substrato na Atividade Enzimática	98
3.2.7.8. Determinação do Peso Molecular da Pululanase	99
3.2.7.9. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	100
3.2.8. Produção de Glicose	101
3.2.8.1. Hidrólise de Amido com alfa-Amilase Bacteriana ...	101

3.2.8.2. Efeito da Concentração de Amiloglicosidase na Hidrólise de Amido Liquefeito	103
3.2.8.3. Produção de Glicose a partir de Amido de Mandioca e de Milho	104
3.2.8.3.1. Preparo das Amostras de Amido Liquefeito	104
3.2.8.3.2. Sacarificação de Amido Liquefeito Utilizando-se Amiloglicosidase	105
3.2.8.3.3. Sacarificação de Amido Liquefeito Utilizando-se Amiloglicosidase e Pululanase	106
3.2.9. Produção de Maltose	106
3.2.9.1. Produção de Maltose a partir de Amido de Mandioca e de Milho Utilizando-se beta-Amilase Purificada	107
3.2.9.2. Produção de Maltose a partir de Amido de Mandioca e de Milho pela Ação Simultânea de beta-Amilase e Pululanase Purificadas	107
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
4.1. Isolamento e Seleção de Microrganismos	109
4.1.1. Isolamento e Seleção Preliminar de Microrganismos Produtores de Enzimas Amilolíticas Desramificantes .	109
4.1.2. Seleção do Microrganismo Melhor Produtor de Pululanase	110
4.2. Identificação da Linhagem Produtora de Pululanase	111
4.3. Produção de Pululanase pela Linhagem de <i>Klebsiella</i> sp em Diferentes meios de Cultura	112
4.4. Relação entre Tempo de Fermentação, Alteração de	

pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Enzima a 28, 30 e 35 °C.	113
4.5. Produção e Purificação da Pululanase	116
4.6. Fracionamento das Preparações Comerciais de alfa- Amilase e Amiloglicosidase com Sulfato de Amônio	117
4.7. Caracterização da Pululanase Purificada	118
4.7.1. Efeito do pH na Atividade Enzimática	118
4.7.2. Efeito do pH na Estabilidade da Enzima	119
4.7.3. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática	121
4.7.4. Estabilidade Térmica da Enzima	122
4.7.5. Efeito de Sais Minerais e Outros Compostos Inorgânicos na Atividade Enzimática	124
4.7.6. Efeito de Inibidores na Atividade Enzimática	126
4.7.7. Efeito da Concentração de Substrato na Atividade Enzimática	127
4.7.8. Determinação do Peso Molecular da Enzima	128
4.7.9. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	132
4.8. Produção de Glicose	133
4.8.1. Hidrólise de Amido com alfa-Amilase Bacteriana	133
4.8.2. Efeito da Concentração de Amiloglicosidase na Hidrólise de Amido Liquefeito	134
4.8.3. Produção de Glicose a partir de Amido de Mandioca e de Milho	135
4.9. Produção de Maltose	137
4.9.1. Produção de Maltose a partir de Amido de Mandioca e de Milho Utilizando-se beta-Amilase Purificada ...	138
4.9.2. Produção de Maltose a partir de Amido de Mandioca	

e de Milho pela Ação Simultânea de beta-Amilase e Pululanase Purificadas	139
6. CONCLUSÕES	184
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	188

ÍNDICE DE TABELAS :

Página

Tabela	1 - Composição dos Meios de Cultura	141
Tabela	2 - Seleção do Microrganismo Melhor Produtor de Pululanase através da Cultura em Frascos sob Agitação	142
Tabela	3 - Características Microscópicas e Fisiológicas da Linhagem <i>Klebsiella</i> sp no. 192	143
Tabela	4 - Produção de Pululanase Extracelular e Ligada à Célula pelo Microrganismo <i>Klebsiella</i> sp no. 192 em Diferentes Meios de Cultura Descritos na Tabela 1	144
Tabela	5 - Pululanases Microbianas	145
Tabela	6 - Purificação da Pululanase Extracelular de <i>Klebsiella</i> sp no. 192	146
Tabela	7 - Efeito de Sais Minerais e Outros Compostos Inorgânicos na Atividade de Pululanase sobre os Substratos Pululana e Amilopectina ...	147
Tabela	8 - Efeito de Inibidores de Enzimas na Atividade	

	de Pululanase sobre Pululana e Amilopectina	148
Tabela 9 -	Efeito da Pululanase na Sacarificação de Amido de Mandioca Liquefeito	149
Tabela 10 -	Efeito da Pululanase na Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito	150
Tabela 11 -	Aplicação de beta-Amilase e Pululanase Purificadas na Produção de Maltose a partir de Amido de Mandioca e de Milho	151

ÍNDICE DE FIGURAS :

	Página
Figura 1 - Isolamento de Microrganismos Produtores de Enzimas Amilolíticas Desramificantes	153
Figura 2 - Seleção de Microrganismos Produtores de Enzimas Amilolíticas Desramificantes	154
Figura 3 - Representação Esquemática da Ação de Enzimas Amilolíticas alfa-Amilase, Amiloglicosidase, beta-Amilase e Enzimas Desramificantes sobre Amilopectina	155
Figura 4 - Hidrólise de Pululana pela Pululanase	156
Figura 5 - Curva Padrão de Atividade de alfa-Amilase	157
Figura 6 - Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação, Alteração de pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Pululanase a 28 °C	158
Figura 7 - Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação, Alteração de pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Pululanase a 30 °C	159

Figura 8 - Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação, Alteração de pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Pululanase a 35 °C	160
Figura 9 - Fluxograma de Produção e Purificação de Pululanase	161
Figura 10 - Cromatografia da Pululanase em Coluna de DEAE- celulose	162
Figura 11 - Cromatografia da Pululanase em Coluna de CM- celulose	163
Figura 12 - Efeito do pH na Atividade de Pululanase	164
Figura 13 - Efeito do pH na Estabilidade de Pululanase	165
Figura 14 - Efeito da Temperatura na Atividade de Pululanase.	166

Figura 15 - Estabilidade Térmica da Pululanase	167
Figura 16 - Efeito da Concentração do Substrato Pululana na Atividade de Pululanase	168
Figura 17 - Efeito da Concentração do Substrato Amilopectina na Atividade de Pululanase	169
Figura 18 - Eluição das Proteínas em Coluna de Sephadex G-200	170
Figura 19 - Relação entre Volume de Eluição e Peso Molecular das Proteínas em Coluna de Sephadex G-200	171
Figura 20 - Eletroforese da Pululanase em Gel de Polia- crlamida	172
Figura 21 - Hidrólise de Amido de Mandioca e de Milho com alfa-Amilase de <i>B. subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i>	173
Figura 22 - Efeito da Concentração de Amiloglicosidase na Sacarificação de Amido de Mandioca em pH 4,3	174

Figura 23 - Efeito da Concentração de Amiloglicosidase na Sacarificação de Amido de Milho em pH 4,3	175
Figura 24 - Efeito da Concentração de Amiloglicosidase na Sacarificação de Amido de Mandioca em pH 6,0	176
Figura 25 - Efeito da Concentração de Amiloglicosidase na Sacarificação de Amido de Milho em pH 6,0	177
Figura 26 - Cromatogramas Ilustrando o Perfil de Carbol- dratos Produzidos após Sacarificação de Amido de Mandioca Liquefeito, com Amiloglicosidase e Pululanase a 50 oC durante 48 horas	178
Figura 27 - Cromatogramas Ilustrando o Perfil de Carbol- dratos Produzidos após Sacarificação de Amido de Mandioca Liquefeito, com Amiloglicosidase e Pululanase a 50 oC durante 72 horas	179
Figura 28 - Cromatogramas Ilustrando o Perfil de Carbol- dratos Produzidos após Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito, com Amiloglicosidase e Pululanase a 50 oC durante 48 horas	180

Figura 29 - Cromatogramas ilustrando o Perfil de Carboi- dratos Produzidos após Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito, com Amiloglicosidase e Pululanase a 50 oC durante 72 horas	181
Figura 30 - Cromatogramas ilustrando o Perfil de Carboi- dratos Produzidos após Hidrólise de Amido de Mandioca com beta-Amilase e Pululanase Purificadas	182
Figura 31 - Cromatogramas ilustrando o Perfil de Carboi- dratos Produzidos após Hidrólise de Amido de Milho com beta-Amilase e Pululanase Purificadas	183

RESUMO :

Duas mil cento e quarenta linhagens de microrganismos foram isoladas de amostras de solo, frutas e flores e testadas quanto à capacidade de desramificar a amilopectina. Dez linhagens de bactérias foram selecionadas preliminarmente como produtoras de enzimas amilolíticas desramificantes. Entre estas, uma linhagem identificada como *Klebsiella sp* apresentou alta produtividade de pululanase.

A enzima amilolítica desramificante de *Klebsiella sp* hidrolisou as ligações glicosídicas alfa-1,6 do amido e da pululana (polímero de maltotrioses unidas pela extremidade por ligações glicosídicas alfa-1,6). A enzima pode ser classificada como uma pululanase (pululana 6-glucanohidrolase, E.C.3.2.1.41.).

Estudou-se a produção da pululanase extracelular pela linhagem selecionada de *Klebsiella sp* e a enzima foi purificada através de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-celulose e CM-celulose. A eletroforese da enzima purificada em gel de poliacrilamida e amilopectina mostrou uma banda de atividade amilolítica desramificante. A enzima purificada foi caracterizada. A

enzima apresentou atividade ótima em pH 6,0 e a 50 °C. A atividade enzimática não foi afetada por NaCl; KCl; Li_2SO_4 ; Al_2O_3 ; $\text{Ba}(\text{OH})_2$; CaCO_3 ; NiSO_4 ; MgCl_2 ; ZnSO_4 ; MnCl_2 ; CuSO_4 ; $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$; FeCl_3 e CaCl_2 porém foi fortemente inibida por HgCl_2 na concentração 1 mM de sal em relação ao volume final da mistura de reação.

O reagente N-bromosuccinimida na concentração 0,1 mM em relação ao volume final da mistura de reação inibiu totalmente a atividade de pululanase, indicando que resíduos triptofano podem estar envolvidos na atividade enzimática. p-Cloromercuribenzoato e Iodoacetamida não inibiram a pululanase de *Klebsiella* sp, indicando que grupos tiol não estão envolvidos na atividade enzimática.

Verificou-se que a aplicação de amiloglicosidase e de pululanase na etapa de sacarificação de mandioca reduz o tempo de reação e aumenta o rendimento de glicose.

A aplicação de pululanase em combinação com beta-amilase aumentou o rendimento na obtenção de maltose a partir de amido.

SUMMARY :

Two thousand one hundred and forty strains of microorganisms were isolated from soil, fruit and flower samples and examined for their capacity to debranch alpha-1,6 glucosidic linkages in amylopectins. Ten strains of bacteria which produce starch debranching enzymes were selected. Of these, one strain, which was classified as *Klebsiella* sp, demonstrated the highest pullulanase activity. The starch debranching enzyme of *Klebsiella* sp was found to hydrolyze the alpha-1,6 glucosidic bond of starch and pullulan (a polymer of maltotriose units joined by alpha-1,6 glucosidic linkages). The enzyme can be classified as pullulanase (pullulan 6-glucanohydrolase E.C.3.2.1.41.).

The production of extracellular pullulanase was performed by using the selected strain of *Klebsiella* sp, and the enzyme was purified by fractionation with ammonium sulfate, DEAE-cellulose and CM-cellulose column chromatography. Electrophoresis of the purified enzyme using a mixed polyacrilamide and amylopectin gel showed one band which had debranching activity. The purified enzyme was characterized. The optimum pH and temperature of the enzyme were 6 and 50 °C respectively. The enzyme activity was not affected by 1 mM NaCl, KCl, Li_2SO_4 ; Al_2O_3 ; $\text{Ba}(\text{OH})_2$; CaCO_3 ;

NiSO_4 ; MgCl_2 ; CoCl_2 ; ZnSO_4 ; MnCl_2 ; CuSO_4 ; $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$; FeCl_3
 and CaCl_2 in the final reaction volume, but it was strongly
 inhibited by HgCl_2 .

A concentration of 0,1 mM of the reagent N-bromosuccinimide in the final reaction volume totally inhibited the pullulanase activity, indicating that tryptophan residues may be involved in the enzymatic activity. p-Chloromercuribenzoate and iodoacetamide did not inhibit pullulanase activity of *Klebsiella* sp, indicating that thiol groups are not involved in the enzyme activity.

It was found that when a mixture of amilloglucosidase and pullulanase was used for the saccharification of cassava starch, the reaction time was reduced and the yield of glucose increased. The application of pullulanase together with beta-amylase also increased the yield of maltose derived from starch.

1 - INTRODUÇÃO :

As pululanases (pululana 6 glucanohidrolase, E.C. 3.2.1.41.) hidrolisam especificamente as ligações glicosídicas alfa-1,6 do amido, pululana e produtos de degradação. Sua especificidade difere das amilases mais conhecidas como: alfa-amilase (alfa-1,4 glucano, 4-glucano-hidrolase, E.C. 3.2.1.1.) e beta-amilase (alfa-1,4 glucano maltohidrolase, E.C. 3.2.1.2.) que hidrolisam as ligações glicosídicas alfa-1,4 do amido, glicogênio e produtos de degradação. Diferencia-se das glicoamilases ou amiloglicosidases (alfa-1,4 glucano glicohidrolase, E.C. 3.2.1.3.) que hidrolisam as ligações glicosídicas alfa-1,4 do amido e também as ligações glicosídicas alfa-1,6 e alfa-1,3, porém em menor velocidade. A especificidade da pululanase em hidrolisar as ligações glicosídicas alfa-1,6 de dextrinas ramificadas torna-a importante na análise estrutural de amilopectina e glicogênio e de interesse potencial na indústria de conversão de amido.

A pululanase aplicada em combinação com a amiloglicosidase aumenta a velocidade de sacarificação e o rendimento de glicose a partir de amido. A enzima desramificante utilizada em conjunto com a beta-amilase aumenta a produção de maltose a partir de amido. Os xaropes de glicose têm grande aplicação em confeitaria, em

panificação e na produção de geléias, conservas, bebidas carbonatadas e fermentadas. Os xaropes contendo maltose como maior componente oferecem resistência a formação de cor, a absorção de umidade e a cristalização tornando-o adequado para uso em confeitaria. Estes xaropes contendo alta concentração de açúcares fermentáveis podem ser utilizados em panificação, cervejaria e outros processos fermentativos. As enzimas desramificantes como a pululanase podem também ser utilizadas na fabricação de cerveja a partir de cereais não maltados.

O presente trabalho visa o isolamento e seleção de microrganismo produtor de enzima amilolítica desramificante pululanase que hidrolisa as ligações glicosídicas alfa-1,6 do amido e pululana.

O microrganismo melhor produtor de pululanase será submetido ao estudo de produção de enzimas em diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação.

A preparação bruta de pululanase extracelular de *Klebsiella* sp n^o 192 será submetida à purificação através de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-celulose e CM-celulose para a caracterização bioquímica de enzima.

Estudar-se-á a aplicação de pululanase nos processos de produção de glicose e de maltose a partir de amido utilizando-se respectivamente amiloglicosidase e beta-amilase.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA :

A primeira enzima amilolítica desramificante do tipo pululanase, descrita em 1951 por Hobson et alii (61), foi obtida de plantas superiores: *Vicia faba* (feijão fava) e *Solanum tuberosum* (batata) e denominada R-enzima (amilopectina 6-glucanohidrolase E.C. 3.2.1.9.). A enzima desramificante hidrolisava as ligações glicosídicas alfa-1,6 da amilopectina e beta-dextrina limite, de amilopectina com um aumento característico da coloração azul com solução de iodo.

Em 1951, Kerr et alii (73), verificaram que a amiloglicosidase de *Aspergillus niger* hidrolisava amilose e amilopectina liberando unidades de glicose.

Pool e Underkofler, em 1953 (123) descreveram o uso de enzimas sacarificantes fúngicas para a conversão de amido no processo de fermentação alcoólica. As preparações enzimáticas de *Aspergillus niger* NRRL 300 apresentavam alta atividade de maltase e baixa atividade de alfa-amilase. As preparações enzimáticas de *Aspergillus oryzae* ISC-38b mostravam alta atividade de alfa-amilase e baixa atividade de maltase e dextrinase limite, enquanto que as soluções enzimáticas de *A. niger* NRRL 337 possuíam alta atividade de dextrinase limite e atividade intermediária de alfa-amilase e maltase.

Em 1953, Adams (7), relatou que a beta-amilase era encontrada em batata doce, grãos de cereais e de soja. A enzima hidrolisava o amido, liberando beta-maltose a partir da extremidade não redutora das cadeias glicosídicas alfa-1,4 porém não rompia as ligações glicosídicas alfa-1,6. A beta-amilase hidrolisava completamente a amilose produzindo maltose. A amilopectina era hidrolisada parcialmente pela liberação de maltose da extremidade das cadeias ramificadas até que a ação da enzima era interrompida com a aproximação de regiões ramificadas contendo ligações glicosídicas alfa-1,6. A enzima exercia pequena influência na viscosidade da pasta de amido e hidrolisava o amido com rendimento de aproximadamente 60% de maltose. O autor observou que a beta-amilase tinha pequeno valor industrial mas a combinação de alfa-amilase e beta-amilase era amplamente utilizada em cervejarias, fermentações industriais e panificação.

Em 1954, Peat et alii (121) verificaram que as preparações de R-enzima de feijão fava e de batata não hidrolisavam o glicogênio.

Em 1959, MacWilliam e Harris (89), relataram que o fracionamento, tanto do concentrado de malte de cevada como do feijão de fava, através de colunas de alumina, resultava em duas enzimas amilolíticas desramificantes. Uma das enzimas, denominada dextrinase-limite hidrolisava as ligações glicosídicas alfa-1,6 de alfa-dextrina limite, que continham cinco a oito resíduos de glicose, produzidas pela ação de alfa-amilase salivar sobre a

amilopectina e parecia não atuar em substratos de maior peso molecular. A dextrinase-limite também não degradava isomaltose, isomaltotriose, nem substratos contendo quase exclusivamente ligações glicosídicas alfa-1,6. A enzima parecia requerer substratos contendo ambas ligações glicosídicas alfa-1,4 e alfa-1,6. A segunda enzima desramificante, R-enzima, hidrolisava amilopectina e beta-dextrina limite, porém não atuava sobre a alfa-dextrina limite. A R-enzima de malte assemelhava-se à R-enzimas de feijão fava e de batata doce mas parecia ser mais específica para a hidrólise das ramificações externas dos substratos, produzindo somente pequena quantidade de maltose e maltotriose, mesmo após 24 horas de reação. A dextrinase-limite e R-enzima de malte de cevada apresentavam atividade ótima a 40 °C e pH ótimo de atividade a 5,1 e 5,3 respectivamente. Ions molibdato inibiam completamente a ação da R-enzima mas não a ação da dextrinase-limite.

A pululanase microbiana (pululana β -glucano hidrolase, E.C. 3.2.1.41.) foi descoberta em 1961 por Bender e Wallenfels (21) em *Aerobacter aerogenes*, linhagens que atualmente são classificadas como membros do gênero *Enterobacter* ou *Klebsiella* (27,36,77). O microrganismo era mucóide e capaz de utilizar pululana, um polissacarídeo extracelular constituído essencialmente de unidades de maltotriose unidas por ligações glicosídicas alfa-1,6 produzido pela levedura *Pullularia pullulans* (*Aureobasidium pullulans*), como única fonte de

carbano. A formação de exoenzima ocorria somente na presença de maltotriose.

Em 1961, Pazur e Ando (117), descreveram a separação de transglicosidase (amilo 1,6 glicosidase, E.C. 3.2.1.33.): oligo 1,4 glucantransferase, E.C. 2.4.1.24.) da preparação comercial de amiloglicosidase de *A. niger*. A enzima purificada era capaz de transferir unidades glicosil de maltose, maltotriose, isomaltose e amido para aceptores apropriados. A transferência de unidades glicosil a aceptores resultava na produção de novos oligossacarídeos enquanto a transferência para água resultava na hidrólise. A enzima apresentava atividade ótima em pH 3,5 a 30 °C.

Pazur e Kleppe, em 1962 (118), verificaram que a amiloglicosidase purificada de *Aspergillus niger* hidrolisava as ligações glicosídicas alfa-1,4 e também as ligações glicosídicas alfa-1,6 e alfa-1,3 de oligossacarídeos porém em menor velocidade do que as ligações glicosídicas alfa-1,4.

Abdullah et alii, em 1964 (1), relataram que a pululanase, uma enzima extracelular de *Aerobacter aerogenes*, hidrolisava as ligações glicosídicas alfa-1,6 de glicogênio, amilopectina e oligossacarídeos derivados.

Wallenfels et alii, em 1965 (154), estudaram a estrutura de pululana e verificaram que o polissacarídeo

apresentava peso molecular estimado em 235.000. A pululanase de *Aerobacter aerogenes* hidrolisava pululana liberando unidades de maltotriose. Os autores constataram que as subunidades de maltotriose estavam unidas por ligações glicosídicas alfa-1,6 nas extremidades.

Brown et alii, em 1965 (24), verificaram a ação da pululanase extracelular, da linhagem de *Aerobacter aerogenes* ATCC 9621, sobre oligossacarídeos ramificados obtidos da hidrólise de glicogênio com alfa-amilase. A pululanase rompia as ligações glicosídicas alfa-1,6 de cadeias laterais contendo duas ou mais unidades de glicose porém não liberava glicose como produto.

Abdullah et alii, em 1965 (2) descreveram um método enzimático usando beta-amilase de batata doce e pululanase de *Aerobacter aerogenes* para a determinação do comprimento médio das cadeias de glicogênio e amilopectina. Os autores relataram que as análises foram realizadas com quantidades de 1 mg de glicogênio obtidos de 7 mg de amostras de biópsia de pacientes com doenças de estocagem de glicogênio.

Underkofler et alii, em 1965 (151) relataram a aplicação de alfa-amilase, beta-amilase e amiloglicosidase na produção de xarope com combinações variadas de glicose, maltose e açúcares de maior peso molecular. Os autores observaram que preparações comerciais de amiloglicosidase apresentando quantidade

negligenciável de transglicosidase catalisavam a polimerização de glicose. Esta reação era catalisada pela amiloglicosidase resultando na síntese de isomaltose e oligossacarídeos de maior peso molecular contendo ligações glicosídicas alfa-1,6 e dependia da concentração de glicose e da enzima presente.

Abdullah et alii, em 1966 (3), verificaram que a pululanase extracelular de *Aerobacter aerogenes* era específica para a hidrólise de ligações glicosídicas alfa-1,6 em polissacarídeos amiláceos ramificados e oligossacarídeos derivados. Sua ação e especificidade era similar ao complexo R-enzima de vegetais. Os autores verificaram que a pululanase não hidrolisava isomaltose e que havia um requerimento absoluto para ligações glicosídicas alfa-1,4 no substrato. A enzima não atuava em compostos no qual glicose estava unida através de ligação alfa-1,6 a maltossacarídeos. A ação sobre alfa-maltossacarídeos unidos por ligação alfa-1,6 a glicose era negligenciável ou tão baixa que poderia ser devido a impureza enzimática. A pululanase atuava rapidamente sobre ligações alfa-1,6 somente quando os componentes unidos pela ligação eram maltossacarídeos; desta forma o substrato mínimo para a atividade era o tetrassacarídeo 6^2 -alfa-maltosilimaltose.

Wallenfels et alii, em 1966 (155), relataram a produção e purificação de pululanase de *Aerobacter aerogenes* na forma de enzima ligada à célula. Os autores verificaram que a liberação de pululanase no meio de cultura podia

ser evitada por métodos de cultura específicos e que não havia diferença entre a enzima livre e a ligada à célula. A pululanase ligada à célula era obtida através da cultura contínua do microrganismo em meio Czapeck constituído de 0,3% NaNO_3 ; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05% KCl ; 0,001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ajustado a pH 7,2. O fator de crescimento limitante utilizado, foi a fonte de carbono 0,25% de maltose ou 0,25% de pululana ou 0,2% de glicerol + 0,08% de maltose ou 0,2% de glicerol + 0,08% de pululana para a indução de enzima. No início da fermentação foi utilizado meio de cultura contendo 0,4% de maltose e 0,4% de glicose para obtenção da enzima no estado ligado. A adição contínua do meio, com um fator de diluição de 10^{-1} 0,2 horas foi efetuada no final da fase exponencial de crescimento. Os autores observaram que a pululanase produzida sob as condições de cultura contínua era firmemente ligada à célula, e mesmo a agitação prolongada das células em água destilada, diferentes tampões ou soluções hipertônicas removiam somente um terço da enzima ligada à célula. Cerca de 90 a 95% da enzima foi extraída após agitação de 10 g de células frescas e úmidas em 100 mL de solução 0,1% (p/v) de lauril sulfato de sódio (SDS) ou solução 0,4% (p/v) de Triton X-100. A solução enzimática obtida continha 7 unidades de pululanase/mL. Uma unidade de atividade foi expressa como a quantidade de enzima que liberava 1 μmol de maltotriose em um minuto a 30 °C e pH 5,0. O aumento de açúcar redutor foi determinado com o reagente de Nelson (104). Os autores obtiveram a pululanase purificada através de procedimento

em duas etapas. Na primeira etapa 500 mL de solução enzimática, obtida após extração de 50 g de células, contendo 3500 unidades de pululanase e 170 mg de proteína foi adicionada a uma suspensão de 3,0 g de DEAE-celulose em 50 mL de tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,7. A suspensão foi agitada por 30 minutos a 0 °C e a resina lavada com solução de sulfato de amônio 0,01M. A enzima foi recuperada pela agitação da resina com duas porções sucessivas de 20 mL de solução de sulfato de amônio 0,4M. Na segunda etapa, gotas de solução de sulfato de amônio saturada foi adicionada a 40 mL de solução enzimática resfriada a 0 °C obtida na primeira etapa. Os autores obtiveram três frações em diferentes concentrações de sulfato de amônio. Neste trabalho não ficou esclarecida a concentração de sulfato de amônio para a obtenção das frações. Os precipitados formados em diferentes concentrações de sulfato de amônio foram removidos por centrifugação e dissolvidos em 4 mL de tampão fosfato 0,002M pH 7,2. A fração I continha 18 unidades de pululanase, 1 mg de proteína e outros materiais, a fração II apresentava 2.100 unidades de pululanase e 27,2 mg de proteína e a fração III, 420 unidades de pululanase e 21 mg de proteína. As frações I e III contendo baixa atividade específica foram descartadas e a fração II contendo alta atividade específica foi utilizada para estudos posteriores. Os autores verificaram que a pululanase ligada à célula foi purificada cerca de 4 vezes após a absorção em DEAE-celulose e fracionamento com sulfato de amônio. A eletroforese da fração II em gel de poliacrilamida e coloração com "amidoblack" 10 B apresentou uma única banda, indicando a presença de uma única

proteína. No diagrama de sedimentação, os autores verificaram a presença de um segundo pico. Após separação, observaram que este apresentava reação de biureto negativa, forte reação de antrona e nenhuma atividade de pululanase. Os autores estimaram o peso molecular da pululanase purificada em 145.000 através dos estudos de sedimentação e difusão.

Em 1966, Bender e Wallenfels (22), descreveram métodos de cultivo de *Aerobacter aerogenes*, preparação de pululanase extracelular, produção, purificação e algumas propriedades de pululanase obtida na forma de enzima ligada à célula. Para a produção de pululanase extracelular, o microrganismo foi cultivado em meio de Czapeck modificado constituído de 5,0 g NaNO_3 , 1 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g KCl, 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 g peptona e 5 g maltose e água destilada para 1 L, ajustado para pH 8,0. Após 48 horas a 30 °C sob condição ótima de aeração, as células foram removidas por centrifugação e o sobrenadante contendo 0,12 unidades de atividade/mL foi resfriado a 0 °C. A enzima foi precipitada com 1,5 volumes de acetona resfriada, o precipitado removido por centrifugação e seco a vácuo. Para a preparação da pululanase extracelular, 1g do precipitado seco foi extraído, por 3 horas, com 9 mL de tampão fosfato 0,02M pH 6,8 a 0 °C. O resíduo insolúvel foi removido por centrifugação e extraído novamente com 1 mL do mesmo tampão. O extrato combinado foi dialisado contra tampão fosfato 0,2M pH 6,8 por 24 horas e a solução enzimática obtida apresentava 10 unidades de

pululanase/mL. Para a obtenção, extração, purificação de pululanase ligada à célula, foi descrito o método previamente relatado em trabalho anterior (155). Os autores verificaram que não havia diferença entre a enzima extracelular obtida por cultura em batelada e a enzima ligada à célula obtida de cultura contínua. A pululanase apresentava atividade entre pH 4,0 a 8,0, com atividade ótima em pH 5,0. A atividade aumentava com a temperatura até 47,5 °C e decrescia em temperaturas superiores. A pululanase hidrolisava as ligações glicosídicas alfa-1,6 da pululana e da amilopectina, mas não rompia as ligações glicosídicas alfa-1,6 da dextrana. Aparentemente a pululanase atacava as ligações glicosídicas alfa-1,6 dos substratos somente se havia ligações glicosídicas alfa-1,4 vizinhas.

Catley et alii, em 1966 (28), verificaram que uma amostra de pululana continha 6,6% de alfa-maltotetraose unidas através das extremidades por ligações glicosídicas alfa-1,6 a resíduos de maltotriose. Observaram que a pululanase de *Aerobacter aerogenes* atuava como uma endoenzima.

Abdullah e French, em 1966 (5,47), relataram que a pululanase era capaz de catalisar reações de condensação. Os autores verificaram a formação de α -1,6-²-alfa-maltosil maltose e α -1,6-¹-alfa-maltosil maltose a partir de solução 25% de maltose, sendo o primeiro produto predominante. Testando maltotriose, como substrato, observaram a formação de três hexassacarídeos (α -1,6-³, α -1,6-² e α -1,6-¹-alfa-maltotriosil maltotriose).

Utilizando maltose e amilose, como substratos, os autores obtiveram polissacarídeos ramificados com menor capacidade de coloração com iodo e menor susceptibilidade a ação da beta-amilase. A reação de síntese catalisada pela pululanase era dependente da concentração, sendo que havia formação de pequena quantidade de tetrassacarídeo a partir de concentrações de maltose inferiores a 5%. Os autores verificaram também que a beta-amilase catalisava a síntese de tetrassacarídeo a partir de maltose (5).

May Frantz et alii, em 1966 (96), purificaram a pululanase extracelular, preparada como descrito por Bender e Wallenfels (21), pela precipitação do filtrado livre de células de *Aerobacter aerogenes* com acetona seguido de filtração em coluna de Sephadex G 200. Observaram que quando soluções da enzima recém preparadas eram percoladas em Sephadex G 200, a maior parte da atividade (> 90%) era recuperada em um único pico com um volume de eluição ligeiramente maior do que o volume vazio da coluna. O segundo pico de atividade enzimática (< 10%) era eluído após cerca de duas vezes o volume de eluição do primeiro pico. Quando soluções de enzima estocadas em refrigerador por longos períodos eram fracionadas, a quantidade de enzima recuperada no segundo pico aumentava com concomitante decréscimo na atividade do primeiro pico. A mesma mudança era observada quando a preparação enzimática bruta era incubada a 30o C por vários dias. Os autores concluíram que a pululanase parecia existir em duas formas, sendo que aquela de maior peso molecular

podia ser convertida na forma de menor peso (forma mais leve). O peso molecular da primeira foi estimado em 150.000 e da segunda cerca de 50.000. Não foi determinado se as duas formas de enzima resultaram de um fenômeno de agregação de monômeros ou se eram duas espécies de proteínas.

A recuperação parcial da atividade de pululanase extracelular de *Aerobacter aerogenes* após aquecimento a 100 °C foi descrita por Abdullah et alii (4). A regeneração ótima ocorria em pH 6,9 - 7,1 sendo completa após 20 minutos de repouso à temperatura ambiente. Os autores obtiveram recuperação de 50% e 30% da atividade inicial após 5 e 10 minutos de aquecimento a 100 °C a pH 7,0, respectivamente. O estudo de cinética de recuperação da enzima após aquecimento a 70 °C indicou que duas enzimas podiam estar presentes na preparação de pululanase liofilizada em tampão fosfato pH 7,0 e obtida por precipitação do filtrado do meio de cultura com acetona. Uma das enzimas, consistindo 20% do total, era termossensível e não recuperava a atividade. O segundo componente podia recuperar a atividade mas era eventualmente desnaturado pelo calor. Outras preparações de pululanase apresentavam diferente conteúdo relativo dos dois componentes.

Em 1966, Croxall (33) relatou que linhagens de *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp produtoras de amiloglicosidase, também conhecidas como glucamilase, gama-amilase ou alfa-1,4 glucana glucohidrolase, produziam enzimas

como as transglicosidases que catalisam a formação de carboidratos não fermentáveis a partir de maltose e glicose. O autor sugeriu a utilização de resina de troca iônica como Amberlite 200, Amberlite IRC 50, Duolite C-65 ou Duolite A-2 para a remoção de transglicosidase de preparações de amiloglicosidase.

Cadmus et alii (26) obtiveram 90-95% de rendimento de glicose a partir de amostras de farinhas integrais de milho, trigo e sorgo utilizando uma combinação de alfa-amilase de cevada ou de *Bacillus subtilis* e glicoamilase de *Aspergillus* sp. As preparações enzimáticas de glicoamilase de *A. awamori* NRRL 3112 e *A. niger* NRRL 3122, apresentavam baixa atividade de transglicosidase e foram mais eficientes na conversão de amido para glicose. Os autores descreveram processos de utilização de xaropes de glicose como fonte de carboidratos para a produção de polissacarídeos, ácido cítrico, ácido fumárico e ácido 2-cetoglucônico.

Em 1967, Pazur e Okada (119), ao estudar a reação de síntese de oligossacarídeos a partir de glicose, catalisada pelas glicoamilases de *Rhizopus delemar* e de *A. niger* concluíram que a velocidade de reversão catalisada pela glicoamilase de *R. delemar* era aproximadamente duas vezes superior a aquela da enzima de *A. niger*.

Ueda e Nanri, em 1967 (146), estudaram a enzima desramificante do tipo pululanase de *Escherichia intermedia* e

a denominaram isoamilase. A atividade da enzima era ótima a 47 °C e em pH 6,0. A enzima hidrolisava as ligações glicosídicas alfa-1,6 do amido, glicogênio e pululana e liberava maltose e maltotriose de beta-límite dextrina de glicogênio.

Kool e Armbruster, em 1967 (78) relataram que a porcentagem de consumo de glicose em panificação, confeitaria, bebidas, conservas, misturas secas, produtos lácteos e outras aplicações compreendiam respectivamente 33%, 18%, 11%, 11%, 6%, 3% e 18%.

Walker, em 1968 (153), verificou que extratos de três linhagens de *Streptococcus mitis* degradavam pululana produzindo glicose, maltose, maltotriose como produtos principais, devido a ação combinada da pululanase e transglicosidase. A pululanase hidrolisava as ligações glicosídicas alfa-1,6 da pululana, produzindo maltotriose que era transformada em glicose, maltose e pequena quantidade de oligossacarídeos lineares pela transglicosidase. Os extratos celulares de *Streptococcus mitis* continham transglicosidase altamente ativa que hidrolisava ligações glicosídicas alfa-1,4 transferindo uma ou mais unidades glicosil do final não redutor de uma molécula doadora para o final não redutor de uma molécula receptora. A transglicosidase da preparação enzimática era eliminada por fracionamento com sulfato de amônio. A pululanase intracelular era produzida na ausência de indutores e a adição de glicose

ou maltose ao meio de cultura não aumentava o rendimento da enzima. O menor substrato hidrolisado pela pululanase foi o tetrassacarídeo β -maltosil maltose. O autor observou a síntese de oligossacarídeos pela pululanase, em altas concentrações de maltotriose, sendo que a condensação de unidades maltosil ocorria menos rapidamente. A pululanase apresentava atividade ótima a 30 °C e na faixa de pH 5,4-5,8. Era rapidamente inativada em temperaturas superiores a 40 °C e não recuperava a atividade após a estocagem a temperatura ambiente.

Em 1968, Lee et alii (82), descreveram um método de estudo da estrutura da amilopectina usando enzima amilolítica desramificante. O perfil das cadeias lineares era determinado através da desramificação de amilopectina e de beta-dextrina limite de amilopectina pela pululanase seguido do fracionamento em coluna de Sephadex G 50 e determinação do comprimento médio das cadeias.

Em 1968, Harada et alii (55), isolaram o microrganismo *Pseudomonas* sp. SB 15 produtor de isoamilase (amilopectina β -glucanohidrolase, E.C. 3.2.1.9.) extracelular capaz de desramificar totalmente o glicogênio e a amilopectina.

Yokobayashi et alii, em 1969 (168), compararam a especificidade da isoamilase de *Pseudomonas* sp. SB 15 com a de pululanase extracelular de *Aerobacter aerogenes* ATCC 9621. A enzima amilolítica desramificante de *Pseudomonas* sp. SB 15 não

era capaz de hidrolisar as ligações glicosídicas alfa-1,6 da pululana. A isoamilase hidrolisava completamente o glicogênio pela ação sucessiva ou simultânea com beta-amilase de batata doce enquanto que a pululanase degradava completamente pela ação simultânea mas provocava somente um pequeno aumento na beta-amilólise limite do glicogênio por ação sucessiva com beta-amilase de batata doce. Os autores sugeriram que a degradação incompleta do glicogênio por ação sucessiva era devido à incapacidade da pululanase penetrar no interior da molécula de glicogênio. Verificaram que cerca de 20-30% de beta-dextrina limite de glicogênio era resistente a ação da isoamilase e concluíram que a ação característica da isoamilase envolvia a hidrólise de todas as ligações glicosídicas de glicogênio, mas as ligações que unem resíduos de maltose à cadeia de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas alfa-1,4 não eram facilmente hidrolisadas.

Wallenfels et alii, em 1969 (157), relataram que a pululanase de *Aerobacter aerogenes* atuava como uma exoenzima sobre o substrato pululana. A quantidade de maltotriose liberada, determinada através de cromatografia a gás, aumentava linearmente com o tempo de reação.

Devido aos resultados contraditórios citados por Wallenfels et alii (157), os pesquisadores Drummond et alii (38), reexaminaram em 1969 o mecanismo de ação da pululanase anteriormente observado (28) e confirmaram que a pululanase

hidrolisava a pululana ao acaso indicando que a mesma podia ser classificada como uma endoenzima. A cromatografia do hidrolisado, em camada delgada, apresentava além de maltotriose, hexa, nona, dodecassacarídeos, etc. Para excluir a possibilidade da pululanase ser uma exoenzima e os oligômeros de maltotriose serem originários da ação da transglicosidase, a hidrólise de pululana foi repetida na presença de maltose e ciclomaltohexaose (Schardinger alfa-dextrina). Verificaram através de cromatografia em papel que não havia formação de novos oligossacarídeos e portanto não havia contaminação com transglicosidase.

Tamura et alii, em 1969 (144), utilizaram as enzimas desramificantes de *Pseudomonas* sp. S8 15 e pululanase de *Aerobacter aerogenes* ATCC 9621 no estudo da estrutura da alfa-D-glucana altamente ramificada de *Vibrio parahaemolyticus* A55. Esta glucana diferia do glicogênio. Era resistente à ação de alfa e beta-amilase, porém era degradada pelas enzimas desramificantes liberando maltotriose e maltotetraose.

Enevoldsen e Bathgate, em 1969 (41), analisaram a estrutura de dextrinas não fermentáveis em mosto de cerveja, utilizando pululanase extracelular de *A. aerogenes* e beta-amilase de cevada. Os autores postularam que os maltooligossacarídeos lineares: maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose, maltoheptaose e maltoctaose estavam presentes no mosto. E pelo menos onze oligossacarídeos ramificados

foram encontrados : ² 6 -alfa-maltosil maltose, 6-alfa-glicosil maltotriose, dois pentassacarídeos, dois hexassacarídeos, dois heptassacarídeos e três octassacarídeos.

Hehre et alii, em 1969 (58), ao estudarem as reações de reversão e síntese de novas ligações glicosídicas concluíram que a glicoamilase cristalina de *Rhizopus niveus* catalisava rapidamente a síntese de maltose e a síntese em menor velocidade de isomaltose a partir de D-glicose na fase inicial da reação. A isomaltose era predominante após 24 horas de reação. A beta-amilase cristalina de batata doce catalisava rapidamente a síntese de maltotetraose a partir de maltose.

Ao estudar a especificidade de substrato da pululanase de *Aerobacter aerogenes*, Abdullah e French, em 1970 (6) concluíram que a enzima hidrolisava as ligações glicosídicas alfa-1,6 de oligossacarídeos contendo no mínimo duas unidades de glicose em cada cadeia. Oligossacarídeos e dextrinas produzidos pela hidrólise de amido, contendo duas ou mais ligações glicosídicas alfa-1,6 foram também hidrolisados. A pululanase não hidrolisava resíduo de glicose unida à cadeia principal através de ligação glicosídica alfa-1,6 e portanto glicose não era observada como produto. Sob condições especiais, a pululanase apresentava reações de condensação. Os autores observaram a formação de tetrassacarídeos após incubação de solução 25% de maltose com a pululanase.

Enevoldsen (42,43), sugeriu a aplicação de enzimas desramificantes como a pululanase, na fabricação de cerveja a partir de cereais não maltados.

Em 1970, Yokobayashi et alii (169), estudaram as propriedades da isoamilase purificada de *Pseudomonas* sp. SB 15. A enzima apresentava pH ótimo de atividade na faixa de pH 3,0-4,0 e temperatura ótima de atividade a 52 °C em tampão acetato pH 3,5 para 10 minutos de reação. A estabilidade térmica foi determinada em tampão acetato 0,1M pH 3,5 através do aquecimento da solução enzimática na faixa de 30 °C a 70 °C durante 10 minutos. Tratamentos térmicos a 50 °C, 55 °C e 60 °C resultaram em decréscimo de 40%, 77% e 95% da atividade respectivamente. A isoamilase apresentou-se estável na faixa de pH 2,5 a 7,5 após incubação a 40°C durante 24 horas. Os autores observaram que a atividade enzimática permanecia a mesma na faixa de pH 3,5-5,5, mas era perdida a valores abaixo de pH 2,5 e acima de 7,5, após 2 horas de incubação a 40 °C.

Suzuki, em 1970 (139), descreveu a aplicação de enzimas desramificantes bacterianas na produção de amilose e de maltose. Na primeira etapa, a suspensão de 30% de amido era liquefeita mecanicamente para obtenção de solução de amido de dextrose equivalente (DE = g de açúcares redutores expressos como glicose / 100g de amostra em peso seco) abaixo de 1,0. Em seguida, a solução de amido era tratada com duas isoamilases, de diferentes especificidades, por um a dois dias. Para a produção de maltose,

a solução de amido desramificado era tratada com beta-amilase de farelo de trigo e a maltose obtida era recristalizada repetidamente para aumento da pureza. Para a obtenção de amilose, a solução de amido desramificado era resfriada, a fração contendo amilose de grau de polimerização DP 200 - 300 separada por centrifugação, e as cadeias curtas eram obtidas do sobrenadante concentrado.

Bender, em 1970 (23), verificou que a pululanase de *Aerobacter aerogenes* produzida por fermentação contínua estava ligada à parede externa da célula. A enzima extraída com dodecilsulfato de sódio estava associada com uma fosfolipoproteína insolúvel em pH 5,0. O congelamento e descongelamento alternados de células continuamente cultivadas em meio hipertônico, liberava cerca de 40% da pululanase ligada à célula e esta última apresentava-se associada com um lipopolissacarídeo - fosfolipoproteína.

Fujio et alii, em 1970 (48), estudaram o efeito da fonte de nitrogênio na produção de enzima desramificante de uma linhagem de *Aerobacter aerogenes* em agitador rotatório. Neste trabalho foi utilizado o termo isoamilase para descrever a enzima amilolítica desramificante pululanase. Quando amido solúvel e acetato de amônio foram usados respectivamente como fonte de carbono e nitrogênio, a atividade enzimática determinada pelo aumento da coloração azul com reagente de Iodo, no filtrado do meio de cultura, foi cerca de 500 unidades/mL após 100 horas de

incubação. Ao utilizar a mesma fonte de carbono e sulfato de amônio em lugar de acetato de amônio, como fonte de nitrogênio a formação da enzima desramificante ocorria simultaneamente com o crescimento celular e quase toda enzima era ligada à célula. A atividade enzimática obtida foi 120 unidades/mL de meio de cultura (27 unidades/mg de massa celular seca). Os autores observaram que a formação da enzima ligada à célula quando era utilizado sulfato de amônio como fonte de nitrogênio era característica da linhagem utilizada.

Posteriormente (49) os autores compararam o efeito da fonte de carbono na formação da enzima desramificante do tipo pululanase pela linhagem de *Aerobacter aerogenes* em fermentador de 1000 mL. A formação da enzima usando maltose e pululana apresentou respectivamente 5% e 10% do rendimento obtido com amido solúvel como fonte de carbono.

Em 1970, Drummond et alii, estudaram a especificidade da R-enzima de batata (*Solanum tuberosum*) e da pululanase de *Aerobacter aerogenes*. Na purificação de R-enzima os autores não observaram a separação da fração R-enzima que atuava sobre polissacarídeos como amilopectina e beta-dextrina limite, da fração de dextrinase-limite que atuava sobre oligossacarídeos como alfa-dextrina limite, descritas em 1959 por MacWilliam e Harris (89). Quando a R-enzima e a pululanase eram diluídas, a atividade sobre a amilopectina desaparecia seletivamente enquanto que a atividade sobre beta e alfa-dextrina limite era retida. Os

pesquisadores sugeriram que dextrinase limite e R-enzima eram a mesma enzima. Verificaram que a pululanase bacteriana apresentava especificidade similar à R-enzima de batata. Ambas hidrolisavam as ligações glicosídicas alfa-1,6 da amilopectina, beta-dextrina limite da amilopectina, pululana e alfa-dextrina limite de amilopectina.

Akai et alii, em 1971 (9), utilizaram a isoamilase de *Pseudomonas* sp e pululanase de *Aerobacter aerogenes* para estudo da distribuição das cadeias lineares do glicogênio de ostra e verificaram que o produto de reação era uma mistura de cadeias de 3 a 50 unidades de glicose sendo que o grau médio de polimerização era de 11. Os mesmos autores em trabalho subsequente (10), investigaram a distribuição das cadeias lineares glicosídicas alfa-1,4 de amilopectinas de milho ceroso e de batata usando enzimas amilolíticas desramificantes e sugeriram que as cadeias longas apresentam grau de polimerização na faixa de 40-80 e as cadeias curtas na faixa de 20-40.

Em 1971, Lee et alii (83), estudaram a especificidade da enzima amilolítica desramificante, de milho doce (*Zea mays* L), em relação ao substrato, e verificaram que apresentava propriedades similares à pululanase de *Aerobacter aerogenes* (3).

A produção de uma enzima do tipo pululanase pela linhagem *Streptomyces* sp no. 28 foi descrita por Ueda et alii,

em 1971 (147). A enzima foi denominada isoamilase apesar de hidrolisar a pululana. A preparação enzimática bruta apresentava atividade ótima a 60 °C e pH 5,0 e maior estabilidade na faixa de 5,5 e pH 7,5 após aquecimento a 40 °C durante 60 minutos. Mostrava estabilidade em temperaturas inferiores a 35 °C, mas perdia rapidamente a atividade a temperaturas superiores a 40 °C após 60 minutos de tratamento térmico em tampão acetato 0,02M pH 6,0. A enzima de *Streptomyces* sp hidrolisava as ligações glicosídicas alfa-1,6 da pululana e do amido de arroz ceroso. Contudo, a pululanase de *Streptomyces* sp, no mesmo nível de atividade sobre a pululana, apresentava menor atividade sobre o amido de arroz ceroso do que a enzima de uma linhagem de *Aerobacter aerogenes* isolada pelos autores.

Lee e Whelan, em 1971 (84), classificaram as enzimas amilolíticas desramificantes em duas classes: enzima desramificante direta e enzima desramificante indireta. A primeira podia ser subdividida em pululanase e isoamilase, que hidrolisam ligações glicosídicas alfa-1,6 de glicogênio e amilopectina não modificados. Os autores relataram que as enzimas amilolíticas desramificantes requeriam substratos que contivessem ligações glicosídicas alfa-1,4 e alfa-1,6. Sugeriram que o termo isoamilase não fosse usado para descrever uma enzima que hidrolisa a pululana. O processo de desramificação indireta requer a ação combinada de duas enzimas. No primeiro passo, a transglicosidase ou oligo alfa-1,4 - alfa-1,4 glucantransferase encurta uma cadeia A do oligossacarídeo até uma unidade de

glicose que é então removida pela ação hidrolítica da amilo 1,6 glicosidase. A transglicosidase atua removendo a cadeia lateral transferindo-a para uma cadeia B que aumenta em comprimento.

Harada et alii, em 1972 (56), compararam a ação da isoamilase de *Pseudomonas* sp SB 15 e da pululanase de *Aerobacter aerogenes* ATCC 9621 sobre a amilopectina e glicogênio, através do aumento do poder redutor e coloração com solução de iodo e do fracionamento dos produtos de hidrólise em coluna de Sephadex G-75. Após a análise dos produtos obtidos, os autores sugeriram que a isoamilase hidrolisava as ligações externas e internas de amilopectina, enquanto que a pululanase hidrolisava facilmente as ligações glicosídicas alfa-1,6 externas da amilopectina mas hidrolisava lentamente as ligações alfa-1,6 internas. Os autores verificaram que a isoamilase rompia todas as ligações glicosídicas alfa-1,6 do glicogênio enquanto que a pululanase hidrolisava comparativamente poucas ligações.

Marshall em 1972 (92) relatou que a beta-amilase era incapaz de ultrapassar os pontos de ramificação do glicogênio e da amilopectina e por esta razão a degradação destes polissacarídeos ramificados pela enzima era incompleta. A ação da beta-amilase cristalina sobre a amilopectina resultava em 50-60% de conversão para maltose e formação de dextrina limite que consistia da macromolécula original com as cadeias externas encurtadas até as proximidades dos pontos de ramificação. O autor ressaltou a importância da aplicação da pululanase em combinação

com a beta-amilase na produção de maltose a partir de amido, na conversão de amido de cereais não germinados em açúcares fermentáveis e no estudo da estrutura de polissacarídeos. E sugeriu a utilização do substrato pululana para a diferenciação das enzimas amilolíticas pululanase e isoamilase.

Yagisawa et alii, em 1972 (163), isolaram uma linhagem de *Streptomyces flavochromogenes* que apresentava atividade de pululanase dez vezes maior do que a linhagem de *Streptomyces sp* no. 28 previamente estudada (147). Os autores estudaram o efeito de íons na atividade enzimática e observaram que na presença de íons cálcio a temperatura ótima de atividade era de 50 oC mas na presença de íons sódio, potássio ou amônio, a temperatura ótima mudava para 35 oC. Observaram também que na presença de íons cálcio a atividade era ótima na faixa de pH entre 5,0 e 6,0 mas na ausência destes era ótima em pH 6,0.

Kurimoto et alii, em 1972 (81), patentearam processos para preparação de maltose cristalina utilizando beta-amilase e alfa-1,6 glicosidases de *Pseudomonas amyloclavata* (ATCC 21282), *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8008) e *Aerobacter aerogenes* (ATCC 8724). As enzimas desramificantes podiam eliminar as ligações glicosídicas alfa-1,6 que impediam a amilólise pela beta-amilase.

Eisele et alii, em 1972 (40), determinaram o peso molecular da pululanase ligada à célula de *Aerobacter*

aerogenes através de estudos de ultracentrifugação e eletroforese em gel de poli(acrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio. Os autores concluíram que a enzima era constituída de uma única cadeia polipeptídica de peso molecular estimado em 143.000 e sugeriram que resultados anteriores indicando baixo peso molecular e subunidades estruturais podiam ser explicados pela degradação parcial da enzima devido à contaminação proteolítica.

Mercier et alii, em 1972 (98), relataram que a cultura de *A. aerogenes*, usada em experimento anterior (96), foi cedida pelo Professor K. Wallenfels. A cultura era uma mistura de dois tipos de *A. aerogenes* que podiam ser distinguidos pela aparência microscópica, um formava cápsula (P₂) e o outro (P₁) não. Desde que as células P₂ eram mais facilmente centrifugadas, os autores escolheram esta linhagem para a produção e purificação de pululanase ligada à célula. Esta última foi produzida de acordo com o método descrito por Wallenfels et alii, em 1966 (155) com a seguinte modificação: foi utilizado 0,04% de pululana no meio de cultura para indução da enzima além de 0,4% de glicose e 0,36% de maltose. Verificaram que a inclusão de pequena quantidade de pululana como fonte de carbono assegurava rendimento constante de enzima enquanto que na ausência de pululana a produção de pululanase era baixa e variável. Após a extração de pululanase ligada à célula com detergente, a enzima foi purificada pela adsorção em DEAE-celulose, fracionamento em coluna de Sephadex G-200 e cromatografia em coluna de DEAE-

celulose e cristalização. A pululanase obtida era livre de alfa-amilase e adequada para estudos estruturais do amido e glicogênio. Os pesquisadores verificaram que na etapa de filtração em gel Sephadex G-200 foram separadas duas formas de diferentes pesos moleculares. O peso molecular do menor componente que podia ser obtido na forma cristalina foi estimado entre 108.000 e 145.000. O outro componente foi eluído com "blue dextran", indicando peso molecular de pelo menos 500.000. Observaram que o componente de maior peso molecular era convertido na forma de menor peso molecular após estocagem a 30 °C durante 18 horas e sugeriram que este fato era resultado da ação de protease presente na solução enzimática. Os autores estudaram a aplicação da pululanase livre de alfa-amilase obtida, na hidrólise de polissacarídeos ramificados. Concluíram que a pululanase hidrolisava facilmente as cadeias curtas, por exemplo resíduos de maltose e maltotriose de beta-dextrina limite e da alfa-dextrina limite de amilopectina. Verificaram também que o peso molecular do substrato não influenciava a velocidade de ataque pela pululanase. As cadeias lineares de amilopectina, foram também hidrolisadas, porém, menos rapidamente. Sugeriram que a incapacidade da pululanase hidrolisar o glicogênio era devido ao alto grau de ramificação do mesmo. Contudo, o glicogênio podia ser totalmente desramificado pela ação concomitante da beta-amilase.

Ueda e Ohba, em 1972 (148), descreveram a purificação, cristalização e algumas propriedades da pululanase

extracelular de uma linhagem de *Aerobacter aerogenes*. Para a produção de enzima, a cultura de 24 horas foi inoculada em frascos de 500 mL de meio de cultura constituído de 0,75% de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$; 1,2% de amido de batata solúvel; 0,25% NaNO_3 ; 0,2% K_2SO_4 ; 0,1% K_2HPO_4 ; 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05% KCl ; 0,04% Peptona e 0,001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e os frascos incubados durante 5 dias a 30 °C em agitador rotatório. A pululanase extracelular foi purificada cerca de 8 vezes por meio de fracionamento com sulfato de amônio, colunas de DEAE-celulose, Sephadex G-200, DEAE-celulose e recristalização sucessiva. A enzima cristalina apresentou atividade ótima em pH 6,5 e a 50 °C. A pululanase cristalina apresentou-se estável na faixa de pH 5,0 a 11,5 após incubação a 40 °C durante 60 minutos. A enzima mostrou-se estável em temperaturas inferiores a 50 °C após incubação em tampão acetato 0,02M pH 6,0 durante 30 minutos. O tratamento térmico de pululanase em tampão acetato 0,02M pH 6,0 a 30 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C durante 30 minutos resultaram respectivamente em 2%, 4%, 5%, 8%, 70%, 85%, 95% e 100% de inativação respectivamente. O peso molecular da pululanase foi estimado em 66.000 e 58.000 através de eletroforese em gel de poliácridamida e ultracentrifugação respectivamente.

Posteriormente, os mesmos autores, em 1973 (111), relataram a purificação, cristalização e algumas propriedades da pululanase intracelular de *Aerobacter aerogenes* no. 105. Para a produção de pululanase os autores utilizaram sulfato de amônio

como fonte de nitrogênio e extraíram a enzima com 0,1% de dodecil sulfato de sódio como descrito anteriormente (48). Os pesquisadores verificaram que a solução enzimática extraída com SDS apresentava menor atividade específica do que o sobrenadante do meio de cultura contendo a pululanase extracelular. Este fato diferia dos resultados obtidos por Wallenfels et alii (155) no qual a atividade específica da pululanase intracelular era maior do que a extracelular. A pululanase intracelular foi purificada cerca de 150 vezes através do fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em colunas de DEAE-celulose e Sephadex G-200 sucessivamente. O peso molecular da pululanase intracelular purificada foi estimado entre 70.000 e 90.000 através da filtração em gel Sephadex G-200 e entre 80.000 e 100.000 através do equilíbrio de sedimentação. No estudo de ultracentrifugação a amostra de enzima cristalina apresentou-se como uma única proteína. Os autores relataram que a pululanase extracelular e intracelular apresentaram atividade ótima na temperatura de 50 °C mas diferiram ligeiramente na faixa de estabilidade térmica e de pH de estabilidade.

Mercier, em 1973 (99), empregando um método enzimático, estudou a estrutura da amilopectina de amido de milho contendo 64% de amilose e comparou a amilopectina de amido de milho ceroso e normal. As cadeias foram desramificadas pela pululanase de *A. aerogenes*, fracionadas por filtração de gel de Sephadex G 50 e a linearidade das cadeias testadas pela ação da beta-amilase. As cadeias internas da fração amilopectina foram estudadas após

desramificação da beta-límite dextrina. Os resultados mostraram que as amilopectinas de amido ceroso e normal eram idênticas. A fração de amilopectina de amido contendo 64% de amilose apresentava cadeias internas mais longas do que aquelas de amilopectina de milho ceroso.

Yokobayashi et alii, em 1973 (170), compararam a atividade específica da isoamilase cristalina de *Pseudomonas* sp SB15 e da pululanase cristalina extracelular de *Aerobacter aerogenes* ATCC 9621 em diferentes substratos. Uma unidade de atividade específica foi definida como a quantidade de enzima que liberava substâncias redutoras equivalente a 1 μ mol de glicose por minuto por mg de proteína a 40 °C usando-se 2% de substrato. Os valores de atividade específica para isoamilase foram 110-280 μ moles para amilopectina e 1,1 μ moles para glicogênio e 1,1 μ moles para pululana. A atividade específica da pululanase de *Aerobacter aerogenes* foi 3-5 μ moles para amilopectina, 0,5-1,2 μ moles para glicogênio e 53 μ moles para pululana. Os valores de K_m (g/mL) da isoamilase foram aproximadamente de 1×10^{-4} a 2×10^{-4} para amilopectina, glicogênio e 2×10^{-3} para pululana enquanto que os valores para pululanase foram aproximadamente 8×10^{-3} - 1×10^{-2} para amilopectina, 2×10^{-2} - 5×10^{-2} para glicogênio e $1,7 \times 10^{-5}$ para pululana. Previamente, os

autores (55) haviam relatado que a isoamilase não hidrolisava a pululana e acreditaram que provavelmente haviam utilizado baixa concentração de enzima.

Marshall, em 1973 (92), verificou que a pululanase de *Aerobacter aerogenes* era inibida por "Schardinger" dextrinas, oligossacarídeos cíclicos constituídos, de 6 e 7 unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas alfa - 1,4. A ciclomaltohexaose na concentração 29,6 µg/mL e cicloheptaose na concentração 2,82 µg/mL inibiram 33% da atividade de pululanase sobre pululana. Os oligossacarídeos lineares correspondentes em concentrações 0,25 mg/mL não inibiram a pululanase. Glicogênio e amilopectina utilizados em concentrações 2,5 mg/mL não inibiram a enzima. A esta concentração contudo a amilose inibia 25% da atividade de pululanase. A ciclomaltohexaose na concentração 6,25 mg/mL inibia 2% da atividade de isoamilase de *Cytophaga sp* enquanto que a ciclomaltoheptaose na mesma concentração não inibia a enzima. Os autores sugeriram que o efeito de "Schardinger" dextrinas sobre enzimas desramificantes poderia ser utilizado para a classificação de isoamilase ou pululanase devido a diferenças de inibição destas enzimas. Similarmente a inibição seletiva da pululanase poderia auxiliar na detecção desta enzima em misturas de amilases.

Em 1973, Manners e Yellowlees (90), verificaram a presença de enzimas amilolíticas desramificantes em extratos de plantas superiores e maltes comerciais. A atividade

desramificante foi denominada atividade de dextrinase limite e determinada usando pululana como substrato. Os extratos de cevada, centelo, milho e trigo não germinados continham baixa atividade que aumentava marcadamente com a germinação. Os extratos de aveia não germinada apresentavam alta atividade porém esta não sofria incremento durante a germinação. A adição de ácido giberélico resultava em um aumento de 70-80% na atividade de dextrinase limite da cevada durante a germinação. Amostras de malte comerciais continham quantidades variáveis de atividade de dextrinase limite que não apresentavam correlação com a capacidade diastática.

Griffin e Fogarty, em 1973 (53), relataram as observações preliminares do sistema enzimático elaborado por uma linhagem de *Bacillus polymyxa* para a degradação do amido. Verificaram a existência de pelo menos dois componentes: uma enzima desramificante específica para as ligações glicosídicas alfa-1,6 da amilopectina e uma alfa-1,4 glucana maltotransferase que convertia amilose para maltose. Posteriormente, os mesmos autores (54) verificaram que a atividade de alfa-1,4 glucana maltotransferase era ótima em pH 6,8 e 37 °C. A enzima era estável a 37 °C mas era rapidamente inativada em temperaturas superiores a 37 °C. Os autores demonstraram que a alfa-1,4 glucana maltotransferase atuava como uma exoenzima da mesma forma que as beta-amilases vegetais e era inibida pela maltose.

Palmer et alii, em 1973 (114), estudaram o mecanismo de utilização de carboidratos exógenos e endógenos de uma linhagem de *Escherichia coli* e sugeriram que o microrganismo utilizaria a pululanase para a desramificação de carboidratos extracelulares enquanto que a função da isoamilase seria na degradação intracelular de glicogênio. Desta forma, maltodextrinas seriam providas para a utilização intracelular em *E. coli* por uma das duas vias. A pululanase e permease atuariam respectivamente na degradação e transferência de alfa glucanas ramificadas extracelulares. A isoamilase produziria maltodextrinas durante o processo de desramificação de glicogênio intracelular. As maltodextrinas originárias de qualquer uma das vias seriam metabolizadas para glicose e glicose-1 fosfato pela ação de amilomaltase e maltodextrina fosforilase. Os autores sugeriram que *A. aerogenes* e *Streptococcus mutans* provavelmente teriam enzimas similares, sendo que o primeiro microrganismo também produziria alfa-amilase extracelular para auxiliar na degradação de alfa-glucanas exógenas. Os autores verificaram que a pululanase ligada à célula da linhagem *E. coli* existia complexada com um lipopolissacarídeo - fosfolipoproteína em associação com a membrana externa, da mesma forma que a pululanase ligada à célula de *A. aerogenes*.

Saito, em 1973 (131), isolou, do solo, uma linhagem de *Bacillus licheniformis* produtora de alfa-amilase de características não usuais. A enzima era ativa em ampla faixa de pH, apresentando atividade máxima entre pH 5 e 8 e cerca de 95% e

78% da atividade em pH 9,0 e pH 10,0 respectivamente. A alfa-amilase apresentava-se estável na faixa de pH 6 a 11 após incubação a 25 °C durante 24 horas. O autor verificou que a alfa-amilase de *B. licheniformis* era mais termoestável do que a alfa-amilase de *B. subtilis*. O tratamento térmico das enzimas de *B. licheniformis* e de *B. subtilis* em tampão Tris-acetato 0,05 M pH 8,0 durante 15 minutos a 70 °C resultaram respectivamente em 4% e 95% de inativação respectivamente. O peso molecular da enzima foi estimado em 22.500 através de filtração em gel Sephadex G-100. A alfa-amilase de *B. licheniformis* apresentava a característica de hidrolisar amilose e amilopectina com produção predominante de maltopentaose durante todos os estágios de hidrólise.

Em 1974, Dessein e Schwartz (36), questionaram a produção de pululanase em *Escherichia coli*, descrita por Palmer et alii (114) no ano anterior. Os autores não detectaram atividade de pululanase em culturas de 11 linhagens de *E. coli* cultivadas em meio contendo maltose. Nenhuma destas linhagens, nem outras 40 linhagens de *Escherichia sp* testadas puderam crescer em meio contendo pululana como fonte de carbono, enquanto todas utilizaram maltose e algumas maltotriose. Por outro lado, a atividade de pululanase pode ser detectada, como relatado por Bender e Wallenfels em 1966, em duas linhagens de *Aerobacter aerogenes*. A linhagem utilizada neste experimento sob o nome de *Aerobacter aerogenes* 10091 III, enviada pelo Dr. Bender H. foi identificada como *Klebsiella pneumoniae* não capsulada,

biotipo d (126) e a outra linhagem de *Aerobacter aerogenes* cedida pelo Dr. Wober G. foi classificada como *Klebsiella pneumoniae* tipo 5, biotipo a.

Enevoldsen e Schmidt, em 1974 (44), utilizaram a pululanase extracelular de *Aerobacter aerogenes* para a determinação das estruturas de dextrinas ramificadas de cerveja. A pululanase foi escolhida devido a capacidade de hidrolisar dextrinas ramificadas em maltossacarídeos lineares. Após cromatografia em coluna de Bio Gel p-2, as dextrinas da cerveja apresentaram uma distribuição característica em relação ao peso molecular. Foram isolados quatro grupos de dextrinas de grau de polimerização (DP) 5-10, 11-16, 17-21 e 22-27. Após desramificação das dextrinas verificou-se que o grupo II (DP 11-16), grupo III (DP 17-21) e grupo IV (DP 22-27) continham duas, três e quatro ligações glicosídicas alfa-1,6 respectivamente. Os autores concluíram que a maior parte das ligações glicosídicas alfa-1,6 da amilopectina não são hidrolisadas no processo de produção de cerveja.

Robin et alii, em 1974 (127), utilizaram a pululanase de *A. aerogenes* e a beta-amilase de batata doce no estudo da composição e da natureza do resíduo insolúvel obtido do tratamento ácido prolongado do amido de batata. Após análise dos produtos da hidrólise enzimática os autores sugeriram que as ramificações altamente ordenadas da amilopectina são constituídas de cadeias contendo 15 resíduos de glicose.

Hope e Dean, em 1974 (63), estudaram a síntese de pululanase em 17 linhagens de *Klebsiella aerogenes*, através de cultura contínua, em meio contendo maltose como indutor e fonte de carbono. A enzima permanecia firmemente ligada à célula e parecia estar localizada na parede celular. Três linhagens produziram alta atividade (R, NCIB 5938 e NCIB 8017), doze linhagens quantidade intermediária e duas (NCIB 8153 e NCIB 9146) produziram atividade negligenciável mas foram induzíveis com pululana. Contudo, em limitação de carbono, a pululana não induzia maior quantidade de enzima do que maltose, maltotriose ou mistura de oligossacarídeos e não foi desenvolvida hiperatividade em cultura prolongada.

Mitsunashi et alii, em 1974 (102), descreveram processos para a produção de maltose, com alto grau de pureza utilizando alfa-amilase ou ácido para a liquefação de amido e beta-amilase, pululanase e ou isoamilase na etapa de sacarificação. Como exemplo a suspensão de 10% de amido de batata doce foi liquefeita até a obtenção de dextrose equivalente (DE) 2,7 com alfa-amilase bacteriana. A seguir o amido liquefeito foi sacarificado com 25 unidades de beta-amilase por grama de amido a 45 °C por 16 horas. A atividade de beta-amilase foi determinada pela incubação da mistura de 5 mL de solução 1% de amido solúvel, 4 mL tampão fosfato 0,1M e 1 mL de enzima, a 40 °C por 30

minutos. Uma unidade de atividade de beta-amilase foi definida como a quantidade de enzima que produzia 10 mg de maltose expressos como glicose nas condições do ensaio. Para comparação a mesma amostra de amido liquefeito foi sacarificado com 25 unidades de beta-amilase e 10 unidades de pululanase por grama de amido. Para a determinação da atividade de alfa-1,6 glicosidase a mistura de 5 mL de solução 1% de amido de arroz ceroso, 1 mL tampão acetato 0,5M pH 6,0 e 1 mL de solução de enzima foi incubada a 49 °C por 30 minutos. Após a incubação, uma alíquota de 0,5 mL da mistura de reação foi transferida para tubo de ensaio contendo 0,5 mL de solução de iodo 0,01M e a solução foi diluída com 15 mL de água destilada. A absorbância da solução foi medida a 610 nm e o aumento de 0,1 na absorbância foi definido como 10 unidades de atividade. Os autores relataram que a sacarificação usando somente beta-amilase resultava em 69% de rendimento de maltose enquanto que utilizando beta-amilase e pululanase era obtido rendimento superior a 90% de maltose.

Norman e Wober, em 1975 (105), compararam o sistema de enzimas envolvidas no catabolismo de maltodextrinas em *Pseudomonas amyloclavata* e *Pseudomonas saccharophila*. Os autores concluíram que permease, maltodextrina fosforilase e 4-alfa-glucanotransferase ocorrem intracelularmente em ambos os microrganismos. A degradação de alfa-glucanas extracelulares era mediada principalmente por uma isoamilase intracelular em *P. amyloclavata* enquanto que a linhagem *P. saccharophila*

possuía uma alfa-amilase extracelular e uma pululanase firmemente ligada à célula.

Amemura et alii, em 1975 (12), relataram que grupos triptofano são importantes para a formação do complexo enzima-substrato da pululanase de *Aerobacter aerogenes* ATCC 9621. A enzima foi inibida por Hg^{2+} , N-bromosuccinimida, brometo de 2-hidroxi 5-nitrobenzil, riboflavina 5-fosfato, histamina e imidazol. Ions metálicos e outros cofatores não pareciam ser essenciais para a atividade da pululanase. Os compostos p-cloromercuribenzoato, N-etilmaleimida e iodoacetato não inibiram a pululanase, indicando que grupos tiol não são essenciais para a atividade. Grupos tirosina e histidina não pareciam ser essenciais desde que a atividade não foi significativamente inibida por iodo. Os compostos N-bromosuccinimida 0,01 mM e brometo 2-hidroxi 5-nitrobenzil 0,1 mM, inibiram completamente a atividade da pululanase, sugerindo que grupos triptofano podem ser importantes para a atividade.

Nakamura et alii, em 1975 (103), descreveram a purificação e algumas propriedades da pululanase alcalina extracelular de *Bacillus sp* no. 202-1. A enzima foi purificada cerca de 290 vezes através da adsorção em DEAE-celulose, fracionamento com acetona, precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de DEAE-celulose seguida por filtração em gel Sephadex G-200. A pululanase apresentou uma banda de proteína em eletroforese em gel. O peso molecular foi estimado em 92.000

daltons por eletroforese em gel de poliácridamida e dodecil sulfato de sódio. O pH ótimo de atividade da enzima foi na faixa de 8,5-9,0. A temperatura ótima de atividade da pululanase foi 55 °C em pH 8,0. A estabilidade térmica foi medida após aquecimento da enzima em tampão fosfato 0,1 M pH 8,0 em várias temperaturas por 15 minutos. A inativação ocorria gradualmente e a atividade residual a 55 °C era cerca de 83%. A enzima apresentava-se estável após incubação a 4 °C por 24 horas na faixa de pH 6,5-11,0. A enzima hidrolisava completamente as ligações glicosídicas alfa-1,6 da amilopectina, glicogênio e pululana.

Ohba e Ueda, em 1975 (112), estudando algumas propriedades da pululanase extra e intracelular da linhagem de *Aerobacter aerogenes* no. 105, isolada pelos autores, verificaram que a composição de aminoácidos destas enzimas eram semelhantes. Ambas enzimas apresentaram três diferentes pontos isoelétricos. Foi sugerido que estas pululanases consistiam de três subunidades não idênticas. A atividade de pululanase após focalização isoelétrica decrescia acentuadamente, sendo recuperada somente 5% da atividade original. Foi observado que a pululanase rompia as ligações glicosídicas alfa-1,6 da pululana ao acaso, atuando como uma endoenzima. íons cálcio estimularam cerca de 30% a atividade de pululanase enquanto que íons de metais pesados exceto Mn^{2+} e Ag^{+} inativaram consideravelmente a enzima. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na concentração 10^{-2} - 10^{-4} M

inibia cerca de 20-40% atividade de pululanase. Os autores sugeriram que íons cálcio podem ter papel importante na manutenção da conformação da enzima. Reagentes sulfidrílicos não inibiram a pululanase. O detergente dodecil sulfato de sódio na concentração 10^{-3} M inibia 50% da atividade de pululanase. O reagente N-bromosuccinimida em concentrações superiores a $2,5 \times 10^{-5}$ M inibia completamente ambas pululanases. Os autores sugeriram que resíduos de triptofano podem estar envolvidos na ação enzimática das pululanases.

Palmer, em 1975 (115), descreveu a aplicação de xaropes de glicose obtidos através da hidrólise enzimática do amido, em panificação, confeitaria, produção de geléias, bebidas carbonatadas, conservas, sorvetes e alimentos infantis e ressaltou a utilização potencial de xarope com alto teor de maltose e frutose.

Manners, em 1975 (91) comparou a ação de enzimas desramificantes extraídas de aveia, arroz, cevada germinada, sorgo e feijão fava. As enzimas purificadas hidrolisavam facilmente beta-dextrina limite de amilopectina com a produção de maltose e maltotriose. A velocidade de hidrólise da beta-dextrina limite de amilopectina pelas enzimas desramificantes era diversas vezes superior àquela de amilopectina. As enzimas apresentavam baixa ou nenhuma atividade sobre o glicogênio de fígado ou fitoglicogênio em condições em que amilopectina ou

beta-dextrina limite de amilopectina eram hidrolisadas e eram incapazes de remover unidades glicosil dos oligossacarídeos panose e 6³-glicosil maltotriose.

No trabalho realizado por Kitagawa et alii (75), estudou-se a inibição e algumas propriedades da isoamilase de *Pseudomonas* sp. Esta última era inibida por N-bromosuccinimida 0,001mM e brometo de 2-hidroxinitrobenzil 0,1mM e os autores sugeriram que a inibição era devido a alteração estrutural de enzima. A atividade era retida após tratamento com ácido etilenodiaminotetracético e após diálise prolongada contra tampão, desta forma íons metálicos ou outros cofatores não pareciam ser essenciais para a atividade de isoamilase. Os autores verificaram que a enzima não era inibida por p-cloromercuribenzoato 0,5mM, N-etilmaleimida 1mM e mercaptoetanol 10mM e sugeriram que grupos tiol e dissulfito não eram essenciais para a atividade. A isoamilase era inibida por fenilmercuriacetato, iodoacetato e metais pesados, contudo verificaram que grupos metionil e carboxilas não pareciam ser essenciais uma vez que azida e carbodiimida não inibiram a atividade. Ao estudar a estrutura da isoamilase, através da análise de equilíbrio de sedimentação e filtração em gel de Sepharose 6B na presença de hidrocloreto de guanidina 5 M, concluíram que era composta de duas subunidades não ligadas covalentemente, cada uma com peso molecular estimado em 50 000.

Em 1975, Urlaub e Wober (152), propuseram que as enzimas envolvidas na degradação de glucanas ramificadas pelo microrganismo *Bacillus amyloliquefaciens* seriam alfa-amilase e isoamilase. Pela ação concomitante destas enzimas, excretadas no meio de cultura, o glicogênio e o amido seriam degradados para maltodextrina e maltose. Estas maltodextrinas lineares poderiam então ser atacadas pela alfa-glicosidase ligada à célula e os produtos transportados para o citoplasma por uma permease.

Jeaningros et alii, em 1975 (69), estudaram a produção de uma enzima amilolítica desramificante pela linhagem de *Escherichia coli* JC 1953. A enzima intracelular hidrolisava as ligações glicosídicas alfa-1,6 de fosforilase dextrina-limite de glicogênio apresentando atividade ótima em tampão acetato pH 6,0 e 50°C. A enzima era estável a 40°C por diversos dias. Era inibida por iodoacetato 10mM, p-cloromercuribenzoato 1mM e CuSO_4 1mM. Cerca de 50% da enzima era inativada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,03M mas não era inibida por Na_2SO_4 0,1M. Os substratos beta-dextrina limite, de amilopectina e de glicogênio eram desramificados pela preparação enzimática purificada, com liberação de maltotriose e pequena quantidade de maltose. A enzima não hidrolisava a pululana. Atuava sobre a amilopectina e glicogênio com aumento de poder de coloração com reagente de Iodo, mas a velocidade de reação sobre estes dois últimos substratos era baixa em relação ao substrato fosforilase dextrina limite, de glicogênio.

Allen e Dawson, em 1975 (11), descreveram as características das enzimas desramificantes isoamilase e pululanase e a utilização das mesmas na produção de maltose e amilose. Ressaltaram também a aplicação potencial de maltose em geléias e sorvetes e de amilose na produção de filmes biodegradáveis.

Enevoldsen, em 1975 (45), enfatizou as possibilidades de aplicação e o uso potencial de enzimas desramificantes em cervejaria, em combinação com alfa e beta-amilases para o aumento de açúcares fermentáveis.

Hurst, em 1975 (65), descreveu um processo de conversão de amido para glicose pela sacarificação de amido liquefeito, com glicoamilase e uma enzima amilolítica desramificante, em pH que inibia a ação reversível da glicoamilase. Neste processo o amido era liquefeito preferencialmente com uma enzima como alfa-amilase e sacarificado com glicoamilase fúngica e pululanase de *Aerobacter aerogenes* na faixa de pH 4,5 e 6,7, preferivelmente entre 5,9 e 6,3.

Wober, em 1976 (160), verificou a produção de pululanase em diversas linhagens de *Klebsiella* sp e sua ação na degradação do amido. As linhagens *Klebsiella pneumoniae* NCTC 9633, *K. ozaenae* NCTC 5050 e *K. rhinoscleromatis* NCTC 5046, representativas de todos os membros do gênero *Klebsiella* sp produziram pululanase. Além destas linhagens foi testado o

crescimento de 58 linhagens de *Klebsiella* sp em meio de cultura sólido contendo maltose, maltodextrina, amido solúvel, glicogênio ou pululana como fonte de carbono. Todas as linhagens apresentaram crescimento exuberante com maltose e maltodextrinas, sete linhagens tiveram baixo ou nenhum crescimento com amido, pululana ou glicogênio. Entre as 51 linhagens que apresentaram crescimento em amido, pululana ou glicogênio, três foram examinadas com maior detalhe para verificar o possível envolvimento da pululanase na utilização de alfa-glucanas. A produção de pululanase foi induzida pelo crescimento das células em alfa-glucanas, enquanto que glicerol, D-glicose ou lactose não induziram a formação de enzima. A produção de pululanase pelas três linhagens variou sob condições diferentes de cultura comparáveis, assim como a alfa-amilase. Experimentos comparativos sobre crescimento do microrganismo em alfa-glucanas lineares e ramificadas permitiram a conclusão que a ação concomitante das hidrolases específicas como a alfa-amilase para ligações glicosídicas alfa-1,4 e a pululanase para ligações glicosídicas alfa-1,6 era um requerimento obrigatório para a utilização efetiva do amido e do glicogênio.

Em 1976, Jeaningros et alii (70), estudaram a purificação e propriedades de uma enzima amilolítica desramificante da linhagem de *Escherichia coli* K12. A enzima hidrolisava facilmente as ligações glicosídicas alfa-1,6 dos substratos fosforilase e alfa-amilase dextrina limite, de glicogênio e de amilopectina. A amilopectina era completamente

hidrolisada mas a enzima mostrava baixa atividade sobre o glicogênio. A enzima desramificante de *E. coli* K12, não podia ser classificada como pululanase porque não apresentava atividade sobre a pululana. E também diferia das isoamilases bacterianas descritas em outros estudos devido a inabilidade para hidrolisar o glicogênio. A enzima desramificante apresentava atividade ótima em pH 5,6 e a 45o - 50oC e era fortemente inibida pelos reagentes sulfidrílicos iodoacetato e p-cloromercuribenzoato.

Takasaki, em 1976 (141), isolou o microrganismo *Bacillus cereus* var. *mycoides* produtor de beta-amilase e pululanase extracelulares, que se mostraram efetivos na produção de maltose a partir de amido. Posteriormente (142), o autor relatou a purificação destas enzimas através do fracionamento com sulfato de amônio, adsorção em amido e celite e cromatografia em coluna de Sephadex G-100. As enzimas purificadas apresentaram-se homogêneas na eletroforese em disco. A beta-amilase produzia somente maltose a partir de amilose, amilopectina, amido e glicogênio. A pululanase de *B. cereus* var. *mycoides* hidrolisava as ligações glicosídicas alfa-1,6 da pululana liberando maltotriose e da beta-dextrina limite produzindo maltose, maltotriose e maltotetraose. O autor observou que não havia aumento da coloração com a solução de Iodo pela ação da pululanase sobre a amilopectina e sugeriu que essa pululanase apresentava alta atividade sobre ramificações de cadeias curtas de 2 ou 4 resíduos de glicose em beta-dextrina limite e não tinha ou apresentava baixa atividade sobre as ramificações mais longas

da amilopectina. A pululanase de *B. cereus* var. *mycoides* não hidrolisava as ligações glicosídicas alfa-1,6 de panose, isomaltose e isomaltotriose. As condições ótimas de conversão de amido para maltose foram pH 6,0 - 6,5 e 50oC. O rendimento de maltose a partir de amido dependia do grau de liquefação do amido e o rendimento máximo 95% de maltose foi obtido a partir do amido de batata não tratado com alfa-amilase. Com o aumento do valor de DE do amido de 1,46 para 31,8 o rendimento de maltose decrescia gradualmente de 89,8% para 61,2% e a formação de maltotriose aumentava de 5,1 para 25,6%. O pH ótimo de atividade da beta-amilase e da pululanase foi cerca de 7,0 e de 6,0 - 6,5 respectivamente. A temperatura ótima de atividade das enzimas foi cerca de 50oC. As enzimas foram inibidas por reagentes sulfidrílicos como cloreto de mercúrio e p-cloromercuribenzoato. A inibição com p-cloromercuribenzoato era recuperada pela adição de cisteína. A adição de íons Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{1+} na concentração 1mM não aumentava a atividade de pululanase de *Bacillus cereus* var. *mycoides*, contudo a adição de íons Ca^{2+} era efetiva na proteção de enzima contra desnaturação térmica. O peso molecular da beta-amilase e da pululanase foram estimados em 35.000 ± 5.000 e 110.000 ± 20.000 respectivamente através de filtração em gel Sephadex G-200. As enzimas foram estáveis na faixa de pH 6,0 a 9,0 após incubação a 30oC durante 3 horas. A beta-amilase permaneceu estável após tratamento térmico durante 10 minutos em pH 7,0 em temperaturas inferiores a 50oC. O tratamento térmico da pululanase a 40oC, 50oC e 60oC em tampão

fosfato 0,05M pH 7,0 durante 10 minutos resultou em 5%, 50% e 100% de inativação respectivamente.

Adam e Priest, em 1977 (8), estudaram a produção de pululanase extracelular pela linhagem *Bacillus macerans* NCIB 9368. A enzima desramificava beta-dextrina limite, de amilopectina e de glicogênio mas diferia da pululanase de *K. aerogenes* devido a inabilidade para desramificar a amilopectina e aumentar o poder de coloração com solução de iodo. Estes resultados pareciam indicar que a pululanase de *B. macerans* tinha baixa atividade sobre cadeias ramificadas longas comparadas às cadeias curtas de beta-limite dextrina ou que as estruturas altamente ramificadas da amilopectina ou do glicogênio impediam o acesso da enzima. A enzima apresentava atividade ótima na faixa de 50 a 55°C mas era rapidamente inativada a temperaturas superiores a 50°C.

McMullen e Andino em 1977 (97) relataram que a presença de maltose e isomaltose, em xarope de glicose obtido da hidrólise enzimática do amido, era resultante da síntese a partir de glicose, catalisada pela amiloglicosidase e não pela presença de impurezas enzimáticas na preparação comercial de amiloglicosidase.

Kainuma, Kobayashi e Harada, em 1978 (72), compararam a ação da isoamilase de *Pseudomonas* e da pululanase da *Klebsiella* sobre vários oligossacarídeos. A isoamilase diferia

da pululanase em diversas características. A isoamilase apresentava maior atividade sobre os polissacarídeos de maior peso molecular como a amilopectina. A maioria dos oligossacarídeos ramificados testados foram hidrolisados a uma baixa velocidade, cerca de 10% menor do que a velocidade de hidrólise da amilopectina. Os resíduos maltosil foram hidrolisados pela isoamilase muito lentamente em comparação aos resíduos maltotriosil. A isoamilase requeria um mínimo de três resíduos de glicose na cadeia. A pululanase assim como a isoamilase foram incapazes de liberar unidades glicosil de oligossacarídeos ramificados como panose, isopanose, ¹6 -o-alfa D glicosil maltotriose, ²6 -o-alfa D glicosil maltotriose, ³6 -o-alfa D glicosil maltotriose, mas a pululanase hidrolisava ligações glicosídicas alfa-1,6 de resíduos maltosil dos compostos ²6 -o maltosil maltose e ³6 -o maltosil maltotriose. Os oligossacarídeos ³6 -o-alfa maltotriosil maltotriose e ³6 -o-alfa maltotriosil maltotetraose foram os melhores substratos para a pululanase, com velocidade relativa de 162 e 146 respectivamente em relação a velocidade de hidrólise da pululana. Os autores confirmaram que os menores substratos para a pululanase foram os tetrassacarídeos ¹6 -o-alfa maltosil maltose, ²6 -o-alfa maltosil maltose e 6-o-alfa maltriosil - D - glucose, como previamente verificados por outros pesquisadores (3). Por outro lado, o menor substrato para a isoamilase de *Pseudomonas* foi o pentassacarídeo ³6 -o-alfa maltosil maltotriose. A Tabela A descrita a seguir ilustra a velocidade de reação relativa da isoamilase e pululanase sobre oligossacarídeos e polissacarídeos.

TABELA A

VELOCIDADE DE REAÇÃO RELATIVA DA ISOAMILASE DE *Pseudomonas* sp
E DA PULULANASE DE *Klebsiella aerogenes* SOBRE VÁRIOS
OLIGOSSACARÍDEOS.

(o = anidroglicose; o = glicose com grupo redutor; - ligação
alfa 1,4 e → = ligação alfa 1,6)

Oligossacarídeos		Velocidade Reação Relativa	
Nome	Estrutura	Isoa- milase	Pulu- lanase
Panose	o ↓ o- o o-o	0	0
Isopanose	↓ o o	0	0
1 6 -o-alfa D glicosil maltose	↓ o-o	0	0
3 6 -o-alfa D glicosil maltotriose	↓ o-o- o	0	0
2 6 -o-alfa maltosil maltose	↓ o- o	0	2
2 6 -o-alfa D glicosil maltotriose	↓ o-o- o	0	0
1 6 -o-alfa maltosil maltose	↓ o- o	0	0
3 6 -o-alfa D glicosil maltotetraose	↓ o-o-o- o	0	0
3 6 -o-alfa maltosil maltotriose	↓ o-o- o	2,8	22
2 6 -o-alfa maltosil maltotriose ou	o-o o-o-o ↓ ↓ o-o- o o- o	0	8,6
1 6 -o-alfa maltotriosil maltose	↓ o- o	0	0
3 6 -o-alfa maltosil maltotetraose	↓ o-o-o- o	6,9	43

(continuação)

Nome	Estrutura	Isoa- amilase	Pulu- lanase
3 6 -o-alfa maltotriosil maltotriose	$\begin{array}{c} 0-0-0 \\ \downarrow \\ 0-0-\alpha' \end{array}$	9,7	162
2 6 -o-alfa maltotriosil maltotriose	$\begin{array}{ccc} 0-0-0 & & 0-0-0-0 \\ \downarrow e & & \downarrow \\ 0-0-\alpha' & & 0-\alpha' \end{array}$	2,7	56
2 6 -o-alfa maltotetraosil maltose			
3 6 -o-alfa maltotriosil maltotetraose	$\begin{array}{c} 0-0-0 \\ \downarrow \\ 0-0-0-\alpha' \end{array}$	33	146
3 6 -o-alfa maltosil maltopentaose	$\begin{array}{c} 0-0 \\ \downarrow \\ 0-0-0-0-\alpha' \end{array}$	8,3	98
2 6 -o-alfa maltopentaosil maltose	$\begin{array}{c} 0-0-0-0-0 \\ \downarrow \\ 0-\alpha' \end{array}$	0	26
2 6 -o-alfa maltotetraosil maltotriose	$\begin{array}{c} 0-0-0-0 \\ \downarrow \\ 0-0-\alpha' \end{array}$	6,8	26
3 6 -o-alfa maltotriosil maltopentaose			
3 6 -o-alfa maltotetraosil maltote- traose	$\begin{array}{ccc} 0-0-0 & & 0-0-0-0 \\ \downarrow e & & \downarrow \\ 0-0-0-0-\alpha' & & 0-0-0-\alpha' \end{array}$	18	86
polissacarídeos			
pululana		<1	100
amilopectina		100	15

Wohner e Wober, em 1978 (161), verificaram através da separação e análise individual da membrana citoplasmática e da membrana externa, da linhagem de *Klebsiella* sp 5246, que a pululanase estava associada à membrana externa. Os autores sugeriram que linhagens de *Klebsiella* produzem pululanase e, dependendo da linhagem, uma amilase específica para a hidrólise de ligações glicosídicas alfa-1,4, quando crescem em meio contendo alfa-glucanas. Enzimas como alfa-amilase, embora não identificadas de modo preciso, presumivelmente existem em algumas linhagens (114, 160). Uma amilase produtora de maltohexaose foi descrita por Kalnina et alii (71). Desta forma, hidrolases ligadas à célula e ciclodextrina glucanotransferase extracelular serviriam para hidrolisar alfa-glucanas disponíveis no ambiente celular e produzir maltodextrinas que poderiam então ser transportadas para o citoplasma. Para este fim pululanase e amilase devem estar disponíveis para a hidrólise do substrato macromolecular. Devido ao tamanho molecular do amido, espera-se que ambas enzimas estejam ligadas à membrana externa da célula. Contudo, a linhagem 5246, formou quantidade muito pequena de amilase e não foi adequada para estudos de localização subcelular desta enzima. Os autores sugeriram que a ação simultânea de pululanase e amilase, independente ou como um complexo, sobre alfa-glucanas ramificadas produzem maltooligossacarídeos lineares que passam através de poros hidrofílicos da membrana externa e alcançam a permease na membrana citoplasmática.

Pazur et alii, em 1978 (120), estudaram a síntese de oligossacarídeos pela enzima glicosil transferase (E.C. 2.4.1.24) isolada de preparação enzimática comercial de glicoamilase destinada para produção de D-glicose. Os autores verificaram a síntese de 1,6 anidro beta-D-glicopirranose e diversos D-glicosil oligossacarídeos pela glicosil transferase a partir de maltose. Tais produtos eram sintetizados pelo mecanismo de transglicosilação envolvendo a formação de complexo D-glicosil enzima e deslocamento do grupo D-glicosil para substratos aceptores apropriados. Foi verificado a produção de nigerose, kojibiose, isomaltose, maltotriose, panose, isomaltotriose e 6-O-D-glicosil panose. O monossacarídeo D-glicose era também um produto da reação e podia ser proveniente tanto do final redutor como do final não redutor da maltose.

Ghiasi et alii, em 1979 (52), utilizaram a pululanase no estudo da caracterização do amido solúvel da crosta do pão. Os autores verificaram que a fração de amido solúvel diminuía com o envelhecimento do pão. Após desramificação do amido solúvel com pululanase seguido do fracionamento em Bio Gel P-10, verificou-se que o amido solúvel era essencialmente ramificado. Este amido solúvel apresentava baixa afinidade com iodo, baixo peso molecular e cadeias lineares de comprimento mais curtos do que aquelas de amilopectina. Os autores relataram que a fração solúvel era a amilopectina degradada pela ação de amilases durante a panificação.

Konishi et alii, em 1979 (77), estudaram a ocorrência da pululanase em vários microrganismos da família *Enterobacteriaceae*. Os autores verificaram que somente as linhagens de *Klebsiella* cresceram bem utilizando amilopectina e pululana e produziram pululanase. Nenhuma das linhagens do gênero *Enterobacter* testadas produziram pululanase. A pululanase produzida por várias linhagens de *Klebsiella* foi testada pelo método de imunodifusão. O filtrado do meio de cultura e do extrato celular de todas as linhagens de *Klebsiella* testadas formaram uma linha de precipitação contra o antisoro preparado com pululanase cristalina de *K. pneumoniae* IFO 3321. Os autores observaram que as pululanases de *Klebsiella* podem ser divididas em dois grupos: o primeiro grupo compreende a pululanase de *K. aerogenes* W70, *K. pneumoniae* IFO 3318, IFO 3319, IFO 3321, IFO 12059 e IFO 13541 e o outro pululanase de *K. pneumoniae* IFO 3317 e ATCC 21073. O primeiro grupo era constituído de pululanase homóloga e o segundo compreendia pululanase heteróloga porque sua linha de precipitação formava um esporão com a linha homóloga. As outras linhagens de *Enterobacteriaceae* testadas não produziram reação de precipitação com o antisoro. Os autores verificaram que a pululanase produzida na forma extracelular ou ligada à célula de acordo com as condições de cultura (48, 155) eram idênticas imunologicamente.

Amemura et alii, em 1980 (13), verificaram que a isoamilase cristalina de *Pseudomonas amyloclavata* estava contaminada com traços de enzima proteolítica. Esta última digeriu a isoamilase sob condições neutras ou alcalinas, especialmente na presença de dodecil sulfato de sódio. O peso molecular da isoamilase foi estimado em 90.000 através de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e por filtração em gel de Sepharose 6B na presença de hidrocloreto de guanidina, após inativação da enzima proteolítica. Os autores relataram que os resultados anteriores (75) indicando subunidades da enzima com peso molecular estimados respectivamente em 46.000 e 52.000 através de análise de equilíbrio de sedimentação e por filtração em gel na presença de hidrocloreto de guanidina estavam incorretos.

Ao estudar o efeito coadjuvante de pululanase na degradação enzimática de grânulos de amido intacto, Ueda e Marshall, em 1980 (150), verificaram que a pululanase tinha pouco efeito na hidrólise de amido de milho ceroso com alfa-amilase de malte, porém estimulava a ação da beta-amilase de batata doce e de *Bacillus polymyxa*.

Atwell et alii, em 1980 (16), estudaram a desramificação de amilopectina de trigo pela isoamilase de *Cytophaga* e pela pululanase de *Enterobacter aerogenes*. O modo de ação da pululanase sobre amilopectina diferia daquele da isoamilase. Na cromatografia do hidrolisado de amilopectina com

pululanase, em gel Sepharose CL-2B obteve-se uma distribuição bimodal das cadeias durante todas as etapas de desramificação da amilopectina. A isoamilase, contudo, hidrolisava o polímero em frações intermediárias que, posteriormente, eram desramificadas resultando em distribuição bimodal.

Hizuhuri et alii, em 1981 (59), utilizando enzimas amilolíticas desramificantes verificaram a presença de cadeias laterais nas amostras de amilose de diversas fontes. A isoamilase de *Pseudomonas* hidrolisava cerca de 30% das ligações ramificadas de amilose de batata. A ação concomitante de pululanase de *Aerobacter aerogenes* e beta-amilase de batata hidrolisava completamente a amilose em maltose.

Lindros et alii, em 1981 (85), estudaram a combinação de diversas enzimas amilolíticas para a hidrólise de amido de cereais pré-tratado com alfa-amilase. As enzimas comerciais de glicoamilase de *Aspergillus niger*, beta-amilase de cevada e pululanase de *Klebsiella aerogenes* foram imobilizadas por adsorção em resina de Duolite S-761-fenol-formaldeído e, subsequentemente, tratadas com 2,5% de glutaraldeído. A adição de 1 unidade de pululanase imobilizada a 20 unidades de glicoamilase aumentava consideravelmente a velocidade de sacarificação de xarope de amido de cevada, em processo descontínuo realizado a 50°C e pH 5,0, porém com pequeno efeito no valor de DE final. A inclusão de 10 unidades de pululanase imobilizada à mistura de 150 unidades de glicoamilase imobilizada e 1690 unidades de

glicose isomerase imobilizada comercial aumentava a velocidade de hidrólise e o valor de DE final na sacarificação e isomerização de xarope de amido de cevada em coluna de operação contínua a 50oC e pH 6,5. Os reatores puderam ser operados por diversos meses com baixo decréscimo na atividade se a contaminação era controlada por preservantes.

Iwaki e Fuwa, em 1981 (68), descreveram a purificação e algumas propriedades da enzima desramificante de arroz germinado. A enzima foi purificada até homogeneidade através de cromatografia em colunas de ciclohexamiloze acoplada a Sepharose 6B, Ultrogel AcA-44 e Bio Gel P-150. A enzima purificada apresentava pH ótimo de atividade em pH 5,5. A temperatura ótima de atividade foi 50oC após 20 minutos de reação em tampão acetato pH 5,5. A enzima hidrolisava rapidamente a pululana, porém degradava moderadamente o amido de arroz ceroso e de milho ceroso. Diferentemente de outras enzimas vegetais, a enzima desramificante de arroz germinado degradava o fitoglicogênio e o glicogênio.

Yamada, em 1981 (166), ao estudar a conversão de enzimas desramificantes ativas e inativas, de sementes de arroz, sugeriram que estas eram sintetizadas na forma ativa durante a fase inicial de amadurecimento, acumulavam na forma inativa e podiam ser reativadas durante a germinação. A seguir, o autor (167) relatou que a enzima desramificante purificada, extraída de aveia, hidrolisava rapidamente a pululana, beta-dextrina limite e

fosforilase dextrina limite, de amido de arroz ceroso e arroz normal, porém degradava lentamente amido de arroz ceroso e arroz normal. Verificou-se também a presença de enzimas na forma inativa em trigo, cevada e centeio, que podiam ser ativadas com agentes redutores.

Spencer-Martins, em 1982 (137), verificou que uma linhagem de levedura (*Lipomyces kononenkoae*) produzia isoamilase (glicogênio 6-glucanohidrolase E.C.3.2.1.68) quando crescia em meio contendo amido. A enzima aumentava a beta-amiloilise da amilopectina e glicogênio, hidrolisava completamente estes substratos em maltose quando utilizada em combinação com beta-amilase mas não tinha ação sobre dextrana ou pululana. A isoamilase apresentava atividade ótima a 30°C e pH 5,6. O peso molecular da enzima foi estimado em 65.000 através de filtração em Bio-gel. O valor de Km para amido solúvel era 9g/litro a 30°C e pH 5,5.

Ohba e Ueda, em 1982 (113), estudaram o mecanismo de liberação da pululanase extracelular de *Aerobacter aerogenes* RS-1. Os autores isolaram e purificaram, do meio de cultura para produção de pululanase extracelular, um fator denominado efetor indutivo, de peso molecular menor que 500 daltons, que liberava a enzima ligada à célula. A produção máxima do efetor indutivo foi obtida pela fermentação do microrganismo em meio de cultura constituído de 1,5% de amido liquefeito; 0,8% $\text{CH}_3\text{COONH}_4$; 0,2% K_2HPO_4 ; 0,075% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,03% peptona e 0,005% FeSO_4 .

ajustado a pH 9,0 durante 4 dias a 30°C. Os autores propuseram que o efator indutivo atuaria liberando uma protease das células cultivadas em agitador rotatório. A pululanase ligada à célula podia ser liberada por proteases comerciais e lisozima.

Sillis e Stewart, em 1982 (134), verificaram a produção de alfa-amilase, glicoamilase e pululanase por diversas linhagens de leveduras amilolíticas. Microrganismos do gênero *Schwanniomyces* sp foram as únicas linhagens que produziram atividade desramificante entre as leveduras estudadas.

Considerando a restrita susceptibilidade dos amidos não gelificados ou intacto a um único sistema enzimático, Wankhede e Rhateke, em 1982 (158), estudaram o efeito sinérgico de diversas enzimas amilolíticas no aumento da hidrólise de amido. Os autores observaram que a glicoamilase I, purificada, obtida de *Aspergillus niger* hidrolisava cerca de 27,5% a 35,6% do amido intacto mesmo após incubação prolongada de 60 horas. A pululanase sozinha não hidrolisava o amido não gelificado. Por outro lado, o sistema combinado de pululanase e glicoamilase I aumentava a hidrólise de amido de arroz (*Oryza sativa*), amido de milho ceroso (*Zea mays*), "ragi" (*Eleusine coracana*), "foxtail millet" (*Setaria italica*) e "jowar" (*Sorgum vulgare*). O amido de milho ceroso foi hidrolisado 71,2% comparado com 40% de hidrólise de outros amidos. A glicoamilase II hidrolisava cerca de 9,12 a 20,18% do amido intacto. A ação conjunta de glicoamilase II e pululanase aumentava cerca de 3 vezes a

hidrólise de amido intacto. Os autores também verificaram que a pululanase estimulava a atividade de beta-amilase sobre o amido não gelificado. A hidrólise de amido de milho ceroso pela beta-amilase era aproximadamente 18,3% e a ação combinada de beta-amilase e pululanase aumentava para 22,84% a digestibilidade do amido de milho ceroso intacto.

Ishizaki et alii, em 1983 (67), purificaram e estudaram algumas propriedades da isoamilase de batata (*Solanum tuberosum*, L.). Esta última continha três enzimas desramificantes separáveis através de eletroforese em gel de poliácridamida. A banda DB foi identificada como isoamilase e as outras duas como R-enzima. A isoamilase foi purificada aparentemente até homogeneidade através de precipitação isoelétrica, fracionamento com sulfato de amônio, filtração em gel de Sepharose 6 B e cromatografia de afinidade em Sepharose 4 B-amido solúvel, sucessivamente. A isoamilase era instável na ausência de reagentes sulfidrílicos. A enzima purificada hidrolisava as ligações glicosídicas alfa-1,6 da amilopectina e glicogênio, mas não atuava sobre pululana. Degradava beta-dextrina limite mais lentamente do que os respectivos polissacarídeos formando maltotriose como produto principal. Baseando-se na especificidade quanto ao substrato, podia ser classificada como uma isoamilase. Esta última apresentava atividade ótima a pH 5,5 - 6,0 e 50°C após 10 minutos de reação. Quando incubada, na ausência de substrato durante 10 minutos, a

enzima permanecia estável a 45°C, mas perdia 50% da atividade original após aquecimento a 50°C nas mesmas condições.

Suzuki e Chishiro, em 1983 (140), relataram a produção de pululanase extracelular termoestável pela linhagem termofílica de *Bacillus stearothermophilus* KP 1064. A atividade enzimática máxima era obtida após 18 horas de cultivo, em agitador rotatório a 60 °C, em meio de cultura constituído de 1,2% de amido solúvel, 1,4 - 1,6% de peptona, 0,3% de extrato de levedura, 0,3% K_2HPO_4 e 0,1% KH_2PO_4 ajustado a pH 7,1 - 7,5. Os autores observaram grande acúmulo da enzima no meio de cultura no início da fase estacionária, mas a atividade desaparecia rapidamente no final da fase estacionária com uma velocidade de decréscimo de 0,074 unidades/mL de cultura/10 horas.

Norman em 1983 (109), descreveu as características de uma pululanase de *Bacillus sp.* A pululanase apresentava atividade ótima em pH 5,0 e a 60°C. A enzima era inibida por íons Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ag^{1+} , Hg^{2+} e Cu^{2+} em concentrações superiores a 1mM. A pululanase de *Bacillus sp.* foi inibida por p-cloromercuribenzoato indicando que grupos sulfidrilas estavam envolvidos na configuração da enzima. A atividade era recuperada pela adição de cisteína e beta-mercaptoetanol. O peso molecular da enzima foi estimado em 100.000 através de eletroforese em gel de poliácridamida.

No trabalho realizado por Baba e Arai, em 1984 (18), estudou-se a estrutura da amilopectina e material intermediário, característico do amido com alto conteúdo de amilose. Os polissacarídeos foram desramificados com isoamilase de *Pseudomonas* e pululanase de *Aerobacter*. Após fracionamento das amostras de beta-dextrina limite desramificada verificou-se que o comprimento das cadeias internas de amilopectina de amido com alto conteúdo de amilose era aproximadamente 9 unidades de glicose mais longo do que aquelas de amilopectina de milho ceroso. Além disso, a proporção de maltose e maltotriose em beta-dextrina limite de amilopectina de amido com alto conteúdo de amilose era menor do que aquela de amilopectina de milho ceroso. Os autores verificaram que as ramificações externas de amilopectina com alto conteúdo de amilose ocorrem com menor frequência confirmando que as cadeias ramificadas internas e externas são mais longas do que aquelas de amilopectina normal. Relatarem que o material intermediário apresentava baixo peso molecular e era constituído de 4 ou 5 cadeias com grau de polimerização aproximado de 50, ligadas à cadeia linear principal de 100 a 150 unidade de glicose.

Takizawa e Murooka, 1984 (143), estudaram a transferência do gene da pululanase (pul) de *Klebsiella aerogenes*, in vivo, para *Escherichia coli* usando o plasmídeo RP4: Mu cts como vetor. O gene pul foi expresso em *E. coli*, porém em nível de atividade mais baixo do que em *K. aerogenes*. Quando as células transconjugantes de *E. coli* cresceram em meio

contendo pululana ou maltose, a maior parte da pululanase foi produzida intracelularmente enquanto *K. aerogenes* produzia pululanase extracelularmente. A retransferência do gene *pul K* do *E. coli* para *K. aerogenes* por conjugação resultou em um aumento da produção de pululanase extracelular.

Mc. Gregor e Morgan, em 1984 (88), empregaram as enzimas desramificantes isoamilase de *Pseudomonas amyloclavata* e pululanase de *Aerobacter aerogenes* ATCC 9621 no estudo da estrutura das amilopectinas isoladas de grânulos de amido de cevada normal e ceroso. Após desramificação e cromatografia de permeação em Bio-gel P-6, os autores verificaram que as amilopectinas dos grânulos grandes e pequenos de amido de cevada normal e amido de cevada ceroso continham três grupos principais de cadeias lineares apresentando 45-50, 18-20 e 10-12 unidades de glicose aproximadamente. O oligossacarídeo maltohexaose foi a menor cadeia encontrada nas amilopectinas estudadas.

Slominska e Maczynski, em 1985 (135) ao estudar a aplicação de pululanase de *Bacillus sp* na etapa de sacarificação de amido liquefeito de batata concluíram que a combinação de enzima amilolítica desramificante e glicoamilase na produção de glicose resultava em aumento de 1,9% no rendimento de glicose, possibilidade de aumento da concentração de substrato para 40% (peso seco), redução do requerimento de glicoamilase e do tempo de reação em relação ao processo convencional. A adição

de pululanase resultava em 97,7% de rendimento de glicose enquanto que no mesmo período o rendimento de glicose na amostra sem pululanase alcançava 95,8%. Os autores obtiveram 95,6% a 97,6% de glicose na sacarificação de amido liofilizado de batata após 48 horas de reação, dependendo da concentração de pululanase.

Atkins e Kenney, em 1985 (15), verificaram o efeito da pululanase e da alfa-amilase na produção de oligossacarídeos em hidrolisado de amido de trigo. Quando pululanase foi usada como pré-tratamento para amilólise ou em combinação com alfa-amilase, foram produzidos hidrolisados com composição de oligossacarídeos significativamente diferente do hidrolisado de amido com mesmo valor de DE utilizando-se somente alfa-amilase. A adição de pululanase produzia menor quantidade de glicose, maltose e maltopentaose (DP 5) e frações de peso molecular intermediário (DP 12). Quando o valor de DE era superior a 20, além das diferenças descritas acima, a utilização de pululanase aumentava a quantidade de polissacarídeo não hidrolisado.

Hyun e Zeikus, em 1985 (66), relataram que extratos celulares de *Clostridium thermohydrosulfuricum*, uma bactéria anaeróbica que fermentava amido para etanol a 65°C, continham atividade de pululanase e glicoamilase. Os autores verificaram que a pululanase e glicoamilase apresentavam atividade ótima a 85°C e 75°C, respectivamente. A faixa de pH ótimo de atividade e pH de estabilidade foram respectivamente 5,5

a 6,0 e 4,5 a 5,5 para pululanase e 4,0 a 6,0 e 5,0 a 6,0 para glicoamilase. Os valores de K_m e V_{max} aparente para atividade de pululanase sobre pululano foram respectivamente 0,33 mg/mL e 2,6 unidades/mg proteína. Os valores de K_m e V_{max} aparente para a atividade de glicoamilase sobre amido foram respectivamente 0,41 mg/mL e 0,31 unidades/mg de proteína. As enzimas foram ativas e estáveis na presença de ar ou 10% (vol/vol) de etanol. A atividade de pululanase e glicoamilase permitia que o microrganismo degradasse amido bruto em glicose, na ausência de quantidade significativa de alfa-amilase.

Slominska e Starogardzka, em 1986 (136), relataram as vantagens da aplicação de xarope de maltose em aplicações comerciais. Os autores observaram que xarope contendo maltose como maior componente oferece resistência não usual à absorção de umidade, formação de cor e cristalização, tornando-o adequado para uso em bala dura, compota e geléia. Sendo também útil no controle da formação de cristais em formulações de sobremesas congeladas. A alta fermentabilidade do xarope de maltose é também valiosa em panificação e cervejaria.

Plant, Morgan e Daniel em 1986 (122) descreveram a purificação e as características da pululanase de *Thermus aquaticus* YT-1. A pululanase associada à célula foi solubilizada com 0,1% de Triton X-100 (v/v) e purificada cerca de 1,89 vezes após tratamento com etanediol seguido por filtração em gel Sephadex G-100, Fractogel TSK HK 55(f) e cromatografia de

troca iônica em DEAE-Sepharose 6L-6B. O peso molecular da enzima foi estimado em 83.000 e 80.000 através de eletroforese em gel de poliacrilamida e filtração em coluna de Fractogel TSK HW 55(F) respectivamente. A enzima apresentava atividade ótima em pH 6,4 e atividade desramificante sobre amido, amilopectina e pululana. A pululanase era termoestável e apresentava 80% de atividade após tratamento térmico a 85°C durante 10 horas. A presença de íons cálcio aumentava a estabilidade térmica da enzima. Os autores observaram que a pululanase de *Thermus aquaticus* era ativa em ampla faixa de pH e termoestável, no entanto a baixa atividade específica poderia limitar sua aplicação comercial.

Saha e Zeikus, em 1987 (130) descreveram o desenvolvimento nos processos de produção de xarope contendo maltose a partir de amido e relataram que xaropes contendo alto teor de maltose ganharão importância em cervejaria, panificação e outras indústrias de alimentos devido a alta fermentabilidade, baixa hidroscopicidade, baixa viscosidade em solução, resistência à cristalização, menor sabor doce e boa estabilidade ao calor.

Odibo e Obi em 1988 (110) estudaram a purificação e caracterização de pululanase extracelular de *Thermoactinomyces thalophilus* no. 15. A enzima foi purificada cerca de 16 vezes após fracionamento com acetona, cromatografia em coluna de DEAE-celulose e de Sephadex G-75. O peso molecular da enzima purificada foi estimado em 79.000 através de filtração em gel Sephadex G 150. A pululanase apresentava atividade ótima em pH

7,0 e a 70°C e retinha 90% da atividade relativa após aquecimento a 80°C durante 30 minutos, na ausência de substrato. A enzima era ativada por Co^{2+} , inibida por Hg^{2+} e apresentava maior estabilidade na presença de Ca^{2+} . As constantes de Michaelis-Menten (K_m) da enzima para os substratos pululana, amilopectina, beta-dextrina limite de amilopectina, beta-dextrina limite de glicogênio foram respectivamente 0,32%; 0,36%; 0,45% e 1,11%. A pululanase apresentava maior especificidade para o substrato pululana. A enzima convertia a pululana em maltotriose e hidrolisava os substratos amilopectina, beta-dextrina limite de amilopectina, beta-dextrina limite de glicogênio liberando maltotriose e maltose como produtos principais. Na hidrólise de glicogênio pela pululanase foi obtido maltotriose como produto principal e traços de um oligossacarídeo não identificado.

Kuriki et alii, em 1988 (80) ao estudar as características de uma enzima de *Bacillus stearothermophilus* que hidrolisava a pululana, verificaram que o produto principal era panose (O - D-glicopiranosil (1-6) O - D-glicopiranosil (1-4) - D-glicopiranoose). A enzima hidrolisava eficientemente a pululana mas apresentava pequena atividade sobre o amido. A enzima denominada novo tipo de pululanase mostrava atividade ótima na faixa de 60°C a 65°C e pH 6,0 e mantinha 90% da atividade enzimática após tratamento térmico a 60°C durante 60 minutos.

Em 1989, Kimura e Horikoshi (74) verificaram que uma linhagem alcalopsicotrófica de *Micrococcus* sp produzia amilase e pululanase. A amilase hidrolisava amilose em maltooligossacarídeos produzindo maltotetraose como produto principal e a pululanase rompia as ligações glicosídicas alfa-1,6 do pululano liberando maltotriose. A temperatura ótima para atividade da amilase e da pululanase foram 60oC e 55oC, respectivamente. O pH ótimo de atividade da amilase foi na faixa de 7,5 a 8,0 e da pululanase no pH 8,0. A estabilidade da amilase e pululanase foi determinada após 5 horas de incubação a 30oC. A amilase apresentou estabilidade na faixa de pH 6,5 a 10,0 na presença de CaCl₂ 5mM, enquanto que a pululanase, na faixa de pH 7,5 a 9,5. Estas enzimas extracelulares foram produzidas de maneira indutiva em meio constituído de 2% de amido solúvel; 0,5% de sacarose; 1,5% de triptona; 1% de extrato de levedura; 0,1% de K₂ HPO₄; 0,02% de MgSO₄ .7H₂O; 0,0002% de MnCl₂ 4H₂O e 0,7% de Na₂ CO₃ (esterilizado separadamente) após 4 dias de incubação a 18oC. A amilase e pululanase não foram produzidas em temperaturas superiores a 30oC. A sacarose não era um indutor efetivo, mas estimulava o crescimento celular e aumentava a produtividade.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS :

3.1. - Materiais

3.1.1. - Reagentes e Materiais Específicos

Reagentes químicos : ácidos, bases, sais minerais, solventes (Merck, Carlo Erba, Riedel ou equivalente).

Reagentes específicos : N-bromosuccinimida, p-cloromercuri-benzoato, iodoacetamida, L-cisteína, azida de sódio, dodecil sulfato de sódio (SDS), dietilditioicarbamato de sódio, "blue-dextran" 2000, albumina de ovo, hemoglobina bovina, catalase, "Cyanogum" e N,N,N',N' tetrametiletilenodiamina comercializados pela Sigma. A alfa-galactosidase de soja (*Glycine max*, L.) (fração I) foi cedida pela Srta. Vera Lucia Signorelli Baldini (ITAL).

Acúcares : glicose, maltose (Merck), isomaltose, panose e maltotriose (Hayashibara Biochemical Laboratories Inc).

Polissacarídeos : Amilopectina de milho ceroso, amido com alto teor de amilopectina extraído de arroz ceroso comercial, amido de milho e de mandioca comercial e pululana (Hayashibara Biochemical Laboratories Inc).

Meios de Cultura : Agar Nutriente, Agar Czapeck, Agar, Peptona, Proteose Peptona e Extrato de Levedura (Difco).

Resinas : DEAE-celulose (trocador anionico dietilaminoetil celulose Sigma Ref. D8382); CM-celulose (trocador cationico carboximetilcelulose Sigma Ref. C2883), Sephadex G-200 (40-120 μ ; Pharmacia Fine Chemicals Inc.), Amberlite IR 120 e Amberlite IR 68 (Rohm & Hass).

Enzimas : alfa-Amilase bacteriana de *B. subtilis* (Ueda Co.), alfa-Amilase bacteriana de *B. licheniformis*, Amiloglicosidase de *Aspergillus niger* (Novo Industrie Co.) e beta-Amilase livre de alfa-Amilase (Calbiochem Re. 17.157).

Papel de Cromatografia e filtros : Papel Whatman no. 1 de 46x57cm; filtros Millipore 0,45 μ Ref. HAWP-04700 e tubos de Collodium Sartorius de capacidade de retenção de proteínas de 13.200 daltons.

3.1.2. - Equipamentos

- Agitador Rotatório New Brunswick Scientific Ind. Co. Inc.
- Câmara Climática com controle de Temperatura 0-60 °C e agitação, Fanem modelo 346.
- Mini-Fermentador New Brunswick Scientific Ind. Co. Inc.
- Estufas Bacteriológicas FANEM.
- Espectrofotômetro Coleman 124 D.
- Espectrofotômetro Bausch Lomb Spectronic 20 e Coleman 295 E.
- Banhos de água de temperatura controlada Fanem.
- Potenciômetro Horiba e Digimed.
- Centrífuga Refrigerada Beckman Modelo J-21B.
- Coletor de frações Buchler Modelo Fractomete Alpha 200.
- Cromatógrafo CG-480 C Isocrático com detector CG-410 de índice de Refração e Integrador Processador Automático Modelo CG 300.

3.2. - Métodos

3.2.1. - Isolamento e Seleção de Microrganismos Produtores de Enzimas Amilolíticas Desramificantes

Com o objetivo de selecionar microrganismos produtores de pululanase foram isolados, do solo, de frutas e de flores, e testados inúmeros microrganismos conforme os métodos descritos a seguir.

3.2.1.1. - Coleta de Amostras

As amostras foram coletadas de diferentes regiões do Estado de São Paulo, Pará e Maranhão. As amostras de solo foram coletadas, no interior de matas cerradas ou próximas às margens de rios, após a remoção dos resíduos vegetais, de uma profundidade máxima de 10 cm e acondicionadas em sacos plásticos. Na coleta de amostras de uma região foi guardada uma distância mínima de 1 quilometro entre as mesmas. As amostras de frutas e de flores também foram acondicionadas em sacos plásticos e utilizadas, sempre que possível, imediatamente após a coleta.

3.2.1.2. - Isolamento de Microrganismos

Cerca de 1 g de solo, partes de frutas ou de flores foram adicionadas em tubos de ensaio de 25x250 mm contendo 10 mL de água destilada, previamente esterilizados. Para o isolamento de bactérias, após agitação dos tubos, o líquido sobrenadante foi inoculado em placas de Agar Nutriente acrescidos de 0,5% de uma das seguintes fontes de carbono; amilopectina, amido de arroz ceroso ou amido solúvel. As placas foram incubadas a 30 °C e a 35 °C durante 24 a 48 horas para o desenvolvimento das bactérias. As colônias isoladas foram replicadas em tubos de ensaio contendo Agar Nutriente acrescido de 0,5% de amido de arroz ceroso e incubados a 30 °C durante 24 a 48 horas.

Para o isolamento de fungos, após agitação dos tubos, o líquido sobrenadante foi inoculado em placas contendo Agar Batata (extrato de 10 g de batata, 4 g de glicose e 3 g de agar em 100 mL de água destilada) e Agar Czapeck acrescido de 0,5% de amido de arroz ceroso. As placas foram incubadas a 30 °C e a 35 °C durante 48 a 96 horas para o desenvolvimento dos fungos. As colônias de fungos isoladas foram replicadas em tubos de ensaio contendo Agar Batata e incubados a 30 °C até desenvolvimento satisfatório das culturas.

3.2.1.3. - Seleção Preliminar de Microrganismos Produtores de Enzimas Amilolíticas Desramificantes

As bactérias e fungos isolados de acordo com o item 3.2.1.2. foram inoculados respectivamente, em placas de Petri contendo Agar Nutriente acrescido de 0,5% de amilopectina e Agar Czapeck acrescido de 0,5% de amilopectina, na forma de estrias. As placas foram incubadas a 30 °C e a 25 °C durante 3 a 6 dias. Após incubação adicionou-se solução de Iodo-KI 0,01N nas placas de Petri. Os microrganismos que apresentaram halo azul ao redor das colônias, indicativo de produção de enzima amilolítica desramificante foram testados quanto a produção de pululanase de acordo com o método descrito a seguir.

3.2.1.4. - Seleção do Microrganismo Melhor Produtor de Pululanase

Os microrganismos seleccionados no item anterior foram inoculados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura no. 8 e no. 10, descritos na Tabela 1, ajustados a pH 7,0 com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. Os frascos foram incubados em agitador rotatório durante 72 horas a 28°C. Após incubação a atividade de pululanase e de isoamilase foram determinadas como descrito nos itens 3.2.1.5.1.a. e 3.2.1.5.2.

3.2.1.5. - Determinação da Atividade de Enzimas Amilolíticas

3.2.1.5.1. - Determinação da Atividade de Pululanase

A atividade de pululanase (pululana 6-glucano hidrolase EC 3.2.1.41), foi baseada no método Takasaki (141), e determinada rotineiramente pelo aumento do poder redutor da solução de pululana, de acordo com as condições descritas no item 3.2.1.5.1.a. A hidrólise da pululana foi verificada por cromatografia descendente em papel, como descrito no item 3.2.1.6.

A determinação da atividade de pululanase sobre a amilopectina, baseada no aumento do poder de coloração da amilopectina de milho ceroso com reagente de iodo (146), foi realizada de acordo com as condições descritas no item 3.2.1.5.1.b.

3.2.1.5.1.a. - Determinação da Atividade de Pululanase Utilizando-se Substrato Pululana

A atividade de pululanase foi determinada pelo método descrito por Takasaki (141), com modificações. Amostras de 0,5 mL de solução 0,7% de pululana em tampão fosfato 0,1 M pH 6,0 ou como indicado foram incubadas em banho de água termostatizado a

40 °C durante 10 minutos para equilibrar a temperatura. A seguir foi adicionado aos tubos 0,5 mL de solução de enzima e a mistura de reação foi incubada a 40 °C durante 30 minutos. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (194), utilizando-se como padrão a maltotriose. Uma unidade de pululanase foi definida como a quantidade de enzima que libera açúcares redutores expressos como μ g maltotriose/minuto/mL de enzima a partir de pululana sob as condições de ensaio.

3.2.1.5.1.b. - Determinação da Atividade de Pululanase Utilizando-se Substrato de Amilopectina

A atividade de pululanase sobre a amilopectina foi determinada pelo método descrito por Ueda e Ohba (198) com modificações. A mistura de 0,5 mL de solução 0,5% de amilopectina do milho ceroso em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 6,0 e 0,25 mL de tampão citrato-fosfato 0,1M pH 6,0 ou como indicado, foi incubada em banho de água termostatizado a 40 °C durante 10 minutos para equilibrar a temperatura. A seguir foi adicionado 0,25 mL de solução enzimática à mistura de reação. Após 1 hora de incubação a 40 °C, foi adicionado 12,5 mL de ácido sulfúrico 0,01 M e os tubos de ensaio foram mantidos a 30 °C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 1 mL de solução iodo-KI 0,01N e 10,5 mL de água destilada. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro Bausch-Lomb modelo Spectronic 20, utilizando-se

como branco a mistura de reação em tempo zero. Uma unidade de atividade foi definida como aumento de 0,01 na absorbância a 620 nm/mL de enzima nas condições do ensaio.

3.2.1.5.2. - Determinação da Atividade de Isoamilase

A atividade de isoamilase (glicogênio 6-glucano hidrolase E.C. 3.2.1.68) foi baseada no método de Kobayashi (76), cujo princípio básico é o aumento do poder de coloração da amilopectina de milho ceroso com reagente de Iodo.

A mistura de 5 mL de solução 1% de amilopectina de milho ceroso em água destilada e 1 mL de solução tampão acetato 0,5M pH 3,6 ou tampão fosfato 0,5M pH 6,3 foi incubada em banho de água termostatizado a 40 °C durante 10 minutos para equilibrar a temperatura. A seguir 1 mL de solução enzimática foi adicionada à mistura de reação. Após 1 hora de incubação a 40 °C, uma alíquota de 0,5 mL da mistura de reação foi transferida para tubo de ensaio contendo 0,5 mL de solução Iodo-KI 0,01N e a solução final diluída para 25 mL com água destilada. A absorbância da solução foi medida em espectrofotometro Bausch-Lomb modelo Spectronic 20, utilizando-se como branco a mistura de reação em tempo zero. Uma unidade de atividade foi definida como aumento de 0,01 na absorbância a 620 nm/mL de enzima nas condições do ensaio.

3.2.1.5.3. - Determinação da Atividade de Alfa-amilase

Este ensaio baseia-se na determinação do tempo necessário para hidrolisar o amido à dextrina de tamanho definido, indicado pela cor do complexo Iodo-Dextrina e comparado com solução de coloração padrão (100).

A mistura de 20 mL de solução 2% de amido solúvel em tampão fosfato 0,05 M pH 6,0 e 9 mL de água destilada foi incubada em banho de água termostatizado a 30 °C durante 10 minutos para equilibrar a temperatura. O tempo exato de adição de 1 mL de enzima de diluição apropriada foi anotado e, a seguir, amostras de 1 mL da mistura de reação foram retiradas e adicionadas a 5 mL de solução diluída de Iodo-KI. A solução diluída de Iodo-KI foi preparada pela mistura de 2 mL de solução estoque ($5,5 \text{ g I}_2$ e 11 g KI em 250 mL de água destilada) e 20 g de KI dissolvido em 500 mL de água destilada. A coloração foi comparada com a cor da solução padrão constituída de $25 \text{ g de CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, $3,84 \text{ g de K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ em 100 mL de HCl 0,01 N. O final da reação foi estabelecido quando a amostra apresentou coloração aproximada à da solução padrão. Para maior acuidade, o tempo de hidrólise final deve estar entre 10 a 25 minutos. A atividade alfa-amilase foi expressa em unidades SKB (132). A Figura 5 apresenta a curva padrão de atividade de alfa-amilase, determinada utilizando-se alfa-amilase de unidades de atividade SKB (Sandsted, Kneen e Blish) conhecida.

3.2.1.5.4. - Determinação da Atividade de Beta-amilase

Para a determinação da atividade beta-amilase, 9 mL de solução 1% de amido solúvel em tampão fosfato 0,05M pH 6,0 foi incubado em banho de água termostatizado a 40 °C durante 10 minutos para equilibrar a temperatura. A seguir foi adicionado 1 mL de solução enzimática e a mistura de reação foi incubada a 40°C durante 30 minutos (133). A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson (104), utilizando-se a maltose como padrão. Uma unidade de atividade foi definida como μmol de maltose/minuto/mg proteína.

3.2.1.5.5. - Determinação da Atividade de Amiloglicosidase

A atividade de amiloglicosidase ou glicoamilase baseia-se na conversão do amido em glicose, sendo esta determinada quantitativamente pelo método alcalino de redução de cobre (101).

Para a determinação da atividade de amiloglicosidase, 50 mL de solução 4% de amido solúvel em tampão acetato 0,06M pH 4,2 foi incubado em banho de água termostatizado a 60 °C durante 10 minutos para equilibrar a temperatura. A seguir foi adicionado

1 mL de solução enzimática e a mistura de reação foi mantida a 60°C durante 1 hora. Após a incubação, a solução foi neutralizada rapidamente com solução de NaOH 2N utilizando-se fenolftaleína como indicador e diluída para 100 mL com água destilada. Para controle foi utilizado um branco preparado pela incubação da mistura de 50 mL de solução de amido em tampão acetato 0,06 M pH 4,2 e 1 mL de água destilada e também tempo zero preparado pela mistura de 50 mL de solução de amido solúvel em tampão acetato 0,06M pH 4,2, 1 mL de solução enzimática e solução de NaOH 2N para a inativação da amilloglicosidase. Para a determinação de açúcares redutores, amostras de 10 mL da mistura de reação final foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 250 mL. Em seguida adicionou-se aos frascos de Erlenmeyer 15 mL de água destilada, 10 mL de solução de sulfato de cobre ($69,680 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 1000 mL de água destilada) e 10 mL de solução alcalina de tartarato de sódio e potássio ($346 \text{ g KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 + 100 \text{ g NaOH}$ em 1000 mL de água destilada). Após agitação os frascos foram aquecidos em bico de Bunsen, mantidos em ebulição por 5 minutos e resfriados rapidamente em água corrente. Em seguida adicionou-se aos frascos de Erlenmeyer 10 mL de solução 30% de iodeto de potássio e 10 mL de solução 25% de ácido sulfúrico e o iodo liberado foi imediatamente titulado com solução de tiossulfato de sódio 0,1N até obtenção de coloração branco-amarela ou seja desaparecimento da coloração azul do complexo iodo-amido. Para a padronização do método foram utilizadas soluções de glicose de concentração conhecida na faixa de 0,01 - 0,1g glicose/10mL. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que

irá catalisar, sob as condições de ensaio, a produção de 1 g de glicose em 1 hora.

3.2.1.6. - Cromatografia de Açúcares em Papel

A cromatografia de açúcares em papel foi realizada em papel Whatman no. 1. O sistema de solventes utilizado para a cromatografia descendente em papel foi butanol : piridina : água destilada na proporção 6:4:3 (v:v), respectivamente. O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi aproximadamente 20 h para fita de papel de 46 cm de comprimento. Utilizaram-se como padrões uma mistura de glicose (G₁), maltose (G₂), maltotriose (G₃), maltotetraose (G₄), maltopentaose (G₅) e maltohexaose (G₆) e também os açúcares padrões isomaltose e panose. Os açúcares redutores foram revelados com AgNO₃ e NaOH alcoólico de acordo com o método descrito por Trevelyan et alii (145).

3.2.1.7. - Cromatografia Líquida de Alta Pressão dos Produtos de Hidrólise do Amido

Os açúcares presentes nas amostras de amido hidrolisado foram analisados através de cromatografia líquida de alta pressão. Utilizou-se coluna de Polypore Ca de 25 cm x 6mm a 80 °C e fase móvel água bidestilada e filtrada com fluxo de 0,5 mL/minuto. Os açúcares glicose, maltose e isomaltose foram identificados por comparação do tempo de retenção com os açúcares

padrões glicose, maltose, isomaltose, panose e maltotriose. As porcentagens relativas dos açúcares foram obtidas por integração das áreas.

3.2.2. - Identificação e Conservação da Linhagem Produtora de Pululanase

O microrganismo melhor produtor de pululanase foi identificado através das características microscópicas e fisiológicas de acordo com Mac Faddin (87) e Krieg e Holt (79).

Para a manutenção, o microrganismo foi cultivado em Agar Nutriente contendo 0,5% de amilopectina. Após incubação durante 48 horas a 30°C, adicionou-se vaselina líquida esterilizada aos tubos de ensaio. A cultura foi conservada a 5°C, com replicagem a cada 2 a 3 meses.

3.2.3. - Produção de Pululanase pelo Microrganismo *Klebsiella* se em Diferentes Meios de Cultura

Para o estudo da produção de pululanase pela linhagem de *Klebsiella* sp, seleccionada de acordo com o item 3.2.1.4., foram testados os meios de cultura 1 a 10 ajustados para pH 7,0 com NaOH ou HCl 0,01N, descritos na Tabela 1. Os frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura

previamente esterilizados, foram inoculados com 1 mL de suspensão homogênea em água destilada de cultura de 24 horas do microrganismo em meio inclinado de Agar Nutriente acrescido de 0,5% de amilopectina e incubados em agitador rotatório a 250 rpm e 30°C. Após 24,45, 69 e 76 horas de incubação foram retiradas assepticamente amostras de 5 mL de meio de cultura. As amostras foram centrifugadas a 11.000 x g durante 10 minutos a 50°C e a atividade de pululanase no sobrenadante determinada como descrito no item 3.2.1.5.1.a. Para a determinação da atividade de pululanase ligada à célula, a massa celular de 5 mL de meio de cultura foi lavada uma vez com 5 mL de água destilada e ressuspensa em 2 mL de solução 0,1% de dodecilsulfato de sódio (155) e mantida a 50°C durante 15 horas. O volume da suspensão de células foi completado para 5 mL com água destilada e a massa celular foi separada por centrifugação a 11.000 x g durante 10 minutos e a atividade de pululanase no sobrenadante foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.2.1.5.1.a.

3.2.4. - Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação, Alteração de pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Enzima a 28,30 e 35 °C

A linhagem de *Klebsiella* sp no. 192 que apresentou maior atividade de pululanase, selecionada de acordo com o item 3.2.1.4 foi utilizada para os estudos da produção de pululanase.

3.2.4.1. - Preparação do Inóculo

Para a preparação do inóculo, 50 mL de meio de cultura no. 8, descrito na Tabela 1, contido em frasco de Erlenmeyer de 250 mL foi inoculado com a linhagem *Klebsiella* sp e incubado a 30°C em agitador rotatório a 250 rpm por um período de 24 horas.

3.2.4.2. - Fermentação

A fermentação foi realizada em mini-fermentador de 1000 mL. Adicionou-se assepticamente 50 mL de inóculo preparado de acordo com o item 3.2.4.1. e 2 mL de óleo de soja estéril como antiespumante ao frasco de cultura contendo 600 mL de meio de cultura no. 8 previamente esterilizado. A fermentação foi realizada a 28, 30 e 35°C, mantendo-se aeração de 1 vvm (volume/volume/minuto) e agitação constante. As amostras do meio de cultura foram retiradas em diferentes tempos de fermentação para a determinação dos parâmetros: alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo de acordo com o item 3.2.4.3., determinação da amilopectina residual de acordo com o item 3.2.4.4. e atividade enzimática. A atividade de pululanase foi determinada no sobrenadante e na massa celular após centrifugação de 5 mL de meio de cultura a 11.000 x g, durante 10 minutos. A pululanase extracelular foi determinada de acordo com o item 3.2.1.5.1.a. e a atividade da pululanase ligada à célula foi medida de acordo com o método descrito no item 3.2.3.

3.2.4.3. - Determinação do Crescimento do Microrganismo

O crescimento do microrganismo foi determinado espectrofotometricamente pela leitura da absorbância a 660 nm (146). Após a fermentação, uma amostra de 5 mL de meio de cultura foi centrifugada a 11.000 x g a 50°C durante 10 minutos e a massa celular obtida foi submetida a três lavagens sucessivas com 5 mL de água destilada nas mesmas condições descritas acima. A massa celular da última lavagem foi ressuspensa com 5 mL de água destilada e, quando necessário, a suspensão foi diluída. A leitura de absorbância da amostra foi realizada contra água destilada a 660 nm em espectrofotômetro Coleman modelo 295 E.

3.2.4.4. - Determinação da Amilopectina Residual no Meio de Cultura

O consumo de substrato amilopectina no meio de cultura foi estimado através da hidrólise com pululanase e coloração com reagente de Iodo. Após centrifugação das amostras de meio de cultura de acordo com as descritas no item 3.2.4.2., alíquotas de 0,5 mL de sobrenadante do meio de cultura foram adicionadas em tubos de ensaio com tampa e aquecidos durante 5 minutos em banho de água em ebulição. Os tubos de ensaio teste e branco foram incubados em banho de água termostatizado a 40 °C durante 15 minutos para equilibrar a temperatura. Em seguida adicionou-se 0,1 mL de solução de pululanase contendo 60 unidades de atividade e 0,2 mL de solução tampão citrato-fosfato 0,2M pH 6,0 no tubo

teste e 0,3 mL de solução tampão citrato-fosfato 0,2M pH 6,0 no tubo branco. Após 1 hora de incubação a 40 °C, foi adicionado 0,5 mL de solução de iodo -KI 0,01N e 8,7 mL de água destilada aos tubos de ensaio. A absorbância das soluções foram medidas a 620 nm utilizando-se o tubo branco para comparação.

3.2.5. - Produção e Purificação da Pululanase

3.2.5.1. - Produção da Pululanase

A produção de pululanase foi realizada em minifermentador de 1000 mL a 30 °C como descrito no item 3.2.4.2. ou em frasco sob agitação. Para a produção de pululanase em frascos, a cultura de 24 horas de *Klebsiella* sp em Agar Nutriente acrescido de 0,5% de amilopectina foi transferida com alça metálica para frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL de meio de cultura no. 8 descrito na Tabela 1. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 250 rpm a 30°C durante 48 horas. Após a fermentação o meio de cultura foi centrifugado a 11.000 x g durante 10 minutos a 50°C. A atividade de pululanase no sobrenadante foi determinada de acordo com o item 3.2.1.5.1.a. A concentração de proteína das soluções enzimáticas, nas diversas etapas de purificação, foi determinada de acordo com o método de Lowry (86) utilizando-se ovalbumina como padrão.

3.2.5.2. Purificação da Pululanase

3.2.5.2.1. - Fracionamento da Pululanase com Sulfato de Amônio

Uma amostra de 3.500 mL de sobrenadante do meio de cultura obtida de acordo com o item 3.2.5.1. foi saturada com sulfato de amônio a 80% e a mistura mantida a 50C durante uma noite. O precipitado foi separado por centrifugação a 11.000 x g durante 10 minutos, dialisado contra água destilada a 50C durante 48 horas e, em seguida, contra tampão citrato fosfato 0,05 M, pH 6,6 a 50C, durante 4 dias. A amostra de 25 mL de enzima dialisada foi centrifugada a 11.000 x g durante 10 minutos a 50C e o sobrenadante foi percolado em coluna de DEAE-celulose de acordo com as condições descritas a seguir.

3.2.5.2.2. - Cromatografia da Pululanase em Coluna de DEAE-Celulose

Cerca de 50 g de DEAE-celulose foi tratada com 500 mL de NaOH 0,5 N, filtrada em lã de vidro e lavada com água destilada para a remoção do NaOH. A seguir, a resina foi tratada com 500 mL de HCl 0,5 N, lavada com água destilada para a remoção do HCl e, finalmente, equilibrada com tampão fosfato 0,05 M, pH 6,6.

Uma amostra de 24 mL de solução enzimática de pululanase obtida no item 3.2.5.2.1. foi aplicada em coluna de DEAE-celulose de 2,5 cm de diâmetro e 43 cm de comprimento, equilibrada com tampão citrato fosfato 0,05 M pH 6,6. A amostra foi eluída da coluna pela aplicação de 300 mL de tampão citrato fosfato 0,05M pH 6,6 e quantidades de 200 mL de tampão citrato-fosfato 0,05M pH 6,6 contendo concentrações de 0,1M; 0,2M; 0,3M; 0,4M; 0,5M; 0,6M; 0,7M e 0,8M de NaCl consecutivamente. As frações de 6 mL foram coletadas a cada 30 minutos utilizando-se coletor de frações. O curso de eluição das proteínas da coluna foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Coleman 124 D. A atividade de pululanase das frações foi determinada de acordo com os itens 3.2.1.5.1.a. As frações de no. 135 a 195 contendo, atividade de pululanase foram reunidas num total de 355 mL. A solução enzimática foi dialisada contra água destilada durante 48 horas a 50°C, liofilizada, dissolvida em 25 mL de tampão citrato fosfato 0,05 M pH 6,6 e percolada em coluna de CM-celulose de acordo com o método descrito a seguir.

3.2.5.2.3. - Cromatografia da Pululanase em Coluna de CM-celulose

Cerca de 35 g de CM-celulose foi tratada com 500 mL de HCl 0,5N, filtrada em lã de vidro e lavada com água destilada

para a remoção do HCl. A seguir a resina foi tratada com 500 mL de NaOH 0,5 N, lavada com água destilada para remoção do NaOH e equilibrada com tampão fosfato 0,05 M pH 6,6.

Uma amostra de 19 mL de solução enzimática obtida de acordo com o método descrito no item 3.2.5.2.2. foi aplicada em coluna de CM-celulose de 2,5 cm de diâmetro x 35 cm de comprimento. A amostra foi eluída da coluna pela aplicação de 350 mL de tampão citrato fosfato 0,05 M pH 6,0 e quantidades de 250 mL de tampão citrato fosfato 0,05 M pH 6,6 contendo concentrações de 0,2M; 0,4M e 0,6M de NaCl consecutivamente. As frações de 6 mL foram coletadas a cada 30 minutos utilizando-se coletor de frações. O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm e a atividade de pululanase foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.2.1.5.1.a. As frações de no. 31 a 57 contendo atividade de pululanase foram reunidas num total de 172 mL e dialisada contra água destilada a 50°C durante 48 horas. Após a diálise, a solução enzimática foi concentrada por filtração em tubos de Collodium com capacidade de retenção de proteínas de PM 13.200 daltons e conservada em congelador.

3.2.6. - Fracionamento das Preparações Comerciais de alfa-Amilase e Amiloglicosidase com Sulfato de Amônio

3.2.6.1. - Fracionamento das Preparações Comerciais de alfa-Amilase com Sulfato de Amônio

Para a eliminação de açúcares redutores, amostras de 20 mL de alfa-amilase comercial de *B. licheniformis* e 5 g de alfa-amilase comercial de *B. subtilis* foram dissolvidas respectivamente em 400 mL e 100 mL de água destilada. As amostras foram centrifugadas a 11.000 x g durante 10 minutos a 50C, os sobrenadantes foram saturados a 80% com sulfato de amônio e mantidos durante 15 horas a 50C. Os precipitados foram recuperados por centrifugação a 11.000 x g durante 10 minutos a 50C, dissolvidos em 10 mL de água destilada e dialisados contra água destilada durante 72 horas a 50C. A atividade de alfa-amilase das amostras dialisadas foram determinadas de acordo com o método descrito no item 3.2.1.5.3. As amostras de alfa-amilase foram conservadas em congelador.

3.2.6.2. - Fracionamento da Preparação Comercial de Amiloglicosidase com Sulfato de Amônio.

Para a eliminação de açúcares redutores, uma amostra de 20 mL de amiloglicosidase ou glicoamilase comercial de *A. niger* foi dissolvida em 400 mL de água destilada. A amostra foi centrifugada a 11.000 x g durante 10 minutos a 50C, o sobrenadante foi saturado a 80% com sulfato de amônio e mantido durante 15 horas a 50C. O precipitado foi recuperado por centrifugação a 11.000 x g durante 10 minutos a 50C, dissolvido em 10 mL de água destilada e dialisado contra água destilada durante 72 horas a 50C. A atividade de amiloglicosidase da amostra dialisada foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.2.1.5.5. A amostra de amiloglicosidase foi conservada em congelador.

3.2.7. - Caracterização da Pululanase Purificada

A pululanase purificada de acordo com os procedimentos descritos no item 3.2.5.2. foi utilizada para o estudo de caracterização da pululanase.

3.2.7.1. - Efeito do pH na Atividade Enzimática

Para o estudo do efeito do pH na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 0,2 mL de solução 1,75% de pululana em água desionizada, 0,4 mL de solução de pululanase purificada contendo 36 unidades de atividade e 0,4 mL de solução tampão. Os sistemas tampões foram usados dentro dos limites de sua ação tamponante: citrato-fosfato pH 2,6 a 7,0 e tampão fosfato de sódio pH 5,0 a 8,0 na concentração 0,2 M. As misturas de reação foram incubadas a 40°C em banho de água termostatizado por 30 minutos. Após a incubação, os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (104) e os valores obtidos calculados como descrito no item 3.2.1.5.1.a. sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

3.2.7.2. - Efeito do pH na Estabilidade da Enzima

Para o estudo do efeito do pH na estabilidade, 0,4 mL de solução de pululanase purificada contendo 36 unidades de atividade, foi pré-incubada com 0,1 mL de solução tampão 0,1 M de diferentes valores de pH durante 24 horas a 30°C. Foram utilizados os sistemas tampões citrato fosfato pH 2,6 a 7,0 e fosfato de sódio pH 5,7 a 8,0. A atividade residual foi determinada pela adição de 0,5 mL de pululana 0,7% em tampão citrato fosfato 0,2 M pH 6,0 às soluções enzimáticas e as misturas de reação foram incubadas a 40°C durante 30 minutos. A

concentração de açúcares redutores obtidos foi calculada como descrito no item 3.2.1.5.1.a., sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

3.2.7.3. - Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 0,5 mL de solução de pululana 0,7% em tampão citrato fosfato 0,05 M pH 6,0, 0,4 mL de solução de pululanase purificada contendo 36 unidades de atividade e 0,1 mL de água destilada. A mistura de reação foi incubada a diferentes temperaturas entre 35°C e 70°C durante 30 minutos. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (104) e calculados como descrito no item 3.2.1.5.1.a., sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

3.2.7.4. - Estabilidade Térmica da Pululanase

Para o estudo da termoestabilidade da pululanase purificada, amostras de 3 mL de solução enzimática em tampão citrato-fosfato 0,05M pH 6,0 contendo 90 unidades de atividade/mL foram adicionadas em tubos com tampa e pré-incubados em diferentes temperaturas entre 10°C e 60°C durante 1 hora. A

atividade residual foi determinada de acordo com as condições descritas no item 3.2.1.5.1.a., sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

3.2.7.5. - Efeito de Sais Minerais e Outros Compostos Inorgânicos na Atividade Enzimática

O efeito de sais minerais e outros compostos inorgânicos na atividade de pululanase sobre os substratos pululana e amilopectina, foi verificado dentro da faixa de concentração onde não havia interferência com o método de determinação de atividade. Para o estudo do efeito de sais minerais e outros compostos inorgânicos na atividade de pululanase sobre a pululana, o sistema de reação foi constituído de 0,5 mL de solução de pululana 0,7% em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 6,0; 0,25 mL de solução enzimática contendo 36 unidades de atividade; 0,25 mL de solução contendo um dos seguintes compostos: Cu SO_4 , Ca CO_3 , Mg Cl_2 , Mg SO_4 , Li SO_4 , Zn SO_4 , K Cl , Ba (OH)_2 , Ca Cl_2 , Fe (SO)_4 , Al_2O_3 , Hg Cl_2 , Ni SO_4 , Fe Cl_3 , Mn Cl_2 , Na Cl na concentração necessária para 1 e 10 mM em relação ao volume final na mistura de reação. Após 30 minutos de incubação a 40°C os açúcares redutores liberados foram determinados de acordo com o método de Somogyi-Nelson (104) como descrito no item 3.2.1.5.1.a., utilizando-se como branco a mistura de tempo zero de reação.

Para o estudo do efeito de sais minerais e outros compostos inorgânicos na atividade de pululanase sobre a amilopectina, o sistema de reação foi constituído de 0,5 mL de solução 1% de amilopectina em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 6,0; 0,25mL de solução enzimática contendo 36 unidades de atividade; 0,25mL de solução contendo um dos compostos descritos no parágrafo anterior na concentração necessária para 1 e 10mM em relação ao volume final na mistura de reação. Após 1 hora de reação a 40°C, foi adicionado 12,5 mL de solução H_2SO_4 0,01N. Após 30 minutos a 30°C foi adicionado 1 mL de solução de Iodo-KI 0,01 N e 10,5 mL de água destilada. A absorbância das soluções foi determinada a 620 nm como descrito no item 3.2.1.5.1.b., utilizando-se como branco a mistura de tempo zero de reação.

3.2.7.6. - Efeito de Inibidores na Atividade Enzimática

O efeito de inibidores de enzimas foi verificado semelhantemente ao efeito de sais minerais e outros compostos inorgânicos na atividade enzimática. Para o estudo do efeito de diversos reagentes na atividade de pululanase sobre a pululana o sistema de reação foi constituído de 0,5 mL de solução 0,7% de pululana em tampão citrato fosfato 0,1 M pH 6,0; 0,25 mL de solução enzimática contendo 36 unidades de atividade; 0,25 mL de solução de um dos reagentes p-cloromercuribenzoato, ácido etilenodiaminotetracético, azida de sódio, dietiliditiocarbamato de sódio, arseniato de sódio, L-cisteína, iodoacetamida, N-

bromosuccinimida na concentração necessária para 0,1; 1 e 10mM em relação ao volume final da mistura de reação. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.2.1.5.1.a., utilizando-se como branco a mistura de reação em tempo zero.

Para o estudo do efeito de inibidores na atividade de pululanase sobre a amilopectina, o sistema de reação foi constituído de 0,5 mL de solução 1% de amilopectina em tampão citrato fosfato 0,1 M pH 6,0; 0,25 mL de solução enzimática contendo 35 unidades de atividade e 0,25 mL de um dos reagentes na concentração descrita no parágrafo anterior. A atividade residual foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.2.1.5.1.b., utilizando-se como branco a mistura de reação em tempo zero.

3.2.7.7. - Efeito da Concentração de Substrato na Atividade Enzimática

O efeito da concentração de substrato na atividade de pululanase foi testado com os substratos pululana e amilopectina.

No estudo do efeito da concentração de pululana, o sistema de reação foi constituído de 0,4 mL de solução enzimática contendo 36 unidades de atividade e 7,0 µg de proteína; 0,6 mL de solução de pululana, em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 6,0, na concentração em relação ao volume final, variável entre 0,01% e 0,42%. As misturas de reação foram incubadas durante 30 minutos

em banho de água termostatizado a 50°C e a atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.2.1.5.1.a.

No estudo do efeito da concentração de amilopectina sobre a atividade de pululanase, o sistema de reação foi constituído de 0,25 mL de solução enzimática contendo 22,5 unidades de atividade e 4,4 µg de proteína; 0,75 mL de solução de amilopectina em tampão citrato fosfato 0,1M pH 6,0, na concentração variável entre 0,06% e 0,45% em relação ao volume final. A atividade enzimática sobre a amilopectina foi determinada de acordo com o item 3.2.1.5.1.b. A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima foram determinados segundo o sistema gráfico de Hanes e Woolf (37 e 162).

3.2.7.8. - Determinação do Peso Molecular da Pululanase

O peso molecular da enzima foi estimado por filtração em gel Sephadex G-200. As proteínas catalase, alfa-galactosidase e hemoglobina bovina de pesos moleculares 240.000, 126.000 e 68.000 respectivamente foram utilizadas como padrões. Previamente 50 g de Sephadex G-200 (40-120 µ) foi entumescido com 2 L de solução KCl 0,1M durante 3 dias a 10°C e em seguida equilibrado com tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,5 contendo KCl 0,1M (14). Uma amostra de 3 mL de solução tampão contendo 10 mg de pululanase purificada de acordo com o item 3.2.5.2., 100 mg de hemoglobina bovina, 30 mg de catalase, 20 mg de alfa-galactosidase foram

percoladas em coluna de 2,7 cm diâmetro x 95 cm de Sephadex G-200 equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 pH 7,5 contendo KCl 0,1M. As frações de 3 mL foram coletadas a cada 7 minutos. A coluna foi caracterizada quanto ao volume de vazão pelo uso de "Blue Dextran" 2000, determinado pela absorção a 254 nm. O volume de eluição de hemoglobina bovina foi determinado pela medida de absorbância a 550nm. Os volumes de eluição da pululanase, alfa-galactosidase e catalase foram determinados pela medida de suas atividades. A atividade de pululanase foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.2.1.5.1.a. A atividade de alfa-galactosidase foi determinada usando p-nitrofenil alfa-D-galactopiranosídeo de acordo com o método descrito por Cruz e Park (34). A atividade de catalase foi determinada pela titulação de peróxido de hidrogênio residual com solução de permanganato de potássio em meio ácido (30).

3.2.7.9. - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A pululanase purificada de acordo com os procedimentos descritos no item 3.2.5.2. foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida preparado de acordo com o método de Davis (35) com modificações. O gel foi preparado pela mistura de 5 g de "Cyanogum" (95% de poliacrilamida e 5% de N,N' metilenobisacrilamida), 250 mg de amilopectina de milho gelatinizada em 25 mL de água destilada, 50 mg de persulfato de amônio dissolvido em 25 mL de tampão fosfato 0,1M pH 8,0 e 20 µl de N,N,N',N'

tetrametiletilenodiamina. Aplicou-se 10 µl de solução 0,1% de azul de bromofenol em água destilada e metanol em quantidade suficiente para a solubilização do corante, 40 µl de pululanase contendo 72 unidades/mL e 50 µl de solução 40% de sacarose no topo do gel. A eletroforese foi desenvolvida pela aplicação de 5 mA por tubo a 28°C por 3 horas. Em seguida os géis foram removidos dos tubos, incubados em tampão citrato-fosfato 0,05M pH 6,0 a 40°C durante 1 hora, corados com solução de Iodo-KI 0,01N e em seguida lavados com água destilada (133).

3.2.8. - Produção de Glicose

Estudou-se a aplicação de alfa-amilase, amiloglicosidase e pululanase na produção de glicose a partir de amido.

3.2.8.1. - Hidrólise de Amido com alfa-Amilase Bacteriana

A liquefação enzimática de amido de milho e de mandioca foi realizada utilizando-se preparação obtida após fracionamento da enzima comercial de *B. subtilis* e *B. licheniformis* com sulfato de amônio, como descrito no item 3.2.6.

Na primeira etapa, amostras de 240 g de amido de milho ou de mandioca em 560 mL de água destilada e 8 mL de solução CaCl_2

20 mg/mL foram ajustadas para pH 6,0 com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. Em seguida adicionou-se 1,7 mL de solução de alfa-amilase de *B. subtilis* ou 0,8 mL de solução de alfa-amilase de *B. licheniformis* contendo 6.700 unidades de atividade. As suspensões de amido (33% em peso seco) foram aquecidas em banho de água termostatizado a 90°C. A liquefação foi acompanhada pela adição de uma alíquota de 1 mL da mistura de reação a 5 mL de solução diluída de Iodo-KI como descrito no item 3.2.1.5.3. Após a obtenção de coloração marrom da mistura solução de amido e solução de Iodo-KI, as amostras foram aquecidas em ebulição por 5 minutos e resfriadas até aproximadamente 60°C. Na segunda etapa de liquefação adicionou-se 1.700 unidades de alfa-amilase às misturas de reação, respectivamente de *B. subtilis* ou *B. licheniformis* e as soluções foram mantidas em banho de água termostatizado a 90°C até a liquefação completa indicada pela coloração amarela da mistura de reação com solução diluída de Iodo-KI. Em seguida as amostras foram ajustadas para pH 4,3 com HCl 0,1N e aquecidas em ebulição durante 5 minutos. Os açúcares redutores produzidos após hidrólise de amido de milho e de mandioca com alfa-amilase de *B. subtilis* e *B. licheniformis* foram verificados através de cromatografia descendente em papel Whatman no. 1, como descrito no item 3.2.1.6.

3.2.8.2. - Efeito da Concentração de Amiloglicosidase na Hidrólise de Amido Liquefeito

O efeito da concentração de amiloglicosidase, na sacarificação de amido de milho e de mandioca liquefeito, foi estudado em pH 4,3 e pH 6,0, utilizando-se preparação enzimática de amiloglicosidase de *Aspergillus niger* obtida após fracionamento da enzima comercial com sulfato de amônio como descrito no item 3.2.6.

As amostras de amido de milho e de mandioca liquefeito com alfa-amilase de *B. licheniformis* foram preparadas de acordo com o método descrito no item 3.2.8.1. e ajustadas para pH 4,3 ou 6,0 com HCl 0,1N.

Para o estudo do efeito da concentração de amiloglicosidase na sacarificação de amido em pH 4,3, as misturas de reação foram constituídas de 40 mL de solução de amido de milho ou de mandioca liquefeito ajustado para pH 4,3; 2 mL de solução enzimática contendo diferentes concentrações de amiloglicosidase variando de 0,0112 a 4,500 unidades de atividade/g amido e 2 mL de toluol.

Para o estudo do efeito da concentração de amiloglicosidase na sacarificação de amido em pH 6,0, as misturas de reação foram constituídas de 40 mL de solução de amido de milho ou de mandioca liquefeito, ajustado para pH 6,0; 2 mL de

solução enzimática contendo diferentes concentrações de amiloglicosidase variando de 0,0225 a 4,500 unidades de atividade/g amido e 2 mL de toluol. Os balões volumétricos de 50 mL contendo as misturas de reação foram incubados em banho de água termostatizado a 50oC durante 72 horas. Os produtos de hidrólise do amido foram analisados através de cromatografia em papel como descrito no item 3.2.1.6.

3.2.8.3. - Produção de Glicose a Partir de Amido de Mandioca e de Milho

Estudou-se o efeito da pululanase na etapa de sacarificação de amido liquefeito, com amiloglicosidase.

3.2.8.3.1. - Preparo das Amostras de Amido Liquefeito

As amostras de soluções de amido de mandioca e de milho liquefeito com alfa-amilase bacteriana de *B. licheniformis* foram preparadas de acordo com o método descrito no item 3.2.8.1. e ajustadas para pH 4,3 ou pH 6,0 com HCl 0,1N ou NaOH 0,1N.

3.2.8.3.2. - Sacarificação de Amido Liquefeito Utilizando-se Amiloglicosidase

Para a sacarificação de amido liquefeito com amiloglicosidase os sistemas de reação foram constituídos de amostras de 40 mL de solução de amido de mandioca ou de milho ajustadas para pH 4,3 ou pH 6,0; 2 mL de solução enzimática contendo 0,0750 unidades de amiloglicosidase/g de amido; 1 mL de água destilada e 2 mL de toluol. As misturas de reação foram preparadas em duplicata. Os balões volumétricos de 50 mL contendo as misturas de reação foram incubados em banho de água termostatizado a 50°C. Após 48 e 72 horas de incubação as amostras foram aquecidas em ebulição durante 10 minutos e resfriadas em banho de gelo. Após a adição de 80 mL de acetona, as misturas foram filtradas em papel de filtro Whatman no. 1 e a acetona evaporada sob vácuo. Em seguida as amostras foram tratadas sucessivamente com 10 g de resinas de troca iônica Amberlite IR 120 e IR 68 como citado por Mitsuhashi et alii. (102). As amostras descoloridas e purificadas foram filtradas em membranas Millipore 0,45 μ e liofilizadas. Os açúcares das amostras liofilizadas foram analisados através de cromatografia líquida de alta pressão de acordo com o método descrito no item 3.2.1.7.

3.2.8.3.3. - Sacarificação de Amido Liquefeito Utilizando-se Amiloglicosidase e Pululanase

Para o estudo do efeito de pululanase na sacarificação de amido liquefeito os sistemas de reação foram constituídos de amostras de 40 mL de solução de amido liquefeito de mandioca ou de milho ajustadas para pH 6,0; 2 mL de solução enzimática contendo 0,0750 unidades de amiloglicosidase/g de amido; 1 mL de solução de pululanase contendo 1.890 unidades de atividade/mL e 2 mL de toluol. As misturas de reação foram preparadas em duplicata. Os balões volumétricos de 50 mL contendo as misturas de reação foram incubados em banho de água termostatizado a 50°C. Após 48 e 72 horas de incubação as amostras foram submetidas ao tratamento como descrito no item anterior e os açúcares das amostras liofilizadas foram analisados através de cromatografia líquida de alta pressão de acordo com o método descrito no item 3.2.1.7.

3.2.9. - Produção de Maltose

A aplicação de pululanase na produção de maltose a partir de amido de mandioca e de milho foi verificada através da ação simultânea de beta-amilase e pululanase purificadas. Neste estudo foram utilizados beta-amilase livre de alfa-amilase (Calbiochem ref. 17157) e pululanase purificada obtida de acordo com o item 3.2.5.2.

3.2.9.1. - Produção de Maltose a Partir de Amido de Mandioca e de Milho Utilizando-se beta-Amilase Purificada

As misturas de reação foram constituídas de 100 mL de solução 1% de amido de mandioca ou de milho gelatinizados em tampão fosfato 0,05M pH 5,0; 86 mg de beta-amilase purificada contendo 3.300 unidades de atividade; 4 mL de água destilada e 2 mL de toluol. Os balões volumétricos de 200 mL contendo as misturas de reação foram incubados em banho de água termostatizado a 45°C durante 48 horas. Após a incubação as misturas de reação foram aquecidas em ebulição durante 10 minutos e resfriadas em banho de gelo. Após a adição de 200 mL de acetona, as amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman no. 1 e a acetona evaporada sob vácuo. Em seguida as amostras foram submetidas ao tratamento como descrito no item 3.2.8.3.2. Os açúcares das amostras liofilizadas foram analisados através de cromatografia líquida de alta pressão de acordo com as condições descritas no item 3.2.1.7.

3.2.9.2. - Produção de Maltose a Partir de Amido de Mandioca e de Milho Pela Ação Simultânea de beta-Amilase e Pululanase Purificadas

Os sistemas de reação foram constituídos de 100 mL de solução 1% de amido de mandioca ou de milho gelatinizados em

tampão fosfato 0,05M pH 6,0: 86 mg de beta-amilase purificada contendo 3.300 unidades de atividade; 4 mL de solução de pululanase purificada contendo 1.800 unidades de atividade e 2 mL de toluol. Os balões volumétricos de 200 mL contendo as misturas de reação foram incubados em banho de água termostatizado a 45°C durante 48 horas. As amostras foram submetidas ao tratamento como descrito no item 3.2.8.3.2. Os açúcares das amostras liofilizadas foram analisados através de cromatografia líquida de alta pressão de acordo com o método descrito no item 3.2.1.7.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO :

4.1. - Isolamento e Seleção de Microrganismos

4.1.1. - Isolamento e Seleção Preliminar de Microrganismos Produtores de Enzimas Amilolíticas Desramificantes

Após o isolamento de 2.140 linhagens de microrganismos foram seleccionadas preliminarmente 10 linhagens de bactérias, de acordo com o método descrito no item 3.2.1.3. As Figuras 1 e 2 ilustram o teste para isolamento e seleção preliminar de microrganismos: observa-se um halo de coloração azul ao redor das colônias produtoras de enzimas amilolíticas desramificantes, tendo como fundo a coloração púrpura de amilopectina com reagente de iodo.

O modo de ação das enzimas amilolíticas desramificantes sobre a amilopectina está ilustrado na Figura 3. Estas enzimas hidrolisam as ligações glicosídicas alfa-1,6 da amilopectina e liberam cadeias lineares como produto. As cadeias lineares de maior comprimento apresentam coloração azul com iodo. Foi observado que a linhagem no. 192 produz halo de coloração azul entre 72 e 96 horas de incubação a 35°C em meio de agar nutriente contendo 0,5% de amilopectina. Em comparação a linhagem de

Flavobacterium sp produtora de isoamilase (133) dá origem a halo de coloração azul com Iodo entre 24 e 48 horas de incubação a 28°C. No caso da isoamilase de *Flavobacterium* sp a enzima é provavelmente sintetizada e liberada imediatamente para o meio extracelular enquanto que a enzima amilolítica da linhagem no. 192 acumula-se na forma intracelular sendo liberada posteriormente.

4.1.2. - Seleção do Microrganismo Melhor Produtor de Pululanase

Entre as 10 linhagens de bactérias selecionadas preliminarmente através do teste de produção de halo azul em meio contendo amilopectina foi selecionada a linhagem no. 192 como melhor produtora de pululanase, através da fermentação em frascos sob agitação de acordo com o método descrito no item 3.2.1.4. A linhagem de *Flavobacterium* sp, produtora de enzima amilolítica desramificante isoamilase foi utilizada para comparação. A Tabela 2 ilustra os resultados. A Figura 4 ilustra a hidrólise de pululana pela pululanase.

Conforme a literatura, a enzima desramificante do tipo pululanase hidrolisa as ligações glicosídicas alfa-1,6 da pululana e libera unidades de maltotriose como produto e também hidrolisa amilopectina produzindo cadeias lineares glicosídicas alfa-1,4 (1, 3, 22). A enzima desramificante isoamilase hidrolisa

as ligações glicosídicas alfa-1,6 da amilopectina mas não hidrolisa a pululana (56, 92, 133).

4.2. - Identificação da Linhagem Produtora de Pululanase

A linhagem no. 192, melhor produtora de pululanase foi identificada como *Klebsiella* sp. As características microscópicas e fisiológicas da linhagem *Klebsiella* sp no. 192 estão ilustradas na Tabela 3.

Diversos microrganismos produtores de pululanase por exemplo *Klebsiella pneumoniae* (citado na literatura como *Klebsiella aerogenes* (63, 85, 143) ou *Aerobacter aerogenes* (2, 3, 22, 48, 148)), *Escherichia intermedia* (146), *Streptococcus mitis* (153), *Streptomyces* sp (147) *Streptomyces flavochromogenes* (163), *Bacillus* sp (103, 109), *Bacillus cereus* var. *mycoides* (141), *Bacillus macerans* (8), *Bacillus stearothermophilus* KP 1064 (140), *Clostridium thermohydrosulfuricum* (66), *Thermus aquaticus* YT-1 (122), *Micrococcus* sp (74), tem sido descritos na literatura, mas produtos comerciais disponíveis são preparados a partir de linhagens de *Klebsiella* sp (17) e *Bacillus* sp (51). Normam em 1980 (107) relatou que pululanases de importância industrial são aquelas produzidas por *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus cereus* var. *mycoides*. A enzima pululanase de

Klebsiella aerogenes (*Klebsiella pneumoniae*) foi incluída no grupo de substâncias provisoriamente aceitáveis para uso em alimentos (31,60).

4.3. - Produção de Pululanase pela linhagem de *Klebsiella sp* em Diferentes Meios de Cultura

Entre os meios de cultura testados para a produção de enzima, de acordo com o método descrito no item 3.2.3, foi obtido maior produção de pululanase no meio de cultura no. 8 descrito na Tabela 1, utilizado por Sugimoto et alii (138) para a produção de isoamilase de *Pseudomonas sp.* Em comparação não foi obtido alta atividade de pululanase após cultivo da linhagem *Klebsiella sp* no. 192 nos meios de cultura no. 2 e no. 5, descritos na Tabela 1, utilizados respectivamente por Ueda e Ohba (148) e Bender e Wallendfels (21) para a produção de pululanase de linhagens de *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella pneumoniae*). A Tabela 4 ilustra os resultados.

4.4. - Relação entre tempo de Fermentação, Alteração de pH do Meio de Cultura, Crescimento do Microrganismo e Produção de Enzima a 28, 30 e 35oC

O estudo do crescimento do microrganismo e produção de pululanase pela linhagem *Klebsiella* sp foi realizado de acordo com as condições descritas no item 3.2.4.

As Figuras 6,7 e 8 ilustram respectivamente a relação entre tempo de fermentação, alteração de pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo e produção de pululanase a 28, 30 e 35oC.

Na fermentação a 28oC a produção de pululanase ligada a célula atingiu a atividade máxima de 80 unidades/mL após 14 horas de fermentação aproximadamente. Após este período observou-se diminuição da atividade da enzima ligada à célula e aumento de enzima extracelular. A pululanase extracelular atingiu a atividade máxima de aproximadamente 65 unidades/mL após 40 horas mantendo-se constante até 80 horas de fermentação.

Na fermentação a 30oC a produção de pululanase ligada a célula alcançou a atividade máxima de 80 unidades/mL depois de aproximadamente 12 horas de fermentação declinando rapidamente após 17 horas de fermentação. A pululanase extracelular atingiu aproximadamente a atividade máxima de 75 unidades/mL após 50 horas mantendo-se constante até 80 horas de fermentação.

Na fermentação a 35°C a produção de pululanase ligada a célula atingiu a atividade máxima de 123 unidades/mL após 8 horas de fermentação diminuindo após este período. A enzima extracelular atingiu aproximadamente a atividade máxima de 43 unidades/mL após 40 horas mantendo-se constante até 80 horas de fermentação. Foi observado que a pululanase ligada à célula é produzida durante a fase exponencial de crescimento. A diminuição da atividade de pululanase ligada à célula foi acompanhada de aumento da atividade de enzima no sobrenadante do meio de cultura. Neste estudo não foi verificado o mecanismo de liberação da enzima intracelular.

Wallenfels et alii, em 1966 (155) empregando meio de cultura constituído de 0,8% maltose, 0,1% K_2HPO_4 ; 0,3% $NaNO_3$; 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,05% KCl; 0,001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ajustado a pH 7,2 verificaram que a síntese de pululanase pela linhagem de *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella pneumoniae*) tinha início após um período de 3 horas, junto com o crescimento celular e ocorria paralelamente ao aumento da massa celular. Durante as primeiras horas de fermentação a enzima era totalmente ligada à célula. A atividade da enzima extracelular aumentava no final da fase logarítmica. A quantidade de enzima ligada à célula diminuía com o aumento da enzima extracelular.

Wohner e Wober, em 1978 (161), relataram que a pululanase da linhagem *Klebsiella* sp 5246 estava associada à

membrana externa. Os autores sugeriram que linhagens de *Klebsiella* produzem pululanase e dependendo da linhagem uma alfa-amilase específica para a hidrólise de ligações glicosídicas alfa-1,4, quando crescem em meio contendo alfa-glucanas. Desta forma enzimas ligadas à célula serviriam para hidrolisar alfa-glucanas disponíveis no ambiente celular e produzir maltodextrinas que poderiam então ser transportadas para o citoplasma. Para este fim pululanase e amilase deveriam estar disponíveis para a hidrólise do substrato macromolecular. Os autores verificaram que a linhagem *Klebsiella* sp 5246 formava quantidade muito pequena de amilase e não era adequada para os estudos de localização da enzima e sugeriram que a ação simultânea da pululanase produzem maltooligossacarídeos lineares que passam através de poros hidrofílicos da membrana externa e alcançam a permease da membrana citoplasmática.

O mecanismo da liberação da pululanase extracelular da linhagem de *Aerobacter aerogenes* RS-1 foi estudado por Ohba e Ueda (113). Os autores propuseram que uma protease atuaria liberando a pululanase ligada à célula para o meio de cultura.

Suzuki e Chishiro, em 1983 (140) utilizando o meio de cultura constituído de 1,2% de amido solúvel; 1,4% a 1,6% de peptona; 0,3% de extrato de levedura; 0,3% de K_2HPO_4 e 0,1% KH_2PO_4 verificaram que a pululanase de *Bacillus stearothermophilus* KP 1064 era acumulada no sobrenadante do

meio de cultura no início da fase estacionária de crescimento mas a atividade da enzima extracelular diminuía rapidamente no final deste estágio.

Kimura e Horikoshi em 1989 (74) verificaram que a produção máxima de pululanase e de alfa-amilase de *Micrococcus* sp ocorria a 170 - 200C. As enzimas eram produzidas, induzivelmente, em meio de cultura constituído de 2% de amido solúvel; 0,5% de sacarose; 1,5% de triptona; 1% de extrato de levedura; 0,1% de K_2HPO_4 ; 0,02% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,0002% de $MnCl_2$ após 4 dias de incubação a 180C e diminuía após 8 dias. A produção máxima das enzimas era obtida em pH 9,7 pela adição de 0,7% de $CaCO_3$ ao meio de cultura.

4.5. - Produção e Purificação de Pululanase

A produção e purificação de pululanase foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.2.5.

O fluxograma de produção e purificação de pululanase de *Klebsiella* sp está apresentado na Figura 9. A pululanase de *Klebsiella* sp no. 192 pode ser obtida da massa celular através de extração com detergente dodecil sulfato de sódio ou na forma de enzima extracelular.

Neste trabalho foi estudado a purificação da enzima extracelular. No fracionamento da preparação bruta de pululanase em coluna de DEAE-celulose equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05M pH 6,6, a enzima adsorvida na resina foi eluída com tampão citrato-fosfato 0,05M pH 6,6 contendo 0,6M NaCl. A pululanase não foi adsorvida em coluna de CM-celulose. As Figuras 10 e 11 ilustram respectivamente o fracionamento da pululanase em coluna de DEAE-celulose e CM-celulose. A purificação está sumarizada na Tabela 6. A enzima foi purificada 11,1 vezes após fracionamento com sulfato de amônio seguido de cromatografia em fracionamento coluna de DEAE-celulose e de CM-celulose. A pululanase purificada apresentou 3.700 unidade de atividade/mg de proteína.

4.6. - Fracionamento das Preparações Comerciais de alfa-Amilase e Amiloglicosidase com Sulfato de Amônio

Verificou-se através de cromatografia em papel que preparações comerciais de alfa-amilase de *B. subtilis* e de *B. lincheniformis*, e amiloglicosidase de *A. niger* apresentavam glicose e outros açúcares não identificados. As enzimas comerciais de alfa-amilase e amiloglicosidase foram fracionadas com sulfato de amônio 80% de acordo com as condições descritas no item 3.2.6.1. e 3.2.6.2. respectivamente.

Foram obtidas preparações de alfa-amilase de *B. subtilis* e de *B. licheniformis*, livres de carboidratos, contendo respectivamente 4.000 e 8.400 unidades de atividade/mL. A preparação de amiloglicosidase de *A. niger*, isenta de carboidratos, apresentou 36.000 unidades de atividade/mL.

4.7. - Caracterização da Pululanase Purificada

As características bioquímicas da pululanase de *Klebsiella* sp no. 192 foram determinadas como descrito no item 3.2.7.

4.7.1. - Efeito do pH na Atividade enzimática

O efeito do pH na atividade de pululanase foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.7.1. A Figura 12 mostra que a enzima apresenta maior atividade em pH 6,0, em tampão citrato-fosfato. A pululanase da linhagem de *Klebsiella* sp no. 192 apresenta atividade ótima em pH levemente ácido da mesma forma que as pululanases de linhagens de *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella* sp) descritas na literatura. As enzimas estudadas por Bender e Wallenfels (22) e Ueda e Ohba (148) apresentaram respectivamente atividade ótima em pH 5,0 e 6,5. As enzimas amilolíticas desramificantes que apresentam atividade ótima em torno de pH 6,0 podem ser

utilizadas simultaneamente com a beta-amilase de soja ou batata doce na produção de maltose a partir de amido.

A enzima amilolítica desramificante do tipo isoamilase (169) obtida de *Pseudomonas* sp SB 15 apresenta atividade ótima na faixa de pH 3,0 a 4,0. Esta enzima pode ser usada na hidrólise de amido em maltose, através de processo em duas etapas, em combinação com a beta-amilase de soja ou de batata doce. Na primeira etapa deste processo a isoamilase rompe as ligações glicosídicas alfa-1,6 do amido liberando as cadeias lineares de amilose que são posteriormente hidrolisadas pela beta-amilase em maltose.

A Tabela 5 ilustra o pH ótimo de atividade de pululanases microbianas.

4.7.2. Efeito do pH na Estabilidade da Enzima

O estudo da influência do pH na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com o item 3.2.7.2. A Figura 13 ilustra o efeito do pH na estabilidade da enzima. A pululanase *Klebsiella* sp no. 192 apresentou-se mais estável na faixa de pH 6,0 a 7,0 em tampão citrato fosfato, e na faixa de pH 5,5 a 7,5 em tampão fosfato sendo inativada em pH inferiores a 5,0 após 24 horas de incubação a 30°C. Em comparação, a pululanase da linhagem de *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella* sp) estudada por Ueda e

Onba (148) apresentou estabilidade na faixa de pH 5,0 a 11,5 após 1 hora de incubação a 40°C.

A enzima amilolítica desramificante do tipo isoamilase de *Pseudomonas* sp SB 15 estudada por Yokobayashi et alii (169) apresentou-se estável na faixa de pH 2,5 a 7,5 após 24 horas de incubação a 40°C.

A pululanase de *Streptomyces* sp no. 28 (147) mostrou maior estabilidade na faixa de pH 5,5 a 7,5 após 1 hora de incubação a 40°C.

Nakamura et alii (103) verificaram que a pululanase de *Bacillus* sp no. 202-1 apresentava-se estável na faixa de pH 6,5 a 11,0 após incubação a 40°C durante 24 horas.

A pululanase de *Bacillus cereus* var. *mycoides* estudada por Takasaki, em 1976 (141) mostrou maior estabilidade na faixa de pH 6 a 9 após incubação a 30°C durante 3 horas.

Hyun e Zeikus, em 1985 (66) ao estudar a pululanase de *Clostridium thermohydrosulfuricum* observaram que a enzima exibia maior estabilidade na faixa de pH 4,5 a 5,5 após tratamento térmico a 60°C durante 1 hora.

Kimura e Horikoshi, em 1989 (74) relataram que a pululanase de *Micrococcus* sp mostrou-se estável na faixa de pH 7,5 a 9,5 após 5 horas de incubação a 30oC.

4.7.3. - Efeito da Temperatura na Atividade enzimática

O efeito da temperatura na atividade de pululanase foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.7.3. A Figura 14 mostra que a pululanase *Klebsiella* sp no. 192 apresenta atividade ótima à 50oC. Este resultado indica que a enzima tem atividade ótima na mesma faixa de temperatura de pululanases de linhagens *Klebsiella pneumoniae* descritas na literatura. Bender e Wallenfels (22) e Ueda e Ohba (148) relataram que as pululanases de linhagens de *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella pneumoniae*) apresentaram atividade ótima a 47,5 e a 50oC, respectivamente.

A Tabela 5 mostra a temperatura ótima de atividade de pululanases microbianas de diferentes fontes descritas na literatura. A maioria apresentam atividade ótima na faixa de 47oC a 60oC. As pululanases de *Clostridium thermohydrosulfuricum* (66) e *Thermoactinomyces thalophilus* (110) são mais termoestáveis e apresentam respectivamente atividade ótima a 85oC e 70oC.

Yokobayashi et alii (169) verificaram que a enzima amilolítica isoamilase de *Pseudomonas* sp SB 15 apresentava atividade ótima a 52°C em tampão acetato pH 3,5 para 10 minutos de reação.

A isoamilase de levedura *Lipomyces konenkae* estudada por Spencer-Martins (137) apresentava atividade ótima a 30°C.

4.7.4. - Estabilidade Térmica da Enzima

O estudo referente à influência da temperatura na estabilidade da pululanase foi realizado de acordo com as condições descritas no item 3.2.7.4. A Figura 15 ilustra os resultados. A incubação da pululanase purificada de *Klebsiella* sp no. 192 em tampão citrato-fosfato 0,05M pH 6,0 a 40°C; 43°C; 45°C; 47°C; 52°C e 57°C durante 1 hora, na ausência de substrato resultaram em 2%; 18%; 29%; 80%; 97% e 100% de inativação, respectivamente.

Em comparação, Ueda e Ohba (148) verificaram que o tratamento térmico da pululanase extracelular cristalina de *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella aerogenes*) em tampão acetato 0,02M pH 6,0 a 30°C; 40°C; 45°C; 50°C; 55°C; 60°C; 70°C e

80oC durante 30 minutos resultaram respectivamente em 2%, 4%, 5%, 8%, 70%, 85%, 95% e 100% de inativação respectivamente.

A pululanase da linhagem de *Klebsiella* sp no. 192 mostrou-se mais termoestável do que as pululanases de *Streptococcus mitis* (153) e de *Streptomyces* sp no. 28 (147) que foram rapidamente inativadas em temperaturas superiores a 40oC.

Em estudos realizados por Yokobayashi et alii (169) o tratamento térmico da enzima amilolítica desramificante isoamilase de *Pseudomonas* sp SB 15 em tampão acetato 0,1M pH 3,5 a 50oC; 55oC e 60oC durante 10 minutos resultaram respectivamente em decréscimo de 40%, 77% e 95% da atividade.

Nakamura et alii, em 1975 (103) verificaram que a pululanase de *Bacillus* sp no. 202-1 apresentava 83% de atividade residual após aquecimento da enzima em tampão fosfato pH 8,0 durante 15 minutos a 55oC.

Ao estudar a estabilidade térmica da pululanase de *Bacillus cereus* var. *mycoides*, Takasaki (142) verificou que o tratamento térmico da enzima a 40oC, 50oC e 60oC em tampão fosfato 0,05M pH 7,0 durante 10 minutos resultava em 5%, 50% e 100% de inativação respectivamente.

Enzimas termoestáveis têm sido descritas na literatura e são de interesse comercial. Plant et alii (122) relataram que a pululanase de *Thermus aquaticus* YT-1 mantinha 80% da atividade após tratamento térmico a 85°C durante 10 horas, e observaram que a pululanase era ativa em ampla faixa de pH e termoestável, no entanto a baixa atividade específica poderia limitar sua aplicação comercial.

4.7.5. - Efeito de Sais Minerais e Outros Compostos Inorgânicos na Atividade Enzimática

O efeito de sais minerais e outros compostos inorgânicos na atividade de pululanase foi testado de acordo com as condições descritas no item 3.2.7.5., utilizando-se os substratos pululana e amilopectina para se verificar a interferência dos sais minerais e outros compostos inorgânicos na metodologia de determinação da atividade enzimática. A atividade de pululanase sobre pululana foi determinada através do aumento da concentração de açúcares redutores liberados, pelo método de Somogyi-Nelson (104). E a atividade de pululanase sobre amilopectina foi determinada através do aumento da coloração das cadeias glicosídicas alfa-1,4 lineares com reagente de iodo (146).

Verificou-se que a presença de NaCl, KCl, Li₂SO₄,

Al_2O_3 , $\text{Ba}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , NiSO_4 , MgCl_2 , CoCl_2 , ZnSO_4 , MnCl_2 , CuSO_4 ,
 $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, FeCl_3 e CaCl_2 na concentração 1mM em relação ao
 volume final da mistura de reação não afetaram significativamente
 a atividade de pululanase da linhagem *Klebsiella* sp no. 192. A
 atividade de pululanase foi fortemente inibida na presença de
 HgCl_2 na concentração 1mM de sal em relação ao volume final de
 reação. Em 1975, Amemura et alii (12) verificaram que a
 pululanase de *Aerobacter aerogenes* ATCC 9621 foi inibida por
 íons mercúrio (Hg^{2+}), e relataram que íons metálicos não
 pareciam ser essenciais para a atividade da enzima. Íons cálcio
 que atuaram aumentando cerca de 30% a atividade de pululanase de
Aerobacter aerogenes estudada por Ohba e Ueda (112) não
 tiveram efeito ativador para a pululanase da linhagem de
Klebsiella sp no. 192. A Tabela 7 ilustra os resultados.

Takasaki em 1976 (142) observou que a adição de íons
 Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{1+} , Ag^{1+} na concentração 1mM não
 aumentava a atividade de pululanase de *Bacillus cereus* var.
mycoides, contudo a adição de íons Ca^{2+} era efetiva na proteção
 da enzima contra a desnaturação térmica.

A presença de íons cálcio aumentava a estabilidade
 térmica de *Thermus aquaticus* YT-1 (122).

Odibo e Obi (110) verificaram que a pululanase de
Thermoactinomyces thalophilus foi ativada por íons cobalto
 (Co^{2+}) , inibida por íons mercúrio (Hg^{2+}) e apresentava maior

estabilidade na presença de íons cálcio (Ca^{2+}).

4.7.6. - Efeito de Inibidores na Atividade Enzimática

O efeito de inibidores na atividade de pululanase de *Klebsiella* sp no. 192 foi testado de acordo com o método descrito no item 3.2.7.6., utilizando-se os substratos pululana e amilopectina para se verificar a interferência dos reagentes na metodologia de determinação da atividade enzimática. A Tabela 8 ilustra os resultados. Verificou-se que o reagente N-bromosuccinimida na concentração 0,1mM em relação ao volume final da mistura de reação inibe a atividade de pululanase de *Klebsiella* sp no. 192 indicando que resíduos de triptofano podem ser importantes para a atividade enzimática. Amemura et alii (12) e Ohba e Ueda (111) verificaram também que resíduos de triptofano parecem ser importantes para a ação enzimática das pululanases de *Aerobacter aerogenes* ATCC 9621 e de *Aerobacter aerogenes* no. 105 respectivamente. A atividade enzimática de pululanase da linhagem de *Klebsiella* sp no. 192 não foi influenciada pela presença dos reagentes ácido etilenodiaminotetracético, p-cloromercuribenzoato, azida de sódio, dietilditioicarbamato de sódio, arseniato de sódio, L-cisteína e iodoacetamida na concentração 0,1mM em relação ao volume final de reação.

4.7.7. Efeito da Concentração de Substrato na Atividade enzimática

O efeito da concentração dos substratos pululana e amilopectina na atividade de pululanase *Klebsiella* sp no. 192, determinado de acordo com as condições descritas no item 3.2.7.7., estão ilustradas respectivamente nas Figuras 16 e 17, nos gráficos de Michaelis-Menten e Hanes e Woolf. A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) foram determinadas de acordo com o sistema gráfico de Hanes e Woolf obtendo-se os valores de K_m $4,3 \times 10^{-4}$ g/mL e V_{max} 14.333 μ g de maltotriose/minuto/mg proteína para o substrato pululana e os valores de K_m $3,7 \times 10^{-3}$ g/mL e V_{max} 69,40 unidades/minuto/mg proteína para o substrato amilopectina.

Em 1973, Yokobayashi et alii (170) compararam a atividade da isoamilase cristalina de *Pseudomonas* sp SB15 e da pululanase cristalina extracelular de *Aerobacter aerogenes* ATCC 9621 em diferentes substratos. Os valores de K_m (g/mL) da isoamilase foram aproximadamente 1×10^{-4} a 2×10^{-4} para amilopectina e glicogênio; e 2×10^{-3} para pululana enquanto que os valores para pululanase foram aproximadamente 8×10^{-3} a 1×10^{-2} para amilopectina; 2×10^{-2} a 5×10^{-2} para glicogênio e $1,7 \times 10^{-5}$ para pululana.

Os resultados obtidos indicam que a pululanase de *Klebsiella* sp no. 192 apresenta menor afinidade ao substrato pululana, porém maior afinidade ao substrato amilopectina do que a pululanase de *Aerobacter aerogenes* ATCC 9621.

A pululanase de *Clostridium thermohydrosulfuricum* apresentou valor de $K_m 3,3 \times 10^{-4}$ g/mL em relação ao substrato pululana (66). Este resultado é próximo ao valor de K_m obtido para a pululanase de *Klebsiella* sp no. 192 indicando que as duas enzimas apresentam afinidade similar em relação ao substrato pululana.

Odibo e Obi (110) verificaram que a pululanase de *Thermoactinomyces thalpophilus* hidrolisava pululana, amilopectina, beta-dextrina limite de amilopectina e de glicogênio apresentando valores de $K_m 3,2 \times 10^{-3}$; $3,6 \times 10^{-3}$; $4,5 \times 10^{-3}$ e $11,1 \times 10^{-3}$ g/mL respectivamente. Comparando-se os resultados, observa-se que a pululanase de *Klebsiella* sp no. 192 apresenta maior afinidade em relação ao substrato pululana do que a pululanase de *Thermoactinomyces thalpophilus*. As pululanases de *Klebsiella* sp e de *Thermoactinomyces thalpophilus* mostram a mesma afinidade em relação ao substrato amilopectina.

4.7.8. - Determinação do Peso Molecular

O peso molecular da pululanase extracelular da linhagem de *Klebsiella* sp no. 192 foi estimado em 96.600 daltons através da filtração em gel Sephadex G-200 de acordo com o método descrito no item 3.2.7.8. As Figuras 18 e 19 ilustram respectivamente a eluição das proteínas em coluna de Sephadex G-200 e a relação v/v_0 e $\log.PM$.

A pululanase extracelular da linhagem *Klebsiella* sp no. 192 apresentou peso molecular diferente das pululanases extracelulares de linhagens de *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella* sp) estudadas por May Frantz et alii (96) e Ueda e Ohba (148).

Em 1966, May Frantz et alii (96) relataram que a pululanase parecia existir em duas formas, sendo que aquela de maior peso molecular podia ser convertida na forma de menor peso. O peso molecular da primeira foi estimado em 150.000 e da segunda cerca de 50.000 através de filtração em gel Sephadex G-200. De acordo com Mercier et alii (98), a pululanase desse experimento (96) foi obtida de cultura contendo dois tipos de *A. aerogenes* que podiam ser distinguidos pela aparência microscópica, um formava cápsula (P2) e o outro (P1) não.

Ueda e Ohba (148) utilizando os métodos de eletroforese em gel de poliácridamida e ultracentrifugação estimaram o peso

molecular da pululanase extracelular em 66.000 e 58.000 respectivamente.

As pululanases de linhagens de *Aerobacter aerogenes*, descritas na literatura, apresentam diferentes pesos moleculares dependendo da forma extracelular ou ligada à célula da presença de protease na solução enzimática, do método de extração e determinação.

Wallenfels et alii (155) e Eisele et alii (40) relataram que a pululanase ligada à célula de *Aerobacter aerogenes* apresentava peso molecular 145.000 e 143.000 respectivamente.

Mercier et alii (98) observaram que a preparação purificada de pululanase ligada à célula obtida da linhagem de *Aerobacter aerogenes* P1 apresentava duas formas de diferentes pesos moleculares após filtração em coluna de gel Sephadex G-200. O peso molecular do menor componente, que podia ser obtido na forma de cristalina, foi estimado entre 108.000 e 145.000. O outro componente foi eluído com "blue dextran", indicando peso molecular de pelo menos 500.000. Os autores verificaram que o componente de maior peso molecular era convertido na forma de menor peso molecular após incubação a 30°C durante 18 horas e sugeriram que este fato era resultado da ação de protease presente na solução na solução enzimática.

Ohba e Ueda (111) estimaram o peso molecular da pululanase intracelular cristalina de *Aerobacter aerogenes* entre 70.000 e 90.000 através de filtração em gel Sephadex G-200 e entre 80.000 e 100.000 através de equilíbrio de sedimentação.

As enzimas amilolíticas desramificantes, de outros microrganismos descritas na literatura apresentam peso molecular na faixa entre 79.000 e 130.000.

Nakamura et alii (103) estimaram o peso molecular da pululanase de *Bacillus sp* no. 202-1, em 92.000 através de eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo dodecil sulfato de sódio.

O peso molecular da pululanase de *Bacillus cereus* var. *mycoides* foi estimado por Takasaki (142) em 90.000 a 130.000 por filtração em gel Sephadex G-200.

Amemura et alii (13) relataram que o peso molecular da isoamilase de *Pseudomonas amyloclavata* foi estimado em aproximadamente 90.000 através de eletroforese em gel de SDS-poli(acrilamida) e filtração em gel de Sepharose 6B e hidrocloreto de guanidina 6M. Os autores observaram que o valor do peso molecular das subunidades estimado anteriormente em aproximadamente 50.000 (75) estava incorreto.

Norman (109) estimou o peso molecular da pululanase de *Bacillus sp* em 100.000 através de eletroforese em gel de poli(acrilamida).

Odibo e Obi (110) estimaram o peso molecular da pululanase de *Thermoactinomyces thalpophilus* no. 15 em 79.000 através de filtração em gel Sephadex G-150.

O peso molecular da pululanase de *Thermus aquaticus* YT foi estimado em 83.000 e 80.000 através de eletroforese em gel de poli(acrilamida) e filtração em coluna de Fractogel TSK HW 55 (F) respectivamente (122).

4.7.9. Eletroforese em gel de Poli(acrilamida)

A eletroforese da pululanase purificada em gel de poli(acrilamida) foi realizada de acordo com as condições descritas no item 3.2.7.9. A Figura 20 mostra a eletroforese desenvolvida em pH 8,0 em gel de poli(acrilamida) contendo o substrato amilopectina. Observa-se uma faixa azul-púrpura, no topo do gel, indicando a atividade de pululanase. A atividade enzimática detectada com géis contendo amilopectina indicou a presença de uma única banda de atividade amilolítica. Em 1975, Nakamura et alii verificaram também que a pululanase purificada de *Bacillus sp* no. 202-1 apresentava uma banda de proteína em eletroforese em gel enquanto que Iskizaki et alii em 1983 (67) estudaram

algumas propriedades da isoamilase de batata (*Solanum tuberosum*, L.) e observaram que esta última continha três enzimas desramificantes separáveis através de eletroforese em gel de poliácridamida.

4.8. - Produção de Glicose

4.8.1. - Hidrólise de Amido com alfa-Amilase Bacteriana

A hidrólise de amido com alfa-amilase bacteriana foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.2.8.1. A Figura 21 ilustra os açúcares redutores de menor peso molecular produzidos após hidrólise de amido de mandioca e de milho com alfa-amilase de *B. subtilis* e *B. licheniformis*. Verificou-se que a alfa-amilase de *B. subtilis* produziu glicose, maltose, maltotriose, maltopentaose e maltohexaose em maior proporção do que maltotetraose. A alfa-amilase de *B. licheniformis* apresentou a característica de produzir glicose, maltose, maltotriose, maltopentaose em maior proporção do que maltotetraose e maltohexaose. A alfa-amilase de *B. licheniformis* foi escolhida pelos autores para a etapa de liquefação enzimática do amido porque apresenta atividade em ampla faixa de pH e maior estabilidade térmica, conforme sugerido por McMullen et alii (97) e afirmado por Rosendal et alii (129).

4.8.2. - Efeito da Concentração de Amiloglicosidase na Hidrólise de Amido Liquefeito

O efeito da concentração de amiloglicosidase de *A. niger* na sacarificação de amido liquefeito foi estudado de acordo com as condições descritas no item 3.2.8.2. Neste estudo foi utilizado o termo sacarificação, empregado tradicionalmente (25) na indústria de produção de açúcares a partir de amido, para descrever a etapa na qual dextrinas e oligossacarídeos são hidrolisados pela amiloglicosidase, para a obtenção de glicose. As Figuras 22 e 23 ilustram respectivamente o efeito da concentração de amiloglicosidase na sacarificação de amido de mandioca e de milho liquefeitos, em pH 4,3. Verificou-se que a utilização de quantidades superiores a 0,2250 unidades de amiloglicosidase/g de amido, na sacarificação em pH 4,3 resulta em formação de grande quantidade de oligossacarídeos.

As Figuras 24 e 25 mostram respectivamente o efeito da concentração de amiloglicosidase na sacarificação de amido de mandioca e de milho liquefeitos, em pH 6,0. Observou-se que a adição de quantidades superiores a 0,6750 unidades de amiloglicosidase/g de amido, na sacarificação em pH 6,0, resulta em síntese de oligossacarídeos.

Mc Mullen e Andino (97) relataram que a presença de maltose e isomaltose, no xarope de glicose, obtido pela hidrólise enzimática do amido era resultante da síntese a partir de

glicose, catalisada pela amiloglicosidase e não pela presença de impurezas enzimáticas presentes na preparação comercial de amiloglicosidase, sendo que no presente trabalho foi comprovada a síntese de oligossacarídeos catalisada pela amiloglicosidase de *Aspergillus niger*.

Pazur e Okada (119) verificaram que a velocidade da reação de síntese de oligossacarídeos catalisada pela amiloglicosidase de *Rhizopus delemar* era duas vezes superior à aquela de *Aspergillus niger*.

4.8.3. - Produção de Glicose a Partir de Amido de Mandioca e de Milho

A aplicação de pululanase na etapa de sacarificação de amido liquefeito, com amiloglicosidase, foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.2.8.3. Os produtos de hidrólise do amido foram quantificados através de cromatografia líquida de alta pressão.

As Figuras 26 e 27 ilustram respectivamente o perfil de carboidratos produzidos após 48 e 72 horas de sacarificação de amido liquefeito de mandioca, com amiloglicosidase e pululanase em pH 6,0 a 50°C. Foi obtido 97,49 % de rendimento de glicose após sacarificação de solução de amido liquefeito de mandioca

contendo 33% de amido em peso seco, após 48 horas de incubação a 50°C em pH 6,0 utilizando amiloglicosidase e pululanase. A Tabela 9 mostra a porcentagem de açúcares obtidos após hidrólise enzimática do amido de mandioca. Os açúcares foram identificados por comparação do tempo de retenção de açúcares padrões. Os padrões glicose, maltose, isomaltose, maltotriose e panose apresentaram tempos de retenção 8,93; 7,64; 7,55; 7,09; 6,97 minutos respectivamente. No experimento não foi obtido separação cromatográfica de maltose e isomaltose. Os açúcares de peso molecular maior do que maltotriose e panose não foram identificados. Comparando-se a sacarificação de amido liquefeito de mandioca com amiloglicosidase em pH 4,3 após 48 e 72 horas, verificou-se aumento da síntese de dissacarídeos, provavelmente isomaltose, após 72 horas de incubação. Observou-se que a adição de pululanase na etapa de sacarificação de amido liquefeito de mandioca, com amiloglicosidase em pH 6,0 durante 48 horas de incubação, aumentava o rendimento de glicose de 94,33% para 97,49%. A incubação da mistura de reação durante 72 horas diminuía o rendimento de glicose de 97,49% para 96,83%, aumentando a concentração do dissacarídeo isomaltose.

As Figuras 28 e 29 ilustram respectivamente o perfil de carboidratos produzidos após 48 e 72 horas de sacarificação de amido liquefeito de milho, com amiloglicosidase e pululanase em pH 6,0 a 50°C. A Tabela 10 ilustra os resultados. Observou-se que a sacarificação de amido liquefeito de milho com amiloglicosidase ocorre mais lentamente em relação à sacarificação de amido

liquefeito de mandioca. Foram obtidos respectivamente 74,60% e 93,31% de rendimento de glicose após 48 e 72 horas de sacarificação de amido liquefeito de milho com amiloglicosidase em pH 4,3. Na sacarificação de amido liquefeito de milho utilizando combinação de pululanase e amiloglicosidase, em pH 6,0, foi obtido rendimento máximo de 96,96% de glicose após 72 horas de reação.

Slominska e Maczynski (135) verificaram que a aplicação de pululanase de *Bacillus sp* na etapa de sacarificação de amido liquefeito de batata com glicoamilase (amiloglicosidase) aumentava o rendimento de glicose de 95,8% para 97,7% após 72 horas de reação. Os autores obtiveram 95,6% a 97,6% de rendimento de glicose na sacarificação de amido liquefeito de batata após 48 horas de reação, dependendo da concentração de pululanase.

4.9. - Produção de Maltose

A aplicação de beta-amilase e pululanase purificadas na produção de maltose a partir de mandioca e de milho foi verificada de acordo com o método descrito no item 3.2.8.

4.9.1. - Produção de Maltose a Partir de Amido de Mandioca e de Milho utilizando-se beta-Amilase Purificada

Na hidrólise de amido de mandioca e de milho utilizando-se beta-amilase purificada, livre de alfa-amilase foram obtidos respectivamente 53,13% e 53,37% de rendimento de maltose. As Figuras 30-A e 31-A ilustram respectivamente o perfil de carboidratos produzidos após hidrólise de amido de mandioca e de milho com beta-amilase purificada. A Tabela 11 mostra a porcentagem dos produtos de hidrólise do amido. Quando o amido é submetido à hidrólise enzimática com beta-amilase, a fração amilopectina é parcialmente degradada. As ligações glicosídicas alfa-1,6 da amilopectina não são hidrolisadas pela beta-amilase e constituem uma barreira contra a hidrólise. Assim a ação prolongada de beta-amilase sobre a amilopectina resulta na formação de beta-dextrina limite que não é susceptível à hidrólise posterior pela beta-amilase.

Comparando-se os açúcares padrões maltose, isomaltose, maltotriose e panose que apresentaram respectivamente tempo de retenção 7,64; 7,55; 7,09 e 6,97 minutos verificou-se a presença de oligossacarídeo de maior peso molecular de tempo de retenção 6,78 minutos. A beta-amilase purificada, livre de alfa-amilase, provavelmente catalisa a síntese de oligossacarídeos a partir de maltose. Abdullah e French (5) e Hehre et alii (58) verificaram

que a beta-amilase catalisava a síntese de maltotetraose a partir de maltose.

4.9.2. - Produção de Maltose a Partir de Amido de Mandioca e de Milho pela Ação Simultânea de beta-Amilase e Pululanase Purificadas.

Na hidrólise de amido de mandioca e de milho pela ação simultânea de beta-amilase e pululanase foram obtidos respectivamente 80,79% e 79,28% de rendimento de maltose. As Figuras 30-B e 31-B ilustram respectivamente o perfil de carboidratos produzidos após hidrólise de amido de mandioca e de milho pela ação simultânea de beta-amilase e pululanase purificadas. A Tabela 11 mostra a porcentagem dos produtos de hidrólise do amido. A aplicação de pululanase em combinação com a beta-amilase aumentou o rendimento de maltose. Na cromatografia líquida de alta pressão dos açúcares do hidrolisado de amido de mandioca e de milho utilizando-se beta-amilase e pululanase, observou-se também a presença de oligossacarídeo provavelmente resultante da síntese de maltose. Abdullah e French observaram que tanto a beta-amilase (5) como a pululanase (5,6,47) eram capazes de catalisar a síntese de tetrassacarídeos a partir de maltose.

TABELAS

Tabela 1 - Composição dos Meios de Cultura

[illegible]

Tabela 2 - Seleção do Microorganismo Melhor Produtor de Pululanase através de Cultura em Frascos sob Agitação

Bactéria	Atividade de Pululanase sobre Pululana em tampão Fosfato pH 7,0 (Unidades de Atividade/mL de meio de cultura)		Atividade de Isoamilase sobre Amilopectina em tampão pH 3,6 e 6,3 (Unidades de atividade/mL de meio de cultura)			
	Meio de Cultura no. 8	Meio de Cultura no. 10	Meio de Cultura no. 8 pH 3,6	Meio de Cultura no. 8 pH 6,3	Meio de Cultura no. 10 pH 3,6	Meio de Cultura no. 10 pH 6,3
7	17,2	0,0	0,0	13,0	4,0	1,0
78	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0
192	100,3	0,0	1,0	21,0	0,0	0,0
432	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0
456	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,0
550	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
554	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0
1538	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0
1650	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0
1666	0,0	0,0	0,0	1,0	2,0	0,0
Flavobacterium sp (1)	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	62,0

(1) usado como padrão

Tabela 3 - Características Microscópicas e Fisiológicas da
Linhagem *Klebsiella*_sp no. 192

Bastonete Gram -	Oxidase -
Motilidade -	Catalase +
Cápsula +	Urease +
Produção de Indol -	Ornitina descarboxilase -
Nitrato +	Lisina descarboxilase +
Citrato +	Arginina descarboxilase -
H ₂ S em Meio TSI -	Fenilalanina deaminase -
Teste de Voges Proskauer +	Hidrólise de amido +
Teste de Vermelho de Metila -	Liquefação de gelatina -
	Hidrólise de pectina +
	Hidrólise de caseína -

Tabela 4 - Produção de Pululanase Extracelular e Ligada à Célula pelo Microrganismo *Klebsiella* sp no. 192 em diferentes Meios de Cultura descritos na Tabela 1

Meio de Cultura	Pululanase Extracelular				Pululanase Ligada à Célula			
	Unidades de Atividade/mL de Meio de Cultura				Unidades de Atividade/mL de Meio de Cultura			
	Tempo de Fermentação				Tempo de Fermentação			
	24h	45h	69h	76h	24h	45h	69h	76h
1	15,0	14,5	14,3	0,0	7,4	5,7	4,9	3,9
2	1,8	2,4	1,4	0,0	3,8	1,4	0,0	0,0
3	0,0	0,0	0,0	0,0	6,6	13,8	1,1	0,0
4	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	5,5	4,9	4,0
5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	2,5	7,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
7	2,1	6,1	5,9	2,2	71,7	46,2	43,0	61,2
8	13,6	40,7	52,0	50,0	107,5	140,0	129,0	72,0
9	10,0	14,3	17,4	16,5	1,6	7,8	0,7	0,0
10	0,0	0,0	0,0	0,0	4,3	11,8	0,0	0,0

Tabela 5 - Pululanases Microbianas

Enzima	Fonte	pH ótimo de Atividade	Temperatura ótima de Atividade (oC)
Pululanase	<i>Aerobacter aerogenes</i> (22)	5,0	47,5
Pululanase	<i>Escherichia intermedia</i> (146)	6,0	47
Pululanase	<i>Streptococcus mitis</i> (153)	5,4-5,8	30
Pululanase	<i>Streptomyces</i> sp no. 28 (147)	5,0	60
Pululanase	<i>Streptomyces flavochromogenes</i> (163)	5,0-6,0	50
Pululanase	<i>Aerobacter aerogenes</i> (148)	6,5	50
Pululanase	<i>Bacillus</i> sp no. 202-i (103)	8,5-9,0	55
Pululanase	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i> (141)	6,0-6,5	50
Pululanase	<i>Bacillus macerans</i> NCBI 9368 (8)	-	50-55
Pululanase	<i>Bacillus</i> sp (109)	5,0	60
Pululanase	<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i> (66)	5,5-6,0	85
Pululanase	<i>Thermus aquaticus</i> YT-1 (122)	6,4	-
Pululanase	<i>Thermopactinomyces thalassophilus</i> no.15 (110)	7,0	70
Pululanase	<i>Micrococcus</i> sp (74)	8,0	55

Tabela 6 - Purificação da Pululanase Extracelular de Klebsiella sp no. 192

Etapa de Procedimento	Volume (mL)	Unidade/mL	Atividade Total Unidades	Proteína mg/mL	Atividade Específica (unidades/mg proteína)	Purificação	% Recuperação
Sobrenadante do Meio de Cultura	3500	63,1	220.850	0,19	332	1,0	100
Fracionamento com Sulfato de Amônio	25	8.200,0	205.000	16,40	500	1,5	92,80
Cromatografia em Coluna de DEAE-celulose	355	507,0	179.985	0,14	3.621	10,9	81,49
Cromatografia em Coluna de CM-celulose	272	370,0	100.640	0,10	3.700	11,1	45,56

Tabela 7 - Efeito de Sais Minerais e Outros Compostos Inorgânicos na Atividade de Pululanase sobre os Substratos Pululana e Amilopectina

Sal / concentração	Z Atividade Relativa Atividade sobre Pululana		Z Atividade Relativa Atividade sobre Amilopectina	
	1mM	10mM	1mM	10mM
NaCl	100,0	100,0	100,0	100,0
KCl	100,0	100,0	100,0	100,0
Li ₂ SO ₄	100,0	100,0	100,0	100,0
Al ₂ O ₃	100,0	100,0	100,0	100,0
Ba(OH) ₂	100,0	100,0	100,0	100,0
CaCO ₃	100,0	100,0	100,0	100,0
ZnSO ₄	100,0	100,0	100,0	100,0
NiSO ₄	100,0	100,0	100,0	88,4
HgCl ₂	100,0	100,0	95,3	87,7
CoCl ₂	100,0	100,0	74,4	65,0
MnCl ₂	100,0	92,0	75,6	55,0
CuSO ₄	100,0	92,0	85,3	19,8
Fe (SO ₄) ₂ 4 3	100,0	92,0	72,1	-
FeCl ₃	100,0	90,0	74,4	67,4
CaCl ₂	100,0	74,0	90,7	84,9
HgCl	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 8 - Efeito de Inibidores de Enzimas na Atividade de Pululanase sobre Pululana e Amilopectina

Reagente	Conc. mM	% Atividade Relativa Atividade sobre Pululana	% Atividade Relativa Atividade sobre Amilopectina
N-Bromosuccinimida	0,1	0,0	0,0
	1,0	0,0	0,0
	10,0	0,0	0,0
Ácido Etilenodi- amínotetracético	0,1	100,0	100,0
	1,0	100,0	100,0
	10,0	72,2	90,9
p-Cloromercuribenzoato	0,1	100,0	100,0
	1,0	95,3	100,0
	10,0	93,8	-
Azida de Sódio	0,1	100,0	100,0
	1,0	98,4	100,0
	10,0	88,0	89,4
Diethylthiocarbamato de Sódio	0,1	100,0	100,0
	1,0	78,8	100,0
	10,0	63,1	96,9
Arseniato de Sódio	0,1	100,0	100,0
	1,0	100,0	100,0
	10,0	100,0	95,4
L-Cisteína	0,1	100,0	100,0
	1,0	93,8	-
	10,0	-	-
Iodoacetamida	0,1	100,0	100,0
	1,0	100,0	100,0
	10,0	67,5	98,5

Tabela 9 - Efeito da Pululanase na Sacarificação de Amido de Mandioca Liquefeito

Enzimas	pH do Sistema de Reação	Tempo de Reação (horas)	Z Açúcares (HPLC)			
			DP 1	DP 2	DP 3	DP > 4
Amiloglicosidase	4,3	48	96,14	3,01	0,48	0,37
		72	94,00	5,27	0,46	0,27
Amiloglicosidase	6,0	48	94,33	1,14	2,16	2,37
		72	96,25	2,28	0,59	0,88
Amiloglicosidase + Pululanase	6,0	48	97,49	1,27	0,79	0,45
		72	96,83	2,34	0,33	0,50

DP = glicose
1

DP = maltose e/ou isomaltose
2

DP = panose
3

DP > 4 = outros açúcares

Tabela 10 - Efeito da Pululanase na Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito

Enzimas	pH do Sistema de Reação	Tempo de Reação (horas)	Z Açúcares (HPLC)			
			DP 1	DP 2	DP 3	DP 3, 4
Amiloglicosidase	4,3	48	74,60	21,77	1,89	1,74
		72	93,31	5,58	0,48	0,62
Amiloglicosidase	6,0	48	70,51	20,82	0,67	-
		72	93,18	0,95	2,91	2,96
Amiloglicosidase + Pululanase	6,0	48	87,00	4,06	2,70	6,24
		72	96,96	1,31	1,10	0,63

DP = glicose
1

DP = maltose e/ou isomaltose
2

DP = panose
3

DP 3, 4 = outros açúcares

Tabela 11 - Aplicação de beta-Amilase e Pululanase Purificadas na Produção de Maltose a partir de Amido de Mandioca e de Milho

		% Açúcares			
	Amido	DP ₁	DP ₂	DP ≥ 3	Dextrina
beta-Amilase	Mandioca	-	53,13	15,84	31,03
	Milho	-	53,37	18,37	28,31
Ação Simultânea beta-Amilase + Pululanase	Mandioca	0,52	80,79	18,69	-
	Milho	0,43	79,28	20,28	-

DP₁ = glicose

DP₂ = maltose

DP ≥ 3 = outros açúcares

Dextrina = beta-dextrina limite

FIGURAS

**FIGURA 1 -ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE
ENZIMAS AMIOLÍTICAS DESRAMIFICANTES**

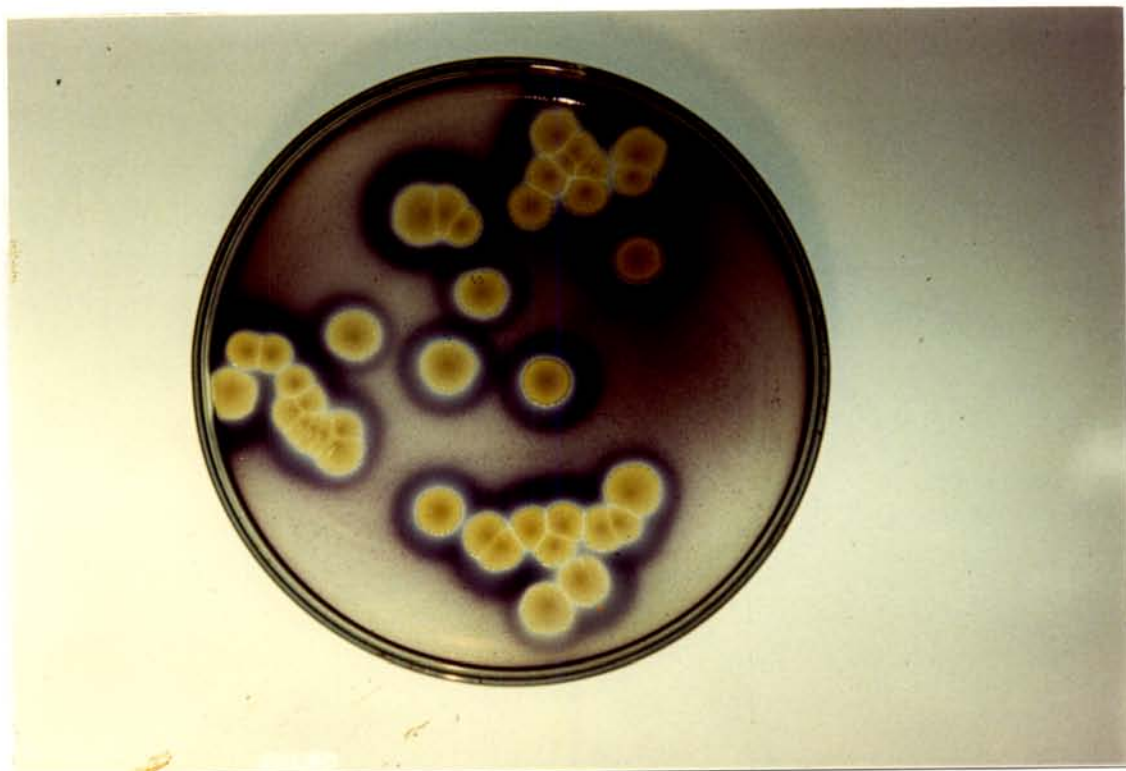


FIGURA 2 -SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE
ENZIMAS AMIOLÍTICAS DESRAMIFICANTES



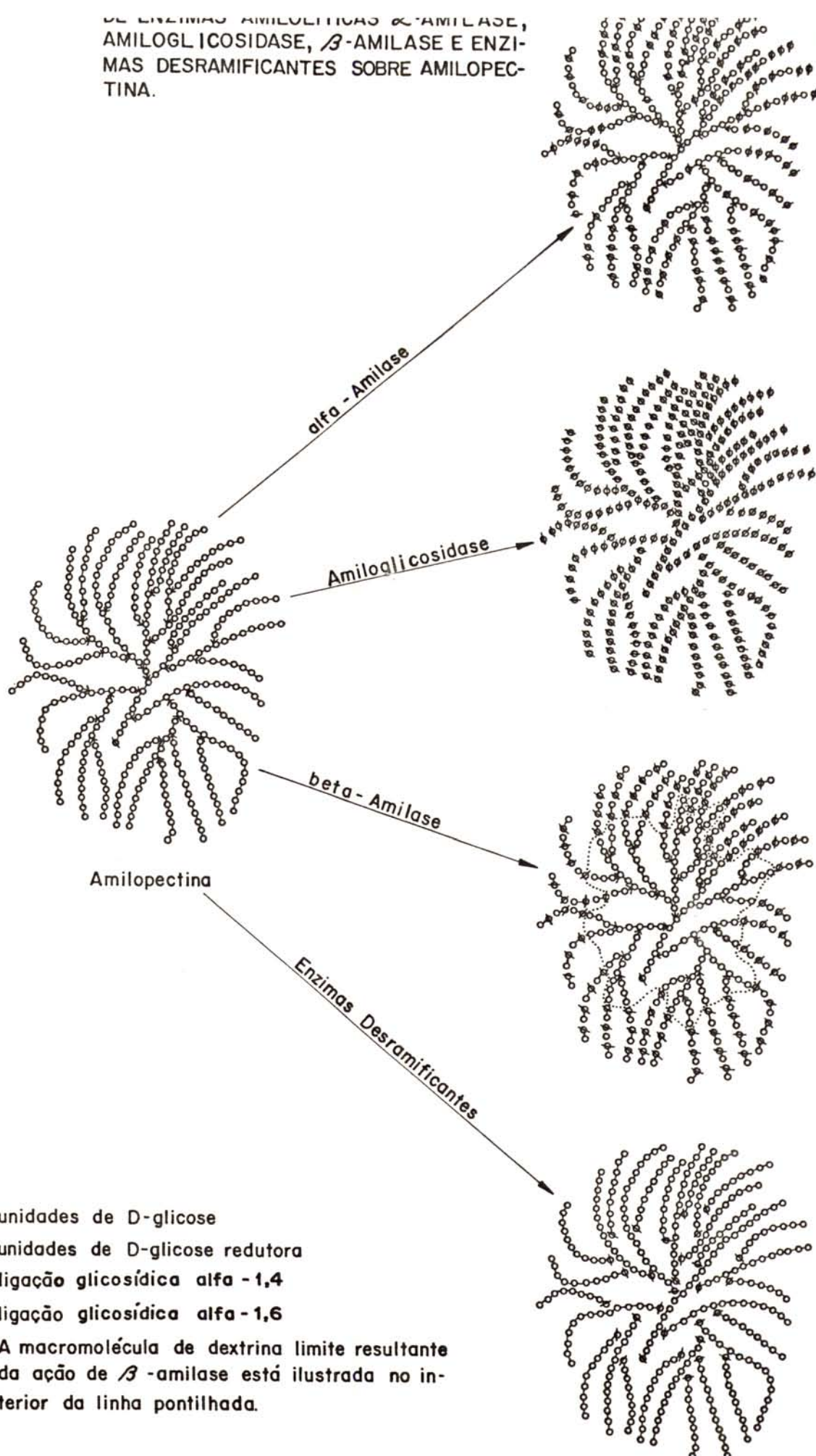
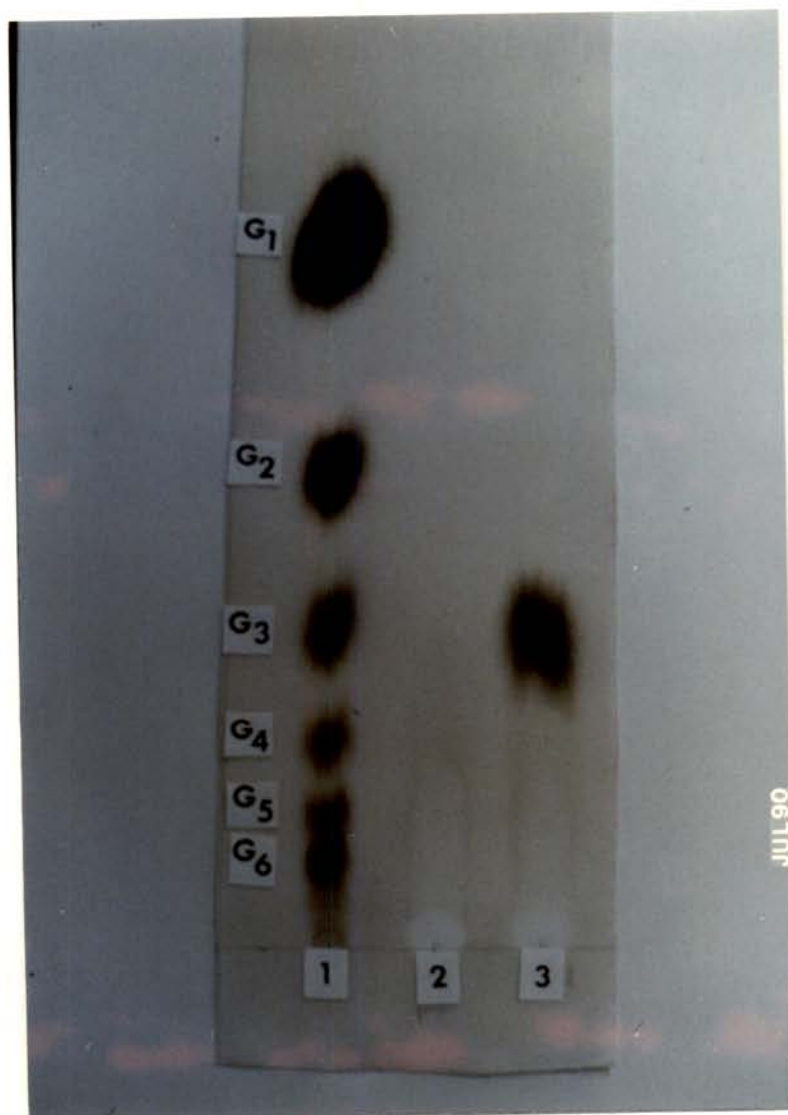


FIGURA 4 -HIDRÓLISE DE PULULANA PELA PULULANASE



- 1 - Mistura de Açúcares Padrões : G₁ = glicose ; G₂ = maltose ; G₃ = maltotriose ; G₄ = maltotetraose ; G₅ = maltopentaose ; G₆ = maltohexaose.
- 2 - Tempo zero de reação: pululana + pululanase
- 3 - Mistura de reação: 1 ml de pululana 0,7% pH 7,0 + 1 ml de pululanase, incubada 4 horas a 50°C.



O = unidade de glicose

Ø = unidade de glicose redutora

- = ligação glicosídica alfa - 1,4

† = ligação glicosídica alfa - 1,6

FIGURA 5 - CURVA PADRÃO DE ATIVIDADE DE ALFA-AMILASE

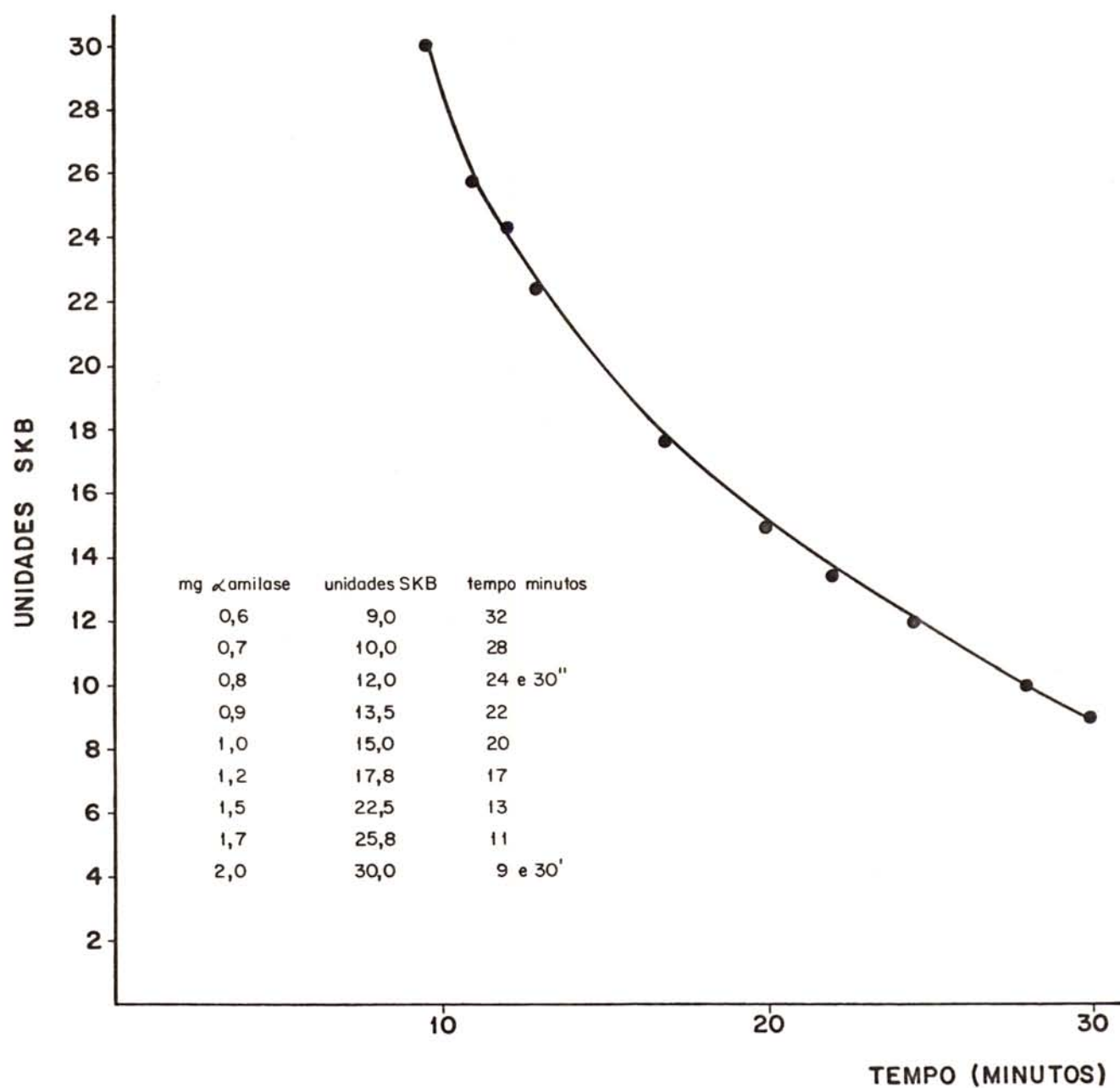


FIGURA 6 - ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, ALTERAÇÃO DE pH DO MEIO DE CULTURA, CRESCIMENTO DO MICROORGANISMO E PRODUÇÃO DE PULULANASE A 28°C

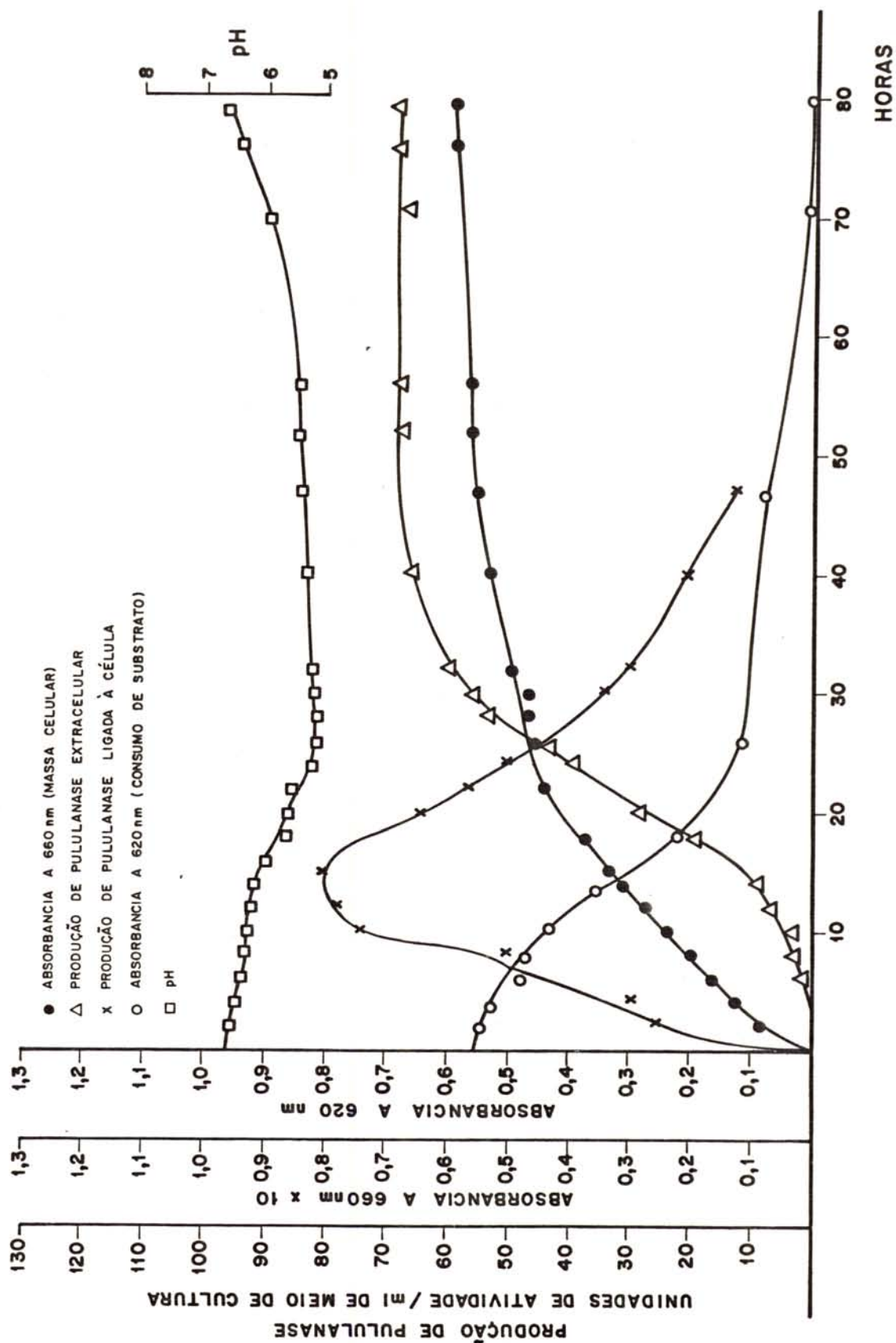


FIGURA 7 - ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, ALTERAÇÃO DE pH DO MEIO DE CULTURA, CRESCIMENTO DO MICROORGANISMO E PRODUÇÃO DE PULULANASE A 30 °C

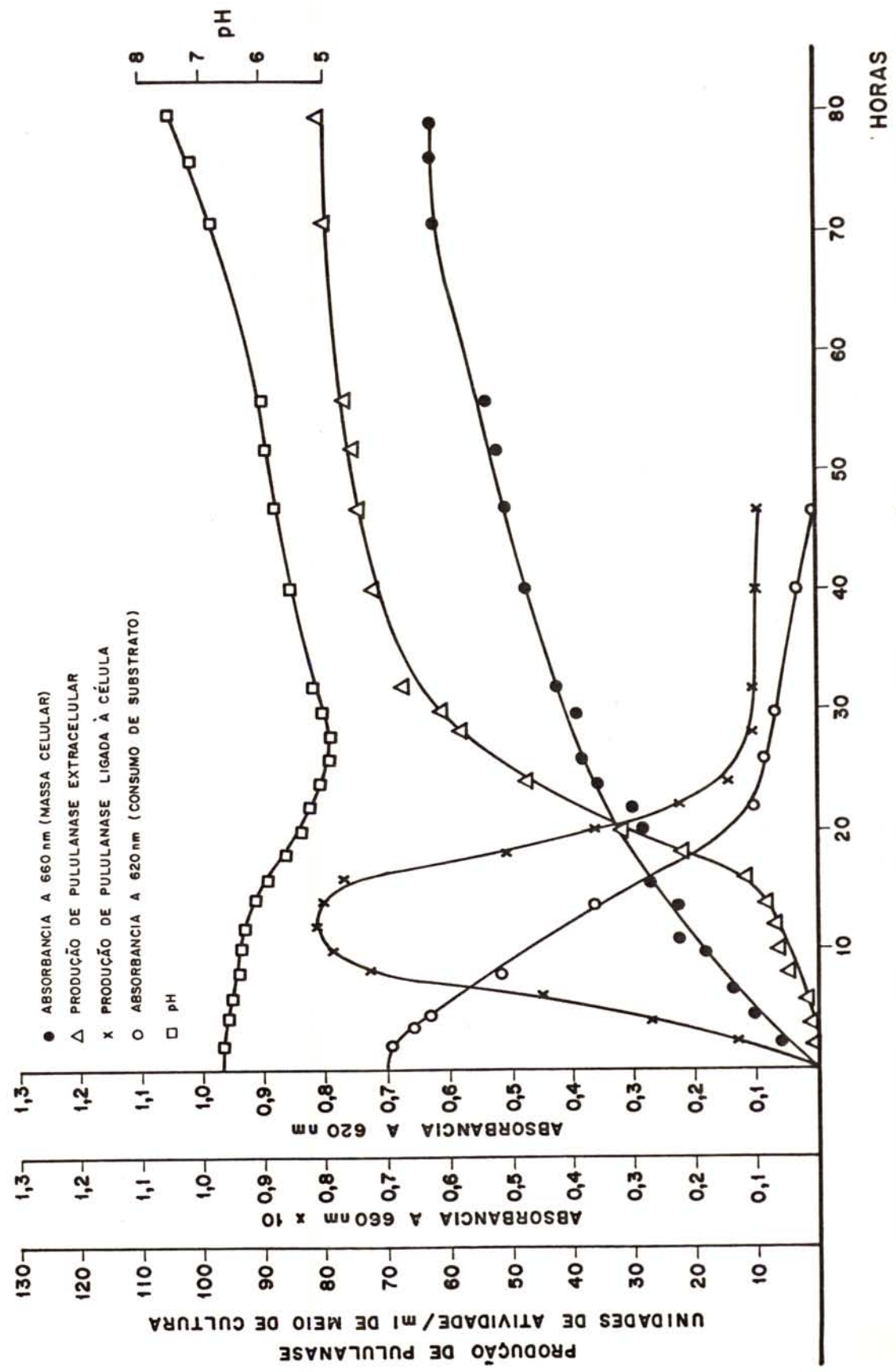


FIGURA 8 - ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, ALTERAÇÃO DE pH DO MEIO DE CULTURA, CRESCIMENTO DO MICROORGANISMO E PRODUÇÃO DE PULULANASE A 35 °C

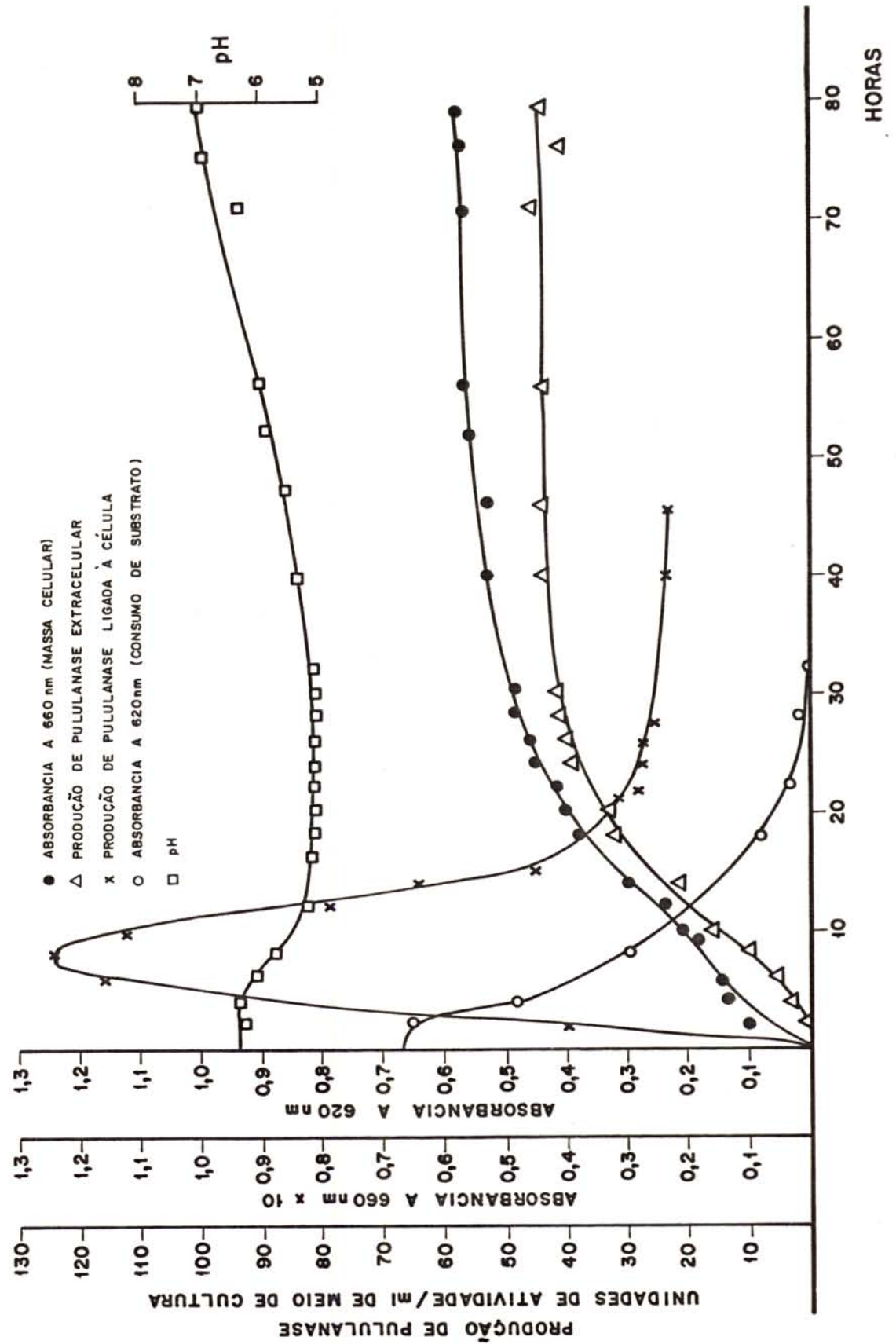


FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PULULANASE DE *Klebsiella* sp.

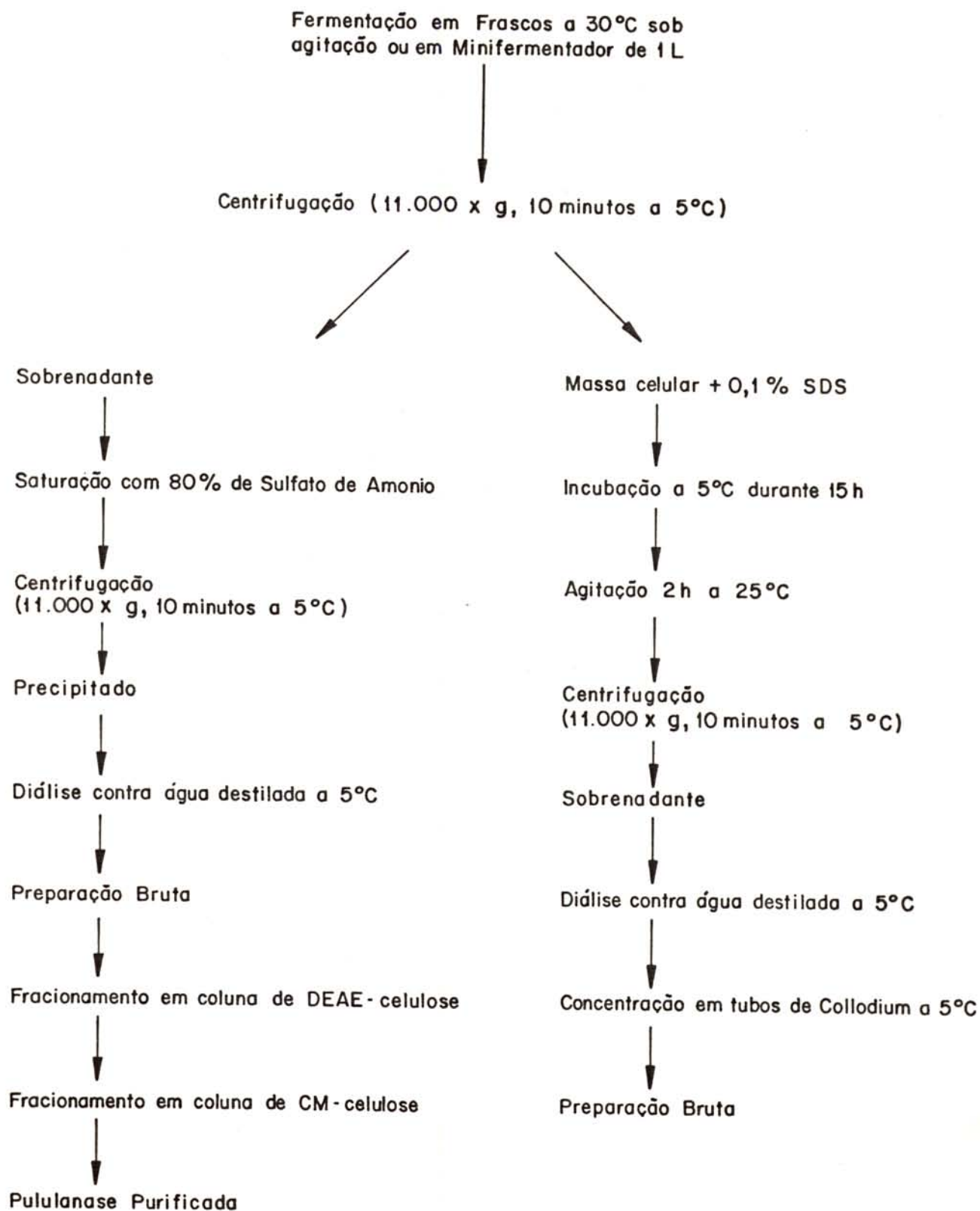


FIGURA 10 - CROMATOGRAFIA DE PULULANASE EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

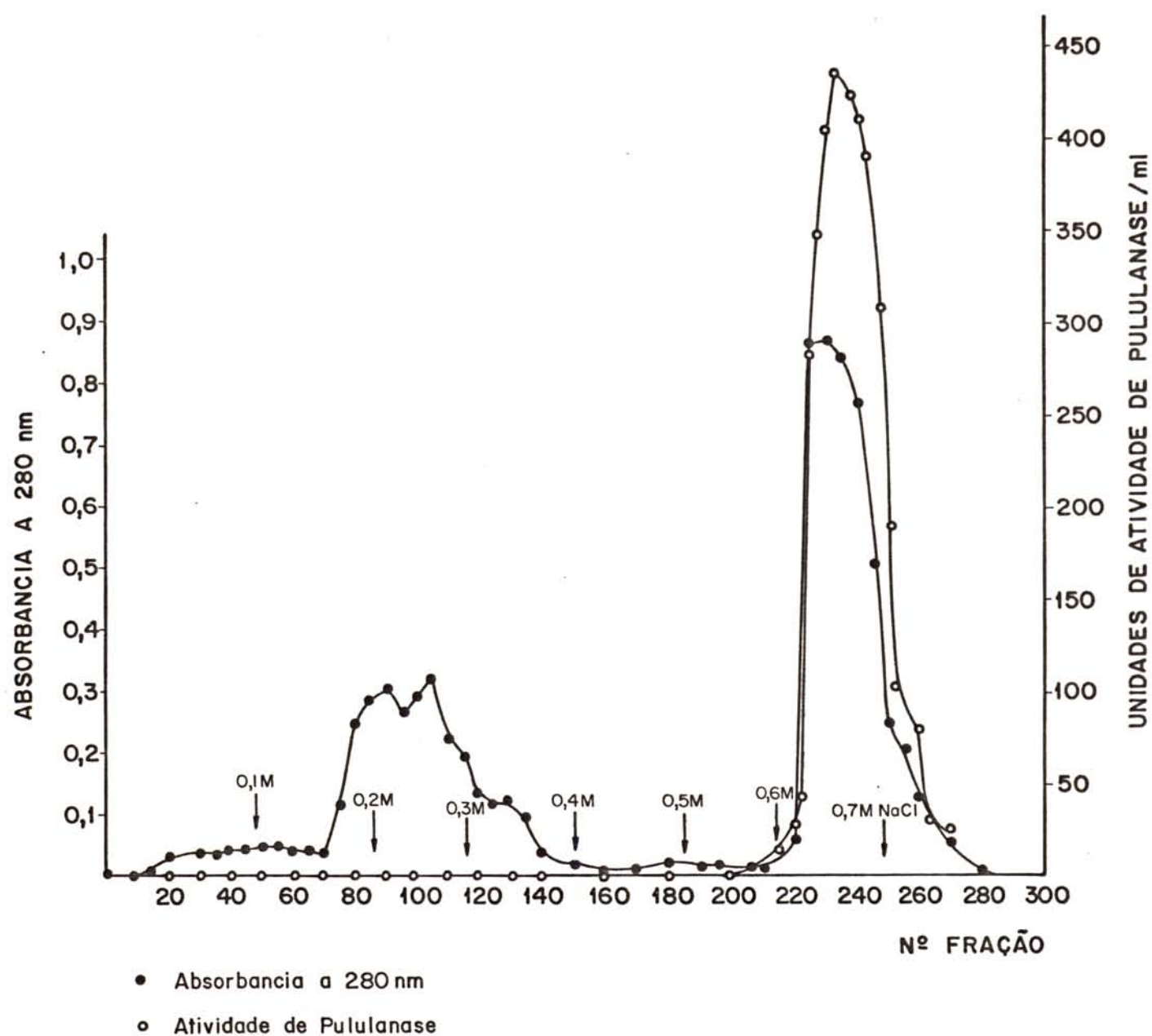


FIGURA 11 - CROMATOGRAFIA DE PULULANASE EM COLUNA DE CM-CELULOSE

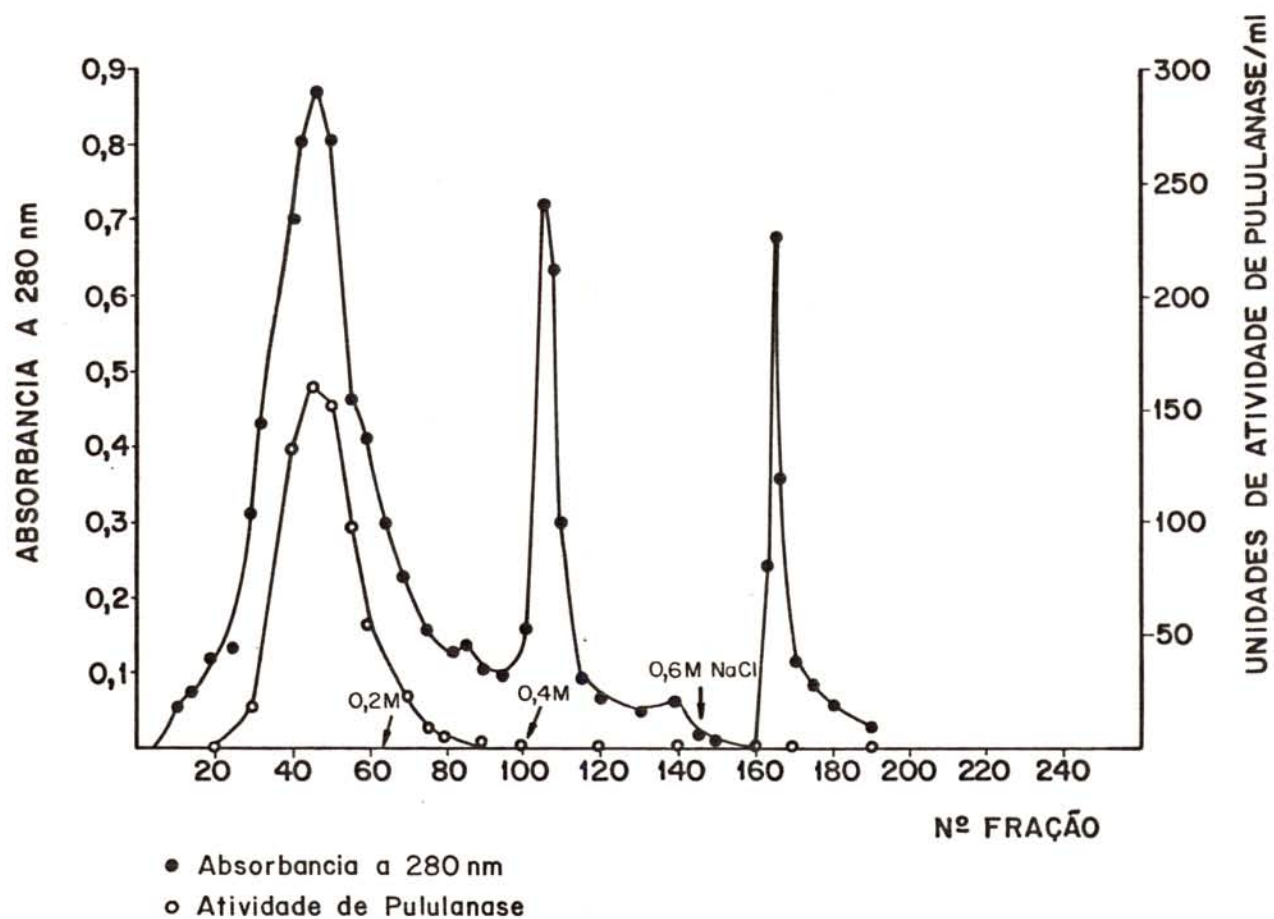
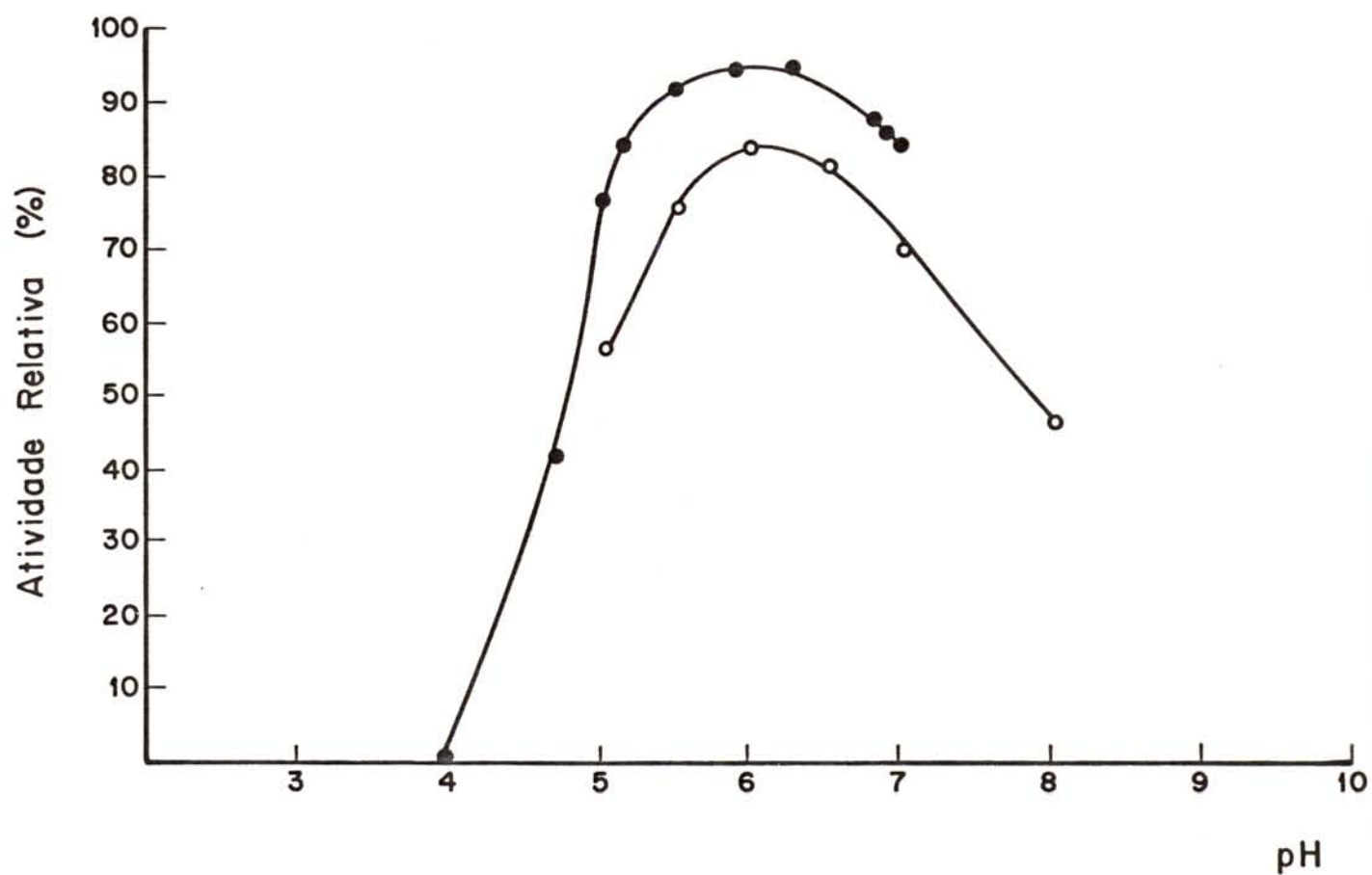


FIGURA 12 - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DE PULULANASE



● tampão citrato - fosfato

○ tampão fosfato

FIGURA 13 -EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DE PULULANASE

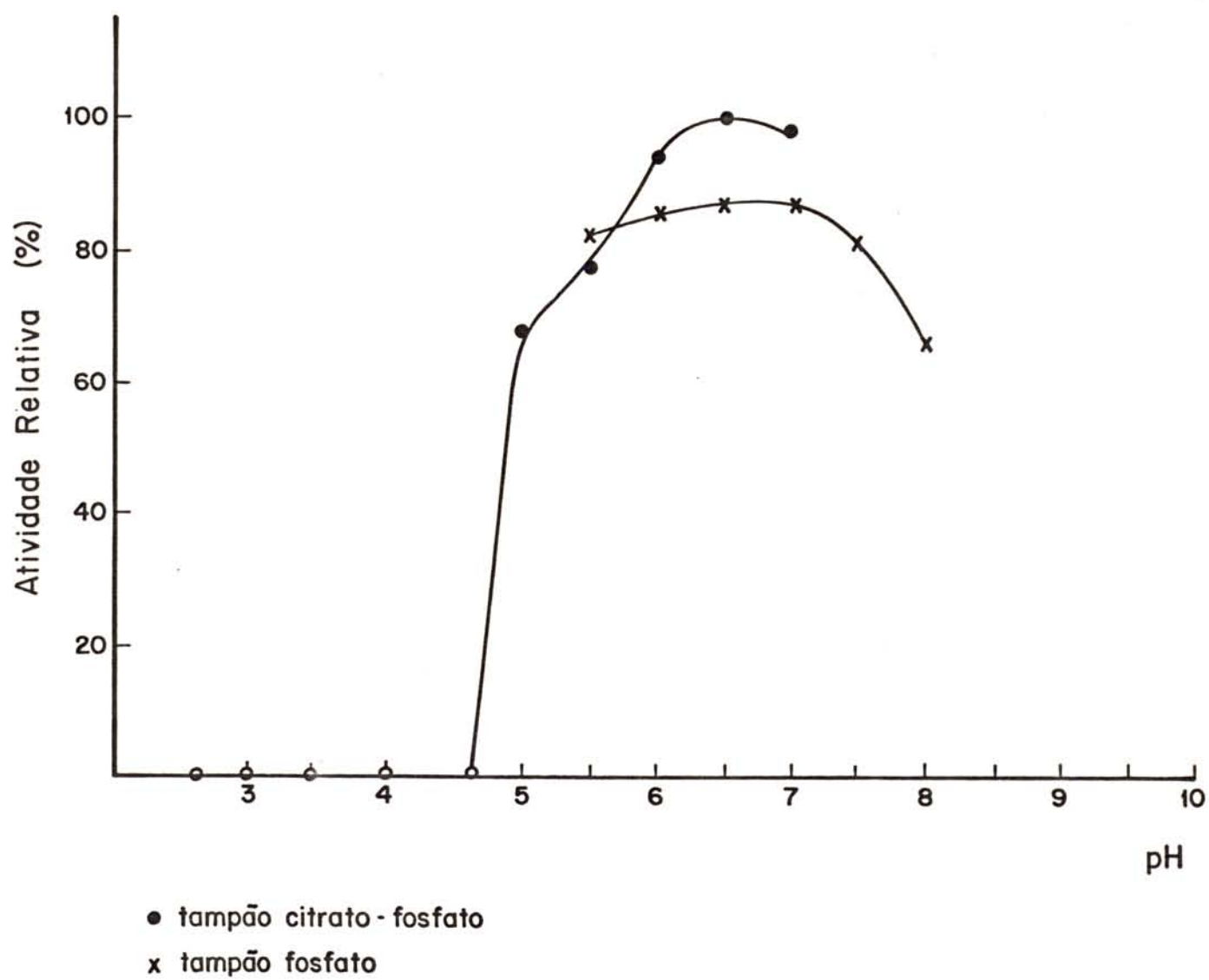


FIGURA 14 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DE PULULANASE

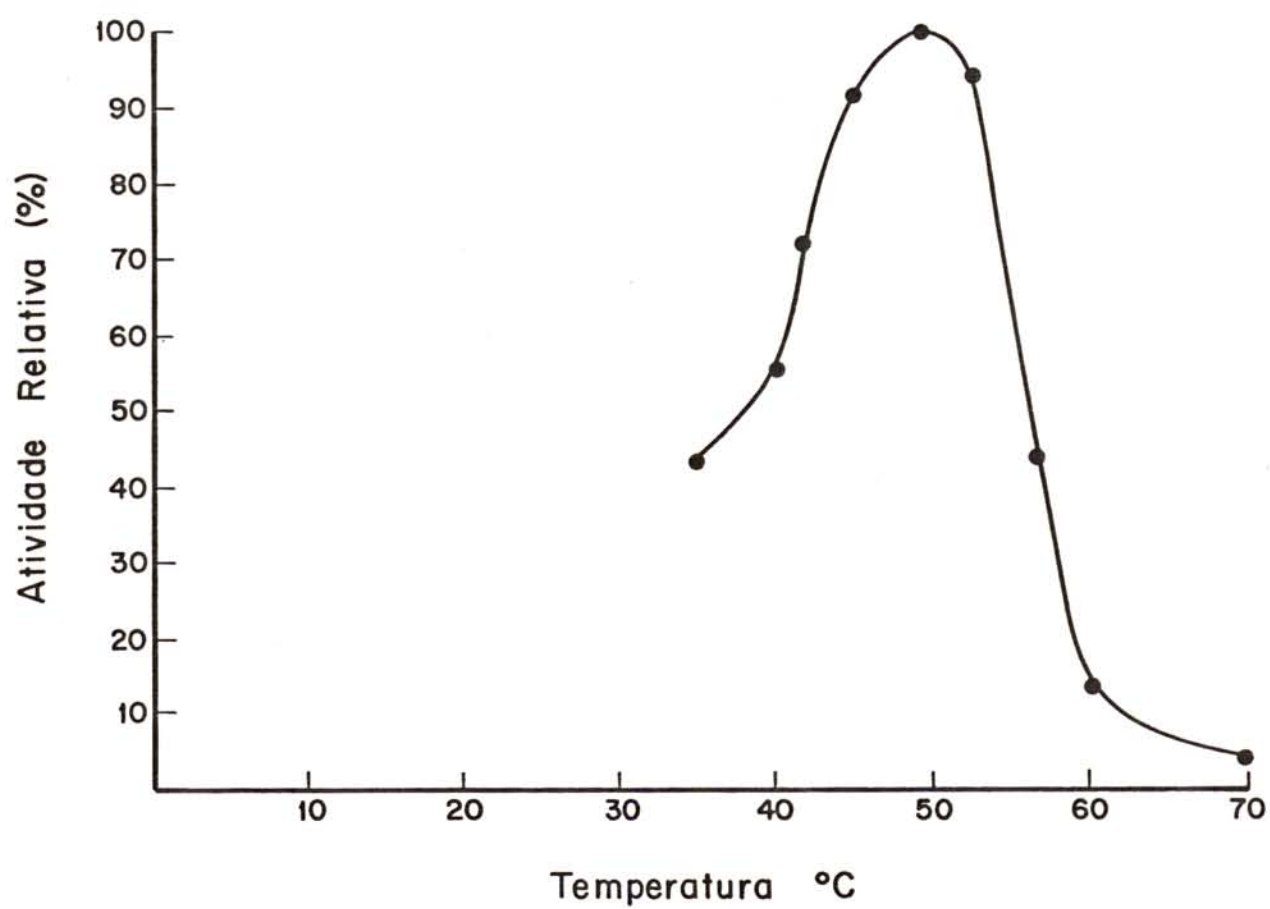


FIGURA 15 - ESTABILIDADE TÉRMICA DA PULULANASE

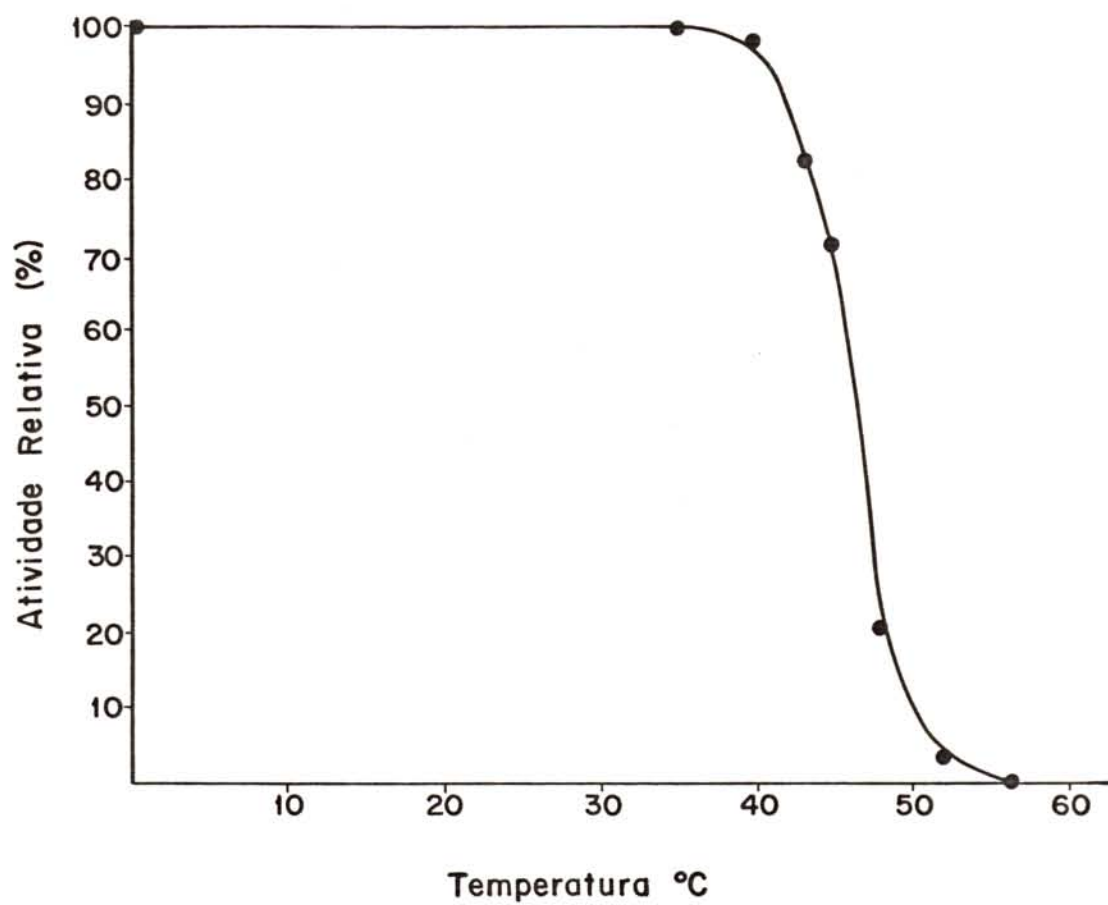


FIGURA 16 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO PULULANA NA ATIVIDADE DE PULULANASE

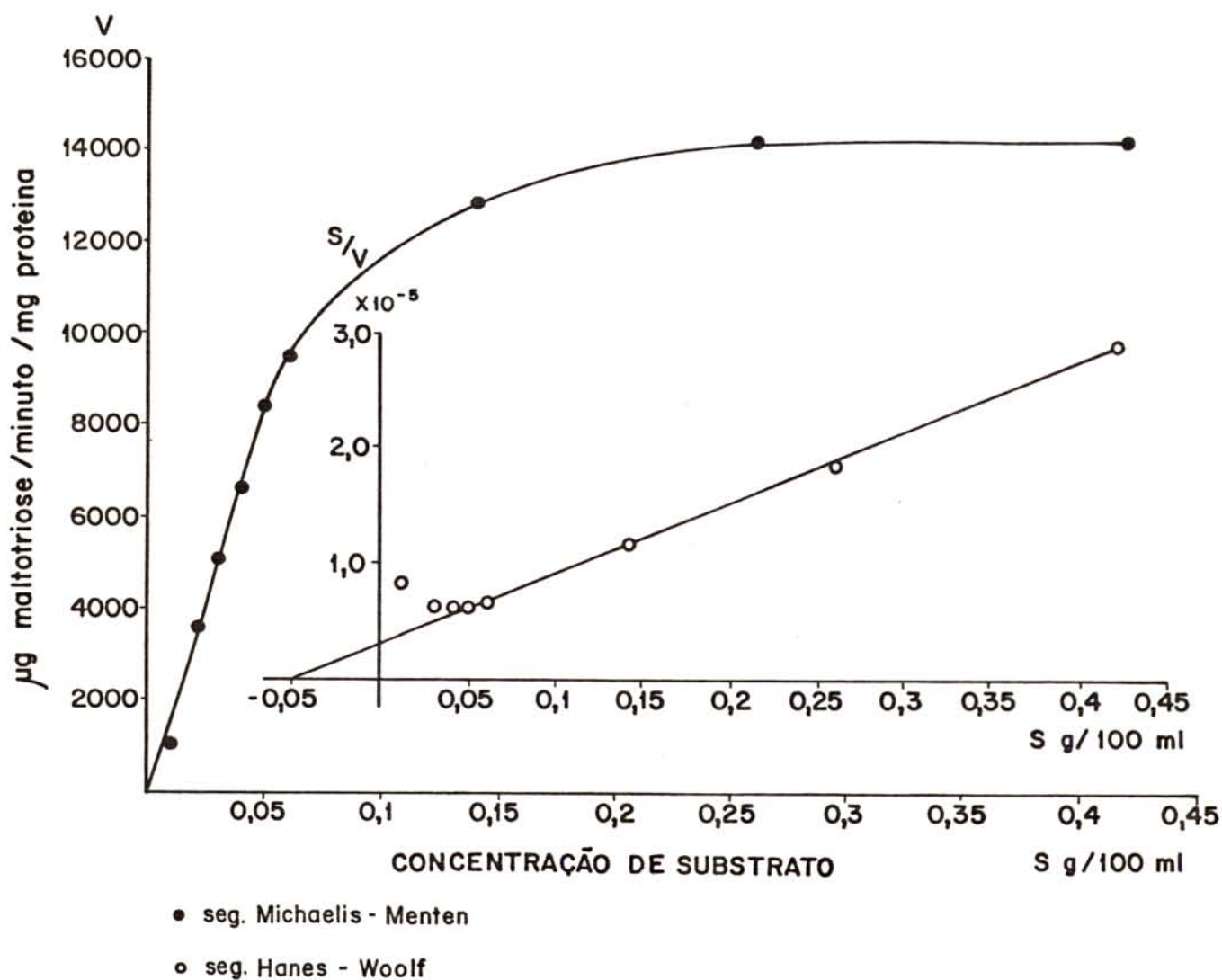


FIGURA 17 - EFEITO DE CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO AMILOPECTINA NA ATIVIDADE DE PULULANASE

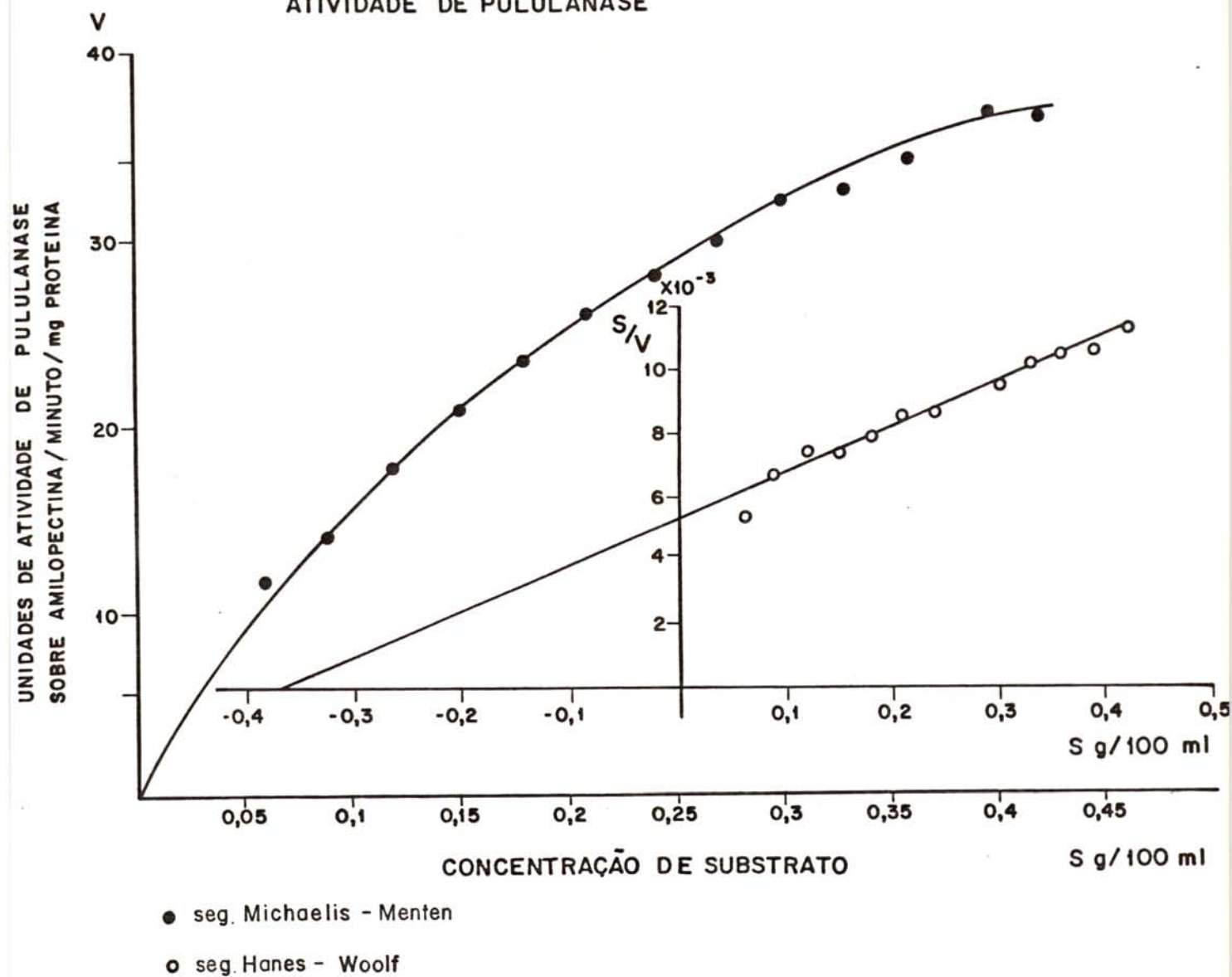


FIGURA 18 - ELUIÇÃO DAS PROTEÍNAS EM COLUNA DE SEPHADEX g 200

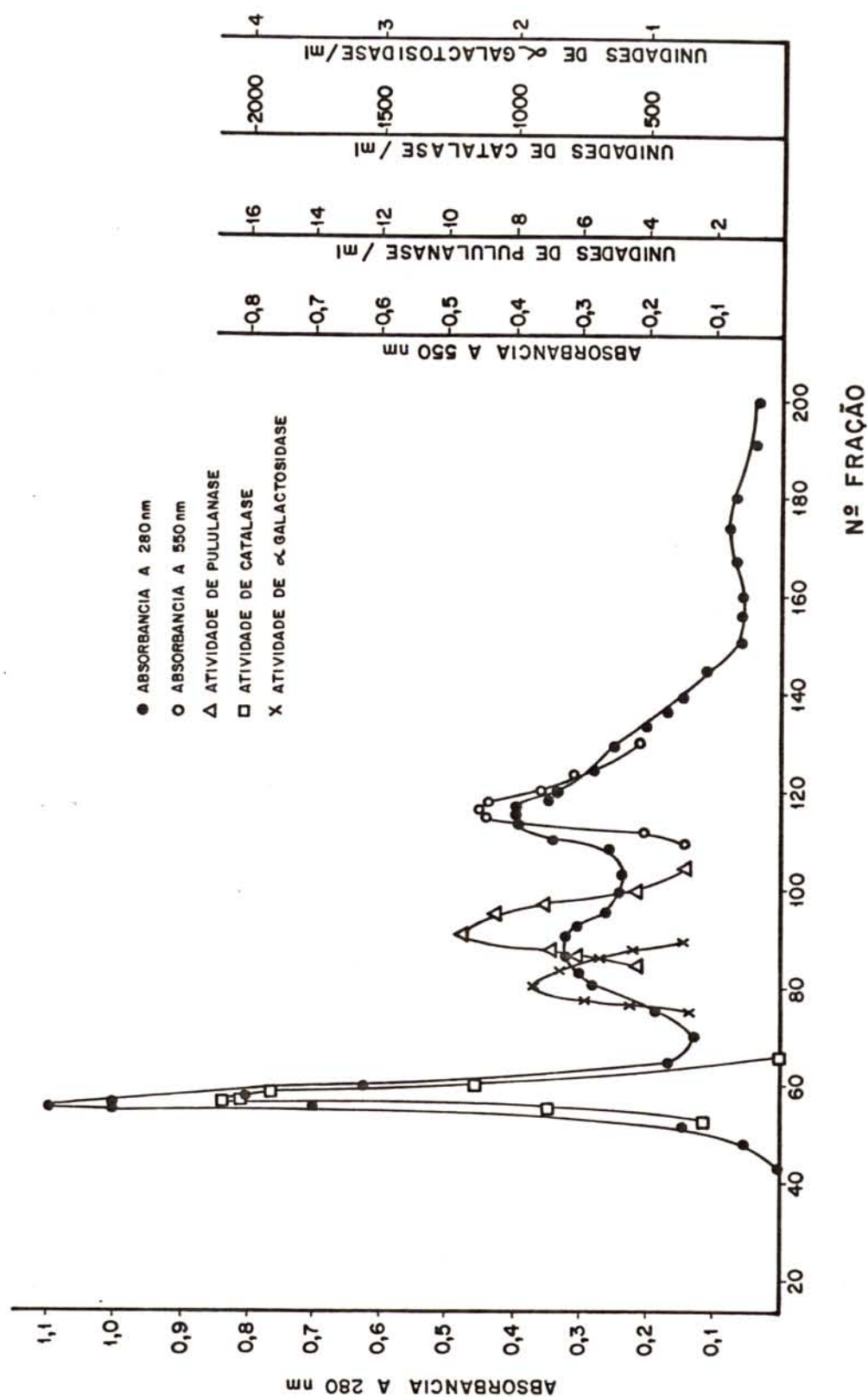


FIGURA 19 - RELAÇÃO ENTRE VOLUME DE ELUIÇÃO E PESO MOLECULAR DAS PROTEÍNAS EM COLUNA DE SEPHADEX G-200

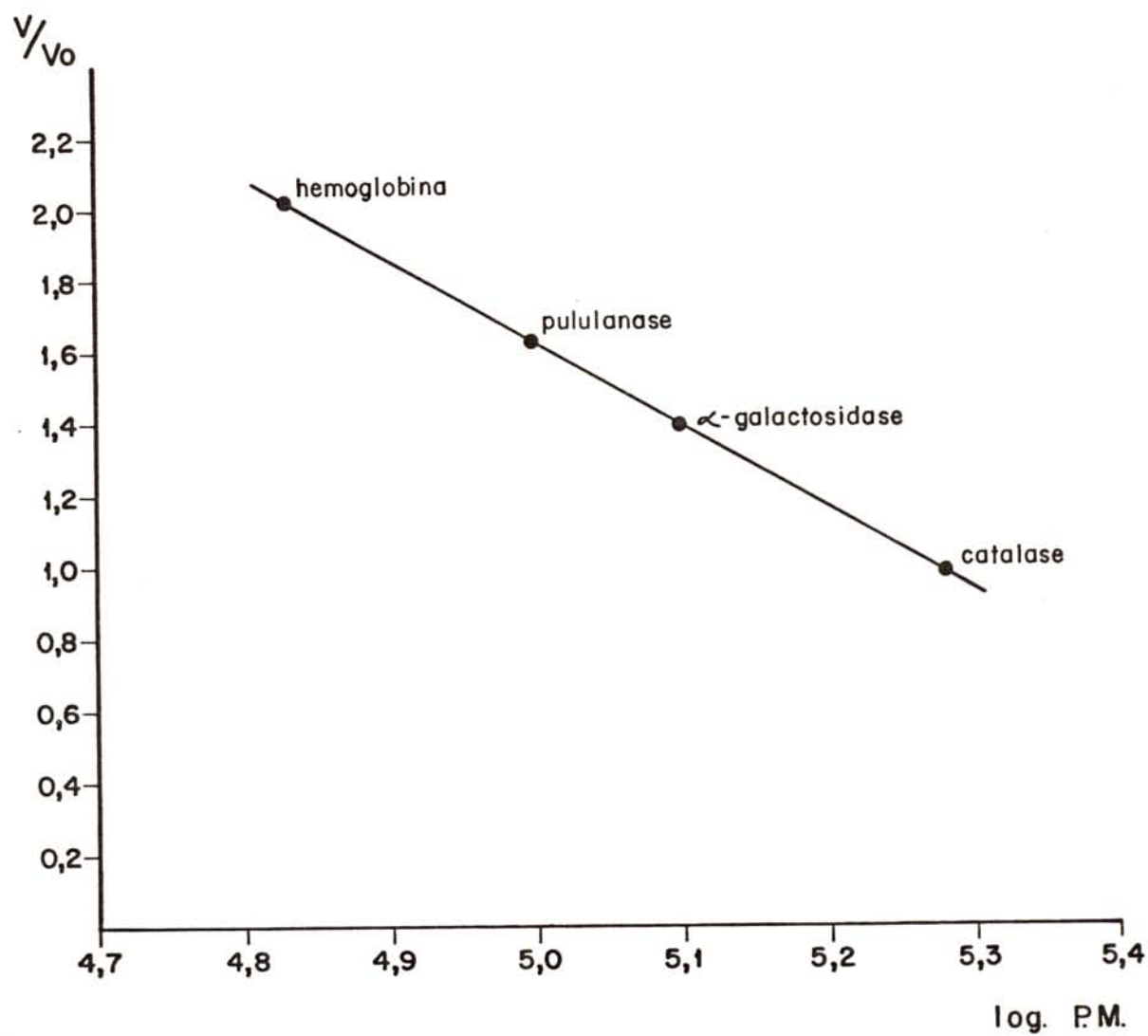


FIGURA 20 - ELETROFORESE DA PULULANASE PURIFICADA EM GEL DE POLIACRILAMIDA.

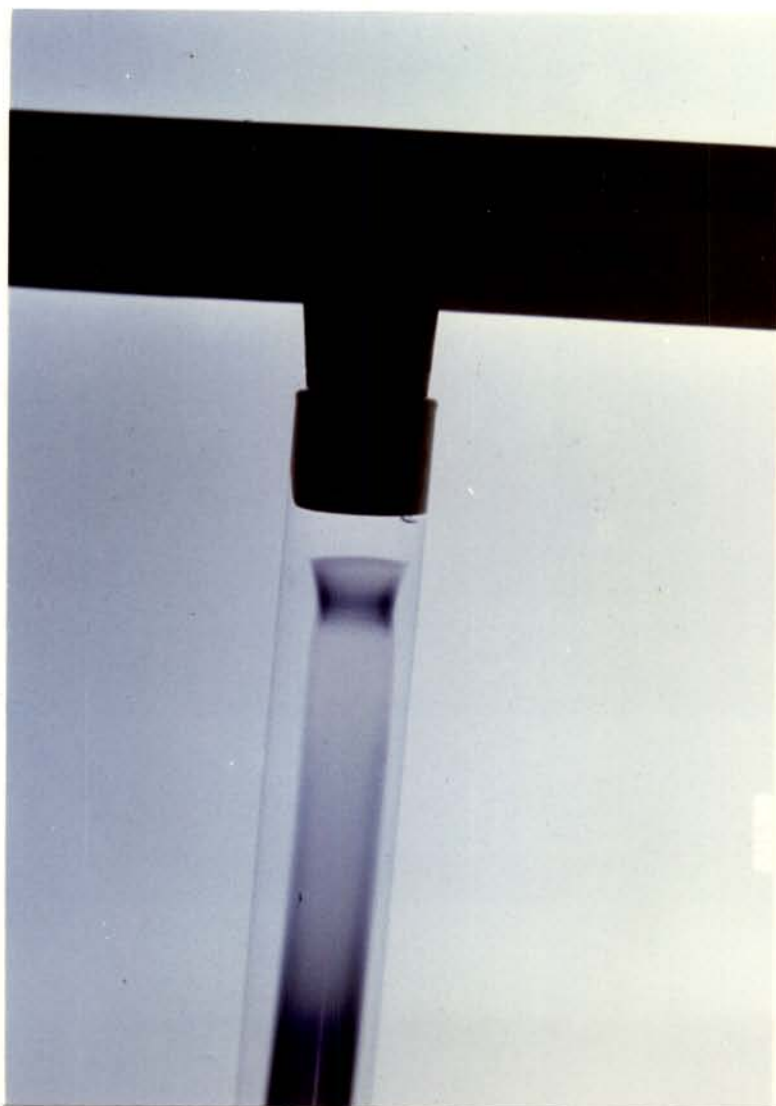
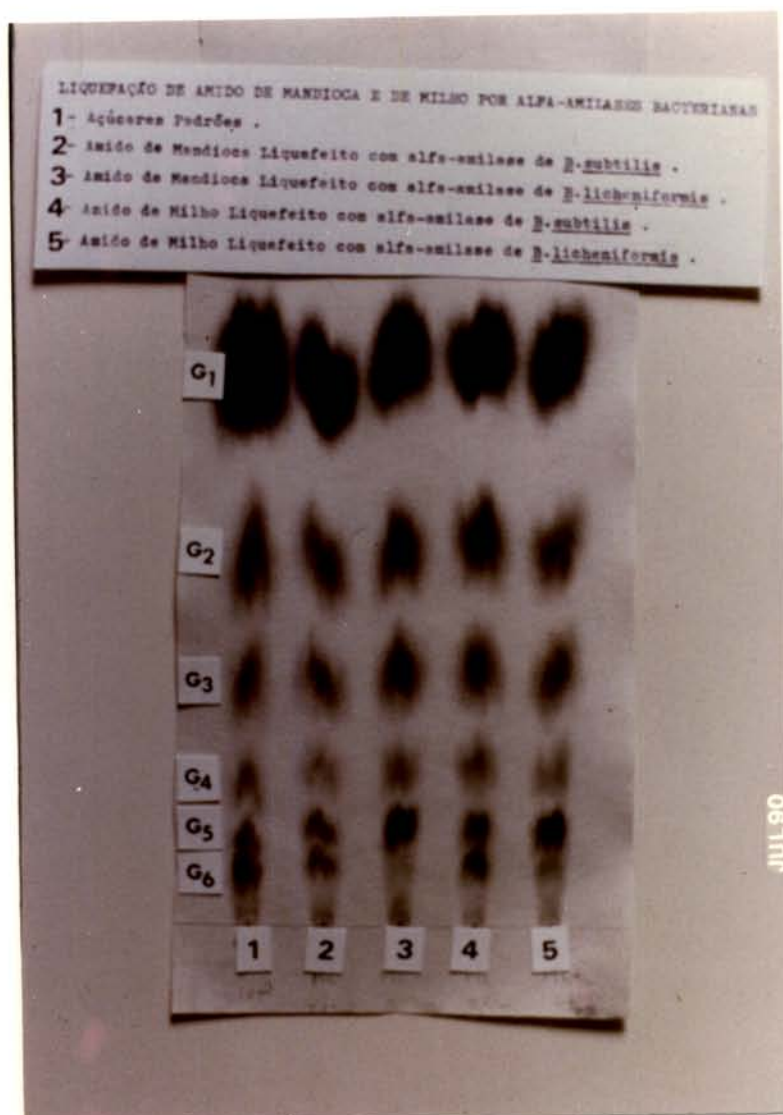


FIGURA 21 -HIDRÓLISE DE AMIDO DE MANDIOCA E DE MILHO COM ALFA - AMILASE DE *B. subtilis* E *B. licheniformis*.



1 - Açúcares Padrões : G₁ = glicose

G₂ = maltose

G₃ = maltotriose

G₄ = maltotetraose

G₅ = maltopentaose

G₆ = maltohexaose

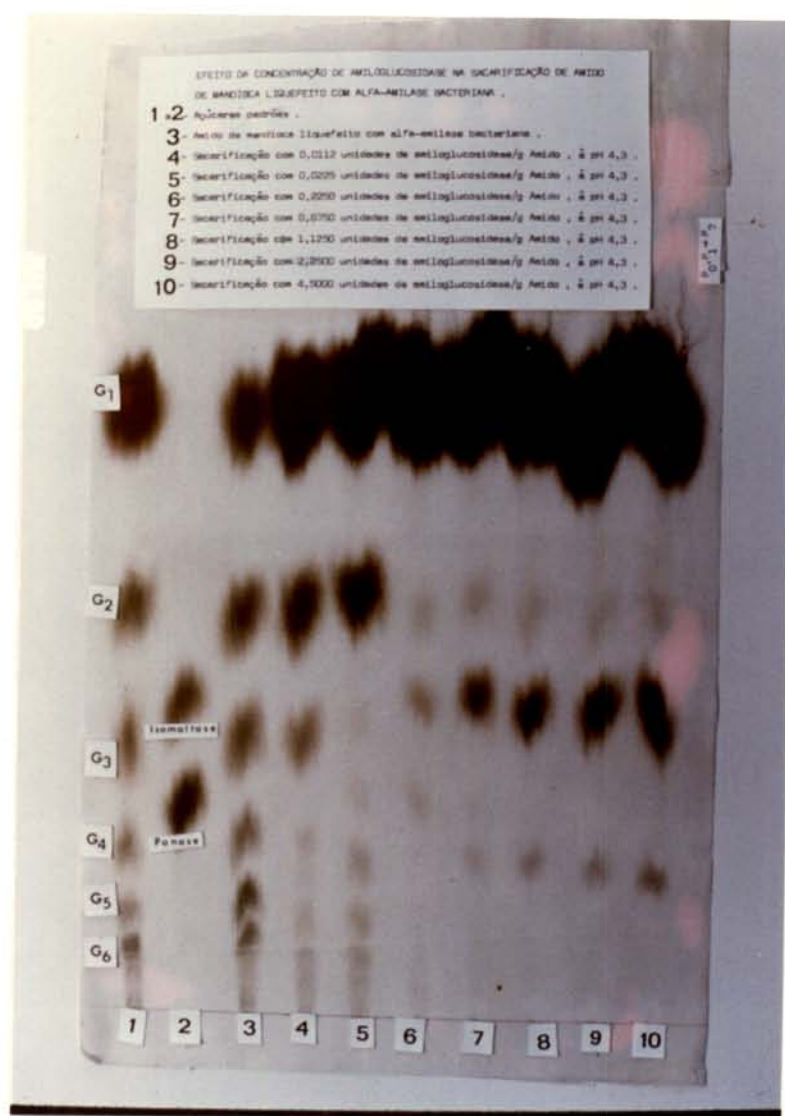
2 - Amido de Mandioca Liquefeito com α -amilase de *B. subtilis*.

3 - Amido de Mandioca Liquefeito com α -amilase de *B. licheniformis*.

4 - Amido de Milho Liquefeito com α -amilase de *B. subtilis*.

5 - Amido de Milho Liquefeito com α -amilase de *B. licheniformis*.

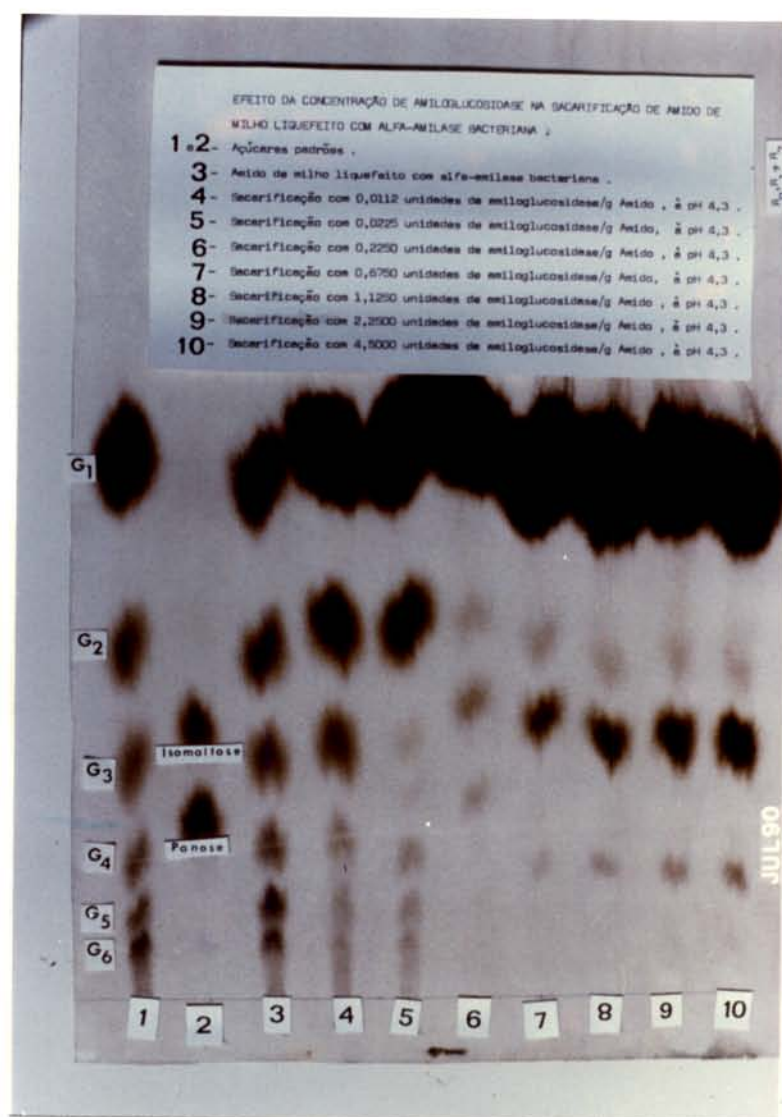
FIGURA 22 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE NA SACARIFICAÇÃO DE AMIDO DE MANDIOCA EM pH 4,3.



1 e 2 - Açúcares Padrões.

- 3 - Amido de Mandioca Liquefeito com α -amilase Bacteriana.
- 4 - Sacarificação com 0,0112 unidades de Amiloglicosidase / g Amido
- 5 - Sacarificação com 0,0225 unidades de Amiloglicosidase / g Amido
- 6 - Sacarificação com 0,2250 unidades de Amiloglicosidase / g Amido
- 7 - Sacarificação com 0,6750 unidades de Amiloglicosidase / g Amido
- 8 - Sacarificação com 1,1250 unidades de Amiloglicosidase / g Amido
- 9 - Sacarificação com 2,2500 unidades de Amiloglicosidase / g Amido
- 10 - Sacarificação com 4,5000 unidades de Amiloglicosidase / g Amido

FIGURA 23 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE NA SACARIFICAÇÃO DE AMIDO DE MILHO EM pH 4,3.



1 e 2 - Açúcares Padrões.

3 - Amido de Milho Liquefeito com α -amilase Bacteriana.

4 - Sacarificação com 0,0112 unidades de Amiloglicosidase/g Amido.

5 - Sacarificação com 0,0225 unidades de Amiloglicosidase/g Amido.

6 - Sacarificação com 0,2250 unidades de Amiloglicosidase/g Amido.

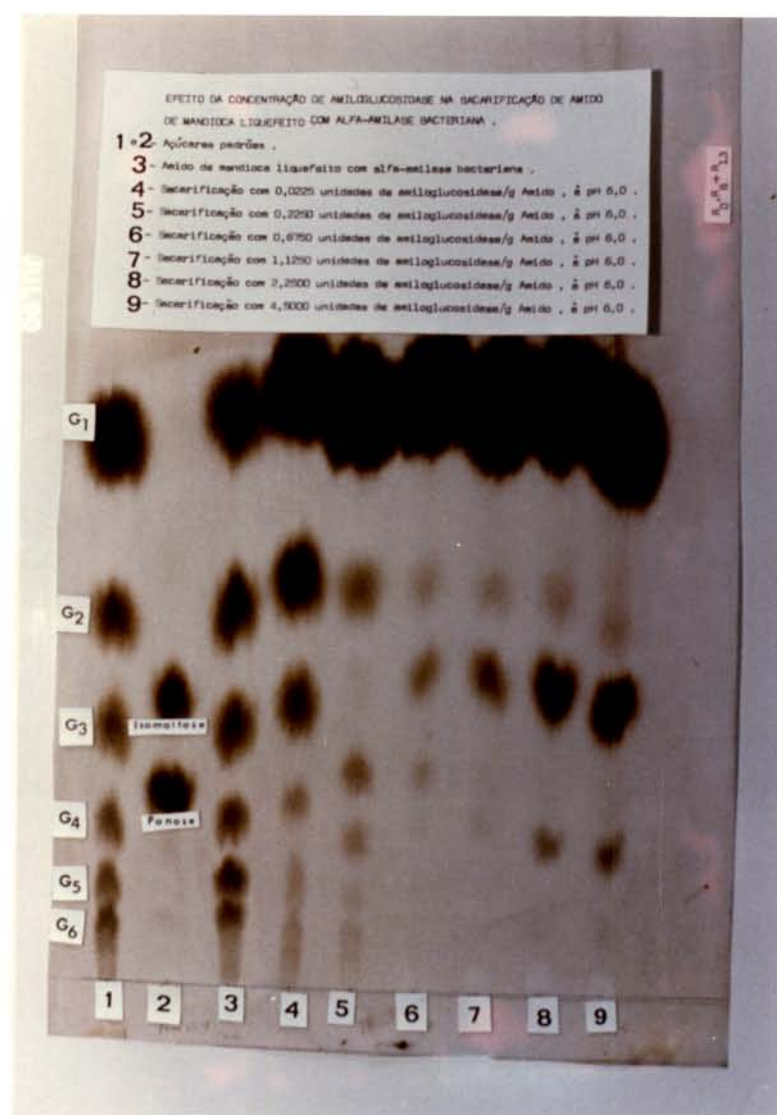
7 - Sacarificação com 0,6750 unidades de Amiloglicosidase/g Amido.

8 - Sacarificação com 1,1250 unidades de Amiloglicosidase/g Amido.

9 - Sacarificação com 2,2500 unidades de Amiloglicosidase/g Amido.

10 - Sacarificação com 4,5000 unidades de Amiloglicosidase/g Amido.

FIGURA 24 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE NA SACARIFICAÇÃO DE AMIDO DE MANDIOCA EM pH 6,0.



1e 2 - Açúcares Padrões.

3 - Amido de Mandioca Liquefeito com α -amilase Bacteriana.

4 - Sacarificação com 0,0225 unidades de Amiloglicosidase/g Amido.

5 - Sacarificação com 0,2250 unidades de Amiloglicosidase/g Amido.

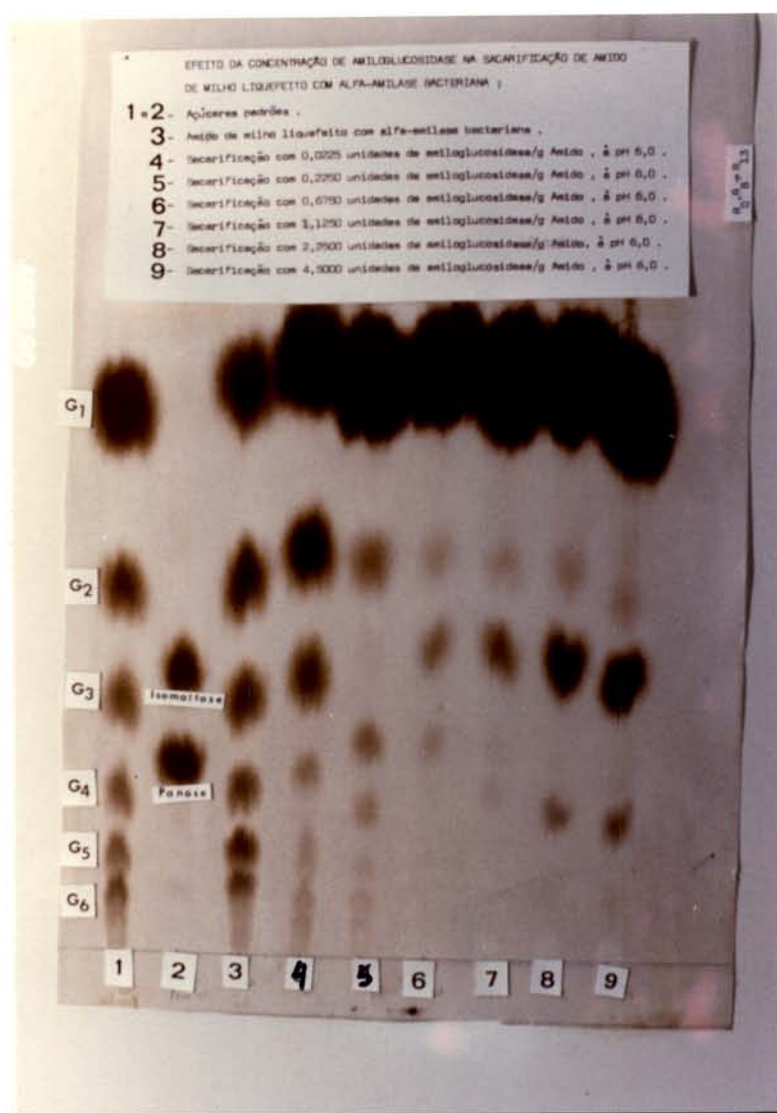
6 - Sacarificação com 0,6750 unidades de Amiloglicosidase/g Amido.

7 - Sacarificação com 1,1250 unidades de Amiloglicosidase/g Amido.

8 - Sacarificação com 2,2500 unidades de Amiloglicosidase/g Amido.

9 - Sacarificação com 4,5000 unidades de Amiloglicosidase/g Amido.

FIGURA 25 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMILOGLICOSIDASE NA SACARIFICAÇÃO DE AMIDO DE MILHO EM pH 6,0



1 e 2 - Açúcares Padrões.

3 - Amido de Milho Liquefeito com α -amilase Bacteriana.

4 - Sacarificação com 0,0225 unidades de Amiloglicosidase / g Amido.

5 - Sacarificação com 0,2250 unidades de Amiloglicosidase / g Amido.

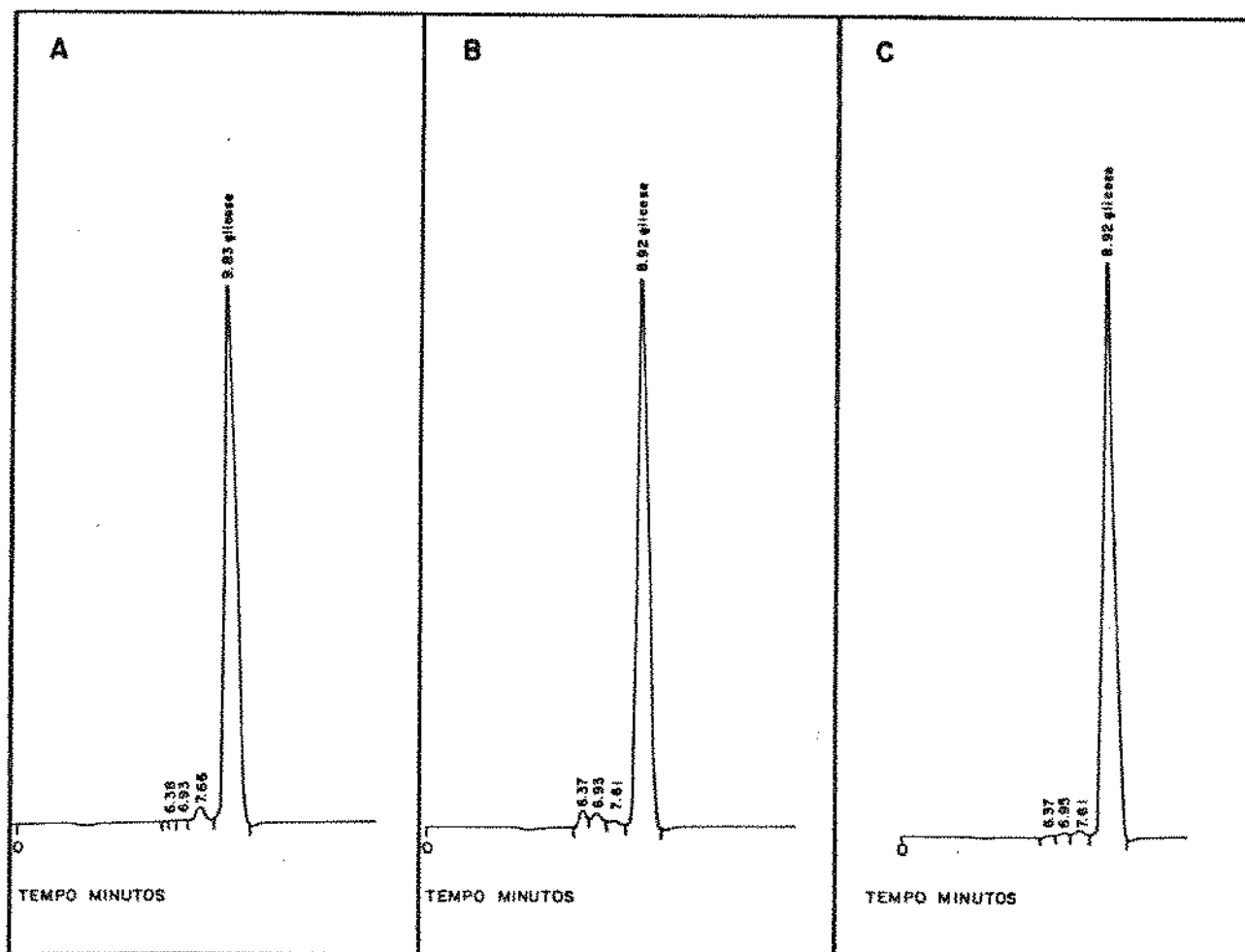
6 - Sacarificação com 0,6750 unidades de Amiloglicosidase / g Amido.

7 - Sacarificação com 1,1250 unidades de Amiloglicosidase / g Amido.

8 - Sacarificação com 2,2500 unidades de Amiloglicosidase / g Amido.

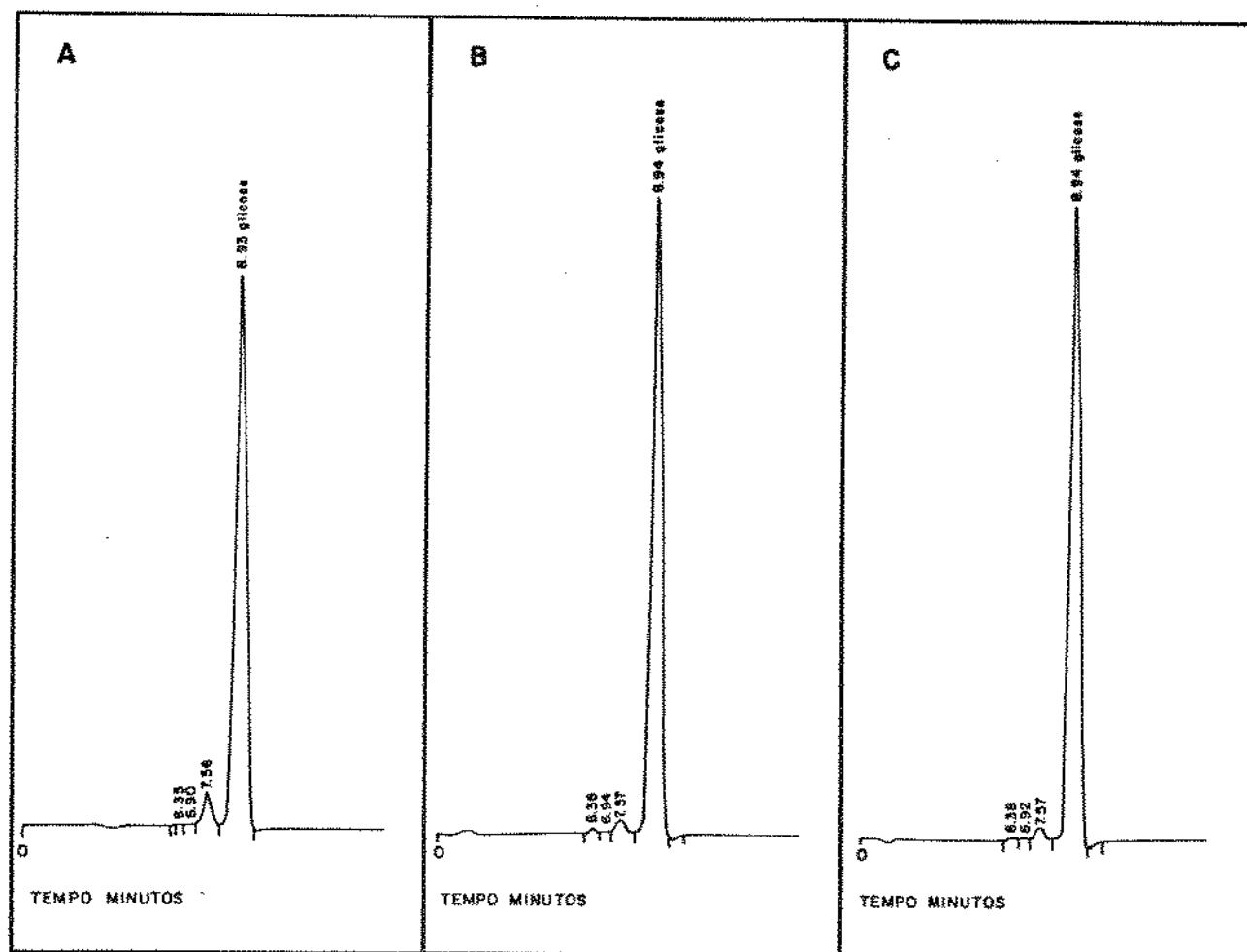
9 - Sacarificação com 4,5000 unidades de Amiloglicosidase / g Amido.

FIGURA 26 - CROMATOGRAMAS ILUSTRANDO O PERFIL DE CARBOIDRATOS PRODUZIDOS APÓS SACARIFICAÇÃO DE AMIDO DE MANDIOCA LIQUEFEITO, COM AMILOGlicosidase E PULULANASE A 50°C DURANTE 48 HORAS



- A = Sacarificação de Amido de Mandioca Liquefeito, com Amiloglicosidase em pH 4,3 a 50 °C durante 48 horas.
- B = Sacarificação de Amido de Mandioca Liquefeito, com Amiloglicosidase em pH 6,0 a 50 °C durante 48 horas.
- C = Sacarificação de Amido de Mandioca Liquefeito, com Amiloglicosidase e Pululanase em pH 6,0 a 50 °C durante 48 horas.

FIGURA 27 - CROMATOGRAMAS ILUSTRANDO O PERFIL DE CARBOIDRATOS PRODUZIDOS APÓS SACARIFICAÇÃO DE AMIDO DE MANDIOCA LIQUEFEITO, COM AMILOGLICOSIDASE E PULULANASE A 50°C DURANTE 72 HORAS

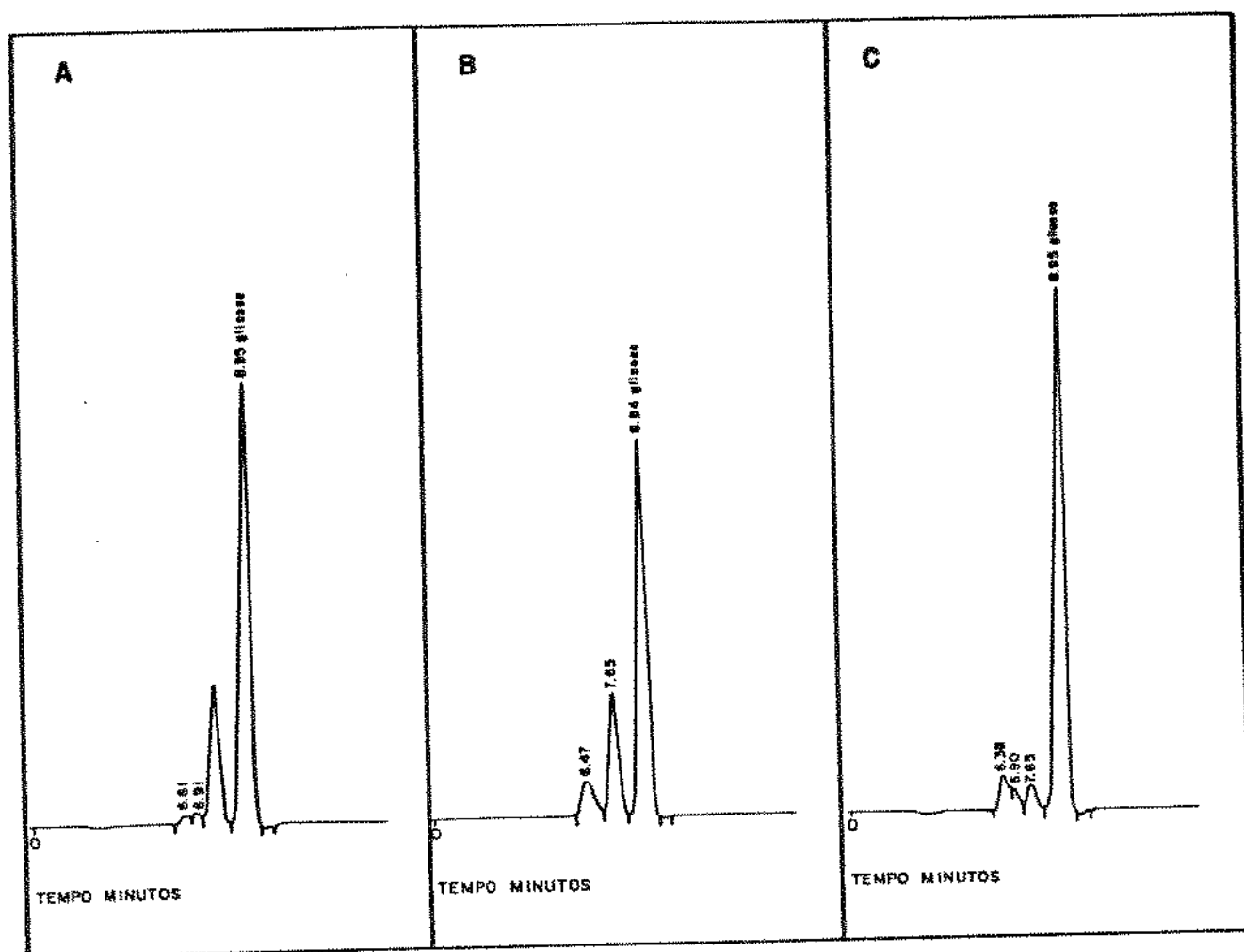


A = Sacarificação de Amido de Mandioca Liquefeito, com Amiloglicosidase em pH 4,3 a 50 °C durante 72 horas.

B = Sacarificação de Amido de Mandioca Liquefeito, com Amiloglicosidase em pH 6,0 a 50 °C durante 72 horas.

C = Sacarificação de Amido de Mandioca Liquefeito, com Amiloglicosidase e Pululanase em pH 6,0 a 50 °C durante 72 horas.

FIGURA 28 - CROMATOGRAMAS ILUSTRANDO O PERFIL DE CARBOIDRATOS PRODUZIDOS APÓS SACARIFICAÇÃO DE AMIDO DE MILHO LIQUEFEITO, COM AMILOGLICOSIDASE E PULULANASE A 50°C DURANTE 48 HORAS

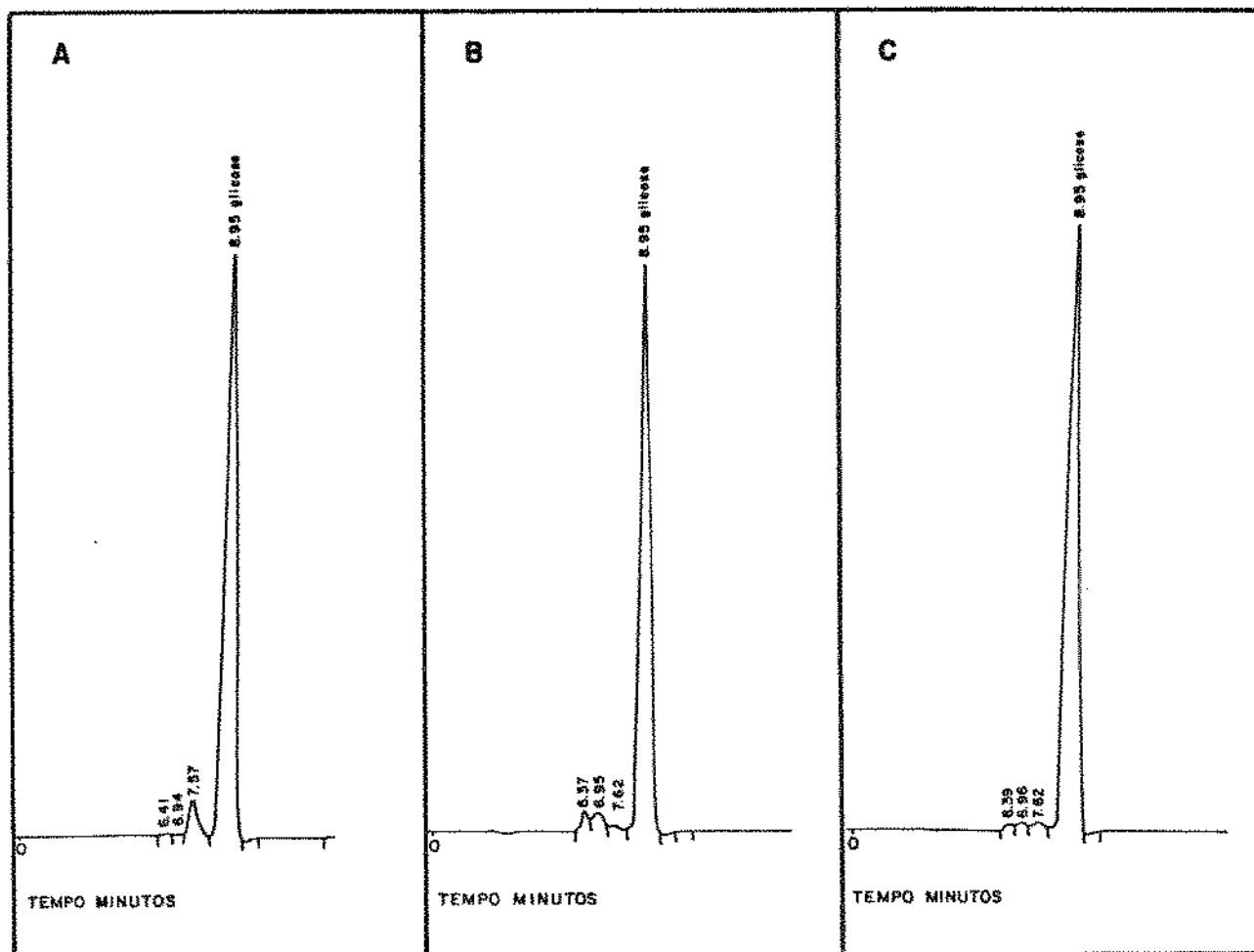


A = Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito, com Amiloglicosidase em pH 4,3 a 50°C durante 48 horas.

B = Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito, com Amiloglicosidase em pH 6,0 a 50°C durante 48 horas.

C = Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito, com Amiloglicosidase e Pululanase em pH 6,0 a 50°C durante 48 horas.

FIGURA 29 -CROMATOGRAMAS ILUSTRANDO O PERFIL DE CARBOIDRATOS PRODUZIDOS APÓS SACARIFICAÇÃO DE AMIDO DE MILHO LIQUEFEITO, COM AMILOGlicosidase E PULULANASE A 50°C DURANTE 72 HORAS

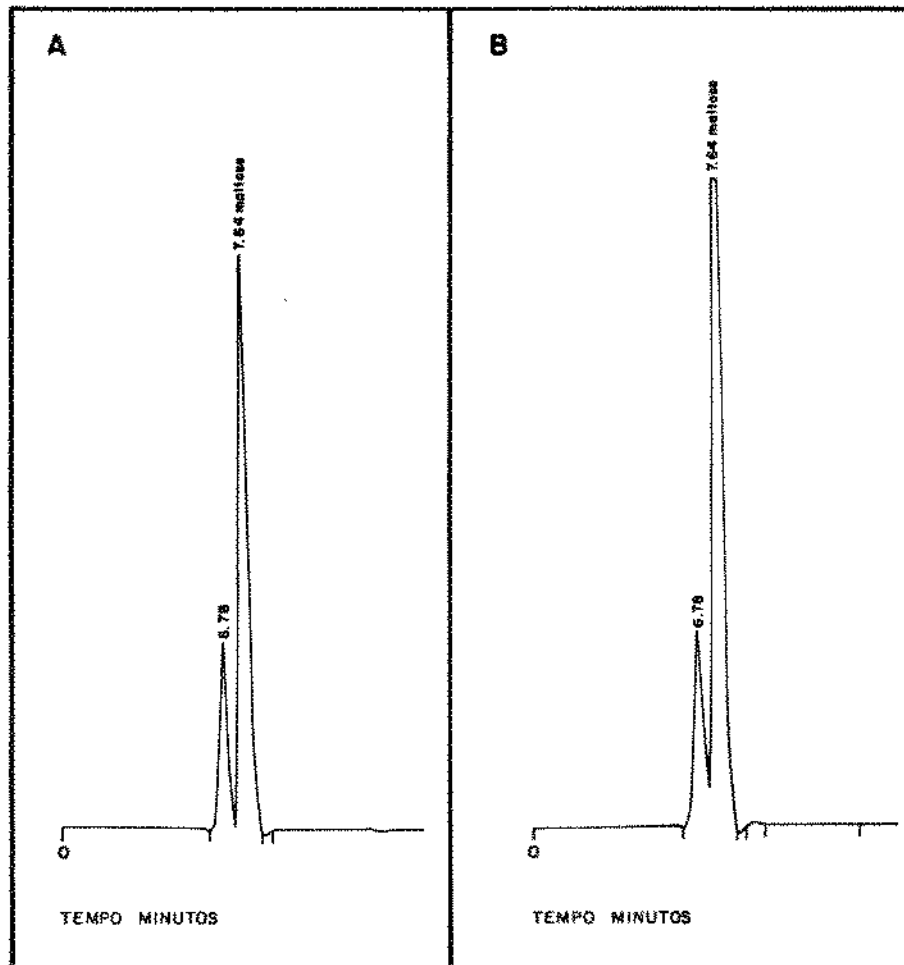


A = Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito, com Amiloglicosidase em pH 4,3 a 50°C durante 72 horas.

B = Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito, com Amiloglicosidase em pH 6,0 a 50°C durante 72 horas.

C = Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito, com Amiloglicosidase e Pululanase em pH 6,0 a 50°C durante 72 horas.

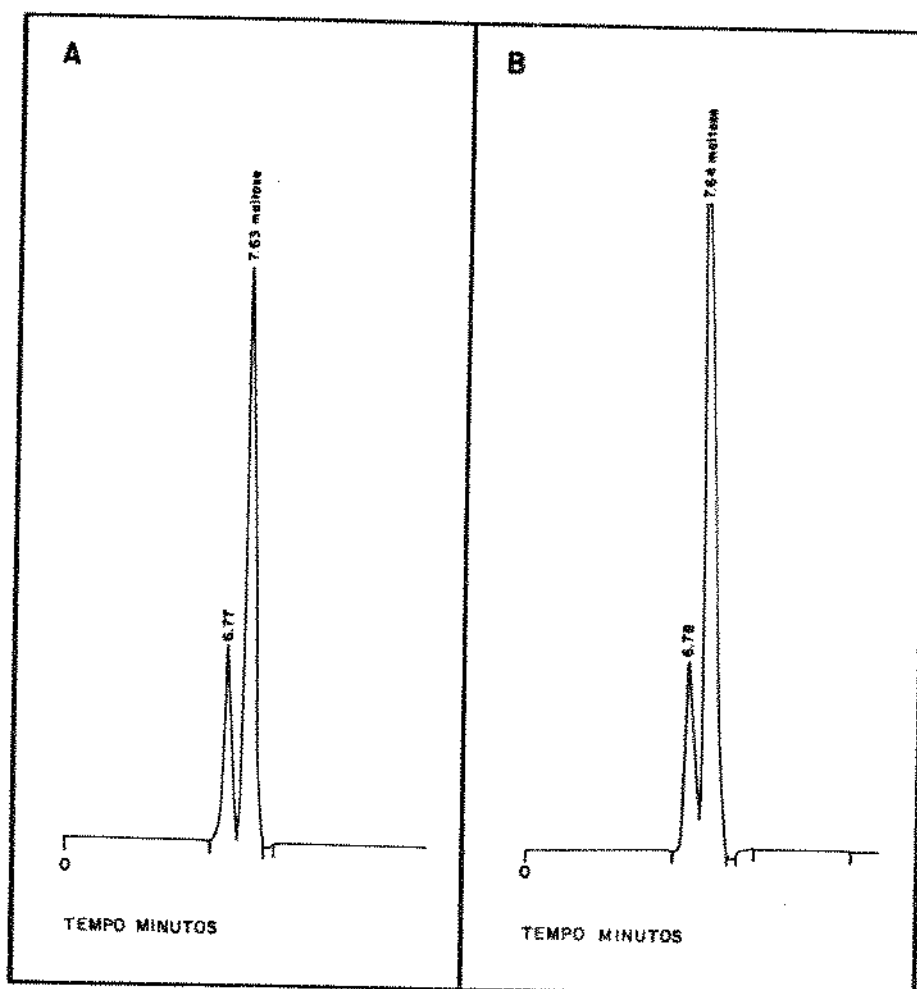
FIGURA 30 - CROMATOGRAMAS ILUSTRANDO O PERFIL DE CARBOIDRATOS PRODUZIDOS APÓS HIDRÓLISE DE AMIDO DE MANDIOCA COM BETA-AMILASE E PULULANASE PURIFICADAS.



A - Hidrólise de Amido de Mandioca Gelatinizado com Beta-amilase Purificada.

B - Hidrólise de Amido de Mandioca Gelatinizado pela ação simultânea de Beta-amilase e Pululanase Purificada.

FIGURA 31 - CROMATOGRAMAS ILUSTRANDO O PERFIL DE CARBOIDRATOS PRODUZIDOS APÓS HIDRÓLISE DE AMIDO DE MILHO COM BETA-AMILASE E PULULANASE PURIFICADAS.



A - Hidrólise de Amido de Milho Gelatinizado com Beta-amilase Purificada.

B - Hidrólise de Amido de Milho Gelatinizado pela ação simultânea de Beta-amilase e Pululanase Purificada.

5 - CONCLUSÕES :

5.1. - O microrganismo isolado e selecionado como maior produtor de pululanase foi identificado como *Klebsiella* sp.

5.2. - A enzima amilolítica desramificante de *Klebsiella* sp no. 192 é uma pululanase (pululana 6-glucanohidrolase E.C. 3.2.1.41) que hidrolisa especificamente as ligações glicosídicas alfa-1,6 do amido, pululana e produtos de degradação. A pululanase de *Klebsiella* sp hidrolisa a pululana liberando unidades de maltotriose.

5.3. - A pululanase de *Klebsiella* sp pode ser obtida na forma de enzima ligada à célula e na forma de enzima livre. A enzima intracelular é produzida na fase exponencial de crescimento sendo liberada na forma livre na fase estacionária. A produção máxima de enzima extracelular foi obtida após 50 horas de fermentação a 30°C em meio de cultura constituído de 2% de amilopectina; 0,4% de glutamato de sódio; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,15% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0,001% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,001% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 0,001% NaCl ajustado para pH 7,0. A 28°C e a 35°C a produção máxima de enzima extracelular se verifica a partir de 40 horas de incubação.

5.4. - A pululanase extracelular purificada através de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em colunas de DEAE celulose e CM-celulose apresenta atividade ótima em tampão citrato fosfato pH 6,0 a 50°C. A enzima apresenta maior estabilidade na faixa de pH 6,0 a 7,0 em tampão citrato-fosfato. A enzima é termosensível, o aquecimento da enzima purificada em tampão citrato fosfato 0,05M pH 6,0 à 40°C; 43°C; 45°C; 47°C; 52°C e 57°C durante 1 hora, na ausência de substrato, resultaram em 2%; 18%; 29%; 80%; 97% e 100% de inativação respectivamente.

5.5. - A atividade da pululanase não é afetada por NaCl; KCl; Li_2SO_4 ; Al_2O_3 ; $\text{Ba}(\text{OH})_2$; CaCO_3 ; ZnSO_4 ; NiSO_4 ; MgCl_2 ; CoCl_2 ; MnCl_2 ; CuSO_4 ; $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$; FeCl_3 e CaCl_2 na concentração 1mM em relação ao volume final da mistura de reação. A atividade enzimática é totalmente inibida na presença de HgCl_2 na concentração 1mM de sal em relação ao volume final de reação.

5.6. - A atividade de pululanase foi totalmente inibida pelo reagente N-bromosuccinimida na concentração 0,1mM em relação ao volume final da mistura de reação, indicando que resíduos de triptofano podem ser essenciais para a atividade enzimática. Os reagentes iodoacetato e p-cloromercuribenzoato não inibem a atividade de pululanase, indicando que grupos sulfidrila não estão envolvidos no centro ativo da enzima.

5.7. - Os valores de K_m e V_{max} da pululanase foram respectivamente 0,043g/100 mL e 14.333 μ g maltotriose/minuto/mg proteína para o substrato pululana e 0,37g/100 mL e 69,40 unidades/minuto/mg proteína para o substrato amilopectina.

5.8. - Por eletroforese, a enzima purificada, em gel de poliacrilamida contendo substrato amilopectina indicou a presença de uma única banda de atividade amilolítica.

5.9. - A pululanase apresenta peso molecular 96.600, determinado através de filtração em gel Sephadex G-200.

5.10. - Na sacarificação de solução de amido de mandioca lioquefeito, contendo 33% de amido em peso seco, utilizando-se amiloglicosidase e pululanase, foi obtido rendimento máximo de 97,49% de glicose após 48 horas de incubação a 50°C.

5.11. - Na sacarificação de solução de amido de milho lioquefeito, contendo 33% de amido em peso seco, utilizando-se amiloglicosidase e pululanase, foi obtido rendimento máximo de 96,96% de glicose após 72 horas de incubação a 50°C.

5.12. - A hidrólise de solução 1% de amido de mandioca e de milho gelatinizado, pela ação da beta-amilase, resulta em 53,13% e 53,37% de conversão para maltose respectivamente.

5.13. - A hidrólise de solução 1% de amido de mandioca e de milho gelatinizado, pela ação simultânea de pululanase e beta-amilase, resulta em 80,79% e 79,28% de conversão para maltose respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS :

1. ABDULLAH, M.; TAYLOR, P.M.; WHELAN, W.J. Control of glycogen metabolism. Em Giba Found Symp. Ed. WHELAN, W.J. & CAMERON, M.P. Edit J. & A. Churchill Ltd., p.123, 1964.
2. ABDULLAH, M.; LEE, E.Y.C.; WHELAN, W.J. An enzymic method for the micro determination of the average unit-chain lengths of glycogen and amylopectin. Biochem. J., 97, 10p, 1965.
3. ABDULLAH, M.; CATLEY, B.J.; LEE, E.Y.C.; ROBYT, J.; WALLENFELS, K.; WHELAN, W.J. The mechanism of carbohydrase action. II. Pullulanase, an enzyme specific for the hydrolysis of Alpha-1->6 bonds in amylaceous oligo and polysaccharides. Cereal Chem., 43:111-118, 1966.
4. ABDULLAH, M.; CATLEY, B.J.; CUTHBERTSON, W.F.J.; WHELAN, W.J. Heat stability of Pullulanase. Biochem. J., 100, 8p, 1966.
5. -----; -----. Reversible action of pullulanase Nature. Lond, 210:200, 1966.
6. ABDULLAH, M.; FRENCH, D. Substrate specificity of pullulanase. Arch. Biochem. Biophys., 137:483-493, 1970.

7. ADAMS, M. Amylases: their kinds and properties and factors which influence activity. Food Technol., 35-38, 1953.
8. ADAMS, K.R.; PRIEST, F.G. Extracellular pullulanase synthesis in *Bacillus macerans*. FEMS Microbiol. Lett., 1:269-273, 1977.
9. AKAI, H.; YOKOBAYASHI, K.; MISAKI, A.; HARADA, T. Complete hydrolysis of branching linkages in glycogen by *Pseudomonas* isoamylase: distribution of linear chains. Biochim. Biophys. Acta, 237, 422-428, 1971.
10. -----; -----; -----; ----- . Structural analysis of amilopectin using *Pseudomonas* isoamylase Biochim. Biophys. Acta, 252:427-431, 1971.
11. ALLEN, W.G.; DAWSON, H.G. Technology and uses of debranching enzymes. Food Technol., 70-80, 1975.
12. AMEMURA, A.; KITAGAWA, H.; HARADA, T. Role of the tryptophan group in the action of pullulanase of *Aerobacter aerogenes*. J. Biochem., 77:575-578, 1975.
13. AMEMURA, A.; KONISHI, Y.; HARADA, T. Molecular weight of undegraded polypeptide chain of *Pseudomonas amyloclavata* isoamylase. Biochim. Biophys. Acta, 611:390-393, 1980.

14. ANDREWS, P. The gel filtration behaviour of protein related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J., 96:595-605, 1965.
15. ATKINS, D.P.; KENNEY, J.F. The influence of pullulanase and Alfa-Amylase upon the oligosaccharide product spectra of wheat starch hydrolysates. Starch/Stärke, 4:126-131, 1985.
16. ATWELL, W.A.; HOSENEY, R.C.; LINEBACK, D.R. Debranching of wheat amylopectin. Cereal Chem., 57(1):12-16, 1980.
17. AUNSTRUP, K. Production, isolation and economics of extracellular enzymes. In: Applied Biochemistry and Bioengineering, Academic Press, 57-69, 1972.
18. BABA, T.; ARAI, Y. Structural Characterization of amylopectin and intermediate material in amylo maize starch granules. Agric. Biol. Chem., 48(7):1763-1775, 1984.
19. BARFOED, H.C. Enzymes in starch processing. Cereal Foods World, 21(11):588-604, 1976.
20. BATHGATE, G.N.; MANNERS, D.J. The specificity of yeast alfa-(1,6) glucosidase. Biochem. J., 107:443-445, 1968.

21. BENDER, H.; WALLENFELS, K. Untersuchungen an pullulan.
Biochem. Z., 334:79-95, 1961.
22. -----; -----, Pullulanase an amylopectin
glycogen debranching enzyme from *Aerobacter aerogenes*.
Methods Enzymol., 8:555-559, 1966.
23. BENDER, H. Pullulanase von *Aerobacter aerogenes*.
Arch. Microbiol., 71:331-352, 1970.
24. BROWN, D.H.; ILLINGWORTH, B.; KORNFIELD, R. Transfer of
glucosyl units to oligosaccharides and polysaccharides by
the action of uridine diphospho glucose alfa-glucan
transglucosylase. Biochemistry, 4(3):486-495, 1965.
25. BUCKE, G. Recent developments in production and use of
glucose and fructose. In: Developments in Sweeteners-1,
Ed. C.A.M. Hough, K.J. Parker & A.J. Viltos. Applied
Science Publishers Ltd. London, 43-68, 1979.
26. CADMUS, M.G.; JAYKO, L.G.; HENSLEY, D.E.; GASDORF, H.;
SMILEY, K.L. Enzymatic production of glucose syrup from
grains and its use in fermentations. Cereal Chem.,
43:658-669, 1966.
27. CARPENTER, K.P.; COWAN, S.T.; LAPAGE, S.P.; LAUTROP, H.; LE
MINOR, L.; ORKOV, F.; ORSKOV, I.; ROHDE, R.; SAKAZAKI, R.:

- SEDLAK, J.; TAYLOR, J.; THAL, E.; FLOYD, T.M.; MOLLARET, H.H.; MAKELA, P.H.; SEELIGER, H.; LACHOWICZ, K.; RAUSS, K.; VAN OYE, E. Request to the judicial comission that *Aerobacter* Beijerinck 1900 and *Aerobacter* Hormaeche and Edwards 1958 be declared rejected generic names. Int. J. Syst. Bacteriol., 20:221-224, 1970.
28. CATLEY, B.J.; ROBYT, J.F.; WHELAN, W.J. A minor structural feature of pullulan. Biochem. J., 100, 5p, 1966.
29. CATLEY, B.J.; WHELAN, W.J. Observations on the structure of pullulan. Arch. Biochem. Biophys., 143:138-142, 1971.
30. CHANGE, B., MAEHLY, A.C. Assay of Catalases and Peroxidases. In: Methods Enzymol. 2:764-768, 1955.
31. CHHETHAM, P.S.J. The application of enzymes in industry. In: Handbook of enzyme biotechnology. 2a. ed. Alan Wiseman. Ellis Horwood Ltd., Halsted Press-John Wiley & Sons, 275-379, 1985.
32. CHIANG, J.P.; ALTER, J.E.; STERNBERG, M. Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. Starch/Stärke, 31(3):86-92, 1972.

33. CROXALL, W.J. Process for removing transglucosidase from amyloglucosidase. U.S. Patent Office 3,254,003, 1966.
34. CRUZ, R.; PARK, Y.K. Production of fungal alfa-galactosidase and its application to the hydrolysis of galactooligosaccharides in soybean milk. J. of Food Sci., 47:1973-1975, 1982.
35. DAVIS, B.J. Disc. eletrophoresis. 2 - Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. USA, 121:404-427, 1964.
36. DESSEIN, A.; SCHWARTS, M. Is there a pullulanase in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem., 45:363-366, 1974.
37. DIXON, M.; WEBB, E.C. Enzymes. Logman Group Ltd., London, 54-166, 1971.
38. DRUMMOND, G.S.; SMITH, E.E.; WHELAN, W.J. Mechanism of action of pullulanase, FEBS Lett., 5(1):85-88, 1969.
39. -----; -----; -----. On the specificity of starch debranching enzymes. FEBS Lett., 9(3):136-140, 1970.

40. EISELE, B.; RASCHED, I.R.; WALLENFELS, K. Molecular characterization of pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. Eur. J. Biochem., 26:62-67, 1972.
41. ENEVOLDSEN, B.S.; BATHGATE, G.N. Structural analysis of wort dextrin by means of beta-amylase and the debranching enzyme, pullulanase. J. Inst. Brew., 75:433-443, 1969.
42. ENEVOLDSEN, B.S. Dextrin in brewing. Proc. European Brewery Convention: 12th Cong. Inter Calsen, 205-223, 1969.
43. -----, Application of the debranching enzyme, pullulanase in brewing from unmalted cereals. I Conditions of mashing and carbohydrate composition of the wort. J. Inst. Brew., 80:520-533, 1974.
44. ENEVOLDSEN, B.S.; SCHMIDT, F. Dextrin in brewing. Studies on the Singly-Branched and Multiply-Branched Dextrin in Brewing. J. Inst. Brew., 80:520-533, 1974.
45. ENEVOLDSEN, B.S. Debranching enzymes in brewing. Proc. European Brewery Convention: 15th Cong., 684-697, 1975.
46. FRENCH, D. beta-Amylases. In: The Enzymes. Boyer, P.D., Lardy, H. & Myrback, K. 2a. ed., Academic Press, London, N.Y. & London, 4A:345-368, 1960.

47. FRENCH, D.; ABDULLAH, M. Specificity of pullulanase.
Biochem. J., 100, 6p, 1966.
48. FUJIO, Y.; SHIOSAKA, M.; UEDA, S. Isoamylase production by
Aerobacter aerogenes. I - Effect of nitrogen source.
J. Ferment. Technol., 48(1):8-13, 1970.
49. FUJIO, Y.; SAMBUICHI, M.; UEDA, S. Isoamylase production by
Aerobacter aerogenes. II - Some quantitative results
by batch culture. J. Ferment. Technol., 48(10):601-606,
1970.
50. FULLBROOK, P.D. Malt and maltose syrups. In: Nutritive
sweeteners. G.G. Birch and K.J. Parker. Applied Science
Publishers, 49-81, 1982.
51. GERGHMANS, E.; NORMAN, B.E. Augmentation de l'efficience de
la conversion enzymatique de l'amidon par l'emploi d'une
nouvelle enzyme debranchante - Utilisation des enzymes en
technologie alimentaire. Symposium International
Versailles, 89-99, 1982.
52. GHIASI, K.; HOSENEY, R.C.; LINEBACK, D.R. Characterization
of soluble starch from bread crumb. Cereal Chem.,
56(5):485-490, 1979.

53. GRIFFIN, P.J.; FOGARTY, W.M. Preliminary observations on the starch degrading system elaborated by *Bacillus polymyxa*. Biochem. Soc. Trans., 1(2):397-400, 1973.

54. -----; -----, Further studies on the amylolytic system elaborated by *Bacillus polymyxa*, Biochem. Soc. Trans., 1(5):1097-1100, 1973.

55. HARADA, T.; YOKOBAYASHI, K; MISAKI, A. Formations of Isoamylase by *Pseudomonas*. Appl. Microbiol., 16(10):1439-1444, 1968.

56. HARADA, T.; MISAKI, A.; AKAI, H.; YOKOBAYASHI, K.; SUGIMOTO, K. Characterization of *Pseudomonas* Isoamylase by its actions on amylopectin and glycogen: Comparison with *Aerobacter pullulanase*. Biochem. Biophys. Acta, 268, 497-505, 1972.

57. HEYNS, K.; LANGLOIS, D.P.; BAKER, B.P.; BUCHMAN, J.L; CHATL, E.M.; LINDBERG, B.; MAYBEE, G.R.; SHUKLA, J.P. Report of the Proceedings of the Twelfth Session of the International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis, Washington D.C., U.S.A., 108-109, 1958.

58. HEHRE, E.J.; OKADA, G.; GENGHOF, D.S. Configuration specificity: unappreciated key to understanding enzymic

- reversions and de novo glycosidic bond synthesis. Arch. Biochem. Biophys., 135:75-80, 1969.
59. HIZUKURI, S.; TAKEDA, Y.; YASUDA, M. Multi-branched nature of amylose and action of debranching enzymes. Carbohydr. Res., 94:205-213, 1981.
60. HMSO. E.U.A. Report on the review of enzyme preparations by food additives and contaminants committee of MAFF, Ministry of Agriculture Fisheries and Food, 1982.
61. HOBSON, P.N.; WHELAN, W.J.; PEAT, S. The enzymic synthesis and degradation of starch. Parth XIV - R-Enzyme. J. Chem. Soc. Part II, 1451-1459, 1951.
62. HODGE, J.E.; RENDLEMAN, J.A.; NELSON, E.C. Useful properties of maltose. Cereal Sci. Today, 17:180-188, 1972.
63. HOPE, G.C.; DEAN, A.C.R. Pullulanase synthesis in *Klebsiella* (Aerobacter) aerogenes strains growing in continuous culture. Biochem. J., 144:403-411, 1974.
64. HULLINGER, C.H.; VAN PATTEN, E.; FRECK, J.A. Food applications of high amylose starches. Food Technol., 27(3):22-24, 1973.

65. HURST, T.L. Process for producing dextrose. United States Patent 3, 897, 305. 1975.

66. HYUM, H.H.; ZEIKUS, J.G. General biochemical characterization of thermostable pullulanase and glucoamylase from *Clostridium thermohydrosulfurium*. Appl. Environ. Microbiol., 49(5):1168-1173, 1985.

67. ISHIZAKI, Y.; TANIGUCHI, H.; MARUYAMA, Y.; NAKAMURA, M. Debranching enzymes of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). I - Purification and some properties of potato isoamylase. Agric. Biol. Chem., 47(4):771-779, 1983.

68. IWAKI, K; FUWA, H. Purification and some properties of debranching enzyme of germination rice endosperm. Agric. Biol. Chem., 45(12):2683-2688, 1981.

69. JEANNINGROS, R.; CREUZET, N.; FRIXON, C.; CATTANEO, J. A debranching enzyme in *Escherichia coli*. Biochem. Soc. Trans., 3:336-337, 1975.

70. -----; -----; -----; -----, Purification and properties of a debranching enzyme from *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta, 438, 186-199, 1976.

71. KAINUMA, K.; WAKO, K.; KOBAYASHI, S.; NOGAME, A.; SUZUKI, S.
Purification and some properties of a novel maltohexaose
producing *exo*-amylase from *Aerobacter aerogenes*.
Biochim. Biophys. Acta , 410, 333-345, 1975.
72. KAINUMA, K.; KOBAYASHI, S.; HARADA, T. Action of
Pseudomonas isoamylase on various branched oligo and
polysaccharides. Carbohydr. Res., 61:345-357, 1978.
73. KERR, R.W.; CLEVELAND, F.C.; KATZBECK, W.J. The action of
amyl α -glucosidase on amylose and amylopectin. J. Am.
Chem. Soc. 73:3916-3921, 1951.
74. KIMURA, T.; HORIKOSHI, K. Production of amylase and
pullulanase by an alkalopsychrotrophic *Micrococcus* sp.
Agric. Biol. Chem., 53(11):2963-2968, 1989.
75. KITAGAWA, H.; AMEMURA, A.; HARADA, T. Studies on the
inhibition and molecular properties of crystalline
Pseudomonas isoamylase. Agric. Biol. Chem., 39(5):989-
994, 1975.
76. KOBAYASHI, T. Studies on isoamylase. Part VIII On the
determination of isoamylase activity. Bull. Agr. Chem.
Soc., 19(3):163-166, 1955.

77. KONISHI, Y.; AMEMURA, A.; TANABE, S.; HARADA, T.
Immunological study of pullulanase from *Klebsiella*
strains and the occurrence of this enzyme in the
Enterobacteriaceae. Internat. J. System. Bacteriol.,
29(1):13-18, 1979.
78. KOOI, E.R.; ARMBRUSTER, F.C. Production and use of
dextrose. In: Starch, chemistry and technology II-
Industrial aspects, Academic Press, N.Y., 553-568, 1967.
79. KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. Bergey's manual of systematic
bacteriology. Williams & Williams, Baltimore, U.S.A., 1a.
Ed. 1:408-465, 1984.
80. KURIKI, T.; OKADA, S.; IMANAKA, T. New type of pullulanase
from *Bacillus stearothermophilus* and molecular
cloning and expression of the gene in *Bacillus
subtilis*. J. Bacteriol., 170(4):1554-1559, 1988.
81. KURIMOTO, M.; SUGIMOTO, K.; HIRAO, M. Process for preparing
crystalline maltose. U.S. Patent Office, 3, 677, 896.
1972.
82. LEE, E.Y.C.; MERCIER, G.; WHELAN, W.J. A method for the
fine structure of amylopectin. Arch. Biochem. Biophys.,
125:1028-1029, 1968.

83. LEE, E.Y.C.; MARSHALL, J.J.; WHELAN, W.J. The substrate specificity of amylopectin - Debranching enzymes from sweet-corn. Arch. Biochem. Biophys., 143:365-374, 1971.
84. LEE, E.Y.C.; WHELAN, W.J. Glycogen and starch debranching enzymes. In: "The Enzymes" ed. P.D. Boyer, 3rd. ed. Academic Press, N.Y., 5:191-233, 1971.
85. LINDROOS, A.; LINKO, Y.Y.; LINKO, P. Immobilized multienzyme systems for starch processing. In: Enzyme engineering. Chibata, I.; Fukui, S.; Wingard, L.R.Jr. 60. International Enzyme Engineering Conference, 6:275-277, 1981.
86. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.F.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275, 1951.
87. MAC. FADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2a. ed. Williams & Wilkins ed., Baltimore, U.S.A., 1980.
88. MAC GREGOR, A.W.; MORGAN, J.E. Structure of amylopectins isolated from large and small starch granules of normal and waxy barley. Cereal Chem., 61(3):333-228, 1984.

89. MAC WILLIAM, I.G.; HARRIS, G. The separation of limit dextrinase from R-enzyme and aspects of the activities of the separated enzymes. Arch. Biochem. Biophys., 84:442-454, 1959.
90. MANNERS, D.J.; YELLOWLESS, D. Studies on debranching enzymes. 1. The limit dextrinase activity of extracts of certain higher plants and commercial malts. J. Inst. Brew., 79:377-385, 1973.
91. MANNERS, D.J. Debranching enzymes in plant tissues. 553rd Meeting, London. Biochem. Soc. Trans., 3:49-53, 1975.
92. MARSHALL, J.J. The structure, function and metabolism of the cereal carbohydrates. Part 1 - The biosynthesis and enzymic degradation of starch. Wallerstein Commun., XXXV (116):49-98, 1972.
93. -----. Inhibition of pullulanase by schardinger dextrans, FEBS Lett., 37(2):269-273, 1973.
94. -----. Application of enzymic methods to the structural analysis of polysaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 30:257-370, 1974.
95. MARTENSSON, K. Preparation of an immobilized two-enzyme system, Beta-amylase-pullulanase, to an acrylic copolymer

for the conversion of starch to maltose. II. Cocoupling of the enzymes and use in a packed bed column. Biotech. Bioeng., XVI, 579-591, 1974.

96. MAY FRANTZ, B.; LEE, E.Y.C; WHELAN, W.J. The fractionation of pullulanase on sephadex G200. Biochem. J., 100, 7p, 1966.
97. McMULLEN, W.H.; ANDINO, R. Production of high glucose syrups. U.S. Patent, 4,017,363, 1977.
98. MERCIER, G; MAY FRANTZ, B.; WHELAN, W. An improved purification of cell bound pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. Eur. J. Biochem., 26:01-09, 1972.
99. MERCIER, G. The fine structure of corn starches of various amylose percentage: waxy, normal and amylo maize. Die Starke, 25(3):78-82, 1983.
100. MILES LABORATORIES, INC. Technical Informations - Determination of liquefying amylase (Modified Wolgemuth Method) Assay, no. 2-124.
101. ----- Technical Informations - Diastase assay procedure - Schoorl copper reduction assay. Assay no. 5-125, Revised 8-4-66.

102. MITSUHASHI, M. et alii. Process for producing high purity maltose. U.S. Patent 3, 795, 584, 1974.
103. NAKAMURA, N.; WATANABE, K.; HORIKOSHI, K. Purification and some properties of alkaline pullulanase from a strain of *Bacillus* no. 202-1, an Alkalophilic microorganism. Biochim. Biophys. Acta, 397, 188-193, 1975.
104. NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153:379-380, 1944.
105. NORMAN, J.; WOBER, G. Comparative biochemistry of - Glucan - Utilization in *Pseudomonas amyloclavata* and *Pseudomonas saccharophila*. Arch. Microbiol. 102, 253-260, 1975.
106. NORMAN, B.E. The application of polysaccharide degrading enzymes in the starch industry. Em: Microbial polysaccharides and polysaccharases. R.C.W. Berkeley, G.W. Goodway & D.C. Ellwood, Academic Press, 339-376, 1979.
107. NORMAN, B.E. New Developments in starch syrup technology. Em: Enzymes and food processing, Birch, G.G., Blackebrough, N. & Parker, K.J. Applied Science Publishers, 15-50, 1980.

108. ----- . A novel debranching enzyme for application in the glucose syrup industry - Starch/Stärke, 34(10):340-346, 1982.
109. ----- . A novel *Bacillus pullulanase*. Its properties and applications in the glucose syrups industry. J. Jpn. Soc. Starch Sci., 30(2):200-211, 1983.
110. ODIBO, F.J.G.; OBI, S.K.G. Purification and characterization of a thermostable pullulanase from *Thermoactinomyces thalophilus*. J. Ind. Microbiol., 3:343-350, 1988.
111. OHBA, R.; UEDA, S. Purification, crystallization and some properties of intracellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. Agric. Biol. Chem., 37:(12):2821-2826, 1973.
112. -----; ----- . Some properties of crystalline extra and intracellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. Agric. Biol. Chem., 39(5):967-972, 1975.
113. -----; ----- . An inductive effector in production of extracellular pullulanase by *Aerobacter aerogenes*. Agric. Biol. Chem., 10:2425-2431, 1982.
114. PALMER, T.N.; WOBBER, G.; WHELAN, W.J. The pathway of exogenous and endogenous carbohydrate utilization in

- Escherichia coli**: A dual function for the enzymes of the maltose operon. Eur. J. Biochem., 39:601-612, 1973.
115. PALMER, T.J. Glucose syrups in food and drink. Proc. Biochem., 19-20, 1975.
116. -----, Nutritive sweeteners from starch. Em: Nutritive Sweeteners. G.G. Birch & K.J. Parker. Applied Science Publishers,, 83-109, 1982.
117. PAZUR, J.H.; ANDO, T. The isolation and the mode of action of a fungal transglucosylase. Arch. Biochem. Biophys., 93:43-49, 1961.
118. PAZUR, J.H.; KLEPPE, K. The hydrolysis of alfa-D-Glucosides by amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. J. Biol. Chem., 237(4):1002-1006, 1962.
119. PAZUR, J.H.; OKADA, S. Properties of the glucoamylase from *Rhizopus delemar*. Carbohydr. Res., 371-379, 1967.
120. PAZUR, J.H.; TOMINAGA, Y.; DeBROSSE, C.W.; JACKMAN, M. The synthesis of 1,6-anhydro-beta-D glucopyranose and D-glucosyl oligosaccharides from maltose by a fungal glucosyltransferase. Carbohydr. Res., 61:279-290, 1978.

121. PEAT, S.; WHELAN, W.J.; HOBSON, P.N.; THOMAS, J.G. The enzymic synthesis and degradation of starch. Part XIX - The action of R-enzyme on glycogen. J. Chem. Soc., 4440-4445, 1954.

122. PLANT, A.K.; MORGAN, H.W.; DANIEL, R.M. A highly stable pullulanase from *Thermus aquaticus* YT-1. Enzyme Microb. Technol., 8:668-672, 1986.

123. POOL, E.L.; UNDERKOFER, L.A. Fungal saccharifying agents - Amylolytic factors of bran culture and submerged culture. Agric. Food Chem., 1(1), 87-90, 1953.

124. PRICE, J.C. Pullulanase. Starch and its derivatives 4ed. J.A. Radley, 509-527, 1968.

125. RADLEY, J.A. The manufacture of dextrose sweetening agents from starch and derived products. In: Starch Production Technology, J.A. Radley. Applied Science Publishers, 311-397, 1976.

126. RICHARD, C. Etude antigenique et biochimique de 500 souches de *Klebsiella*. Ann. Biol. Clin., 31(4):295-303, 1973.

127. ROBIN, J.P., Mercier, C., Carboniere, R., Guelbot, A. Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies

- of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starches. Cereal Chem., 51(3):389-406, 1974.
128. ROBYT, J.F.; WHELAN, W.J. The alpha amylases. In: Starch and its derivatives. ed. J.A. Radley, 4a. ed., London, Chapman & Hall, 430-476, 1968.
129. ROSENDAL, P.; NIELSON, B.H.; LANGE, N.K. Stability of bacterial alpha-amylase in the Starch Liquefaction Process. Starch/Starke, 31 (11):368-372, 1979.
130. SAHA, B.C.; ZEIKUS, J.G. Biotechnology of maltose syrup production. Proc. Biochem., 78-82, 1987.
131. SAITO, N.A. Thermophilic extracellular alpha-amylase from Bacillus licheniformis. Arch. Biochem. Biophys., 155:290-298, 1973.
132. SANDSTED, R.M.; KNEEN, E.; BLISH, M.J. A standardized Wohlgemuth procedure for alpha-amylase activity. Cereal Chem., 16:712-723, 1939.
133. Sato, H.H. Produção, purificação e estudo das propriedades da isoamilase de Flavobacterium sp. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 1979.

134. SILLS, A.M.; STEWART, G.G. Production of amylolytic enzymes by several yeast species. J. Inst. Brew., 88:313-316, 1982.
135. SLOMINSKA, L.; MACZYNSKI, M. Studies on the application of pullulanase in starch saccharification process. Starch/Starke, 37,11:386-390, 1985.
136. SLOMINSKA, L., STAROGARDZKA, G. Studies on the application of maltogenic amylase in the production of maltose containing syrup. Starch/Starke, 38,6:205-210, 1986.
137. SPENCER-MARTINS, I. Extracellular isoamylase produced by the yeast *Lipomyces konenkae*. Appl. Environ. Microbiol., 44(6):1253-1257, 1982.
138. SUGIMOTO, T; ANEMURA, A., HARADA, T. Formations of extracellular isoamylase and intracellular alpha-glucosidase and amylase(s) by *Pseudomonas* SB15 and a mutant strains. Appl. Microbiol., 28(3):336-339, 1974.
139. SUZUKI, S. Novel industrial processes for enzymic conversion of starch. Third Int. Cong. Food Science and Technology (Inst. of Food Technologists, Chicago), 484-490, 1970.

140. SUZUKI, Y.; CHISHIRO, M. Production of extracellular thermostable pullulanase by an amylolytic obligately thermophilic soil bacterium, *Bacillus stearothermophilus* KP 1064. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17, 24-29, 1983.

141. TAKASAKI, Y. Productions and utilizations of beta-amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*. Agric. Biol. Chem. 40(8):1515-1522, 1976.

142. -----, Purifications and enzymatic properties of beta-amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*. Agric. Biol. Chem. 40(8):1523-1530, 1976.

143. TAKIZAWA, N.; MUROOKA, Y. Intergeneric transfer of the pullulanase gene between *Klebsiella aerogenes* and *Escherichia coli* by in vivo genetic manipulation. Agric. Biol. Chem. 48(6):1451-1458, 1984.

144. TAMURA, T.; FUJINO, T.; MIYAJI, H.; MISAKI, A.; KOTANI, S. A Highly branched alpha-D-glucan of *Vibrio parahaemolyticus* A55 1-Its isolation and structure. Biken J. 12:231-244, 1969.

145. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.G. Detection of Sugars on Paper Chromatograms. Nature, 166:444-445, 1950.

146. UEDA, S.; NANRI, N. Production of isoamylase by *Escherichia intermedia*. Appl. Microbiol., 15(3):492-496, 1967.

147. UEDA, S.; YAGISAWA, M.; SATO, Y. Production of isoamylase by *Streptomyces* sp no. 28. J. Ferment. Technol., 49(6):552-558, 1971.

148. UEDA, S.; OHBA, R. Purification, crystallization and some properties of extracellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. Agric. Biol. Chem., 36(13):2381-2391, 1972.

149. UEDA, S.; OHDA, R. Pullulanase responsible for digesting raw starch. Die Starke, 28(1):20-22, 1976.

150. UEDA, S.; MARSHALL, J.J. On the ability of pullulanase to stimulate the enzymic digestions of raw starch. Carbohydr. Res., 84:196-199, 1980.

151. UNDERKOFER, L.A.; DENAULT, L.J.; HOU, E.F. Enzymes in the starch industry. Die Starke, 6(17):179-184, 1965.

152. URLAUB, H.; WOBER, G. Utilization of branched alpha-glucans in *Bacillus amyloliquefaciens*. Biochem. Soc. Trans., 3:1076-1078, 1975.

153. WALKER, G.J. Metabolism of the reserve polysaccharide of *Streptococcus mitis*. Biochem. J., 108:33-40, 1968.
154. WALLENFELS, K.; KEILICH, G.; BECHTLER, G.; FREUDENBERGER, D.
Untersuchungen an pullulan IV Die Klärung des
Strukturproblems mit physikalischen, chemischen und
enzymatischen method. Biochem. Z., 341:433-450, 1965.
155. WALLENFELS, K.; BENDER, H.; RACHED, J.R. Pullulanase from
Aerobacter aerogenes: Production in a cell-bound
state. Purification and Properties of the Enzyme. Biochem.
Biophys. Res. Commun., 22(3):254-161, 1966.
156. WALLENFELS, K.; RACHED, J.R. Kristallisation und
stereospezifität der pullulanase aus *Aerobacter*
aerogenes. Biochem. Z., 344:524-526, 1966.
157. WALLENFELS, K.; RACHED, J.R.; HUCHO, F. Klassifizierung der
pullulanase als exoenzym mit hilfe der gaschromatographie.
Eur. J. Biochem., 7:231-233, 1969.
158. WANKHEDE, D.B.; RHATEKE, R.S. Synergistic Digestibility of
Several Native Starches by Amyolytic Enzymes.
Starch/Starke, 34(9):309-312, 1982.

159. WILLIAMS, J.M. The chemical evidence for structure of starch. Em: Starch and its derivatives. Ed. J.A. Radley, 4a. ed., London, Chapman & Hall, 91-138, 1968.
160. WOBER, G. Pullulanase is a characteristic of many *Klebsiella* species and functions in the degradations of starch. Eur. J. Appl. Microbiol., 3:71-80, 1976.
161. WOHNER, G.; WOBER, G. Pullulanase, an enzyme of starch catabolism, is associated with the outer membrane of *Klebsiella*. Arch. Microbiol., 116:303-310, 1978.
162. WOOD, W.B.; WILSON, J.H.; BENBOW, R.M.; HOOD, L.E. Biochemistry - A problems approach. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, 144-172, 1981.
163. YAGISAWA, J.; KATO, K.; KOBA, Y.; UEDA, S. Pullulanase of *Streptomyces* no. 280. J. Ferment. Technol., 50(9):572-579, 1972.
164. YAMADA, J.; IZAWA, M. A debranching enzyme of rice seeds at milky stage. Its purification and substrates specificities. Agric. Biol. Chem., 43(1):37-44, 1979.
165. YAMADA, J.; KOJIMA, E. Action mode of rice debranching enzyme on starch like polysaccharides. Agric. Biol. Chem., 45(1):105-111, 1981.

166. YAMADA, J. Conversion of active and inactive debranching enzymes in rice seeds. Agric. Biol. Chem., 45(3):747-750, 1981.
167. -----, Purification of oat debranching enzyme and occurrence of inactive debranching enzyme in cereals. Agric. Biol. Chem., 45(4):1013-1015, 1981.
168. YOKOBAYASHI, K.; MISAKI, A.; HARADA, T. Specificity of *Pseudomonas* isoamylase. Agric. Biol. Chem., 33(4):625-627, 1969.
169. -----; -----; -----, Purification and properties of *Pseudomonas* isoamylase. Biochim. Biophys. Acta, 212, 458-469, 1970.
170. YOKOBAYASHI, K.; AKAI, A.; SUGIMOTO, T.; HIRAO, M.; SUGIMOTO, K.; HARADA, T. Comparison of the kinetic parameters of *Pseudomonas* isoamylase and *Aerobacter* pullulanase. Biochim. Biophys. Acta, 293, 197-202, 1973.