

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMA AMIOLÍTICA
DE *Candida* sp E SUA APLICAÇÃO.

Caracter

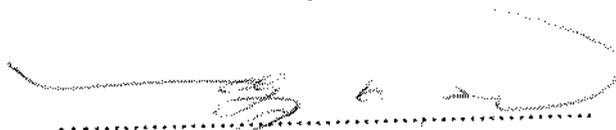
Este exemplar corresponde a versão final
da tese defendida por Edilsa Rosa da Silva
e aprovada pela Comissão Julgadora em
30.11.94.

Edilsa Rosa da Silva³⁸
Economista Doméstica

Prof. Dr. Yong Kun Park¹⁶
Orientador

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

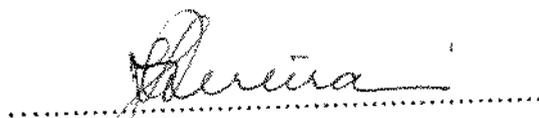
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Yong Kun Park
(Orientador)



Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
(Membro)



Prof. Dr. José Luís Pereira
(Membro)



Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(Membro)

Campinas, 30 de novembro de 1994.

PROCURO A TUA VOZ

Espírito que dás vida ao mundo,
coração que bate no profundo,
limpa as manchas da terra
e recobre-as de liberdade.

Sopra, vento
que tens a força de transformar
dentro e fora de mim este mundo
que neste momento gira ao teu redor.

Sopra, justamente aqui
entre estas casas,
nas estradas destas cidades.
Tu que nos conduzes
na direção de um ponto
que representa a direção do tempo,
o tempo da unidade.

DenRosso

Eu agradeço ao Senhor Jesus por tudo...

Dedico este trabalho a:

Mãe, Maria
Dr. Cecílio, Companheiro
Vózinha, Ternura
Dolça, Combativa
Edilson, Força
Idália, defensora

Porque o amor tudo suporta,
Porque o amor tudo desculpa, tudo crê, tudo espera.
E permanece apesar de tudo, da distância, do tempo, da saudade...
O amor jamais acaba.
São Paulo

Raion

Como agradecer-te pelo teu apoio,
tua compreensão, teu silêncio e tua espera...?

"A solidariedade e os amigos foram os tesouros encontrados ao longo deste trabalho e que me fizeram ver que nada foi em vão."

À profa. Hélia H. Salo, pela disponibilidade e ensinamentos;

À profa. Gláucia M. Pastore, pelo altíssimo astral e apoio;

Ao prof. José L. Pereira, pela colaboração e sugestões;

Ao prof. Yong K. Park, pela dedicada orientação;

À profa. Maria Cristina D. Vanelli, pelo incentivo à pesquisa e amizade;

À Eliane M. Ferrarezzo, pelo seu apoio e ensinamentos nos experimentos;

Ao Dong K. Yim, por toda ajuda na utilização de HPLC e determinação de peso molecular da enzima estudada;

Ao grupo de oração Charolaise, pelas orações e apoio;

À Aparecida Sônia e Marymar pelo apoio incondicional em todos os momentos;

À Argentina e Laurimar, por sua amizade e auxílio;

À Ila Maria, por sua disponibilidade e amizade;

Ao pessoal do microcentro da FEA, especialmente à Fátima, por sua disponibilidade e amizade;

Ao pessoal da secretaria de Ciência de Alimentos, especialmente à Cícera, Franceli e Jardetti, pelo auxílio e disponibilidade;

Ao pessoal da secretaria de pós-graduação, especialmente à Cristiane e Telma pelo auxílio e trabalho;

Ao pessoal da biblioteca da FEA, pela dedicação e trabalho;

Ao pessoal técnico do laboratório de Bioquímica de Alimentos, à Maria das Dores e Paulo, pelo apoio e colaboração;

Aos amigos Marcolino, Massaharo, Dusy, Erica, Angelita, Roseli, Marjorie, Cíntia, Gabriela, Alessandra, Luciana I e II, Contado, Patrícia e Marta, pelo carinho, colaboração e apoio;

À Edna Azuma, por seu trabalho de isolamento de microrganismos e por sua solidariedade;

Ao Cícero e Jonas, do xerox da FEA, pelo bom-humor e disposição;

À Esmeralda, pelos belíssimos desenhos e auxílio;

À CNPq, pela bolsa de estudos concedida;

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMO.....	viii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Materiais	
3.1.1. Reagentes e Materiais Específicos	23
3.1.2. Equipamentos	23
3.1.3. Enzimas	24
3.2. Métodos	
3.2.1. Produção de Enzima Amilolítica de Candida sp ATCC 90238 ...	24
3.2.2. Produção de Pululanase de Klebsiella sp N° 192.....	25
3.2.3. Determinação da Atividade de Enzimas Amilolíticas	
3.2.3.1. Determinação da Atividade de Enzima Amilolítica de Candida sp.....	25

3.2.3.2. Determinação da Atividade de Pululanase de Klebsiella sp	26
3.2.3.3. Determinação da Atividade de α -amilase de Bacillus licheniformis	26
3.2.4. Purificação da Enzima Amilolítica de Candida sp	
3.2.4.1. Fracionamento com Sulfato de Amônio	27
3.2.4.2. Cromatografia em Coluna de DEAE-Sephadex	27
3.2.4.3. Cromatografia em Coluna de CM-Celulose	27
3.2.5. Determinação Quantitativa de Proteínas	28
3.2.6. Cromatografia em Papel de Açúcares.....	28
3.2.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos Produtos da Hidrólise Enzimática	29
3.2.8. Caracterização de Enzima Amilolítica Purificada de Candida sp ATCC 90238.	
3.2.8.1. Efeito do pH na Atividade Enzimática.....	29
3.2.8.2. Efeito do pH na Estabilidade da Enzima.....	29
3.2.8.3. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática	30
3.2.8.4. Efeito da Temperatura na Estabilidade da Enzima	30
3.2.8.5. Determinação do Peso Molecular.....	30
3.2.9. Estudo do Mecanismo de Ação e Especificidade de Enzima Amilolítica de Candida sp ATCC 90238.....	32
3.2.9.1. Hidrólise de Amido de Milho Gelatinizado, Utilizando-se a Enzima Amilolítica de Candida sp	32

3.2.9.2. Hidrólise de Diversos Substratos pela Enzima Amilolítica de Candida sp.....	33
3.2.10. Produção de Glicose	
3.2.10.1. Hidrólise de Amido de Milho, Utilizando-se α -amilase de B. licheniformis	34
3.2.10.2. Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito, Utilizando-se a Enzima Amilolítica de Candida sp ATCC 90238.....	34
3.2.10.3. Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito, Utilizando-se a Enzima Amilolítica de Candida sp e Klebsiella sp	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Produção e Purificação da Enzima Amilolítica de Candida sp ATCC 90238	36
4.1.1. Produção da Enzima Amilolítica de Candida sp	36
4.1.2. Purificação da Enzima Amilolítica de Candida sp	
4.1.2.1. Fracionamento com Sulfato de Amônio	36
4.1.2.2. Cromatografia da Enzima Amilolítica de Candida sp em Coluna de DEAE-Sephadex	37
4.1.2.3. Cromatografia da Enzima Amilolítica de Candida sp em Coluna de CM-Celulose.....	37
4.2. Caracterização da Enzima Amilolítica purificada de Candida sp	
4.2.1. Efeito do pH na Atividade Enzimática.....	38
4.2.2. Efeito do pH na Estabilidade da Enzima.....	39
4.2.3. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática.....	39

4.2.4. Efeito da Temperatura na Estabilidade da Enzima	40
4.2.5. Determinação do Peso Molecular da Enzima.....	41
4.3. Estudo do Mecanismo de Ação e Especificidade de Enzima amilolítica de Candida sp ATCC 90238.....	42
4.3.1. Hidrólise de Amido de Milho Gelatinizado, Utilizando-se a Enzima Amilolítica de Candida sp	42
4.3.2. Hidrólise de Diversos Substratos, Utilizando-se a Enzima Amilolítica de Candida sp.....	43
4.4. Produção de Glicose	
4.4.1. Produção de Glicose a Partir de Amido de Milho Liquefeito, Utilizando-se a Enzima Amilolítica de Candida sp ATCC 90238	45
4.5. Produção de Xarope de Glucomaltose a Partir de Amido de Milho Utilizando-se Enzima Amilolítica de Candida sp ATCC 90238 e Pululanase de Klebsiella sp N°192.....	46
5. CONCLUSÕES.....	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Microrganismos Produtores de Amiloglicosidase	50
Tabela 2 - Purificação de Enzima Amilolítica de Candida sp ATCC 90238	51
Tabela 3 - Características de Amiloglicosidase de Diversos Microrganismos em Relação a pH Ótimo e Temperatura Ótima de Atividade	52
Tabela 4 - Estudo Sobre a Hidrólise de Vários Substratos pela Enzima Amilolítica Purificada de Candida sp ATCC 90238	53
Tabela 5 - Análise de Carboidratos Através de HPLC de Amido Liquefeito com α -amilase de B. licheniformis , pH 6,0 a 90°C	54
Tabela 6 - Análise de Carboidratos através de HPLC de Amido Liquefeito com Amiloglicosidase de Candida sp ATCC 90238e Pululanase de Klebsiella sp 192, pH 5,6 a Diferentes Temperaturas	55
Tabela 7 - Porcentagem de Açúcares Resultantes da Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito com Amiloglicosidase de Candida sp ATCC 90238	56

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Fluxograma de Produção e Purificação de Enzima Amilolítica de Candida sp ATCC 90238	58
Figura 2 - Cromatografia de Enzima amilolítica de Candida sp, em Colunade DEAE Sephadex.....	59
Figura 3 - Cromatografia de Enzima Amilolítica de Candida sp, em Coluna de CM-Celulose	60
Figura 4 - Efeito do pH na atividade de Enzima Amilolítica de Candida sp.....	61
Figura 5 - Efeito do pH na estabilidade de Enzima Amilolítica de Candida sp.....	62
Figura 6 - Efeito da Temperatura na Atividade de Enzima Amilolítica de Candida sp	63
Figura 7 - Efeito da Temperatura na Estabilidade de Enzima Amilolítica de Candida sp.....	64
Figura 8 - Determinação do Peso Molecular de Amiloglicosidase de Candida sp ATCC 90238 Através de Eletroforese em Gel de SDS-PAGE	65
Figura 9 - Sacarificação de Amido Gelatinizado, Utilizando-se a Enzima Amilolítica de Candida sp e Pululanase de Klebsiella sp, em pH 5,6 a 55°C, Após 24 Horas de Incubação.....	66
Figura 10 - Hidrólise de Maltose e Maltotriose pela Enzima Amilolítica de Candida sp, em pH 5,6 a 55°C, Após 48 Horas de Incubação.....	67

Figura 11 - Cromatogramas Ilustrando os Açúcares Produzidos Após a Hidrólise de Vários Substratos pela Enzima Amilolítica de Candida sp	68
Figura 12 - Representação Esquemática da Ação de Enzimas Amilolíticas α -amilase , Amiloglicosidase e Enzimas Desramificantes sobre Amilopectina	69
Figura 13 - Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito com Enzima Amilolítica de Candida sp e Combinação de Enzima Amilolítica de Candida sp e Pululanase de Klebsiella sp, em pH 5,6 a 55°C, após 72 horas de Incubação	70
Figura 14 - Cromatogramas Ilustrando o Perfil de Carboidratos Produzidos pela Liquefação de Amido de Milho com α -amilase de B. licheniformis	71
Figura 15 - Cromatogramas Ilustrando o Perfil de carboidratos Produzidos Após a Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito, com a Enzima Amilolítica de Candida sp e Pululanase de Klebsiella sp, a 50°C.....	72
Figura 16 - Cromatogramas Ilustrando o Perfil de Carboidratos Produzidos Após a Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito, com a Enzima Amilolítica de Candida sp e Pululanase de Klebsiella sp a 55°C.....	73
Figura 17 - Cromatogramas Ilustrando o Perfil de Carboidratos Produzidos Após a Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito, com a Enzima Amilolítica de Candida sp e Pululanase de Klebsiella sp, a 60°C.....	74

RESUMO

A enzima amilolítica produzida por uma nova linhagem de levedura, classificada como **Candida** sp ATCC 90238, foi purificada e caracterizada. Este trabalho visou o aproveitamento de amido de milho para a produção de xarope de glicose e maltose. Estudou-se a sacarificação de amido, com a preparação bruta da enzima amilolítica de **Candida** sp, onde foi verificado a produção principalmente de glicose e maltose a temperaturas mais elevadas. A enzima foi purificada por fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex e CM-Celulose. A eletroforese da enzima purificada em gel de SDS-PAGE revelou uma única banda de proteína. O peso molecular foi estimado como 120.000 daltons. A enzima purificada foi caracterizada. Verificou-se que a enzima hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 de amido, o que tornou possível concluir que esta enzima é uma amiloglicosidase (E.C. 3.2.1.3., α -1,4 glucano glucanohidrolase), que entretanto, apresenta características diferentes da amiloglicosidase de **Aspergillus niger** e **Rhizopus** sp quanto à hidrólise da ligação glicosídica α -1,4 da maltose. A amiloglicosidase de **Candida** sp hidrolisa com menor eficiência a maltose e pode ser utilizada na produção de mistura de glicose e maltose. A enzima apresentou pH ótimo e temperatura ótima de 5,6 e 55° - 60°C respectivamente. A combinação da amiloglicosidase de **Candida** sp com a pululanase de **Klebsiella** sp, resultou no aumento significativo da eficiência da hidrólise de amido de milho, para a produção de glicose e maltose.

SUMMARY

Amylolytic enzyme was produced by a new strain of yeast which was identified as **Candida** sp ATCC 90238 was purified and investigated to its enzymatic characteristics. The enzyme was purified by ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephadex A-50 and CM-Cellulose column chromatography. The molecular weight of the purified enzyme was determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) which showed a single protein band. The molecular weight of the enzyme was calculated as 120.000. The purified enzyme hydrolyzed starch to only glucose. This is apparent that the enzyme cleaved α -1,4 and α -1,6 glycosidic linkages in the starch. This result indicated that the enzyme is an extracellular amyloglucosidase (α -1,4-glucan glucanohydrolase, E.C.3.2.1.3.). When substrate is liquefied starch which was hydrolyzed by bacterial α -amylase, the enzyme hydrolyzed the liquefied starch to glucose and maltose. The property of the enzyme was different as compared with amyloglucosidases from **Aspergillus niger** and **Rhizopus** sp. Further investigation demonstrated that the purified enzyme was not able to hydrolyze maltose efficiently. The optimum pH and the optimum temperature of the purified enzyme were 5,6 e $55^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$. Combination of the **Candida** sp amyloglucosidase and **Klebsiella** sp pullulanase efficiently hidrolyzed the liquefied corn starch, producing glucose and maltose as compared to **Candida** amyloglucosidase only.

1. INTRODUÇÃO

A produção de enzimas amilolíticas de origem microbiana tem sido amplamente investigada. Alguns microrganismos foram registrados como produtores de enzimas amilolíticas, como *Aspergillus niger* (32), *Rhizopus* sp (38, 81), *Saccharomyces diastaticus* (66), *Lipomyces kononenkoeae* (73), *Filobasidium capsuligenum* (13), *Candida antarctica* (15) e *Schwanniomyces alluvius* (86), *Endomycopsis fibuligera* e *Schwanniomyces castelli* (9).

As leveduras *Endomycopsis fibuligera* e *Schwanniomyces castelli* foram registradas como produtoras de α -amilase e amiloglicosidase.

Uma nova linhagem de levedura, com alta produtividade de enzima amilolítica, foi descoberta e estudada no laboratório de Bioquímica de Alimentos, Unicamp (52) e posteriormente enviada para o American Type of Culture Collection (ATCC), onde foi depositada e classificada como *Candida* sp ATCC 90238.

A amiloglicosidase (E.C. 3.2.1.3., glicoamilase, α -1,4-glucano glicohidrolase), produzida a partir de uma ampla variedade de microrganismos, hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 de polissacarídeos amiláceos. Esta enzima atua removendo sucessivamente unidades de glicose na β -conformação, a partir das extremidades das cadeias com final não redutor, (19, 20, 47). É uma enzima muito utilizada comercialmente, no processamento de amido, para a produção de glicose e xaropes com alta concentração de frutose, em combinação com as α -amilases (E.C. 3.2.1.1. α -1,4 glucano 4 glucanohidrolase) e glicose-isomerases (E.C. 5.3.1.5), (20, 49). Também, é utilizada na fermentação e destilação de matérias primas, para melhorar a fermentabilidade das mesmas (20). A indústria da bioconversão de amido, produz anualmente, várias toneladas de amiloglicosidase para o processamento de milhões de toneladas de produtos amiláceos, (44, 63).

A amiloglicosidase aplicada em combinação com enzimas desramificantes como a pululanase (pululana 6 glucanohidrolase, E.C. 3.2.1.41.), aumenta a velocidade de hidrólise e o rendimento da produção de glicose a partir de amido (36,65).

Os xaropes de glicose tem grande aplicação em confeitaria, panificação e na produção de geléias, conservas, bebidas carbonatadas e fermentadas (65). Entretanto, nos últimos anos tem-se destacado a produção comercial do xarope de maltose, devido às suas propriedades físico-químicas. Xaropes com alta

concentração de maltose, apresentam características muito interessantes para a indústria de alimentos, como resistência a formação de cor, reduzida higroscopicidade e cristalização, tornando-os adequados para a produção de confeitos. A alta fermentabilidade do xarope de maltose é muito apropriado para a indústria de panificação e fermentação (69).

O presente trabalho teve por objetivo a purificação e caracterização de enzima amilolítica de *Candida* sp ATCC 90238 e sua aplicação para a produção de xarope de glucomaltose.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1948, Corman e Langlykke descreveram a ação de enzimas sacarificantes fúngicas para a hidrólise de amido no processo de fermentação alcoólica. O sistema diastático de culturas filtradas de alguns fungos constituía-se de uma enzima que atuava liquefazendo o amido, denominada α -amilase e de um sistema enzimático sacarificante constituído de carboidrases. Nas preparações enzimáticas fúngicas a α -amilase convertia o amido em dextrinas com pequena produção de maltose. O sistema enzimático sacarificante, denominado glicogênico, demonstrava alta atividade de hidrólise sobre maltose e polímeros complexos de glicose. As preparações enzimáticas de **Aspergillus niger** NRRL 330 com alta atividade glicogênica, hidrolisavam o amido rapidamente a glicose.

Phillips e Caldwell, em 1951 relataram algumas propriedades de glicoamilase purificada de **Rhizopus delemar**. Esta enzima apresentou alta atividade de maltase. Os autores verificaram que a inativação ou remoção da atividade de maltase resultava na redução da atividade de glicoamilase. A glicoamilase utilizada em combinação com α -amilase demonstrou menor sensibilidade à atividade de íons hidrogênio em solução aquosa, à temperaturas de 5° a 10°C. Íons cálcio aumentavam a inativação da glicoamilase quando submetidas a temperaturas desfavoráveis à ação enzimática. A enzima demonstrou atividade ótima em pH 4,5 e 40°C.

Posteriormente, os autores (58) verificaram a ação da glicoamilase de **Rhizopus delemar** sobre diferentes substratos. As preparações de glicoamilase produziram aproximadamente 96% de glicose, a partir de frações lineares e ramificadas de amido; 92% de glicose a partir de glicogênio; 89% de glicose de β -dextrinas e 100% de glicose do substrato maltose. A glicoamilase hidrolisou as ligações glicosídicas a partir de final não redutor dos substratos de modo semelhante a hidrólise efetuada pela β -amilase para a produção de maltose. Os autores concluíram que a glicoamilase não alcançava 100% de hidrólise sobre substratos ramificados, sugerindo que algumas ligações glicosídicas α -1,6 não podiam ser hidrolisadas pela enzima.

Em 1951, Kerr et al. estudaram a enzima amiloglicosidase produzida por *Aspergillus niger* e verificaram que a sua atuação sobre a amilose e a amilopectina, resultava na liberação de unidades de glicose.

Barker et al., em 1957 relataram o estudo da especificidade e mecanismo de ação de amiloglicosidase purificada de *Aspergillus niger*, sobre diversos substratos. O mecanismo de ação sugerido para a enzima foi a degradação simultânea de todas as cadeias do substrato, a partir de um final não redutor, obtido pela análise realizada em cromatografia em papel, da conversão de maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentaose pela amiloglicosidase. Quanto a especificidade da enzima, os autores concluíram que a maltose, a maltotriose, a maltotetraose, a maltopentaose, a amilose e o malobionato de cálcio foram os melhores substratos, hidrolisados de um modo rápido e eficiente. Enquanto que a sacarose, rafinose, isomaltotetraose e panose foram atacados pela enzima muito vagarosamente. Os substratos não hidrolisados pela enzima foram a glicose, metil α -D-glicopiranosídeo, α -trealose, isomaltose, dextrana, α e β dextrinas de Schardinger, celobiose, melibiose, melezitose, maltulose e lactose.

Ao estudar a hidrólise de oligossacarídeos com ligações glicosídicas α -D-(1 \rightarrow 4) e α -D-(1 \rightarrow 6) pela amiloglicosidase de *Aspergillus niger*, Pazar e Ando, em 1960 concluíram que a enzima foi capaz de hidrolisar as ligações glicosídicas α -D-(1 \rightarrow 4) e α -D-(1 \rightarrow 6) de vários oligossacarídeos glicosídicos. A estrutura mínima necessária no substrato para a amiloglicosidase atuar foi a presença de uma unidade glicosídica ligada através de uma ligação α -D-(1 \rightarrow 4) ou α -D-(1 \rightarrow 6) à uma molécula de glicose. Os autores observaram que a hidrólise do substrato pela amiloglicosidase ocorria a partir do final não redutor e de um modo mais rápido se a unidade terminal estivesse ligada pela ligação glicosídica α -D-(1 \rightarrow 4), ao invés de uma ligação glicosídica α -D-(1 \rightarrow 6).

Em 1962, Fleetwood e Weigel estudaram o modo de ação da amiloglicosidase sobre o substrato maltose e concluíram que a clivagem da maltose ocorria pela ruptura da ligação entre o carbono anomérico e o oxigênio glicosídico.

Lenney e Shively, 1962, relataram um processo de conversão enzimática de amido para glicose. Primeiramente, o substrato amiláceo foi submetido a

uma liquefação com α -amilase termoestável. Em seguida, os produtos resultantes desta primeira etapa eram convertidos quase que completamente a glicose, pela utilização de um complexo enzimático obtido a partir de várias espécies do gênero **Rhizopus**.

Em 1962, Pazur e Kleppe, observaram que a amiloglicosidase purificada de **A. niger**, hidrolisava as ligações glicosídicas α -1,4 e também em menor velocidade as ligações glicosídicas α -1,6 e α -1,3.

Lineback et al., 1966, investigaram a produção de amiloglicosidase (α -1,4 glucano glicohidrolase, E.C.3.2.1.3.) por **A. niger**, em função da composição do meio de cultura. Os autores relataram que os níveis de amiloglicosidase, α -amilase (α -1,4 glucano glucohidrolase) e glicosiltransferase produzidos por **A. niger**, foram influenciados pelo tipo e concentração da fonte de nitrogênio, carboidratos, traços de elementos e pH do meio. Condições ótimas para a produção de amiloglicosidase, com o mínimo de contaminação de α -amilase e glicosiltransferase foram estabelecidas devido a produção de amiloglicosidase por **A. niger** apresentar maior sensibilidade com relação a composição do meio de cultura. O cultivo de **A. niger** em caldo nutriente constituído de 5% ou 2,5% de carboidrato contendo traços de elementos como ferro, cobre, zinco, molibdênio e magnésio, resultou na produção de níveis significantes de amiloglicosidase. O extrato de levedura utilizado sob as mesmas condições, também resultou na produção de níveis significantes de amiloglicosidase. As fontes de nitrogênio orgânico foram superiores às fontes inorgânicas para a produção de amiloglicosidase. A ausência de traços de elementos resultaram na redução da produção de amiloglicosidase, enquanto que a α -amilase e a glicosiltransferase não foram afetadas por esta variável. Os autores observaram que a presença de α -amilase no meio de cultura era dependente de pH e que o nível da enzima foi reduzido quando o pH foi ajustado de 5,5 para 4,0, e esta mudança no pH não influenciava a produção de amiloglicosidase.

Em 1966, Abdullah e French, observaram que a pululanase (pululana 6 glucanohidrolase, E.C.3.2.1.41) extracelular de **Aerobacter aerogenes** foi específica para a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,6 em polissacarídeos amiláceos ramificados. Os autores constataram que a pululanase não hidrolisava isomaltose e que havia um requerimento para ligações α -1,4 no substrato. A pululanase atuava sobre ligações α -1,6 somente quando estas

ligações uniam maltossacarídeos; com isso o substrato mínimo para a atividade era o tetrassacarídeo 6²- α -maltosilmaltose,(38).

Abdullah e French, 1966, relataram que a ação de pululanase foi reversível através de reações de condensação. Os autores observaram a formação, principalmente, de 6²- α -maltosilmaltose e 6¹- α -maltosilmaltose a partir de solução de 25% maltose.

Pazur e Okada, 1967, detectaram que a reação de síntese de oligossacarídeos a partir da glicose, catalisada pela amiloglicosidase de **Rhizopus delemar** era aproximadamente duas vezes superior a atividade de síntese da amiloglicosidase de **A. niger**.

Em 1968, Van Lanen e Smith, descreveram um processo de produção de um sistema enzimático com elevada atividade de amiloglicosidase, pelo cultivo de uma linhagem de **A. niger**, sob condições aérobicas, em um meio concentrado de amido.

Em 1969, Hehre et al., ao pesquisarem as reações de síntese e reversão de ligações glicosídicas concluíram que a amiloglicosidase cristalina de **Rhizopus niveus**, catalisava com velocidade maior a síntese de maltose, enquanto que a síntese de isomaltose era realizada com menor velocidade a partir da D-glicose na fase inicial da reação. Entretanto, a isomaltose era predominante após 24 horas de reação.

Em 1970, Lineback e Baumann, verificaram que a amiloglicosidase extracelular de **Aspergillus phoenicis** Staly 155, purificada pela cromatografia de troca iônica, em colunas de DEAE-Celulose, consistia de duas formas. Os autores relataram que uma das formas altamente purificada, apresentou um peso molecular de 63.600 daltons e as condições ótimas para a hidrólise do amido foram de 60°C e pH 4,6.

Park e Papini, 1970, estudaram a produção de xarope de glicose a partir do amido de mandioca pelo método enzima-enzima, utilizando a amiloglicosidase produzida por **A. niger** NRRL 3122 e **Aspergillus awamori** NRRL 3112. Estas linhagens apresentaram alta produtividade de amiloglicosidase e pequena produção de transglicosidase. Os autores relataram estudos sobre a variação da concentração da α -amilase termoestável na liquefação do amido, e a concentração da amiloglicosidase na sacarificação.

Um mínimo de 1500 unidades SKB de α -amilase bacteriana foi necessário para a liquefação do amido de mandioca a 30%. Foi obtido melhor desempenho no processo de sacarificação com a adição de 70 unidades (AU) de amiloglicosidase por 500 gramas ou mais de amido e incubação a 60°C, por 72 horas.

A ação da pululanase de *Aerobacter aerogenes* sobre alguns oligossacarídeos foi estudada por Abdullah e French, 1970. Os autores observaram que a enzima hidrolisava as ligações glicosídicas α -1,6 de oligossacarídeos contendo no mínimo 2 unidades de glicose em cada cadeia. Oligossacarídeos e dextrinas produzidos pela hidrólise do amido, contendo duas ou mais ligações glicosídicas α 1,6 foram também hidrolisados. Quando submetida a condições com alta concentração de maltose (5% a 25% de maltose), as preparações de pululanase exibiram reação de condensação.

Marshall e Whelan, 1970, observaram a conversão incompleta do glicogênio e amido em glicose pela amiloglicosidase cristalina de *A. niger* e *R. niveus*. Os autores verificaram que a preparação de amiloglicosidase de *A. niger* quando contaminada com α -amilase, apresentava melhores resultados para a conversão do amido em glicose, em comparação com a amiloglicosidase purificada. E concluíram que provavelmente existem ligações ou modificações químicas, presentes na molécula do amido e glicogênio que impossibilitam a atuação da amiloglicosidase, mas não dificultam a atuação da α -amilase.

Enevoldsen, 1971, ressaltou a aplicação de enzimas desramificantes como a pululanase, na fabricação de cerveja de cereais não maltados. O autor observou que a utilização de preparações de pululanase sobre cereais não maltados, resultava na formação de pequena quantidade de glicose e aumento na quantidade de maltose e maltotriose.

Pazur et al., em 1971 estudaram as propriedades e estrutura de duas formas de amiloglicosidase de *A. niger*, designadas I e II. Os autores verificaram que o peso molecular da amiloglicosidase I foi 99.000 daltons e da amiloglicosidase II foi 112.000 daltons. Ambas as formas estavam ligadas covalentemente a oligossacarídeos (contendo resíduos D-manose, D-glicose e D-galactose) e foram denominadas glicoenzimas. Foi constatado inicialmente, que a ligação glicosídica entre a proteína e o carboidrato da glicoenzima ocorria com o grupo hidroxila dos resíduos de L-serina e L-treonina .

Posteriormente, ligações glicosilaminas com resíduos de L-asparagina e L-glutamina foram observados. As amiloglicosidases I e II apresentaram a mesma composição e sequência de aminoácidos, contudo, as duas glicoenzimas diferiram quanto ao conteúdo quantitativo de carboidratos presentes na molécula.

A caracterização e purificação de duas formas de amiloglicosidase denominadas I e II de *A. niger* através de cromatografia em coluna de DEAE-celulose foi realizada por Lineback e Aira em 1972. A amiloglicosidase I apresentava 13% de carboidrato em sua estrutura e peso molecular de 74.900 daltons. A amiloglicosidase II apresentava 18% de carboidrato e peso molecular de 54.300 daltons. Os autores verificaram que as moléculas de carboidrato em ambas glicoproteínas eram ligadas através da manose com os grupos hidroxilas dos aminoácidos serina e treonina na cadeia polipeptídica. Estudos biossintéticos indicaram o envolvimento de uma via nucleotídeo-hexose para a incorporação de resíduos de carboidrato na amiloglicosidase I e II (64). Embora as duas formas de amiloglicosidase tivessem pesos moleculares diferentes, ambas apresentaram a mesma quantidade de carboidratos (aproximadamente 60 resíduos de hexose), indicando que diferiam quanto a composição de aminoácidos.

Em 1972, Park e Lima, estudaram a produção de amiloglicosidase fúngica por fermentação submersa. *A. awamori* NRRL 3112 produziu maior quantidade de amiloglicosidase e menor quantidade de α -amilase e transglicosidase. A amiloglicosidase preparada pela cromatografia em coluna de DEAE-Celulose apresentou duas frações.

Marshall, 1972, publicou que a amiloglicosidase (α -1,4 - glucosidase, E.C.3.2.1.2), era produzida principalmente, por fungos do gênero de *Aspergillus* e *Rhizopus* (47), e que não havia relatos da ocorrência da enzima em bactérias, plantas ou tecidos animais. Em anos posteriores foi constatado, que alguns tipos de bactérias são produtoras de amiloglicosidase. O autor relatou que a ação da amiloglicosidase não era influenciada por pontos de ramificações no amilopectina e glicogênio, no entanto, em termos práticos estes substratos ramificados, não eram completamente hidrolisados até a glicose (37), provavelmente devido a presença de ligações ou modificações químicas na molécula do substrato, que dificultavam a atuação da enzima. A enzima também hidrolisava oligossacarídeos, mas a taxa de hidrólise diminuía com o comprimento das cadeias de maltodextrinas. Preparações relativamente puras

de amiloglicosidase foram obtidas de filtrados de cultura de microrganismos. As técnicas como adsorção em argila ácida e fracionamento com o sulfato de amônio foram utilizadas frequentemente para a purificação da enzima. As principais dificuldades envolvidas no processo foram a obtenção de uma solução enzimática sem contaminação com α -amilase e transferase.

Em 1973, Watanabe e Fukimbara estudaram a amilase sacarogênica, α -D-(1 \rightarrow 4)-glucano glicohidrolase, E.C.3.2.1.3), de **Rhizopus javanicus** sp. 3-46, que ficou conhecida como uma glicoproteína contendo vinte e sete resíduos de manose e quatro resíduos de N-acetilglicosamina por mol de amilase sacarogênica. Os autores obtiveram três glicopeptídeos da enzima, denominados GP-I-a, GP-I-b e GP-II, separados através de filtração em gel de Sephadex G-50 e DEAE-Sephadex A-25. Verificou-se que a glicoproteína GP-I-a constituía-se de resíduos de asparagina, glicina, manose e N-acetilglicosamina na proporção molar de 1:1:6:2. A glicoproteína GP-I-b constituiu-se de asparagina, treonina, manose e N-acetilglicosamina na proporção molar de 1:1:9:2 e a glicoproteína GP-II consistiu-se de treonina, serina, prolina, alanina e manose na proporção molar de 6:2:2:2:12.

Ueda et al., em 1974 estudaram o sistema de amiloglicosidase de **Aspergillus awamori** var. **kawachi**, fracionado em quatro tipos de amiloglicosidase pelo uso da técnica de adsorção em amido e cromatografia em coluna de DEAE-celulose. Uma dessas frações, denominada amiloglicosidase I, apresentou alta atividade desramificante e mostrou-se ativa na degradação de amido cru. A degradação de amido solúvel pela amiloglicosidase I foi acelerada pela adição de isoamilase ou α -amilase. A fração denominada amiloglicosidase II apresentou pequena atividade desramificante e pouca atividade sobre o amido cru. A hidrólise de amido cru pela amiloglicosidase II embora pequena, apresentou-se extremamente acelerada pela adição, principalmente de isoamilase.

Tsuboi et al., em 1974 descreveram a purificação e a caracterização de duas formas (isoenzimas) de amiloglicosidase de **Mucor rouxianus**, separadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida ou pela cromatografia em coluna de SP-Sephadex C-50 e denominadas amiloglicosidase I e amiloglicosidase II. Os autores caracterizaram as enzimas quanto a coeficiente de sedimentação e peso molecular que foi 4,39 S e 59.000 daltons para a amiloglicosidase I e 4,29 S e 49.000 daltons para a amiloglicosidase II, respectivamente.

Em 1975, Ohba e Ueda, pesquisaram algumas propriedades de pululanases extra e intracelulares, de *Aerobacter aerogenes* N° 105, isoladas pelos autores, verificando que a composição de aminoácidos destas enzimas eram semelhantes e que ambas apresentavam três diferentes pontos isoéletricos. Também foi verificado, que a pululanase rompia as ligações glicosídicas α -1,6 da pululana ao acaso, atuando como uma endoenzima.

Allen e Dawson, 1975, registraram as características das enzimas desramificantes pululanase e isoamilase, e a utilização das mesmas na produção de maltose e amilose. Os autores também recomendaram a aplicação da maltose em geléias e sorvetes e da amilose na produção de filmes biodegradáveis.

Enevoldsen, 1975, ressaltou as possibilidades da aplicação das enzimas desramificantes pululanase e isoamilase, em cervejarias, conjuntamente com α e β -amilases para o aumento de açúcares fermentecíveis.

Hayashida, em 1975 estudou a produção seletiva de três tipos de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* variedade **kawachi**, submetido a diferentes condições em culturas submersas com o pH controlado na faixa de 6,5 a 7,0. A amiloglicosidase do tipo I que hidrolisava o amido cru (não gelatinizado) foi produzida através do cultivo do microrganismo em meio, contendo citrato de amônio como fonte de nitrogênio, deficiente em zinco e com um mínimo de fosfato, por um período de 30 horas a 35°C. A amiloglicosidase tipo I' que não degradava o amido cru e mostrava a mesma curva de hidrólise para amido gelatinizado que a amiloglicosidase I, foi produzida através do cultivo do microrganismo em meio constituído de acetato de amônio como fonte de nitrogênio e com o mínimo de zinco, por 50 horas a 30°C. A amiloglicosidase do Tipo II que não degradava o amido cru e foi menos eficiente para hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,6 de amido gelatinizado, foi produzida através do cultivo do microrganismo em um meio contendo glicose, peptona de caseína e quantidade suficiente de elementos inorgânicos, especialmente cálcio e zinco, por 96 horas a 25°C. O autor concluiu que especialmente a composição do meio de cultura influenciava a quantidade relativa de α -amilase e amiloglicosidase produzidas e também influenciavam os tipos de amiloglicosidase produzida pelo microrganismo.

Um sistema de amiloglicosidase de **Rhizopus** sp foi fracionado em dois tipos de amiloglicosidase através da técnica de adsorção em amido cru, cromatografia de troca iônica e fracionamento com sulfato de amônio. Ueda e Kano, em 1975 verificaram que, os dois tipos de amiloglicosidasas, apesar de apresentarem o mesmo comportamento cromatográfico na coluna de DEAE-celulose ou na coluna de CM-celulose, mostraram diferenças significantes na atividade de hidrólise do amido cru (não gelatinizado), na atividade desramificante e na adsorção das enzimas no amido cru. Nos experimentos preliminares foi constatado que a amiloglicosidase I e II de **Rhizopus** sp, apresentavam o mesmo pH ótimo e temperatura ótima de 5,0 e 40°C, respectivamente, quando o amido gelatinizado foi usado como substrato. Estes fatos sugeriram que poucas diferenças existiam entre as duas amilases em relação a estrutura química e física da molécula e estas diferenças pareciam estar relacionadas com a atividade de hidrólise do amido cru, com a atividade desramificante e com a adsorbabilidade da enzima no amido cru.

Em 1976, Hayashida et al. relataram a modificação de amiloglicosidase do tipo I, produzida por **A. awamori** var. **kawachi**, pela subtilisina. A enzima foi fracionada em duas frações obtendo-se a amiloglicosidase modificada ativa e um glicopeptídeo. Os autores verificaram que a enzima modificada apresentou uma redução no peso molecular de 90.000 para 83.000 daltons, demonstrou uma atividade específica de 77% e manteve a mesma curva de hidrólise para amido de batata gelatinizado e maltose. Entretanto, a enzima modificada não mostrou atividade de hidrólise para amidos crus e reduziu o limite de hidrólise para 80% para o glicogênio. A estabilidade de pH e temperatura da enzima modificada foi reduzida para um máximo de 9,0 e 65°C, respectivamente, em comparação com a enzima não modificada que apresentava estabilidade em pH 10,0 e 70°C.

Smith e Lineback, em 1976 estudaram a ação de amiloglicosidase I e II de **Aspergillus niger** e amiloglicosidase de **Rhizopus niveus** sobre grânulos de amido de trigo e milho, através do uso de microscopia eletrônica e pela determinação da glicose liberada pela hidrólise enzimática. Os autores observaram dois padrões de hidrólise. A amiloglicosidase I de **A. niger** e a amiloglicosidase de **R. niveus** hidrolisaram a superfície do grânulo de maneira uniforme, resultando em grandes depressões. A hidrólise realizada pela amiloglicosidase II resultou em pequenos sulcos na superfície do grânulo e algumas depressões maiores. Padrões similares de hidrólise foram observados para ambos os grânulos de amido de trigo e milho. A determinação da glicose

liberada indicou que a hidrólise pela amiloglicosidase I e pela amiloglicosidase de **R. niveus** foram quase iguais em extensão e aproximadamente duas vezes maiores que a hidrólise realizada pela amiloglicosidase II.

Em 1976, Takasaki, isolou e estudou a produção e utilização de β -amilase e pululanase de **Bacillus cereus** var. **mycooides**, que se mostraram efetivos na produção de maltose a partir do amido. O autor observou que as condições ótimas para a conversão do amido para a maltose foram pH 6,0 a 6,5 a 50°C. O rendimento máximo da maltose a partir do amido de aproximadamente 95%, foi influenciado pelo grau da liquefação do amido.

Em 1977a, Yamasaki et al. realizaram a purificação e caracterização de duas formas de amiloglicosidase de **Penicillium oxalicum**, denominadas amiloglicosidase I e II. As frações das enzimas foram separadas em gel de poliacrilamida, submetido a 80 volts por 72 horas. Verificou-se que a constante de sedimentação e peso molecular da amiloglicosidase I foram 4,42 S e 84.000 daltons, respectivamente; e da amiloglicosidase II foram 4,53 S e 86.000 daltons, respectivamente. O pH ótimo de atividade para amiloglicosidase I foi 5,0 e para a amiloglicosidase II foi 4,5. O pH de estabilidade para ambas as enzimas estava na faixa de pH 3,0 a 6,5.

A amiloglicosidase I e II produzida por **Mucor rouxianus** foi estudada por Yamasaki et al., em 1977d. Verificou-se que ambas as formas hidrolisavam moléculas de amilopectina, amilose, glicogênio, amido solúvel, maltotriose e maltose, mas não atuavam sobre a isomaltose e a isomaltotriose. Fenil α -maltosídeo foi hidrolisado em glicose e fenil α -glicosídeo pelas duas enzimas. As enzimas hidrolisavam a amilose com a inversão da configuração, produzindo glicose na forma anomérica β . A amiloglicosidase II hidrolisou o amido cru três vezes mais que amiloglicosidase I. O ponto isoelétrico de ambas as enzimas foi estimado em pH 8,4. O pH ótimo de atividade da amiloglicosidase I e II foi 4,6 e 5,0, respectivamente. A amiloglicosidase I apresentou-se estável na faixa de pH 4,0 a 8,0 e amiloglicosidase II na faixa de pH 4,0 a 7,5. As duas enzimas apresentaram atividade ótima a 55°C e apresentaram-se estáveis em temperaturas acima de 50°C.

A amiloglicosidase de **Aspergillus awamori** foi caracterizada por Yamasaki et al., 1977c. O peso molecular da enzima foi estimado em 83.700.

O pH ótimo e de estabilidade da amiloglicosidase foram 4,5 e na faixa de 5,0 a 9,0, respectivamente. A temperatura ótima para a atividade enzimática foi 60°C e a enzima apresentou-se estável em temperaturas acima de 50°C. A amiloglicosidase hidrolisou rapidamente substratos como a amilose, a amilopectina, o glicogênio e o amido solúvel, convertendo-os em glicose. A formação de β -glicose como único produto da hidrólise da amilose indicou que a hidrólise ocorreu com a inversão da glicose como observado no caso de amiloglicosidasas de outras fontes. Os autores concluíram que a completa hidrólise da amilopectina e o glicogênio sugeria que a enzima era capaz de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,6 de substratos com alto peso molecular. A maltose foi hidrolisada a uma velocidade muito menor pela enzima, em comparação com a hidrólise de outros polissacarídeos amiláceos.

Miah e Ueda, em 1977, verificaram algumas propriedades físico-químicas e enzimáticas de três formas de amiloglicosidase de *Aspergillus oryzae*, denominadas I, II e III. As três formas de amiloglicosidase apresentaram pH ótimo de atividade na faixa de 4,5 a 5,0 na temperatura de 40°C, e a temperatura ótima na faixa de 40° e 60°C. As enzimas foram mais estáveis na faixa de pH 4,0 e 7,0 e em temperaturas acima de 40°C. Os pesos moleculares estimados para as amiloglicosidasas I, II e III, foram 76.000, 38.000 e 38.000 daltons, respectivamente. A atividade de hidrólise das amiloglicosidasas sobre diferentes substratos foi estudada. Verificou-se que a amilose foi o melhor substrato para a amiloglicosidase II, enquanto que a amilopectina, o glicogênio e o β -limite dextrina foram os piores substratos. A amilose, a amilopectina e dextrina foram bons substratos para a amiloglicosidase I e III. A maltotriose foi considerada melhor substrato para as três amiloglicosidasas, quando comparada com a maltose, sugerindo que a maltose não foi um bom substrato para as enzimas. Apenas a amiloglicosidase I demonstrou uma pequena atividade sobre a pululana, e a amiloglicosidase II e III não mostraram atividade hidrolítica sobre a pululana. As três amiloglicosidasas não hidrolisaram dextrana e ciclodextrina. A amiloglicosidase I apresentou alta atividade desramificante e foi mais ativa na digestão do amido cru, enquanto que a amiloglicosidase II e III apresentaram pequena atividade desramificante e pequena degradação do amido cru (não gelatinizado).

Algumas propriedades de duas formas de amiloglicosidase de *Penicillium oxalicum*, designadas amiloglicosidasas I e II, foram estudadas

por Yamasaki et al., em 1977b. Verificou-se que as amiloglicosidasas hidrolisaram a amilopectina (≈ 100 % de hidrólise) a amilose, glicogênio, maltotriose e maltose, mas não hidrolisaram a isomaltose e isomaltotriose. A glicose foi o único produto encontrado após a hidrólise destes substratos. Ambas as enzimas hidrolisaram o fenil α -maltosídeo para glicose e fenil α -glicosídeo. Foi observado que as enzimas hidrolisaram a amilose com a inversão de configuração produzindo a glicose na forma anomérica β . Os autores relataram que entre o íons metálicos testados, Hg^{2+} , foi o inibidor mais eficiente para as duas formas de amiloglicosidasas. As enzimas também foram inibidas pelo composto Tris. As amiloglicosidasas I e II eram glicoproteínas, constituídas de 3,93% e 3,22% de manose, respectivamente.

Em 1978, Kobayashi e Matsuda estudaram a ação da amiloglicosidase comercial de *Rhizopus niveus* sobre dextranas, atuando como uma exo-dextranase. As dextranas são polissacarídeos extracelulares produzidas por várias linhagens de *Leuconostoc mesenteroides*, constituídos de resíduos de D-glicose ligadas através de ligações glicosídicas cruzadas de α -1,6 e outras. Alguns tipos de dextranas apresentam estruturas complexas. Tem sido registrado que a amiloglicosidase (E.C. 3.2.1.3.) que catalisa a remoção de grupos α -D-glicopiranosil de final não redutor de amido e glicogênio, pode atuar em oligossacarídeos contendo ligações glicosídicas α -1,3 ou α -1,6 (55). Os autores relataram que tentativas tem sido realizadas para que a amiloglicosidase atue como uma exo-dextranase. Os autores concluíram que a amiloglicosidase comercial pode ser utilizada para remover resíduos de moléculas de dextranas, e que a amiloglicosidase apresentou diferentes graus de afinidade dependendo do tipo de dextrana usado como substrato. Dextranas altamente ramificadas foram muito pouco hidrolisadas pela amiloglicosidase e apesar da amiloglicosidase hidrolisar ligações glicosídicas lineares α -1,6 e α -1,3, as ligações α -1,4, α -1,2 e α -1,3 nos pontos de ramificações da dextrana constituíram uma barreira à ação da amiloglicosidase.

O fungo termofílico *Humicola lanuginosa* produz dois tipos de amiloglicosidase. Algumas propriedades da amiloglicosidase II foram investigadas por Taylor et al., em 1978. A enzima apresentou-se completamente estável na faixa de pH 5,0 a 10,0 por 24 horas à temperatura ambiente e o pH ótimo de atividade foi 6,6. A pré-incubação da enzima a várias temperaturas por 30 minutos, a pH 6,6 mostrou que a amiloglicosidase era muito estável à temperaturas acima de 50°C. Apenas 4 % da atividade

na incubação à 60°C e 48 % de perda de atividade hidrolítica à 70°C. Observou-se também que o amido solúvel foi completamente hidrolisado pela amiloglicosidase II.

Ingle e Erickson, 1978, relataram que para a produção eficiente de glicose a partir de amido, α -amilases bacterianas são utilizadas para a liquefação de amido para posterior atuação de enzimas sacarificantes.

A influência da composição do meio de cultura na produção de enzimas amilolíticas, α -amilase e amiloglicosidase pela linhagem de **A. niger Van Tieghem** foi estudada por Ramachandran et al., 1978. Os autores verificaram que, enquanto a glicose, maltose, dextrina e amido solúvel induziam a produção da amiloglicosidase, a pectina e o polipectato de sódio induziam a formação de α -amilase. Íons alcalinos reprimiram a formação da amiloglicosidase. NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ foram boas fontes de nitrogênio inorgânico, enquanto que caseína, proteínas de grãos e água de maceração de milho foram boas fontes de nitrogênio orgânico. A retirada de fatores de crescimento como piridoxinahidroclorato e inositol, inibiram a produção de enzimas, enquanto que a ausência de riboflavina resultou em um efeito oposto.

Spencer-Martins e Van Uden, 1979, verificaram que uma linhagem da levedura **Lipomyces kononenkoae**, foi capaz de utilizar o amido como fonte de carbono e energia para seu crescimento celular, com alto rendimento. E produziu três formas de amilases extracelulares que foram posteriormente purificadas. As enzimas foram a α -amilase, amiloglicosidase e uma transferase desramificante. A amiloglicosidase apresentou as seguintes propriedades: peso molecular 81.500 daltons; atividade ótima em torno de pH 4,5 e 50°C; ponto isoelétrico de 6,1; K_m (30°C, pH 4,5) para amido solúvel foi $16,2\text{g}^{-1}$, para maltose $0,36\text{g}^{-1}$, para p-nitro fenil- α -D-glucosídeo $0,35\text{g}^{-1}$.

Em 1980, Fogarty e Kelly, relataram que, embora a pululanase e isoamilase fossem enzimas desramificantes específicas, diversas amiloglicosidasas também apresentam atividade desramificante paralela.

Em 1980, Clementi et al., relataram que **Schwanniomyces castelli** e **Endomycopsis fibuligera** produziram enzimas amilolíticas extracelulares quando desenvolvidas em diversas fontes de carbono e a diferentes valores de pH. Ambas espécies de leveduras demonstraram notável síntese de amilases na

presença de maltose ou amido solúvel, em pH 6,0 a 50°C. A glicose livre no meio de cultura, aparentemente inibia a síntese da enzima. Os autores concluíram que embora os resultados apresentados não fossem conclusivos, eles sugeriram que *S. castelli* e *E. fibuligera* eram capazes de produzir amilases do tipo α -amilase e amiloglicosidase.

Em 1981, Searle e Tubb realizaram alguns estudos sobre a regulação da produção de amiloglicosidase de *Saccharomyces diastaticus*. Foi observado que em mostos de fermentação, a produção de amiloglicosidase (AMG) extracelular pela *S. diastaticus* era significativa quando o requerimento da levedura, quanto à O₂ ou ácidos graxos insaturados não estavam devidamente satisfeitos. Durante as fermentações, a maltotriose desaparecia antes que a maltose e ocorria um acúmulo de glicose como produto da ação da amiloglicosidase. Em todos os experimentos realizados, verificou-se que o início da hidrólise da dextrina coincidia com o início da excreção da amiloglicosidase pelo microrganismo. A enzima que atuava antes de ser excretada estava associada com as células de levedura, mas localizada externamente na membrana plasmática. Os autores concluíram que a dextrina ou o amido não eram requeridos para a indução da produção da amiloglicosidase que se iniciava quando a fonte de energia e carbono tornava-se limitado. As linhagens *S. diastaticus* hidrolisavam apenas uma pequena proporção de dextrina no mosto e as amiloglicosidases produzidas em bebidas fermentadas eram incapazes de liberar glicose de pululana.

Em 1982, Sills e Stewart estudaram a produção de enzimas amilolíticas por algumas linhagens de leveduras. *Endomycopsis* sp, *Swanniomyces* sp, *Picchia* sp e *Saccharomyces* sp foram comparadas pela capacidade para síntese de α -amilase, amiloglicosidase e pululanase. A linhagem N° 240 de *Endomycopsis fibuligera*, produziu uma amiloglicosidase com alta atividade (208 nmoles de glicose / min) e uma α -amilase com atividade de 128 nmoles de maltose / min. Das linhagens de leveduras estudadas, *Swanniomyces* sp apresentaram a atividade desramificante mais notável. Os autores verificaram que *Endomycopsis* sp, *Swanniomyces* sp e *Picchia* sp quando cultivados em meio contendo glicose na concentração de $3,0 \times 10^{-3}$ M, não produziram a enzima α -amilase, mas a atividade de amiloglicosidase não era reprimida.

Wilson e Ingledew, em 1982, isolaram e caracterizaram as enzimas amilolíticas de *Schwanniomyces alluvius*. A α -amilase apresentou atividade

ótima em pH 6,3 e foi estável na faixa de pH 4,5 a 7,5. A temperatura ótima para a enzima foi 40°C e esta foi rapidamente inativada a temperaturas superiores a 40°C. O Km da α -amilase para amido solúvel foi 0,364 mg / ml. O peso molecular foi estimado em 61.900 daltons. A α -amilase não apresentou atividade hidrolítica sobre a pululana. A amiloglicosidase apresentou atividade ótima em pH 5,0 e foi estável na faixa de de pH 4,0 a 8,0. A temperatura ótima foi 50°C, e apresentou-se estável à temperaturas não superiores a 60°C. Os valores de Km da amiloglicosidase para o amido solúvel foi 12,67 mg / ml e 0,72 mM para maltose. O peso molecular foi estimado em 155.000 daltons. A amiloglicosidase liberou apenas glicose de amido solúvel e pululana. Os autores relataram que *S. alluvius* é uma das poucas leveduras que apresentava a capacidade para síntese de α -amilase e amiloglicosidase, combinada com alguma capacidade fermentativa para a produção de etanol.

Chiba et al., 1983, realizaram um estudo quantitativo de formas anoméricas de glicose produzidas pelas enzimas α -glicosidases e amiloglicosidases. Cromatografia gasosa foi utilizada para determinação das formas anoméricas dos açúcares produzidos pelas enzimas. As formas anoméricas da glicose liberada a partir de maltotriose, fenil- α -maltosídeo e fenil- α -glucosídeo foram analisadas quantitativamente. Os autores verificaram que α -glicosidase de diversas fontes, produziam exclusivamente α -glicose e que as amiloglicosidases produziam apenas β -glicose.

De Mot et al., 1984, estudaram a produção de enzimas amilolíticas extracelulares que hidrolisam o substrato pululana, por várias espécies de leveduras. Os autores concluíram que as amiloglicosidases extracelulares de leveduras, foram responsáveis pela degradação da pululana e que a atividade desramificantes observada com a enzima de várias espécies mutantes de leveduras, pode ser atribuída ao aumento da produção de amiloglicosidase.

Simões - Mendes, em 1984, caracterizou e purificou as amilases extracelulares produzidas pela levedura *Schwanniomyces alluvius*. O sistema amilolítico extracelular de *S. alluvius* constituiu-se de uma α -amilase, uma amiloglicosidase e provavelmente uma enzima desramificante. Preparações brutas da enzima foram obtidas pelo fracionamento do sobrenadante do meio de cultura, na fase estacionária de crescimento com isopropanol. A purificação foi realizada em coluna de DEAE-celulose. A amiloglicosidase apresentou as seguintes propriedades: peso molecular 117.000 daltons, atividade ótima em

pH 4,5 e 50°C e estabilidade na faixa de pH 4,0 a 6,0. A glicose foi o produto final da hidrólise de amido e o Km em pH 4,5, a 30°C para amido solúvel foi 22,22 g.l⁻¹. A α -amilase apresentou as seguintes propriedades: peso molecular, 62.000 daltons, atividade ótima em pH 6,3 e 40°C e estabilidade na faixa de pH 4,0 a 7,0. O produto final da hidrólise do amido foi maltose e glicose e o Km em pH 5,5, 40°C, foi 2,7 g.l⁻¹ para amido solúvel.

A purificação e caracterização de enzimas amilolíticas produzidas pela levedura *Filobasidium capsuligenum* foi relatada por De Mot e Verachtert, em 1985a. O sistema amilolítico de *F. capsuligenum* foi constituído por duas formas de amiloglicosidase, designadas I e II e uma α -amilase. As enzimas foram purificadas pelo fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica (DEAE - Sephadex A-50) e filtração em gel (Sephadex G-25 e Sephadex G-100). A α -amilase apresentou atividade ótima em pH 5,6 e 50°C, mas foi rapidamente inativada em temperaturas superiores a 50°C. O peso molecular foi estimado em 64.000 daltons através de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. Os autores verificaram que as amiloglicosidasas eram glicoproteínas com o mesmo peso molecular (60.000 daltons) e produziram apenas glicose, após a hidrólise de amido solúvel. A atividade desramificante das amiloglicosidasas foi constatada pela atuação das enzimas em substratos com ligações α -1,6, como a amilopectina e pululana. A amiloglicosidase I e II apresentaram atividade ótima na faixa de pH 5,0 a 5,6 e na faixa de pH 4,8 a 5,3, respectivamente. A temperatura ótima de atividade para a amiloglicosidase I foi 55°C e para a amiloglicosidase II foi 50°C. Apesar de *F. capsuligenum* produzir as enzimas amilolíticas necessárias para a completa degradação de amido, α -amilase e amiloglicosidase com atividade desramificantes, a levedura não foi considerada adequada para a fermentação alcoólica direta da biomassa de amido, provavelmente devido à fermentação incompleta de glicose e pequena tolerância ao etanol, apresentada pela levedura.

De Mot et al., em 1985b, purificaram e caracterizaram uma amiloglicosidase produzida pela levedura *Candida tsukubaensis* CBS 6389, quando cultivada em meio contendo amido solúvel. A purificação foi realizada pela cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50 e filtração em gel em coluna de Ultragel AcA 44. Os autores verificaram que a amiloglicosidase era uma glicoproteína com peso molecular de 56.000 daltons. A amiloglicosidase apresentou atividade ótima na faixa de pH 2,4 a 4,8 e 55°C. A atividade

desramificante foi demonstrada pela atividade de hidrólise sobre pululana, resultando na liberação de glicose.

Abe et al., 1985, pesquisaram as propriedades cinéticas e estruturais de três formas de amiloglicosidase de **R. delemar**, que foram separadas e purificadas de uma preparação comercial, livres da atividade de α -amilase e fosfatase. As propriedades das três formas de amiloglicosidase foram comparadas com as de **A. niger**. O peso molecular da GI, GII e GIII foi de 61.000, 70.000 e 78.000 daltons, respectivamente. Estas três formas demonstraram propriedades cinéticas similares para oligossacarídeos, entretanto, a forma GIII demonstrou afinidade e atividade extremamente alta para polissacarídeos. As enzimas de **R. delemar** apresentaram menores valores de Km para polissacarídeos e maiores valores para oligossacarídeos, e também maiores valores de Vmax para todos os substratos analisados.

Em 1986, Takao et al., isolaram e estudaram a produção de uma enzima sacarificante de amido cru (não gelatinizado) pelo fungo **Corticium rolfsii** AHU 9627. Os autores verificaram que a produção da enzima foi maior com o aumento da concentração de fontes de carbono e nutrientes orgânicos no meio de cultura. A atividade ótima da enzima foi em pH 4,0 e 65°C. A reação de sacarificação do amido não gelatinizado não foi inibida com a utilização de altas concentrações de substrato.

Em 1987, Kanlayakrit et al., descreveram as características de uma amiloglicosidase que hidrolisava o amido não gelatinizado, produzida pelo fungo termofílico **Rhizomucor pusillus** NH-139. Os autores, constataram que esta enzima diferia de outras amiloglicosidases, pois não hidrolisava completamente o glicogênio, produzindo apenas 80% de glicose e foi denominada amiloglicosidase tipo B.

A purificação e caracterização de amilases produzido pela levedura **Candida antarctica** CBS 6678, foi relatada por De Mot e Verachtert, em 1987. **C. antarctica** foi cultivada em um meio com β ciclodextrina como única fonte de carbono. O sobrenadante foi tratado com sulfato de protamina, para reduzir a viscosidade, facilitando assim a concentração do fluido pela precipitação com sulfato de amônio. Posteriormente, relatou-se a purificação com filtração em gel de Sephadex G-75, cromatografia em coluna de DEAE - Sephacel e cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B. Ambas enzimas foram designadas glicoproteínas, apresentando diferenças quanto a

composição de aminoácidos. A α -amilase apresentou 468 resíduos de aminoácidos, enquanto que a amiloglicosidase 404. O peso molecular de α -amilase e amiloglicosidase foram estimados em 50.000 e 48.500 daltons respectivamente, através de eletroforese em SDS-PAGE. O ponto isoelétrico da amiloglicosidase foi em pH 10,1 e da α -amilase foi em pH 10,3. A natureza básica de ambas as amilases foram confirmadas pela ausência de ligação a resina de DEAE-Sephacel em pH 7,6. Os autores compararam os valores do ponto isoelétrico das amilases pesquisadas com as amilases produzidas por alguns fungos e leveduras e constataram que o pI das amilases de **C. antarctica** são especialmente altas. O pH ótimo de atividade para ambas as enzimas foi 4,2. A temperatura ótima de 62°C para α -amilase apresentou-se surpreendentemente alta, quando comparada com amilases de outras leveduras, com a temperatura ótima não ultrapassando 50°C (12, 13). A temperatura ótima da amiloglicosidase foi 57°C, considerada dentro da faixa para amiloglicosidase de leveduras (50° a 60°C). As análises cinéticas indicaram que ambas as enzimas hidrolisaram preferencialmente substratos com alto peso molecular, inclusive alguns amidos não gelatinizados. A α -amilase foi ativa sobre ciclodextrinas, enquanto que a atividade desramificante foi demonstrado pela amiloglicosidase em substratos como amilopectina e glicogênio.

Ono et al., 1988, realizaram estudos comparativos de várias tipos de amiloglicosidasas produzidas por **A. niger**. Os autores constataram que uma preparação comercial de **A. niger** consistia de pelo menos, seis espécies diferentes (A - II-IV e B - I-III), das quais cinco formas foram caracterizadas quanto a peso molecular, ponto isoelétrico, composição química, parâmetros cinéticos e outras propriedades enzimáticas.

Basuki et al., 1989, estudaram comparativamente a isomerização enzimática da glicose obtida da hidrólise de amido pela α -glicosidase do soro de porco e a amiloglicosidase de **Rhizopus** sp. Os autores compararam os seguintes experimentos: reação enzimática de sacarificação-isomerização de maltohexose pela α -glicosidase do soro de porco e glicose isomerase de **Streptomyces** sp; e reação enzimática de sacarificação-isomerização de maltohexose pela amiloglicosidase de **Rhizopus** sp. e glicose-isomerase de **Streptomyces** sp. Os resultados obtidos, demonstraram que a glicose isomerase de **Streptomyces** sp foi estereo-específica para moléculas de α -D-glicose produzidas pela α -glicosidase do soro de porco.

Em 1990, Ali et al., purificaram a amiloglicosidase de **Aspergillus terreus**, utilizando cromatografia em coluna de DEAE-Celulose. Os autores obtiveram um monômero após eletroforese em gel de SDS - poliacrilamida. A enzima obtida foi uma glicoproteína de peso molecular de 86.000 daltons com 7,5% (p/p) de carboidrato em sua estrutura.

Ohnishi et al., 1991, realizaram a purificação da amiloglicosidase de **Clostridium** sp G0005 e estudaram algumas de suas características, que demonstraram ser semelhantes à amiloglicosidase de fungos e leveduras.

Preparações de amiloglicosidasas, não purificadas em **Rhizopus** sp, **Chalara paradoxa** e **Aspergillus** sp k-27 foram utilizadas por Noda et al., em 1992, para determinar a digestibilidade enzimática de amidos crus (não gelatinizados) de oito variedades de batata doce. Foi verificado que as preparações enzimáticas além da atividade de amiloglicosidase apresentavam atividade de α -amilase, o que provavelmente estimulou a atuação da amiloglicosidase sobre os amidos não gelatinizados. As misturas de reação foram incubadas a 40 °C , pH 5,0 por 24 horas. Os autores concluíram que, a hidrólise realizada pela enzima de **Rhizopus** sp foi um pouco menor que aquela apresentada pelas outras enzimas. Foi sugerido que as amilases de **Chalara paradoxa** e **Aspergillus** sp k-27 apresentaram uma alta afinidade para a hidrólise de amido cru, comparada com a hidrólise convencional conhecida realizada pelas amilases de **Rhizopus** sp. A variedade de batata doce KS-M apresentou a maior porcentagem de hidrólise, e as outras variedades diferiram mais ou menos quanto a porcentagem da hidrólise, dependendo da amiloglicosidase utilizada. Estes resultados sugeriam que a digestibilidade do amido pela amiloglicosidase depende não apenas da fonte do amido, mas também da fonte de amiloglicosidase.

Reddy e Basappa em 1993, selecionaram e caracterizaram linhagens de **Endomycopsis fibuligera** produtoras de α -amilase e amiloglicosidase com potencial para a produção de etanol a partir de açúcares e substratos amiláceos. Os autores relataram que a produção de altos níveis de α -amilase e amiloglicosidase, a ausência de um catabólito repressor, a natureza constitutiva e a resistência à inibição pelo etanol foram os requisitos essenciais na levedura, para a produção direta de etanol a partir de amido. O amido de mandioca e de arroz foram os melhores substratos. Entre as várias linhagens de leveduras testadas, **E. fibuligera** NRRL 76 demonstrou o melhor desempenho

para a produção de etanol, a partir de amido de mandioca e arroz; em condições ótimas de crescimento: pH 6,0 e 30°C por um dia sobre condições aeradas seguida por três dias sem aeração.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes e Materiais Específicos :

- Reagentes Químicos: ácidos, bases, sais minerais, solventes (Merck, Reagen, Carlo Erba)
- Açúcares: glicose (Merck), maltose (Merck), e maltotriose (Hayashibara Biochemical Laboratories Inc.)
- Polissacarídeos: amido de milho comercial (Maizena) e pululana (Hayashibara Biochemical Laboratories Inc.), amido solúvel (Merck)
- Meios de Cultura: extrato de levedura (Difco), peptona, agar (Merck)
- Resinas: DEAE-Sephadex A-50 , CM- Celulose
- Papel de cromatografia e filtros: papel Whatman N°1 de 46 x 57 cm, filtros Millipore 0,45 μ , Ref . HAWP- 04700
- Kit de proteínas padrões para eletroforese da Pharmacia LKB Referência LMW-17-0446-01

3.1.2. Equipamentos:

- Câmara climática com controle de temperatura 0 - 60°C com agitação, FANEM, modelo 346
- Estufas bacteriológicas FANEM
- Espectrofotômetro Bausch Lomb Spectronic 20
- Espectrofotômetro Beckman, DU - 70
- Banhos de água de temperatura controlada FANEM

- Potenciômetro Digimed
- Centrífuga refrigerada Beckman, modelo J-21
- Coletor de frações Buchler , modelo Fractomete Alpha 200
- Agitador de Tubos Tecnal
- Cromatógrafo CG - 480 C. Isocrático com detector CG - 410 de índice de refração, Registrador automático modelo CG 300, e coluna YMC-Pack Polyamine-II

3.1.3. Enzimas:

- α -amilase de **Bacillus licheniformis** (Novo Industrie Co.);
- Pululanase de **Klebsiella** sp, N°192, isolada por Hélia H. Sato, no laboratório de Bioquímica de Alimentos, UNICAMP (65);
- Enzima amilolítica de **Candida** sp, ATCC 90238, isolada por Yong K. Park, no laboratório de Bioquímica de Alimentos, UNICAMP (52).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Produção de enzima amilolítica de **Candida** sp ATCC 90238, isolada no laboratório de Bioquímica de Alimentos, UNICAMP (52).

A linhagem **Candida** sp ATCC 90238 cultivada por 24 horas a 30°C em ágar YPS, contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 3% de amido solúvel e 2% de agar, foi inoculada com alça metálica, em frascos de Erlenmeyer (250ml), contendo 50 ml de meio YPS, contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 3% de amido solúvel e incubado à 30°C, por 3 dias com agitação de aproximadamente 100 RPM. Após incubação, a atividade enzimática amilolítica foi determinada como descrito no item 3.2.3.1.

3.2.2. Produção de Pululanase de *Klebsiella* sp N°192, isolada no laboratório de Bioquímica de Alimentos, UNICAMP (65).

Para a produção de pululanase, a cultura de *Klebsiella* sp em Agar Nutriente acrescido de 0,5% de amilopectina foi transferido com alça metálica para frascos Erlenmeyer, contendo 100 ml de meio de cultura, com 2% de peptona, 0,4% de glutamato de sódio, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,001% de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,001% de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,001% de NaCl, ajustado a pH 7,0, com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. 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 5°C. A atividade de pululanase no sobrenadante foi determinada de acordo com o item 3.2.3.2.

3.2.3. Determinação da atividade das enzimas amilolíticas

3.2.3.1. Determinação da atividade da enzima amilolítica de *Candida* sp ATCC 90238

A atividade da enzima amilolítica da levedura foi determinada pelo método descrito por Park e Azuma (52). As misturas de reação constituídas de 0,5 ml de 1% de amido solúvel em tampão acetato 0,1M, pH 5,6 e 0,5 ml de solução de enzima foram incubadas a 55°C por 30 minutos. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (42), usando-se a glicose como padrão. Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de glicose / minuto sob as condições de ensaio.

3.2.3.2. Determinação da atividade de pululanase de **Klebsiella** sp

A atividade de pululanase foi determinada pelo método descrito por Sato (65). Amostras de 0,5 ml de solução 0,7% de pululana em tampão acetato 0,1M pH 6,0 foram incubadas em banho de água termostaticado 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 foi incubada a 40°C, durante 30 minutos. Os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (42), utilizando-se como padrão a maltotriose. Uma unidade de pululanase foi definida como a quantidade da enzima que libera açúcares redutores expressos como μg de maltotriose/minuto/ml de enzima a partir de pululana sob as condições de ensaio.

3.2.3.3. Determinação da Atividade de α -amilase de **Bacillus licheniformis**

Este ensaio baseou-se na determinação do tempo necessário para hidrolisar o amido à dextrina de tamanho definido, como indicado pela cor do complexo Iodo-Dextrina e comparado com solução padrão (65,40). A mistura de reação foi preparada com 20 ml de solução 2% de amido solúvel em tampão fosfato 0,05M, pH 6,0 e 9 ml de água destilada. Em seguida, a mistura foi incubada em banho termostaticado 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 de reação foram retiradas e adicionadas a 5 ml de solução diluída de Iodo-KI. A coloração foi comparada com a cor da solução padrão constituída de 25g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3,84g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ em 100 ml de HCl 0,01N. O final da reação foi estabelecido quando a amostra apresentou coloração aproximada à da solução padrão. A atividade α -amilase foi expressa em unidades SKB (40).

3.2.4. Purificação da Enzima Amilolítica de *Candida* sp.

3.2.4.1. Fracionamento com Sulfato de Amônio

Para a purificação da enzima o sobrenadante do meio de cultura obtido de acordo com o item 3.2.1., foi saturado com sulfato de amônio a 80% e mantido a 5°C por uma noite, sendo depois centrifugado a 10.000 x g, durante 10 minutos. O precipitado obtido foi dissolvido em 110 ml de água destilada, sendo posteriormente dialisado contra água destilada a 5°C por 48 horas. Em seguida, dialisado contra tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,6 a 5°C durante 3 dias.

3.2.4.2. Cromatografia em Coluna de DEAE-Sephadex

Aproximadamente 50g de DEAE-Sephadex foi tratado com 500 ml de NaOH 0,5N, filtrada em lã de vidro e lavada com água destilada para remoção do NaOH. Em seguida, a resina foi tratada com 500 ml de HCl 0,5N, lavada com água destilada para remoção do HCl. Finalmente, a resina foi equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,6. Posteriormente, a solução enzimática, obtida no item 3.2.4.1. foi aplicada em coluna de DEAE-Sephadex de 2,9 cm de diâmetro e 61,0 cm de comprimento e eluída através da coluna, pela adição de 300 ml de tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,6 e solução de NaCl em gradiente de concentração de 0,1 a 1M. As frações de 8 ml foram coletadas a cada 30 minutos, utilizando-se coletor de frações. O curso de eluição das proteínas foi acompanhado a 280 nm e a atividade da enzima amilolítica da levedura medida de acordo com o item 3.2.3.1. As frações contendo atividade foram reunidas, para posterior aplicação em coluna de CM-Celulose.

3.2.4.3. Cromatografia em Coluna de CM-Celulose

Aproximadamente 40g de CM-Celulose foi tratada com 500 ml de NaOH 0,5N, filtrada em lã de vidro e lavada com água destilada para remoção do NaOH. Em seguida, a resina foi tratada com HCl 0,5N e lavada com água

destilada para remoção do mesmo e finalmente equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,6. A solução enzimática obtida de acordo com o item 3.2.4.1. foi aplicada em coluna de CM-Celulose de 2,9 cm de diâmetro e 63 cm de comprimento. A eluição foi realizada com 300 ml de tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,6 e solução de NaCl em gradiente de concentração de 0,1 a 1,0M. O curso da eluição de proteínas da coluna foi acompanhado pela medida da absorbância a 280 nm. As frações que apresentaram atividade de enzima amilolítica foram reunidas, dialisadas contra tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,6, por 48 horas e posteriormente congeladas.

3.2.5. Determinação Quantitativa de Proteínas

A determinação de proteínas das preparações de enzimas foi realizada pelo método colorimétrico de Lowry et al.,1951 (35), utilizando-se a ovoalbumina como padrão.

3.2.6. Cromatografia em Papel de Açúcares

Os açúcares resultantes da hidrólise do amido de milho, foram verificados por cromatografia em papel Whatman N°1. O sistema de solvente utilizado para a cromatografia descendente constituiu-se de butanol: piridina: água destilada, na proporção 6:4:3 (v:v:v), respectivamente. O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de aproximadamente 18 horas para a fita de papel de 46 cm de comprimento. Utilizou-se como padrões, uma mistura de glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e maltohexaose.

Os açúcares redutores foram revelados com AgNO_3 em acetona, NaOH alcohólico e tiosulfato de sódio 10% , de acordo com o método descrito por Trevelyan et al.,1950(78).

3.2.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos Produtos da Hidrólise Enzimática

Os açúcares resultantes da hidrólise do amido de milho foram analisados através da cromatografia líquida de alta eficiência. Utilizou-se a coluna YMC-Pack Polyamine II de 250 mm x 4,6 mm a 25°C e fase móvel, água bidestilada e filtrada com fluxo de 1,0 ml/min. Os açúcares formados após a hidrólise foram identificados por comparação do tempo de retenção com os açúcares padrões glicose, maltose e maltotriose. As porcentagens relativas dos açúcares foram obtidas por integração das áreas.

3.2.8. Caracterização da Enzima Amilolítica Purificada de *Candida* sp ATCC 90238

3.2.8.1. 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 a 1% de amido solúvel em água deionizada, 0,4 ml de solução da enzima purificada e 0,4 ml de tampão. Os sistemas de tampão foram utilizados dentro dos limites de sua ação tamponante: citrato-fosfato pH 2,6 a 7,0 e tampão fosfato pH 5,0 a 8,0 na concentração 0,1M. As misturas de reação foram incubadas a 55°C em banho termostaticado por 30 minutos. Após a incubação, os açúcares redutores liberados foram determinados de acordo com o item 3.2.3.1.

3.2.8.2. Efeito do pH na Estabilidade da Enzima

Para o estudo do efeito do pH na estabilidade enzimática, 0,4 ml de solução enzimática purificada foi pré-incubada com 0,1 ml de solução tampão 0,1M de diferentes valores de pH, durante 24 horas, a 55°C. A atividade residual foi determinada pela adição de 0,5 ml de amido solúvel 1% em tampão citrato-fosfato 0,2M, pH5,6 às soluções enzimáticas, e as misturas de

reação foram incubadas a 55°C, durante 30 minutos. Os açúcares redutores formados foram analisados como descrito no item 3.2.3.1.

3.2.8.3.Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática

Para se verificar o efeito da temperatura na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 0,5 ml de amido solúvel 1% em tampão citrato-fosfato pH 5,6 , 0,4 ml de solução da enzima purificada e 0,1 ml de água destilada. A mistura de reação foi incubada em diferentes temperaturas entre 30° a 70°C, por 30 minutos e os açúcares redutores formados determinados de acordo com o item 3.2.3.1.

3.2.8.4.Efeito da Temperatura na Estabilidade da Enzima

Para o estudo do efeito da temperatura na estabilidade da enzima, foram incubados amostras de 3 ml de solução enzimática em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,6, em tubos de ensaio, a diferentes temperaturas entre 10 a 60°C, durante 60 minutos. A atividade residual da enzima foi determinada de acordo com o item 3.2.3.1..

3.2.8.5. Determinação do Peso Molecular

Após a purificação em coluna de DEAE-Sephadex e CM-Celulose, a enzima amilolítica de *Candida* sp ATCC 90238, teve o seu peso molecular determinado através de eletroforese em gel.

3.2.8.5.1. Eletroforese - SDS-PAGE

Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, Pharmacia Fine Chemicals Inc.), foi realizada de acordo com o método de Weber e Osborn (84), usando kit de calibração para determinação de peso molecular da Pharmacia LKB.

3.2.8.5.2. Preparo da Amostra de Proteína para Eletroforese

A enzima amilolítica de **Candida** sp eluída da coluna de CM-Celulose foi dialisada contra tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 5,6, durante 48 horas a 5°C. Após a diálise, a amostra da enzima amilolítica e a mistura de proteínas padrões foram incubadas à 100°C por 5 minutos em tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 7,0 contendo 2,5% SDS e 5% de β -mercaptoetanol.

3.2.8.5.3. Proteínas Padrões (Pharmacia) usadas na Eletroforese (57)

Padrão	Peso Molecular (Daltons)
Fosforilase B	94.000
Albumina de Soro Bovino	67.000
Ovoalbumina	43.000
Anidrase Carbônica	30.000
Inibidor de Tripsina	20.100
α -lactoalbumina	14.400

3.2.8.5.4. Preparo do Gel e Desenvolvimento da Eletroforese

O gel de poliacrilamida 10% foi preparado com 22,2g de acrilamida e 0,6g de metilenobisacrilamida, dissolvidos em 100 ml de água. O tampão do gel constituiu-se de 7,8g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 38,6g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,0g de SDS, dissolvidos em 1000 ml de água. O gel foi preparado pela mistura de 15 ml de tampão do gel, 13,5 ml de solução de acrilamida, 1,5 ml de solução de persulfato de amônio (15,0 mg / ml) e 0,045 ml de N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamino, que foi imediatamente acrescentado à placa do gel. Após a polimerização do gel, 10 μl das amostras de proteínas foram aplicadas no gel. O tampão do gel foi utilizado para preencher os compartimentos do aparelho de eletroforese. A eletroforese desenvolveu-se sob corrente constante de 50 volts, durante 45 minutos. O gel foi corado com azul de Coomassie 0,25%, dissolvido em ácido acético e água na seguinte proporção 5:1:5 (v / v / v), durante uma noite. Em seguida, o gel foi descorado com solução de ácido acético 7%, sob 24 volts, por 45 minutos. Após a corrida, o comprimento do gel e a distância percorrida pelas proteínas coradas foram medidas. A mobilidade da proteína foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\text{Mobilidade} = \frac{\text{Distância de migração da proteína} \times \text{comprimento do gel antes de corar}}{\text{comprimento do gel após descoramento} \times \text{distância de migração do corante}}$$

As mobilidades foram relacionadas aos pesos moleculares das proteínas padrões expressos em escala logarítmica.

3.2.9. Estudo do Mecanismo de Ação e Especificidade da Enzima Amilolítica de *Candida* sp ATCC 90238.

3.2.9.1. Hidrólise de Amido de Milho Gelatinizado Utilizando-se a Enzima Amilolítica de *Candida* sp.

A hidrólise enzimática do amido de milho gelatinizado inicialmente foi realizada utilizando-se uma preparação de enzima amilolítica de *Candida* sp e posteriormente a combinação da enzima amilolítica de *Candida* sp e pululanase de *Klebsiella* sp.

Na primeira etapa, amostras de 2% e 5% de amido de milho em 90 ml de tampão acetato 0,1M, pH 5,6, foram aquecidas a 100°C, por 5 minutos. Em seguida, 36 ml da amostra foi transferido para balão volumétrico (100 ml), onde foi adicionado 4 ml de solução enzimática da levedura, contendo 2,6 Unidades / ml de atividade. Posteriormente, o mesmo procedimento foi mantido para verificar a atuação da enzima da levedura juntamente com a pululanase, sendo que a solução enzimática constituiu-se de 1 ml de enzima amilolítica de levedura, contendo 2,6 Unidades/ml e 1 ml de pululanase contendo 1.890 Unidades de atividade/ml.

Os balões volumétricos, contendo as misturas de reação foram incubados em banho de água termostatizado a 55°C, durante 72 horas.

Os produtos da hidrólise foram coletados durante o período de 24, 48 e 72 horas, e analisados através de cromatografia em papel, de acordo com o item 3.2.6.

3.2.9.2. Hidrólise de Diversos Substratos Utilizando-se a Enzima amilolítica de **Candida** sp

O estudo da hidrólise de substratos foi realizada utilizando-se a preparação enzimática obtida após a cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex, como descrito no item 3.2.4.3.

A hidrólise de 1 ml de substrato de 2% maltose ou 2% de maltotriose em tampão acetato 0,1M, pH 5,6, foi realizada pela adição de 0,1 ml de solução de enzima amilolítica de **Candida** sp, contendo 2,6 Unidades de atividades / ml. A mistura de reação foi incubada a 55°C e os produtos da hidrólise foram analisados através de cromatografia em papel de acordo com o item 3.2.6, no período de 24 e 48 horas.

Foi estudado a atividade de hidrólise da enzima amilolítica de **Candida** sp sobre a maltose, maltotriose, pululana e amido solúvel, preparados na concentração de 2%, com tampão acetato 0,1M, pH 5,6. As misturas de reação constituíram-se de 1 ml de solução de carboidratos e 0,1 ml de enzima, incubadas a 55°C, por 60 minutos. Após a incubação os produtos da hidrólise foram analisados por HPLC, como descrito no item 3.2.7.

3.2.10. Produção de Glicose

3.2.10.1. Hidrólise de amido de milho Utilizando-se α -amilase de **Bacillus licheniformis**

Para a preparação de amido de milho liquefeito foi utilizado preparação enzimática comercial de α -amilase de **B. licheniformis**.

Na primeira etapa amostras de 66g de amido de milho foram suspensas em 250 ml de água destilada, com 1,25 ml de solução de CaCl_2 20 mg/ml e ajustadas para pH 6,0 com NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. Posteriormente, adicionou-se 0,07 ml de solução de α -amilase bacteriana contendo 6.700 Unidades de atividade. As suspensões do amido (15% em peso seco) foram aquecidas em banho de água termostaticado 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 3.2.3.3,. Após a obtenção de coloração marrom da mistura de 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 α -amilase às misturas de reação e as soluções foram mantidas em banho de água termostaticado 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 aquecidas em ebulição durante 5 minutos. Os açúcares redutores produzidos após a hidrólise do amido de milho com α -amilase bacteriana foram verificados através de cromatografia descendente em papel Whatman N°1, como descrito no item 3.2.6.

3.2.10.2. Sacarificação do Amido de Milho Liquefeito Utilizando-se a Enzima Amilolítica de **Candida** sp.

Para a sacarificação do amido de milho liquefeito pela enzima amilolítica de **Candida** sp foram preparados sistemas de reação em duplicata, constituídos de 40 ml de solução de amido de milho liquefeito obtido de acordo com o item 3.2.10.1., ajustados para pH 5,6 ; 1 ml de solução de enzima amilolítica obtida de acordo com o item 3.2.4.1., contendo 2,6 Unidades de

atividade / ml; 3 ml de água destilada e 0,5 ml de toluol. Os balões volumétricos contendo os sistemas de reação foram incubados em banho de água termostatizado a 50°, 55° e 60°C. Aliquotas de 2 ml da solução de reação foram retiradas para análises nos seguintes períodos: 0, 24, 48 e 72 horas. Os produtos da hidrólise foram analisados através de cromatografia em papel, de acordo com o item 3.2.6 e cromatografia líquida de alta eficiência como descrito no item 3.2.7. A atividade enzimática foi determinada como descrito no item 3.2.3.1.

3.2.10.3.. Sacarificação de amido de milho liquefeito utilizando-se enzima amilolítica de **Candida** sp e pululanase de **Klebsiella** sp

A sacarificação do amido de milho liquefeito pela enzima amilolítica de **Candida** sp e pululanase de **Klebsiella** sp foi realizada preparando-se sistemas de reação, em duplicata, constituídos de amostras de 40 ml de amido de milho liquefeito, ajustados para pH 5,6; 1 ml de solução de enzima amilolítica de levedura contendo 2,6 Unidades de atividade / ml; 1 ml de pululanase contendo 1.890 Unidades de atividade / ml e 0,5 ml de toluol. Os balões volumétricos de 50 ml contendo as misturas de reação foram incubados em banhos de água termostatizado a 50°, 55° e 60°C. Aliquotas de 2 ml foram retirados nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas para análises de açúcar redutor, item 3.2.3.1., cromatografia em papel, item 3.2.6. e cromatografia líquida de alta eficiência de acordo com o item 3.2.7.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção e Purificação da Enzima Amilolítica de **Candida** sp ATCC 90238

4.1.1. Produção da Enzima Amilolítica de Levedura

A produção da enzima amilolítica de levedura foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.2.1. O fluxograma de produção e purificação da enzima amilolítica de **Candida** sp ATCC 90238, está apresentado na figura 1. A enzima amilolítica de **Candida** sp é uma enzima extracelular. O sobrenadante do meio contendo a enzima apresentou 0,6 unidades de atividade / ml. A tabela 1 ilustra alguns microrganismos produtores de amiloglicosidase.

4.1.2. Purificação de Enzima Amilolítica de **Candida** sp ATCC 90238

4.1.2.1. Fracionamento com Sulfato de Amônio

A enzima amilolítica de levedura foi fracionada com sulfato de amônio 80%, de acordo com as condições descritas no item 3.2.4.1. Foi obtida uma preparação parcialmente purificada, livres de contaminantes como carboidratos e outras substâncias presentes na primeira etapa da produção, contendo 0,5 unidades / mg de proteína.

4.1.2.2. Cromatografia de Enzima Amilolítica de *Candida* sp ATCC 90238, em coluna de DEAE-Sephadex

A purificação da preparação enzimática de levedura em coluna de DEAE-Sephadex A-50, equilibrada com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,6, foi realizada como descrito no item 3.2.4.2. A enzima adsorvida na resina foi eluída com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,6 contendo 1,0 M NaCl. A figura 2 ilustra o fracionamento da enzima amilolítica de levedura em coluna de DEAE-Sephadex. As frações 98 ~ 109 apresentaram atividade de enzima amilolítica, medida como descrito no item 3.2.3.1. Estas frações foram concentradas e dialisadas com tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,6 e aplicadas em coluna de CM-Celulose. A purificação está sumarizada na tabela 2. A enzima amilolítica de levedura purificada em coluna de DEAE-Sephadex, apresentou 2,15 unidades de atividade / mg de proteína.

4.1.2.3. Cromatografia de enzima amilolítica de *Candida* sp ATCC 90238, em coluna de CM-Celulose

A cromatografia de enzima amilolítica de *Candida* sp ATCC 90238 em coluna de CM-Celulose C-50 foi realizada como descrito no item 3.2.4.3. A enzima amilolítica não foi adsorvida em coluna de CM-Celulose equilibrada com tampão citrato - fosfato 0,05 M pH 5,6. A figura 3 ilustra a purificação da enzima amilolítica de levedura, em coluna de CM-Celulose. A enzima amilolítica de levedura foi purificada 40,0 vezes após o fracionamento com sulfato de amônio, seguido de cromatografia de DEAE-Sephadex e CM-Celulose, como demonstrado na tabela 2. A enzima purificada em coluna de CM-Celulose apresentou 2,0 unidades de atividade / mg de proteína e pode se observar que ocorreu uma redução na atividade da enzima quando comparada com a purificação em coluna de DEAE-Sephadex. A enzima na forma purificada parece ser mais sensível à variações de temperatura e pH.

4.2. Caracterização da enzima amilolítica purificada de *Candida* sp

As características bioquímicas da enzima amilolítica purificada de *Candida* sp ATCC 90238 foram determinadas como descrito no item 3.2.8.

4.2.1. Efeito do pH na Atividade Enzimática

O efeito do pH na atividade da enzima amilolítica de *Candida* sp foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.8.1. A figura 4 mostra que a enzima apresenta maior atividade na faixa de pH 5,6 a 6,0 em tampão citrato-fosfato.

Este resultado está de acordo com os resultados obtidos por Park e Azuma, no estudo desenvolvido sobre preparação bruta de enzima amilolítica de *Candida* sp ATCC 90238. A amiloglicosidase produzida pelas leveduras *Candida antarctica* CBS 6678 e *Candida tsukubaensis* CBS 6389, apresentaram atividade ótima em pH 4,2 e na faixa de 2,4 a 4,8 respectivamente De Mot e Verachtert, 1987 (15); De Mot et al., 1985 (12). A amiloglicosidase de *Candida* sp ATCC 90238 apresentou atividade ótima em pH mais próximo da neutralidade, que outras amiloglicosidases do gênero *Candida*, descritas na literatura.

As amiloglicosidases com atividade ótima em torno de pH 6,0 podem ser utilizadas, com pululanase de *Klebsiella* sp, para a completa conversão de amidos e dextrinas para glicose. A atividade desramificante de pululanase hidrolisa numa 1ª etapa as ligações glicosídicas α -1,6 do amido, liberando cadeias lineares de amilose, enquanto a amiloglicosidase atua de modo eficiente nas ligações glicosídicas α -1,4 do amido e amilose.

A tabela 3 ilustra o pH ótimo de atividade de amiloglicosidases produzidas por alguns microrganismos.

4.2.2. Efeito do pH na Estabilidade da Enzima

O estudo do efeito do pH na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com o item 3.2.8.2. A figura 5 mostra o efeito do pH na estabilidade da enzima. A enzima amilolítica de **Candida** sp ATCC 90238 apresentou-se mais estável na faixa de pH 4,5 a 5,5 em tampão citrato-fosfato, sendo progressivamente inativada, em pH inferiores a 4,5, após 24 horas de incubação a 55°C, na ausência de substrato.. Em comparação, a amiloglicosidase da linhagem de **Candida tsukubaensis**, estudada por De Mot et al. (12) apresentou estabilidade na faixa de pH 2,3 a 7,0 , após 24 horas de incubação a 35°C.

Wilson e Ingledew (86) verificaram que a amiloglicosidase de **Schwanniomyces alluvius** apresentava-se estável na faixa de pH 4,0 a 8,0 , após incubação a 30°C, durante 24 horas.

As amiloglicosidases I, II e III de **Aspergillus oryzae**, estudadas por Miah e Ueda (39), mostraram maior estabilidade na faixa de pH 4,0 a 7,0 , após incubação de 30 min. a 40°C.

Yamasaki et al., 1977d (90), ao estudar a amiloglicosidase I e II de **Mucor rouxianus** observavam que a amiloglicosidase I exibiu maior estabilidade na faixa de pH 4,0 a 8,0 e a amiloglicosidase II, na faixa de pH 4,0 a 7,5 , após 24 horas de incubação a 30°C.

Yamasaki et al. (87), relataram que a amiloglicosidase de **Penicillium oxalicum** mostrou-se estável na faixa de pH 3,0 a 6,5, após 20 horas de incubação a 30°C.

4.2.3. Efeito da Temperatura na Atividade Enzimática

O efeito da temperatura na atividade da enzima amilolítica de **Candida** sp foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.2.8.3. A figura 6 mostra que a enzima amilolítica de **Candida** sp ATCC 90238 apresenta atividade ótima a 60°C. Este resultado indica que a enzima mostra atividade ótima na mesma faixa de temperatura de linhagens de **Candida antarctica** e **Candida tsukubaensis** descritas na literatura. De Mot e Verachtert (15) e De Mot et al. (12), verificaram que as amiloglicosidases de **Candida antarctica**

CBS 6678 e *Candida tsukubaensis* CBS 6389 apresentaram atividade ótima a 57° e 55°C, respectivamente.

A tabela 3 mostra a temperatura ótima de atividade de amiloglicosidase de diferentes microrganismos, descritos na literatura. A maioria apresentam atividade ótima na faixa de 50° a 60°C. Entretanto, as amiloglicosidasas de *Rhizopus delemar* (58) e *Aspergillus awamori* variedade *Kawachii* (80), demonstraram possuir menor termoestabilidade, apresentando atividade ótima a 40°C.

A amiloglicosidase de *Schwanniomyces alluvius*, isolada por Wilson e Ingledew, em 1982 (86), apresentou atividade ótima à 50°C em tampão fosfato pH 5,0, após 30 minutos de reação.

Ono et al., 1988 (46), verificaram que a amiloglicosidase de *Aspergillus oryzae*, apresentava atividade ótima à 56°C em tampão acetato pH 5,0, para 20 minutos de reação.

4.2.4. Estabilidade Térmica da Amiloglicosidase de *Candida* sp

A influência da temperatura na estabilidade da amiloglicosidase foi estudada de acordo com o método 3.2.8.4. A figura 7 ilustra os resultados. A enzima amilolítica purificada de *Candida* sp ATCC 90238 não foi inativada após tratamento térmico em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,6 nas temperaturas de 30°, 40°, 45°, 50° e 55°C durante 60 minutos, na ausência do substrato. Entretanto, verificou-se que o tratamento térmico em temperaturas de 60°, 65° e 70°C, resultaram em 10%, 20% e 100% de inativação, respectivamente.

Em comparação com a literatura, De Mot et al., 1985 (12), verificaram que a amiloglicosidase purificada de *Candida tsukubaensis*, submetida a tratamento térmico na faixa de temperatura de 30°C a 70°C, em tampão MClvaine pH 4,0, demonstrou estabilidade a 30°C após 30 minutos de incubação. Apenas 15% da atividade enzimática foi mantida após 30 minutos de incubação à 50°C. E a exposição à 60°C por 5 minutos, reduziu a atividade enzimática para menos que 5% do valor inicial. Esses resultados demonstraram que a amiloglicosidase de *Candida* sp ATCC 90238 apresenta maior termoestabilidade que a amiloglicosidase de outras linhagens de *Candida* sp descritas na literatura.

Miah e Ueda (39), relataram o resultado do tratamento térmico das amiloglicosidases I, II, III, produzidas por *Aspergillus niger*, em tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 na faixa de temperatura de 20°C a 70°C. As três amiloglicosidases demonstraram resultados semelhantes, apresentando estabilidade térmica a 40°C. Quando incubada a 60°C por 30 minutos, as enzimas perderam aproximadamente 80% da atividade catalítica.

Muitas amiloglicosidases são estáveis a temperatura superiores a 40°C (39). Taylor et al. (77) verificaram que a amiloglicosidase II produzida pelo fungo *Humicola lanuginosa* mostrou-se estável após tratamento térmico da enzima em tampão citrato de sódio 0,2 M, pH 6,0 em temperaturas superiores a 50 °C durante 30 minutos. O tratamento térmico a 60° e 70°C resultou respectivamente na perda de 4 % e 50 % da atividade inicial.

A amiloglicosidase de outro fungo termofílico *Torula thermophila* apresentou-se estável após tratamento térmico a 60°C durante 1 hora. A enzima reteve 60% da atividade após aquecimento a 70°C durante 1 hora (86).

4.2.5. Determinação do Peso Molecular da Enzima

Verificou-se que a enzima amilolítica obtida após cromatografia em colunas de DEAE-celulose e CM-Celulose foi obtida na forma pura indicado pela presença de uma única banda de proteína na eletroforese em gel e o peso molecular foi estimado em 120.000 daltons, que foi consideravelmente maior, em comparação com os pesos moleculares de amiloglicosidase, produzida por outras espécies de *Candida*. De Mot et al. (12), estimaram o peso molecular da amiloglicosidase de *Candida tsukubaensis*, em 56.000, determinado pelo mesmo método utilizado no presente trabalho. E o peso molecular da amiloglicosidase de *Candida antarctica*, determinado com eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, mostrou uma única banda de proteína, e foi estimado em 48.000, por De Mot e Verachtert (15).

Yamasaki et al., 1977c (89), estimaram o peso molecular de amiloglicosidase de *Aspergillus awamori*, pelo método de SDS-PAGE, em 83.700.

Wilson e Ingledew (86), relataram que o peso molecular da amiloglicosidase de *Schwanniomyces alluvius*, estimado em 155.000, foi bem maior que o peso molecular de 81.500 da amiloglicosidase de

Lipomyces kononekoe (73), mas que se encontra na faixa de pesos moleculares de cinco formas de amiloglicosidases isoladas de **Saccharomyces diastaticus**, estimados na faixa de 98.500 a 305.000, por eletroforese em gel-SDS determinado por J. A. Erratt.

O peso molecular de duas formas de amiloglicosidase de **Mucor rouxianus** foi determinado por Tsuboi et al. (79), através de eletroforese em gel-SDS e foi estimado em 59.000 e 49.000, respectivamente.

Miah e Ueda, 1977 (39) determinaram o peso molecular de três formas de amiloglicosidase de **Aspergillus oryzae**, utilizando filtração em gel, em coluna de Sephadex G-200. Os pesos moleculares de amiloglicosidase I, II e III foram estimados em 76.000, 38.000 e 38.000 respectivamente.

Em 1985, De Mot e Verachtert (13), relataram que o peso molecular de duas formas de amiloglicosidase de **Filobasidium capsuligenum**, foi estimado em 60.000, para ambas formas através de eletroforese em gel SDS.

4.3. Estudo do Mecanismo de Ação e Especificidade da Enzima Amilolítica de **Candida** sp ATCC 90238

4.3.1. Hidrólise de Amido de Milho Gelatinizado Utilizando-se a Enzima Amilolítica de **Candida** sp

A utilização da enzima amilolítica e de **Candida** sp ATCC 90238 e de pululanase de **Klebsiella** sp n° 192, para a sacarificação de amido gelatinizado, foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.2.9.1. Os produtos da hidrólise foram analisados através da cromatografia em papel, como descrito no item 3.2.6.

A figura 9 ilustra a hidrólise de amido gelatinizado com a enzima amilolítica de levedura e o efeito da combinação enzima amilolítica de levedura e pululanase na hidrólise de amido gelatinizado. Foi observado que a hidrólise de solução de amido a 2 % e 5 % com a enzima amilolítica de **Candida** sp resulta na formação apenas de glicose.

Este resultado indica que a enzima amilolítica de **Candida** sp ATCC 90238 é uma enzima extracelular, do tipo amiloglicosidase (E.C. 3.2.1.3. α -1,4 glucano glicohidrolase), pois demonstra um mecanismo exohidrolítico de atividade. O seu modo de atuação provável é ilustrado na figura 12.

Observou-se que a adição de pululanase em conjunto com a enzima amilolítica de levedura na solução de amido gelatinizado a 2 % e 5 % aumentava a formação de glicose e reduzia a formação de maltooligossacarídeos.

Em 1967, Pazur e Okada (55) relataram que a amiloglicosidade de **R. delemar** e **Aspergillus niger** (53) atuavam através de um mecanismo de multicadeia sobre maltooligossacarídeos e amido, hidrolisando as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 em diversas cadeias ao mesmo tempo

Baker et al. (6) , relataram o mecanismo de ação de amiloglicosidase purificada de **Aspergillus niger**, sobre diversos substratos. Através da análise realizada em cromatografia em papel da hidrólise de maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentaose pela enzima, os autores sugeriram que a amiloglicosidase atuava pela degradação de todas as cadeias simultaneamente, a partir de um final não redutor.

Ueda e Kano, em 1975 (81) estudaram o efeito da pululanase sobre a hidrólise de amido gelatinizado pelas amiloglicosidases I e II de **Rhizopus** sp. Os autores observaram que não ocorria uma diferença significativa entre os resultados da hidrólise do amido pela amiloglicosidase I e II e a hidrólise do amido pelas amiloglicosidases combinadas com pululanase. E concluíram que a atividade desramificante da amiloglicosidase era suficiente para hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,6 do amido gelatinizado.

4.3.2. Hidrólise de Diversos Substratos Utilizando-se a Enzima Amilolítica de **Candida** sp

O estudo da atividade de hidrólise da amiloglicosidase de **Candida** sp para produção de glicose sobre diversos substratos, como maltose, maltotriose, pululana e amido solúvel, foi realizado como descrito no item 3.2.9.2. No estudo da hidrólise de maltose (2 %) e maltotriose (2 %) pela amiloglicosidase a 55°C por 48 horas, os produtos da hidrólise foram analisadas por cromatografia em papel descrito pelo item 3.2.6. e ilustrado pela figura 10. Com esses resultados, verificou-se que a maltotriose foi completamente hidrolisada, enquanto que a maltose foi apenas parcialmente hidrolisada a glicose pela amiloglicosidase de **Candida** sp.

No estudo da ação de amiloglicosidase de **Candida** sp sobre amido solúvel (2 %), maltose (2 %), maltotriose (2 %) e pululana (2 %), em pH 5,6 à

55°C, durante 1 hora, os produtos da hidrólise foram analisados através de HPLC, ilustrado na figura 11. A tabela 4 mostra a porcentagem de hidrólise da amiloglicosidase sobre os diversos substratos. Com esses resultados pode-se concluir que a maltotriose, com 100 % de hidrólise foi o açúcar mais eficientemente hidrolisado, seguido pelo amido solúvel com 85 % de hidrólise, enquanto que a maltotriose e a pululana foram os menos hidrolisados com 38 % e 0 % de hidrólise, respectivamente.

Estes resultados indicam que a amiloglicosidase de *Candida* sp apresenta características diferentes de amiloglicosidase de *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp; pois a literatura relata que a amiloglicosidase fúngica hidrolisa completamente a maltose a glicose (38).

Em estudos realizados com a levedura *Filobasidium capsuligenum*, por De Mot e Verachtert (13), verificou-se que a amiloglicosidase I e II produzida pelo microrganismo liberavam apenas glicose de amido solúvel, indicando a presença de um mecanismo exohidrolítico. Estas enzimas diferiram com relação a especificidade do substrato, entretanto ambas demonstraram alta atividade sobre substratos com alto peso molecular, incluindo o glicogênio. A pululana foi vagarosamente hidrolisada pelas enzimas, mas a amiloglicosidase II demonstrou maior atividade relativa sobre a pululana. A maltotriose foi melhor substrato que a maltose, especialmente para a amiloglicosidase I. Ambas as enzimas atacaram oligossacarídeos contendo ligações α -1,6 (isomaltose, panose).

Yamasaki et al. (90) verificaram que as amiloglicosidasas I e II do fungo *Mucor rouxianus* hidrolisavam quase que completamente os substratos amilopectina, amilose, glicogênio, amido solúvel, maltotriose, maltose e fenil α -maltosídeo; no entanto, não atuavam sobre isomaltose, dextrana, sacarose, fenil α -glicosídeo e metil α -glicosídeo. Apesar de ambas as enzimas hidrolisarem a maltose, a taxa de hidrólise enzimática foi muito menor em comparação com a taxa de polissacarídeos amiláceos. Ambas amiloglicosidasas convertiam facilmente moléculas de amilopectina, amilose, glicogênio e amido solúvel, quase que completamente em glicose.

De Mot e Verachtert (15) verificaram que a amiloglicosidase de *Candida antarctica* CBS 6678 hidrolisava preferencialmente substratos de alto peso molecular contendo ligações glicosídicas α -1,4. A maior atividade hidrolítica com o aumento do grau de polimerização do substrato amiláceo é também obtido com amiloglicosidasas de *Aspergillus* e *Rhizopus* (74, 3). A amiloglicosidase de *C. antarctica* hidrolisou vagarosamente ligações α -1,6, de panose, dextrana e pululana. As enzimas extracelulares desramificantes, como

a pululanase e isoamilase, não são produzidas normalmente por fungos e leveduras (13), portanto a atividade desramificante de amiloglicosidase é essencial para a utilização extensiva de amido por esses microrganismos.

Barker et al. (6), relataram a especificidade de ação da amiloglicosidase de *A. niger*. Os autores verificaram que maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose e amilose foram os melhores substratos, hidrolisados de um modo eficiente e rápido; a sacarose, a rafinose, a isomaltotetraose e a panose foram hidrolisados de modo vagaroso pela enzima; e alguns substratos não sofreram a hidrólise da enzima, como metil α -D-glicopiranosídeo, α -trehalose, isomaltose, dextrana, celobiose, melezitose e maltulose, indicando que a amiloglicosidase atua eficientemente apenas sobre ligações glicosídicas α -1,4.

4.4. Produção de Glicose

4.4.1. Produção de Glicose à Partir do Amido Liquefeito Utilizando-se Enzima Amilolítica de *Candida* sp ATCC 90238

A etapa da liquefação do amido de milho foi realizado com α -amilase de *B. licheniformis*, conforme descrito no item 3.2.10.1. Posteriormente, para a sacarificação do amido de milho liquefeito (15 %) foi utilizado a amiloglicosidase de *Candida* sp apenas e combinação com pululanase de *Klebsiella*, como descrito nos itens 3.2.10.2. e 3.2.10.3., respectivamente. Os produtos resultantes da hidrólise foram analisados através da cromatografia em papel, como descrito no item 3.2.6.

A figura 13 ilustra o perfil de carboidratos formados após 72 horas de incubação a 55°C na sacarificação de amido de milho liquefeito, utilizando-se apenas amiloglicosidase e em combinação com a pululanase. Os produtos formados resultantes da hidrólise da amiloglicosidase e pululanase foram a glicose e maltose. Observou-se também que a sacarificação do amido liquefeito realizada pela amiloglicosidase e pululanase resultava em menor formação de maltose, quando comparado com a sacarificação do amido feita apenas com amiloglicosidase. Concluiu-se também que a mistura de reação incubada à

temperatura mais elevada, como 60°C, resultava na formação de maior quantidade de maltooligossacarídeos, em detrimento da glicose.

Em 1978, Ingle e Erickson (26) relataram que a liquefação do amido realizado por α -amilases bacterianas resultavam no aumento da eficiência de enzimas sacarificantes para a produção de glicose. As α -amilases são endoamilases capazes de hidrolisar ao acaso as ligações α -D-(1,4) glicosídicas do amido, como ilustrado na figura 12.

Em 1986, Slominska e Maczynski (71) estudaram a utilização de pululanase de *Bacillus* sp com amiloglicosidase, na etapa de sacarificação de amido liqüefeito de batata. E concluíram que o rendimento de glicose aumentava de 95,8 % para 97,7 % após 72 horas de reação.

Sato, 1991 (65), verificou que a utilização de pululanase de *Klebsiella* sp na sacarificação de amido liqüefeito de milho com amiloglicosidase comercial aumentava o rendimento de glicose após 72 horas de incubação de 93,91 % para 96,96 %.

4.5. Produção de Xarope de Glucomaltose a Partir de Amido de Milho

O estudo da produção de xarope de glicose e maltose, utilizando-se amiloglicosidase de *Candida* sp ATCC 90238, na etapa de sacarificação de amido liqüefeito está descrito no item 3.2.10.2. A sacarificação de amido de milho liqüefeito realizada com amiloglicosidase de *Candida* sp e pululanase de *Klebsiella* sp está descrito no item 3.2.10.3. Os produtos de hidrólise do amido liqüefeito e da etapa de sacarificação foram quantificados através de HPLC, como descrito no item 3.2.7. e ilustrado pelas figuras 14, 15, 16 e 17.

A figura 14 ilustra o perfil de carboidratos formados após a liquefação do amido de milho, com α -amilase *Bacillus licheniformis*, em pH 6,0, à 90°C, como descrito pelo item 3.2.10.1. A tabela 5 mostra os resultados da análise de carboidratos em HPLC, de amido liqüefeito. Verificou-se a formação de 26,0 mg de glicose / ml e 16,0 mg de maltose / ml de solução. Os carboidratos com peso molecular maiores que a maltose não foram quantificados.

A figura 15 ilustra o perfil de carboidratos produzidos após 72 horas de sacarificação de amido de milho liqüefeito, com amiloglicosidase apenas (A) e amiloglicosidase combinada com pululanase (B) em pH 5,6 à 50°C. A tabela 6 mostra os resultados da análise quantitativa (mg de açúcares / ml) de

carboidratos em HPLC, da sacarificação de milho liqüefeito com a amiloglicosidase e pululanase em pH 5,6, a diferentes temperaturas.

Com a sacarificação de solução de amido de milho liqüefeito, contendo 15 % de amido em peso seco, utilizando apenas amiloglicosidase, foi obtido 69,0 % de rendimento de glicose e 15,0 % de rendimento de maltose, como mostrado pela tabela 7. Em comparação com a sacarificação de amido de milho liqüefeito com amiloglicosidase e pululanase, verificou-se aumento no rendimento da glicose para 76,0 % e redução da maltose para 9,0 %. Os carboidratos foram identificados pela comparação com o tempo de retenção de açúcares padrões. Os açúcares padrões glicose e maltose apresentaram tempos de retenção 4,37 e 5,45 minutos, respectivamente. Neste experimento, os carboidratos de peso molecular maiores que a maltose não foram identificados.

A figura 16 ilustra o perfil de carboidratos produzidos após 72 horas de sacarificação de amido de milho, com amiloglicosidase apenas (A) e amiloglicosidase e pululanase (B), em pH 5,6 à 55°C. Na sacarificação de solução de amido liqüefeito de milho, contendo 15 % de amido em peso seco, foi obtido 57,0 % de rendimento de glicose e 24,0 % de rendimento de maltose, em pH 5,6 à 55°C, utilizando apenas amiloglicosidase de *Candida* sp. Em comparação com a sacarificação de amido de milho liqüefeito, contendo 15 % de amido em peso seco, com amiloglicosidase e pululanase observou-se um aumento no rendimento de glicose para 71,0 % e redução no rendimento da maltose para 21,0 %. Os açúcares foram identificados pela metodologia descrita acima.

A figura 17 ilustra o perfil de carboidratos produzidos após 72 horas de sacarificação de amido de milho, com amiloglicosidase apenas (A) e amiloglicosidase e pululanase (B), em pH 5,6 a 60°C. Com a sacarificação de solução de amido liqüefeito de milho, contendo 15 % de amido em peso seco, com a amiloglicosidase de *Candida* sp apenas, foi obtido 50,0 % de rendimento de glicose; 30,0 % de rendimento de maltose e 3,0 % de rendimento de maltotriose. Comparando-se com a sacarificação de amido de milho liqüefeito, contendo 15 % de amido em peso seco, utilizando-se amiloglicosidase combinada com pululanase, verificou-se um pequeno aumento no rendimento de glicose para 57,0 % apenas, e também um aumento no rendimento de maltose para 40,0 %, permanecendo 3,0 % de rendimento de maltotriose.

De acordo com os resultados descritos acima observou-se que as reações submetidas a temperaturas mais altas como 60°C resultavam em um aumento característico na produção da maltose e redução na produção de glicose pela enzima amilolítica de *Candida* sp e que a combinação da

amiloglicosidase com a pululanase de *Klebsiella* sp resultavam no aumento da produção de glicose. Com esses resultados pode-se concluir que o aumento da produção da glicose é devido a atuação da ação desramificante da pululanase sobre os maltooligosacarídeos e que o aumento da temperatura favoreceu a atuação da enzima para produção de mistura de glucomaltose.

MacAllister, 1979 (36), relatou que o amido pode ser convertido à níveis excepcionalmente altos de D-glicose pelo uso de enzimas desramificantes em combinação com a enzima amiloglicosidase, o que está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

Enevoldsen (17) verificou que os produtos formados pela ação da enzima desramificante pululanase (E.C. 3.2.4.1., pululana 6 glucanohidrolase), em dextrinas ramificadas são: os açúcares fermentecíveis, maltose e maltotriose e uma série de dextrinas lineares.

Os xaropes de glicose tem grande aplicação em confeitaria, panificação e na produção de geléias, conservas, bebidas carbonatadas e fermentadas (65). Entretanto nos últimos anos tem-se destacado a produção comercial do xarope de maltose, devido as suas propriedades fisico-químicas. Xaropes com alta concentração de maltose apresentam características muito interessantes para a indústria de alimentos, como resistência a formação de cor, reduzida higroscopicidade e cristalização. A fermentabilidade do xarope de maltose é muito apropriado para a indústria de panificação e fermentação.

TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos produtores de amiloglicosidase

Tipo	Microrganismo	Referência
Bactéria	Halobacterium sodomense	Oren, 1983 citado por Rehm e Reed, 1987
	Clostridium thermohydrosulfuricum	Hyum et al., 1985
	Clostridium sp	Ohnishi et al., 1991
Fungo	Aspergillus awamori	Gerhartz, 1990
	Aspergillus niger	Gerhartz, 1990; Lineback et al., 1969
	Aspergillus phoenicis staly 155	Lineback e Baumann, 1970
	Aspergillussaitoi	Takahashi et al., 1981
	Aspergillus oryzae	Miah e Ueda, 1977
	Corticium rolfsii	Takao et al., 1986
	Humicola lanuginosa	Taylor et al., 1978
	Mucor rouxianus	Yamasaki et al., 1977
	Neurospora crassa	Murayama e Ishikawa, 1973
	Rhizopus delemar	Phillips e Caldwell, 1951
	Rhizopus javanicus	Watanabe e Fukimbara, 1973
Rhizopus niveus	Gerhartz, 1990	
Talaromyces sp	Tamura et al., 1981 citado por Rehm e Reed, 1987	
Levedura	Candida antarctica	De Mot e Verachtert, 1987
	Candida tsukubaensis	De Mot et al., 1985
	Filobasidium capsuligenum	De Mot e Verachtert, 1985
	Lipomyces kononenkoae	Spencer-Martins e Van Uden, 1979
	Saccharomyces diastaticus	Searle e Tubb, 1981
	Schwanniomyces alluvius	Wilson e Ingledeu, 1982
	Schwanniomyces diastaticus	Rehm e Reed, 1987
	Trichosporon pullulans	De Mot e Verachtert, 1986

Tabela 2 - Purificação da enzima amilolítica de *Candida sp* ATCC 90238.

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	750,0	0,6	450,0	12,0	0,05	1,0	100
Fracionamento com sulfato de amônio	120,0	2,6	312,0	5,0	0,52	10,4	69
Cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex	160,0	0,86	138,0	0,4	2,15	43,0	31
Cromatografia em coluna de CM-Celulose	156,0	0,2	31,0	0,1	2,0	40,0	7

Tabela 3. Características de amiloglicosidase de diversos microrganismos em relação a pH ótimo e temperatura ótima de atividade.

Microrganismo	pH Ótimo de Atividade	Temperatura. Ótima de Atividade °C
<i>Candida antarctica</i> CBS 6678 (15)	4,2	57
<i>Candida tsukubaensis</i> CBS 6389 (12)	2,4 - 4,8	55
<i>Schwanniomyces alluvius</i> (86)	5,0	50
<i>Aspergillus phoenicis</i> Staly 155 (33)	4,6	60
<i>Lipomyces kononenkoae</i> (73)	4,5	50
<i>Corticium rolfsii</i> AHU 9627 (75)	4,0	65
<i>Clostridium</i> sp 60005 (31)	4,5	60
<i>Aspergillus awamori</i> (89)	3,0 - 5,0	55 - 65
<i>Aspergillus niger</i> (22, 32)	4,5 - 5,0	55 - 60
<i>Rhizopus delemar</i> (58)	4,5	40
<i>Rhizopus niveus</i> (22)	3,0 - 5,5	55 - 60
<i>Aspergillus awamori</i> var. Kawachi (80)	4,0	40
<i>Aspergillus oryzae</i> (39)	4,5 - 5	40 - 60
<i>Trichosporon pullulans</i> (14)	5,4	55
<i>Filobasidium capsuligenum</i> (13)	4,8 - 5,6	50 - 55

Tabela 4. Estudo sobre hidrólise de vários substratos pela enzima amilolítica purificada de *Candida sp* ATCC 90238.

Substrato	Formação de Glicose ($\mu\text{g/mL}$)	% Hidrólise
Amido	3400	85
Maltose	1550	38
Maltotriose	4040	100
Pululana	0	0

Tabela 5 - Resultados da análise de carboidratos através de HPLC, de solução 15% de amido liquefeito com α -amilase de **Bacillus licheniformis**, pH 6,0 a 90°C.

Amostra	Carboidratos mg / ml	
	G ₁	G ₂
Amido de Milho Liquefeito	26,0	16,0

G₁ - Glicose

G₂ - Maltose

Tabela 6 - Resultados da análise de carboidratos através de HPLC, após a sacarificação de amido de milho liquefeito com amiloglicosidase de *Candida* sp ATCC 90238 e pululanase de *Klebsiella* sp N° 192, pH 5,6 a diferentes temperaturas.

Temperatura de Reação °C		Carboidratos mg / ml	
		Amiloglicosidase ¹	Amiloglicosidase e pululanase ²
50	G ₁	103,0	114,0
	G ₂	22,0	13,0
55	G ₁	85,0	106,0
	G ₂	37,0	31,0
60	G ₁	75,0	88,0
	G ₂	46,0	58,0
	G ₃	4,0	5,0

1 - Mistura de reação obtida após 72 horas de sacarificação de amido liquefeito com amiloglicosidase.

2 - Mistura de reação obtida após 72 horas de sacarificação de amido liquefeito com amiloglicosidase e pululanase.

G₁ - Glicose

G₂ - Maltose

G₃ - Maltotriose

Tabela 7- Porcentagem de açúcares resultantes da sacarificação do amido de milho liquefeito com amiloglicosidase de *Candida* sp ATCC 90238 e pululanase de *Klebsiella* sp N°192.

Temperatura de Reação °C		% Açúcares (HPLC)	
		Amiloglicosidase	Amiloglicosidase e Pululanase
50	G ₁	69,0	76,0
	G ₂	15,0	9,0
55	G ₁	57,0	71,0
	G ₂	24,0	21,0
60	G ₁	50,0	57,0
	G ₂	30,0	40,0
	G ₃	3,0	3,0

1 - O cálculo dos açúcares de amido liquefeito foi baseado no peso de amido seco.

2 - Os carboidratos presentes na mistura de reação foram analisados através de HPLC, após 72 horas de incubação.

G₁ = Glicose

G₂ = Maltose

G₃ = Maltotriose

FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de Produção e Purificação de Enzima Amilolítica de Candida sp.

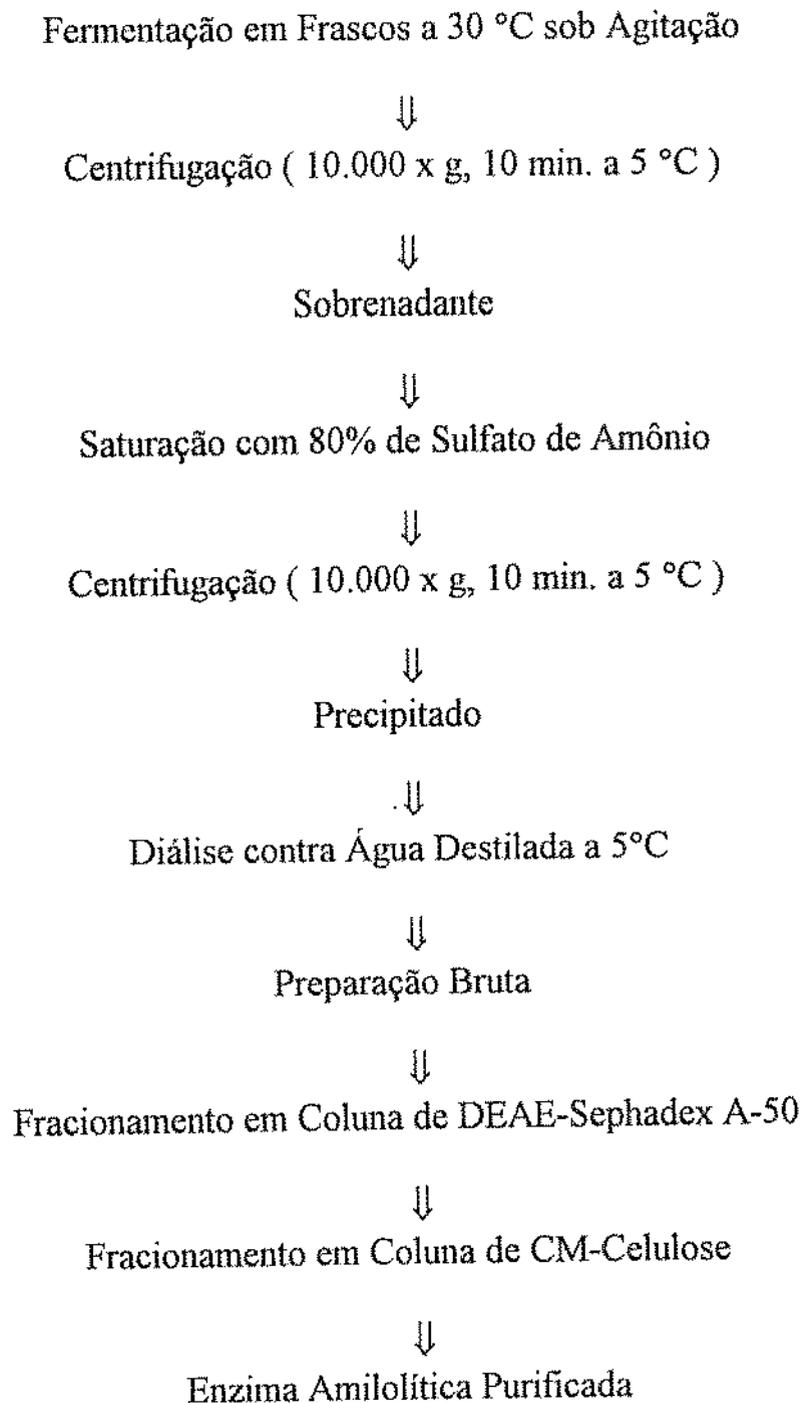


Figura 2 - Cromatografia de enzima amilolítica de Candida sp em coluna de DEAE-Sephadex A-50.

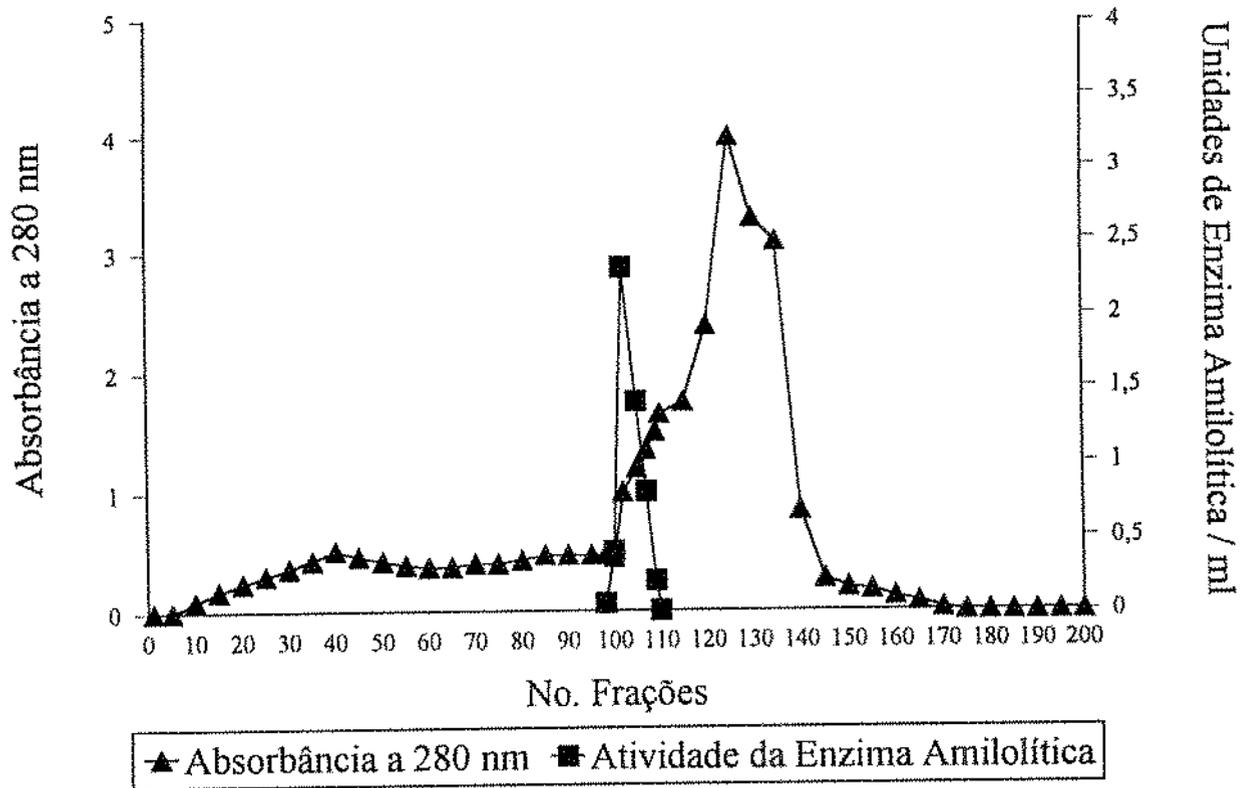


Figura 3 - Cromatografia de enzima amilolítica de *Candida* sp, em coluna de CM-Celulose.

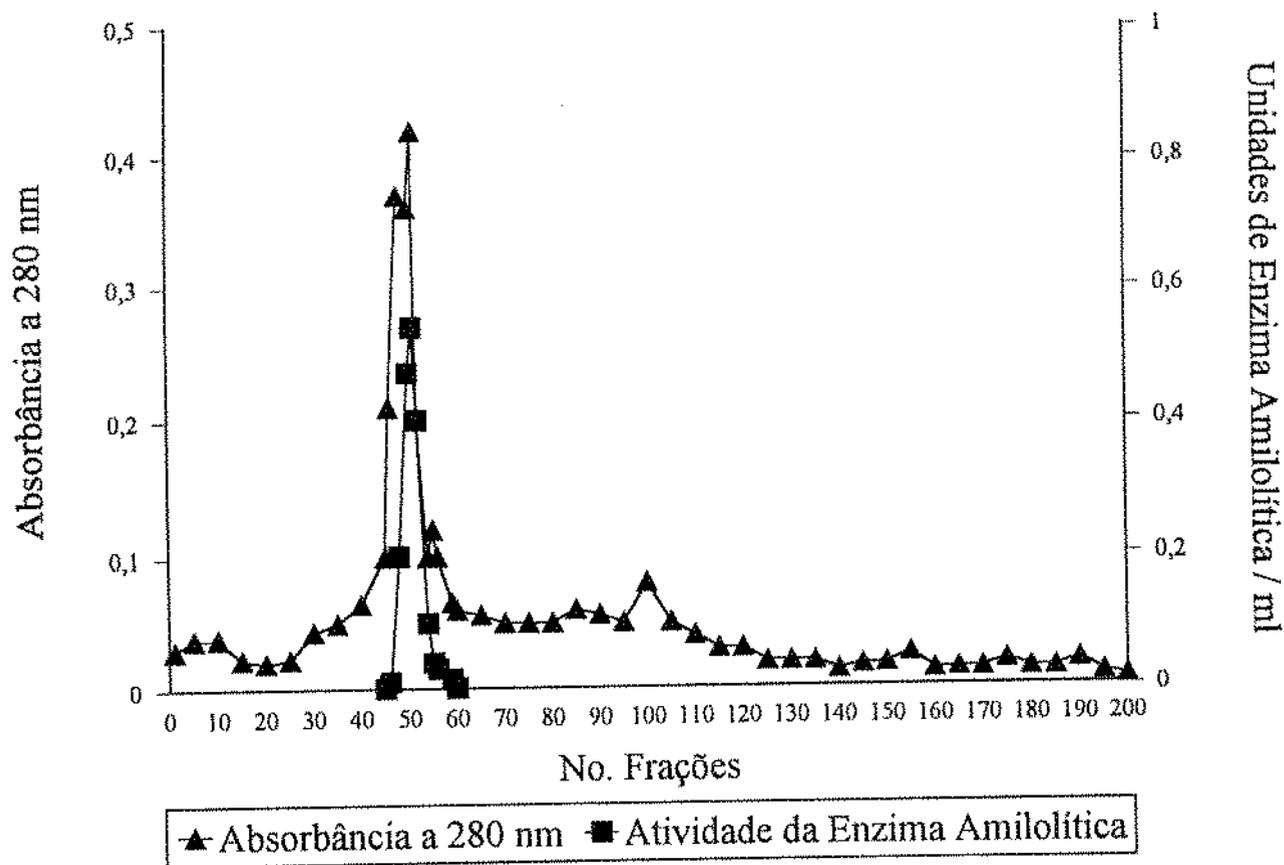


Figura 4 - Efeito do pH na atividade de enzima amilolítica de Candida sp.

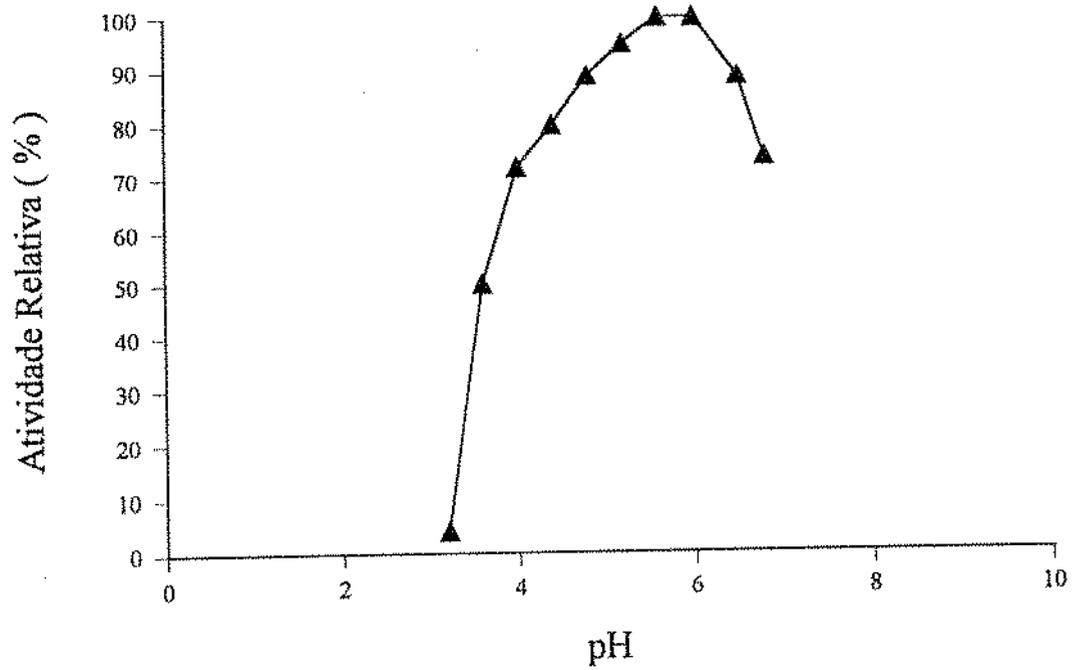


Figura 5 - Efeito do pH na estabilidade de enzima amilolítica de Candida sp.

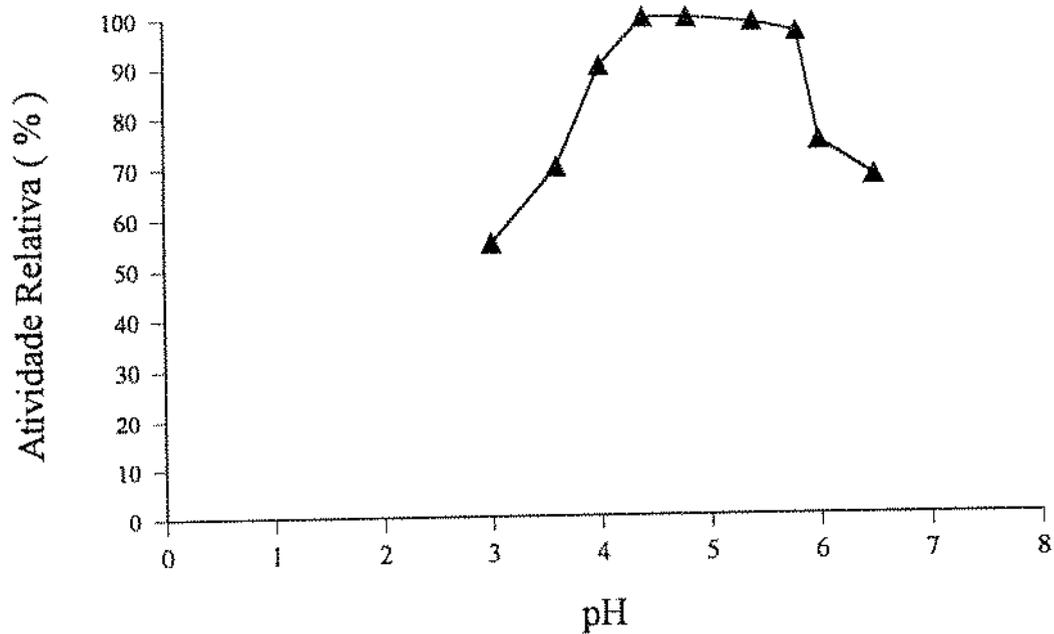


Figura 6 - Efeito da temperatura na atividade de enzima amilolítica de Candida sp.

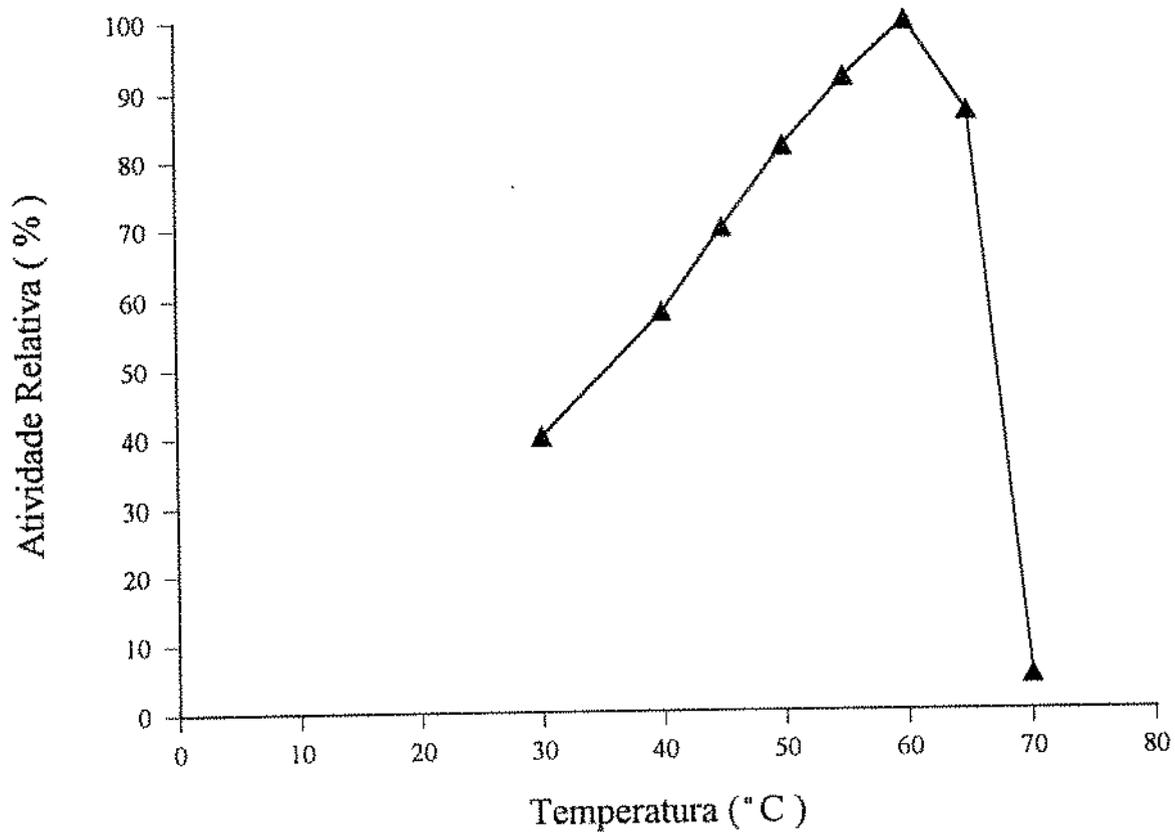


Figura 7 - Efeito da temperatura na estabilidade de enzima amilolítica de Candida sp.

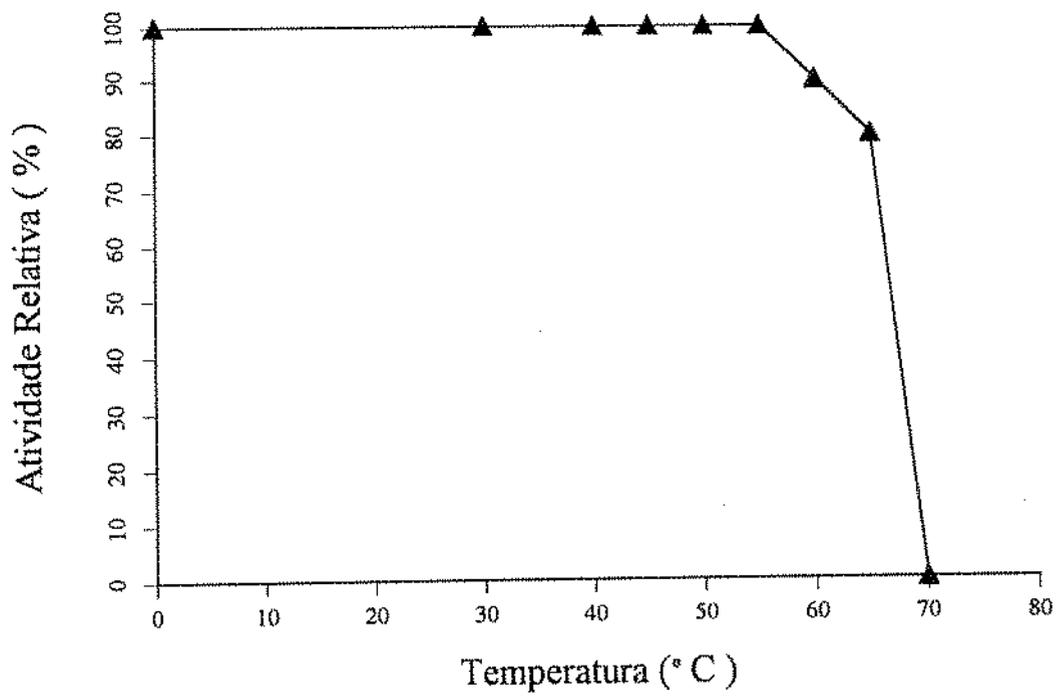
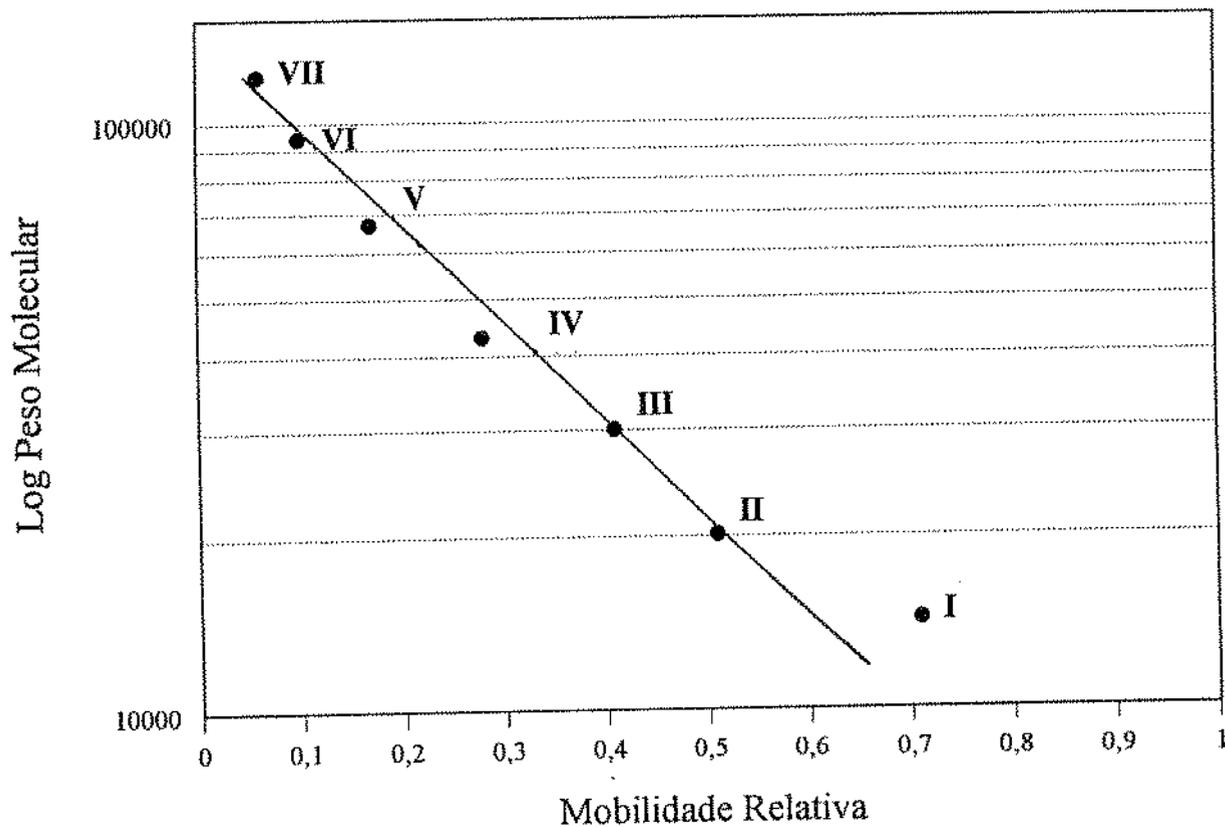
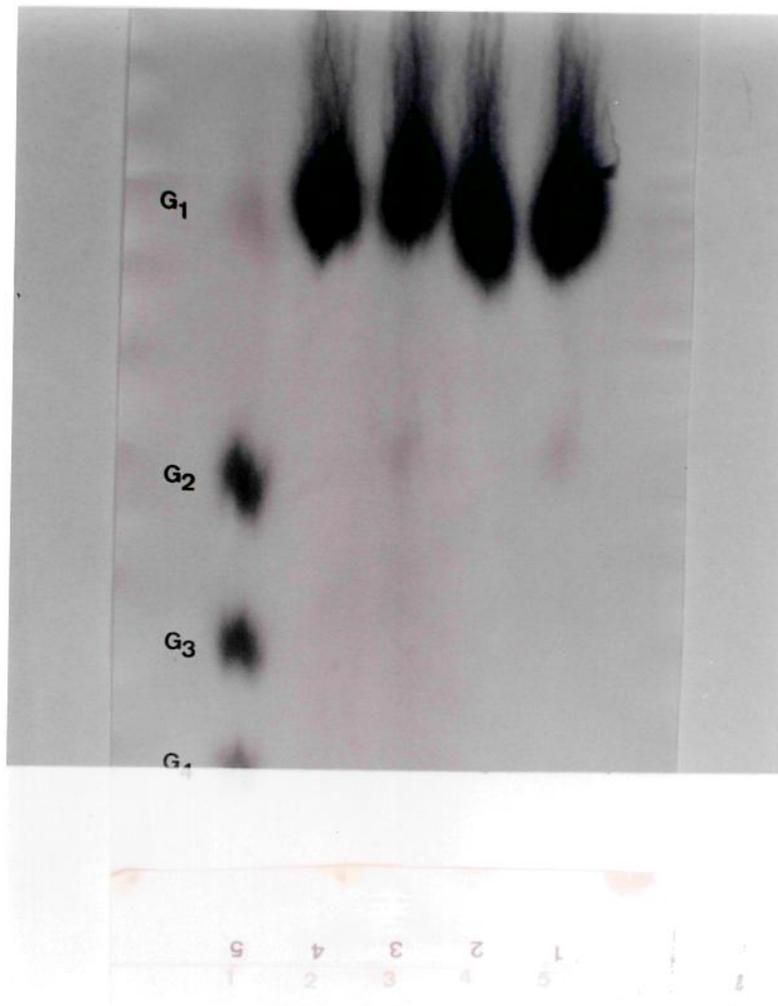


Figura 8 - Determinação do peso molecular da amiloglicosidase de *Candida* sp ATCC 90238, com eletroforese SDS-PAGE.



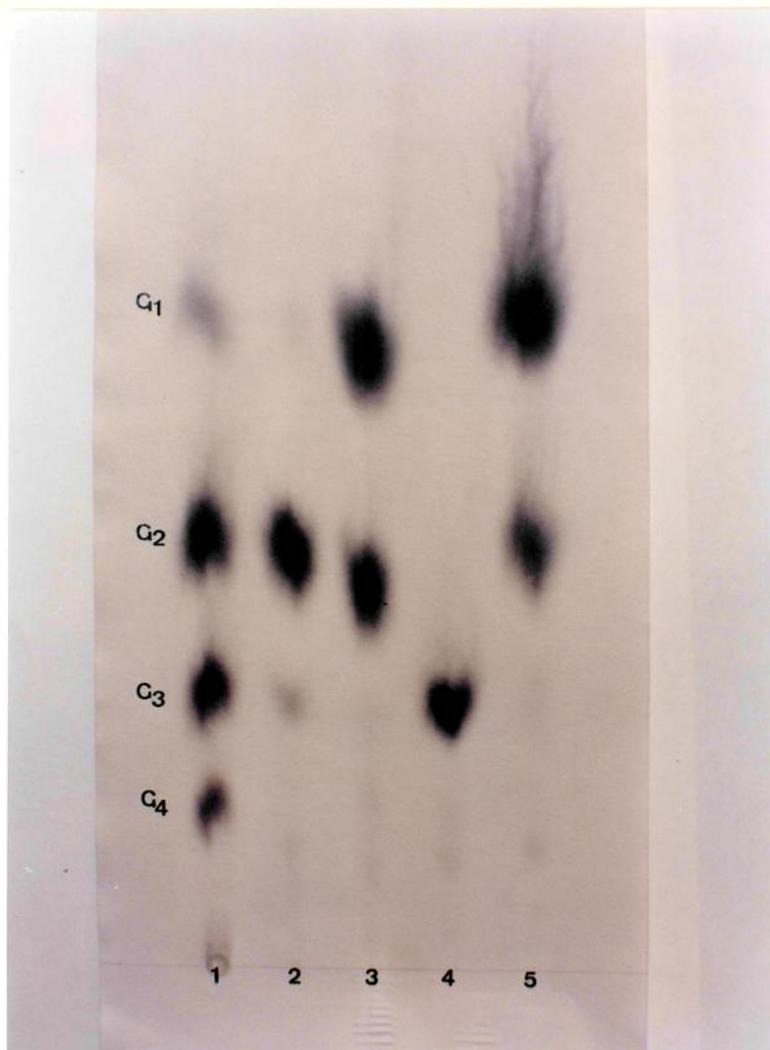
- I - α -lactoalbumina
- II - Inibidor de Tripsina
- III - Anidrase Carbônica
- IV - Ovoalbumina
- V - Albumina de Soro Bovino
- VI - Fosforilase B
- VII - Amiloglicosidase de *Candida* sp

Figura 9 - Sacarificação de Amido Gelatinizado Utilizando-se Enzima Amilolítica de **Candida** sp e Pululanase de **Klebsiella** sp, em pH 5,6 a 55°C Após 24 Horas de Incubação.



- 1 - Açúcares Padrões: G1 = Glicose
G2 = Maltose
G3 = Maltotriose
G4 = Maltotetraose
- 2 - Sacarificação de Amido de Milho 2% com a Enzima Amilolítica de **Candida** sp.
- 3 - Sacarificação de Amido de Milho 2% com a Enzima Amilolítica de **Candida** sp e Pululanase.
- 4 - Sacarificação de Amido de Milho 5% com a Enzima Amilolítica de **Candida** sp.
- 5 - Sacarificação de amido de Milho 5% com a Enzima Amilolítica de **Candida** sp e Pululanase.

Figura 10 - Hidrólise de Maltose e Maltotriose pela enzima Amilolítica de **Candida** sp em pH 5,6 a 55°C, Após 48 Horas de Incubação.



1 - Açúcares Padrões: G1 = Glicose

G2 = Maltose

G3 = Maltotriose

G4 = Maltotetraose

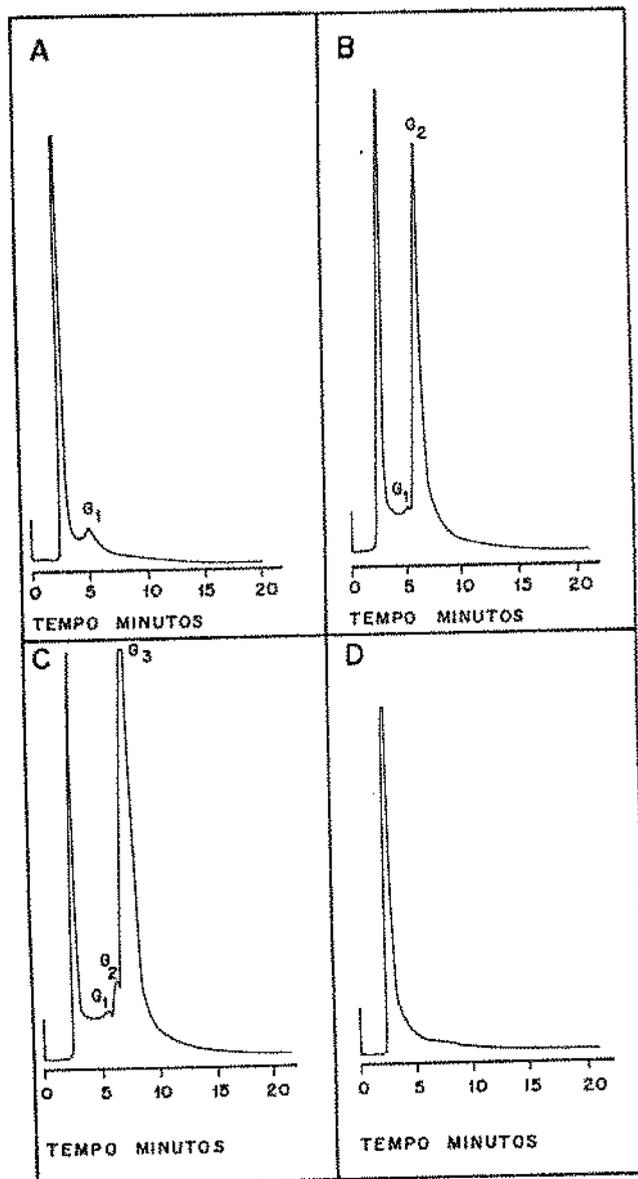
2 - Maltose com a Enzima Amilolítica de **Candida** sp no Tempo Zero.

3 - Maltose com a Enzima Amilolítica de **Candida** sp Após 48 Horas de Reação.

4 - Maltotriose com a Enzima Amilolítica de **Candida** sp no Tempo Zero.

5 - Maltotriose com a Enzima Amilolítica de **Candida** sp Após 48 Horas de Reação.

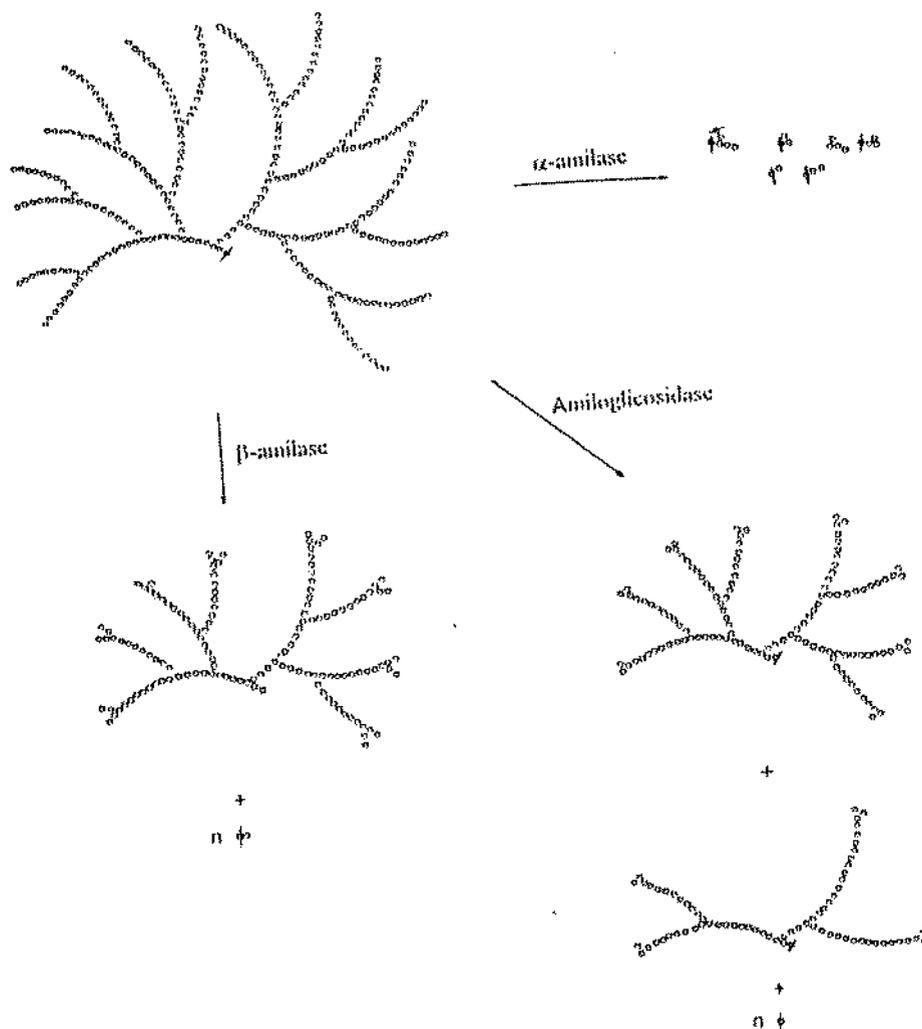
Figura 11 - Cromatogramas Ilustrando os Açúcares Produzidos Após a Hidrólise de Vários Substratos pela Enzima Amilolítica de *Candida* sp, em pH 5,6 a 55°C, durante 1 hora.



- A - Amido Solúvel 2%
- B - Maltose 2%
- C - Maltotriose 2%
- D - Pululana 2%

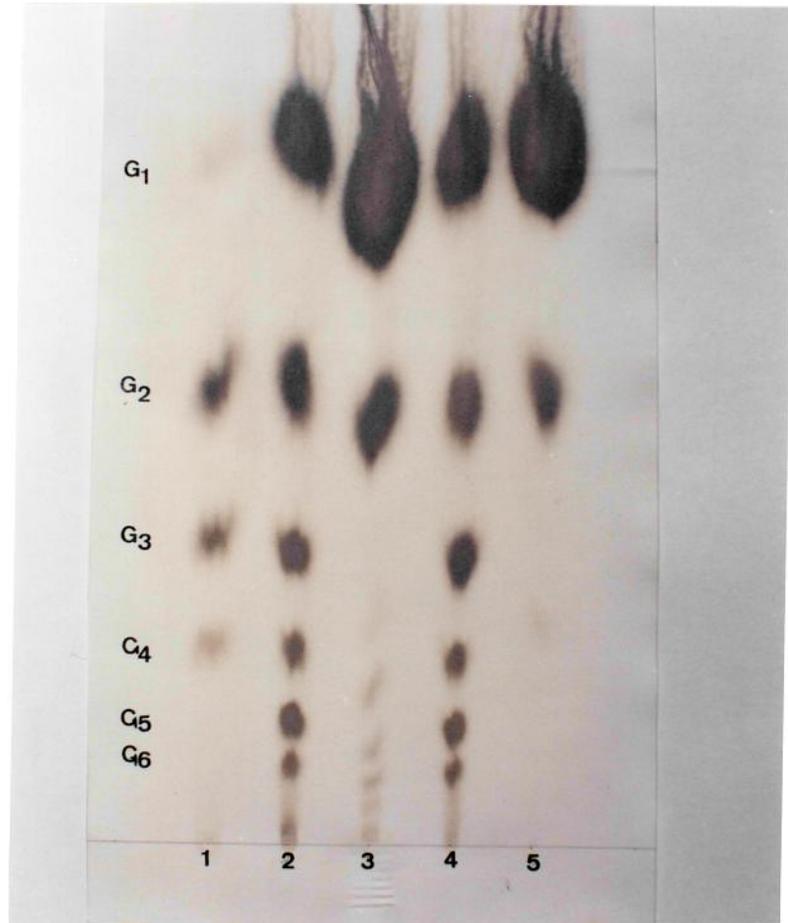
G₁ = Glicose
G₂ = Maltose

Figura 12 - Representação Esquemática da Ação de Enzimas Amilolíticas α -amilase, β -amilase e Amiloglicosidase Sobre a Estrutura de Amilopectina.



- 1 - O círculo representa a unidade de D-glicose.
- 2 - ϕ - representa a unidade de D-glicose redutora.
- 3 - A α -amilase hidrolisa a amilopectina produzindo oligossacarídeos contendo de dois a seis monômeros de glicose. Algumas α -amilases podem liberar fragmentos maiores.
- 4 - A β -amilase hidrolisa cada cadeia de amilopectina produzindo maltose até encontrar uma ligação glicosídica α -1,6.
- 5 - A amiloglicosidase hidrolisa preferencialmente ligações glicosídicas α -1,4 liberando glicose, mas pode hidrolisar ligações glicosídicas α -1,6 com menor velocidade

Figura 13 - Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito Utilizando-se a Enzima Amilolítica de **Candida** sp e Pululanase de **Klebsiella** sp, em pH 5,6, a 55°C, Após 72 Horas de Incubação.



1 - Açúcares Padrões:

- G₁ = Glicose
- G₂ = Maltose
- G₃ = Maltotriose
- G₄ = Maltotetraose
- G₅ = Maltopentaose
- G₆ = Maltohexaose

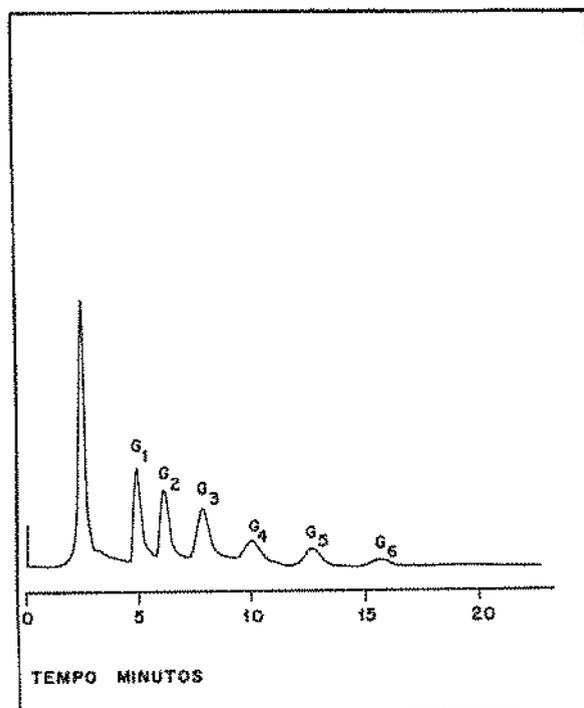
2 - Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito com a Enzima Amilolítica de **Candida** sp, Tempo Zero.

3 - Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito com a Enzima Amilolítica de **Candida** sp, Após 72 Horas.

4 - Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito com a Enzima Amilolítica de **Candida** sp e Pululanase, Tempo Zero.

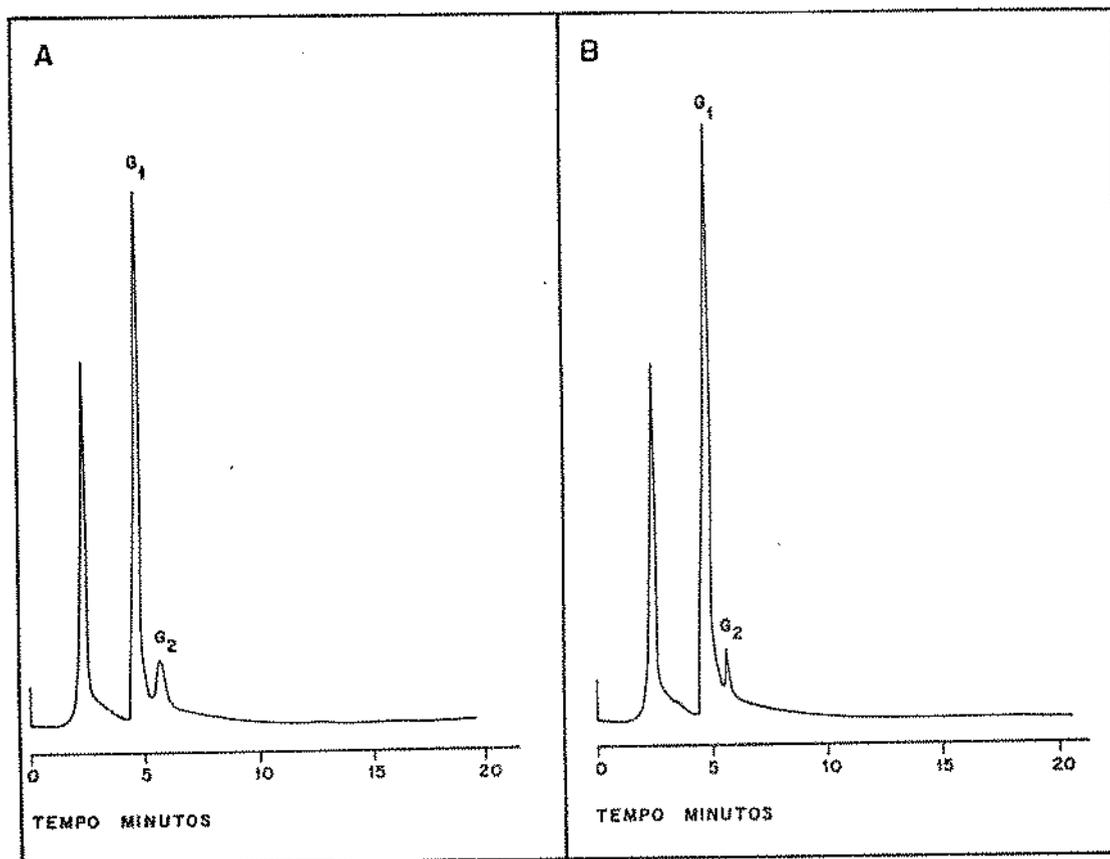
5 - Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito com a Enzima Amilolítica de **Candida** sp e Pululanase, Após 72 Horas.

Figura 14 - Cromatograma Ilustrando o Perfil de Carboidratos Produzidos pela Liquefação de Amido de Milho com α -amilase de *B. licheniformis*, em pH 6,0 a 90°C.



- G₁ = Glicose
- G₂ = Maltose
- G₃ = Maltotriose
- G₄ = Maltotetraose
- G₅ = Maltopentaose
- G₆ = Maltohexaose

Figura 15 - Cromatogramas Ilustrando o Perfil de Carboidratos Produzidos Após a Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito com a Enzima Amilolítica de *Candida* sp e Pululanase de *Klebsiella* sp, em pH 5,6 a 50°C, durante 72 Horas.



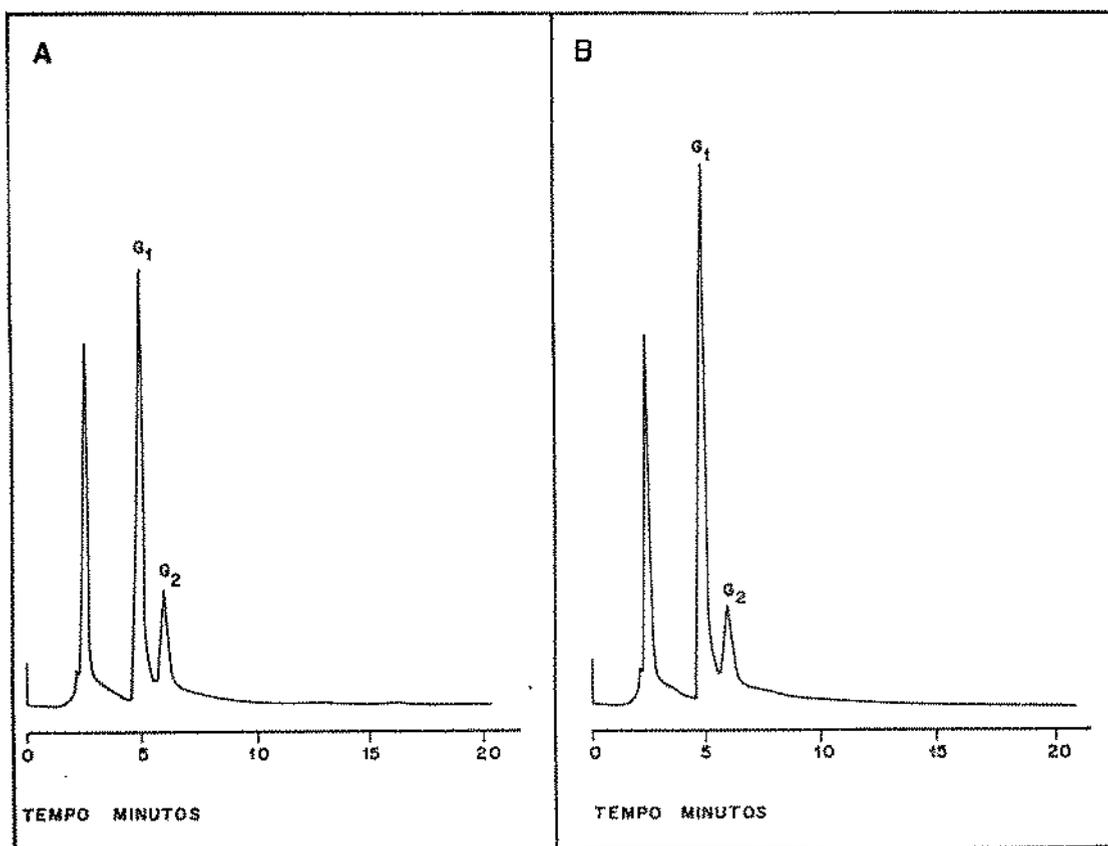
A - Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito Utilizando-se a Enzima Amilolítica de *Candida* sp.

B - Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito Utilizando-se a Enzima Amilolítica de *Candida* sp e Pululanase.

G₁ = Glicose

G₂ = Maltose

Figura 16 - Cromatogramas Ilustrando o Perfil de Carboidratos Produzidos Após a Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito com a Enzima Amilolítica de *Candida* sp e Pululanase de *Klebsiella* sp, em pH 5,6 a 55°C, durante 72 Horas.

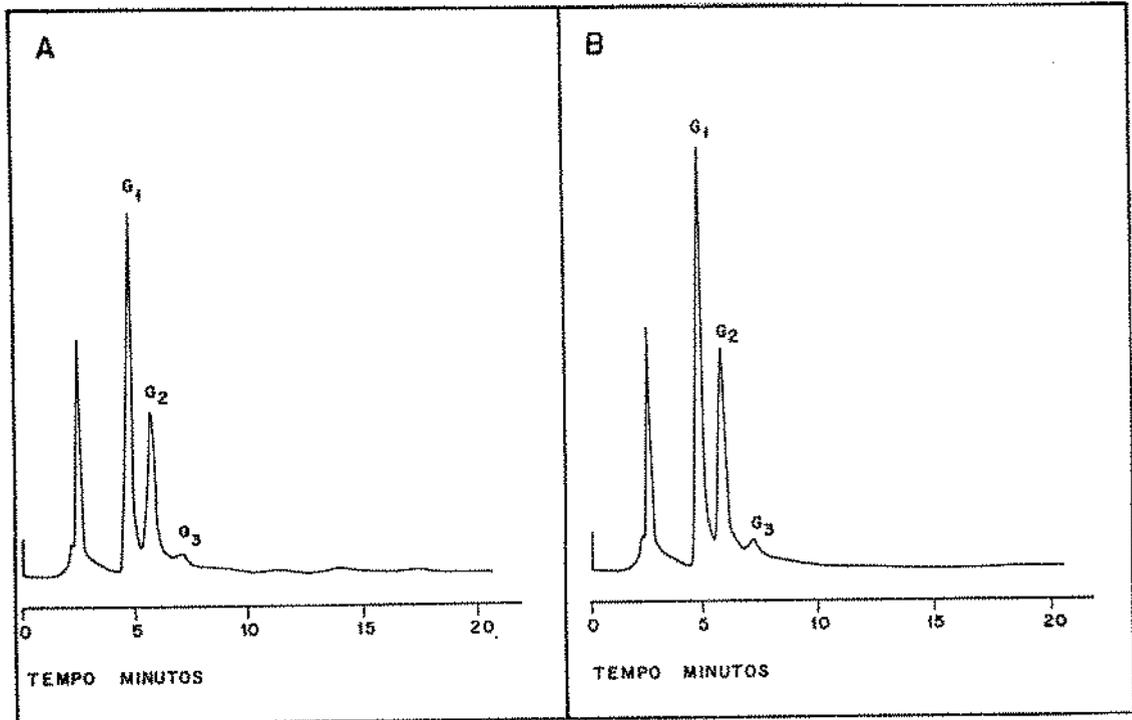


A - Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito Utilizando-se a Enzima Amilolítica de *Candida* sp.

B - Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito Utilizando-se a Enzima Amilolítica de *Candida* sp e Pululanase.

G₁ = Glicose
G₂ = Maltose

Figura 17 - Cromatogramas Ilustrando o Perfil de Carboidratos Produzidos Após a Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito com a Enzima Amilolítica de *Candida* sp e Pululanase de *Klebsiella* sp, em pH 5,6 a 60°C, durante 72 Horas.



A - Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito Utilizando-se a Enzima Amilolítica de *Candida* sp.

B - Sacarificação de Amido de Milho Liquefeito Utilizando-se a Enzima Amilolítica de *Candida* sp e Pululanase.

G₁ = Glicose
G₂ = Maltose
G₃ = Maltotriose

5 - CONCLUSÕES

5.1. A enzima amilolítica de **Candida** sp ATCC 90238 é uma amiloglicosidase (α 1,4 glucano glicohidrolase, E.C.3.2.1.3.), produzida de forma extracelular, que hidrolisa ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 de amido e produtos de degradação. A amiloglicosidase de **Candida** sp hidrolisa o amido a partir do final não redutor, liberando moléculas de glicose.

5.2. A amiloglicosidase purificada através de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex e CM-Celulose apresenta atividade ótima em tampão citrato-fosfato pH 5,6 a 55° - 60°C. A enzima é termoestável a temperaturas inferiores a 60°C. O aquecimento da enzima purificada em tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 5,6 a 30°; 40°; 45°; 50°; 55° e 60°C durante 1 hora, na ausência de substrato, resultaram em 0%; 0%; 0%; 0% e 10% de inativação respectivamente.

5.3 A amiloglicosidase purificada e caracterizada quanto ao seu peso molecular indicou a presença de uma única banda de proteína na eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e o peso molecular foi estimado em 120.000 daltons.

5.4. A sacarificação de solução de amido de milho gelatinizado contendo 2% e 5% de amido em peso seco, utilizando-se a amiloglicosidase purificada de **Candida** sp, em pH 5,6 a 55°C resulta na produção de glicose como produto final, demonstrado por cromatografia em papel, após 24 horas de incubação.

5.5. A sacarificação de solução de amido de milho liquefeito, contendo 15% de amido em peso seco, utilizando-se a amiloglicosidase purificada de **Candida** sp, em pH 5.6 a 55°C, resulta no aparecimento de glicose e maltose como produto final, demonstrado por cromatografia em papel.

5.6. A hidrólise de solução 2% de maltose e 2% de maltotriose pela ação de amiloglicosidase purificada de **Candida** sp mostra através de cromatografia em papel que a maltotriose é completamente hidrolisada, enquanto que a maltose é apenas parcialmente hidrolisada à glicose pela enzima.

5.7. A hidrólise de solução de 2% de amido solúvel, 2% de maltotriose, 2% de maltose e 2% de pululana pela ação da amiloglicosidase purificada de **Candida** sp resulta em 85%; 100% 38% e 0% de conversão para glicose, respectivamente.

5.8. Na sacarificação de solução de amido de milho contendo 15% de amido em peso seco, utilizando-se amiloglicosidase de **Candida** sp, em pH 5,6, a 50°C, obteve-se rendimento de 69,0% de glicose e 15% de maltose, após 72 horas de incubação.

5.9. Na sacarificação de solução de amido de milho contendo 15% de amido em peso seco, utilizando-se a amiloglicosidase de **Candida** sp e pululanase de **Klebsiella** sp, em pH 5,6, a 50°C, obteve-se rendimento de 76,0% de glicose e 9,0% de maltose, após 72 horas de incubação.

5.10. Na sacarificação de solução de amido de milho contendo 15% de amido em peso seco, utilizando-se amiloglicosidase de **Candida** sp, em pH 5,6, a 55°C, obteve-se rendimento de 57,0% de glicose e 24,0% de maltose, após 72 horas de incubação.

5.11. Na sacarificação de solução de amido de milho contendo 15% de amido em peso seco, utilizando-se a amiloglicosidase de **Candida** sp e pululanase de **Klebsiella** sp, em pH 5,6, a 55°C, obteve-se rendimento de 71,0% de glicose e 21,0% de maltose, após 72 horas de incubação.

5.12. Na sacarificação de solução de amido de milho contendo 15% de amido em peso seco, utilizando-se amiloglicosidase de **Candida** sp, em pH 5,6, a 60°C, obteve-se rendimento de 50,0% de glicose, 30,0% de maltose e 3,0% de maltotriose, após 72 horas de incubação.

5.13. Na sacarificação de solução de amido de milho contendo 15% de amido em peso seco, utilizando-se a amiloglicosidase de **Candida** sp e pululanase de **Klebsiella** sp, em pH 5,6, a 60°C, obteve-se rendimento de 57,0% de glicose, 40,0% de maltose e 3,0% de maltotriose, após 72 horas de incubação.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDULLAH, M.; FRENCH, D. Reversible action of pullulanase. *Nature*, 9 (210): 200, 1966.
2. ABDULLAH, M.; FRENCH, D. Substrate specificity of pullulanase. *Arch. Bioch. Biophys.*, 137: 483-493, 1970.
3. ABE, J.; NAGANO, H.; HIZUKURI. Kinetic and structural properties of the three forms of glucoamylase of **Rhizopus delemar**. *J. Appl. Biochem*, 7: 235-247, 1985.
4. ALI, S.; HOSSAIN, Z.; MAHMOOD, S.; ALAM, R. Purification of glucoamylase from **Aspergillus terreus**. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 6: 431-433, 1990.
5. ALLEN, W. G.; DAWSON, H. G. Technology and uses of debranching enzymes. *Food Technol.*, 29 (5): 70-80, 1975.
6. BARKER, S. A; BOURNE, E. J., ; FLEETWOOD, J.G.. Studies on **Aspergillus niger**. Part IX. The mechanism of glucamylase action. *J. Amer. Chem. Soc.*, 4865-4871, 1957 .
7. BASUKI, W.; IIZUKA, M.; FURUICHI, K.; MINAMIURA, N.; KOMAKI, T.; YAMAMOTO, T. Comparison of the enzymatic isomerization of glucose produced by porcine serum α -glucosidase and **Rhizopus** glucoamylase. *Agric. Biol. Chem.*, 53 (12): 3341-3342, 1989.
8. CHIBA, S.; KIMURA, A.; MATSUI, H. Quantitative study of anomeric-forms of glucose produced by α -glucosidases and glucoamylases. *Agric. Biol. Chem.*, 47 (8): 1741-1746, 1983.
9. CLEMENTI, F.; ROSSI, J; COSTAMAGNA, L ; ROSI, J. Production of amylase (s) by **Schwanniomyces castelii** and **Endomycopsis fibuligera**. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 46 : 399-405, 1980.
10. CORMAN, J. ; LANGLYKKE, A. F. Action of mold enzymes in starch saccharification. *Cereal chemistry* ,25 : 190-201, 1948.

11. De MOT, R.; VAN DUDENDIJK, E.; VERACHTERT, H. Production of extracellular debranching activity by amylolytic yeast. *Biotechnol. Letters*, 6 (9): 581-586, 1984.
12. De MOT, R.; VAN OUDENDIJK, ; e VERACHTERT, H. , Purification and characterization of an extracellular glucoamylase from the yeast **Candida tsukubaensis** CBS 6389. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 51: 275-287,1985b.
13. De MOT, R ; VERACHTERT, H. Purification and Characterization of extracellular amylolytic enzymes from the yeast **Filobasidium capsuligenum.**, *Appl. Environm. Microbiol.*, 50 (6) : 1474-1482, 1985a.
14. De MOT, R ; VERACHTERT, H. Secretion of α -amilase and multiple forms of glucoamylase by the yeast **Trichosporon pullulans.** *Can. J. Microbiol.* , 32 : 47-51, 1986.
15. De MOT, R.; VERACHTERT, H. Purification and characterization of extracellular α -amilase and glucoamylase from the yeast **Candida antarctica** CBS 6678. *Eur. J. Biochem.*, 164 (3): 643-654, 1987.
16. ENEVOLDSEN, B. S. Application of the debranching enzyme, pullulanase in brewing from unmalted cereals. I. Conditions of mashing and carbohydrate composition of the wort. *Brygmesteren*, 2: 41-51,1971.
17. ENEVOLDSEN, B. S. Debranching enzymes in brewing. *Proc. European Brewery convention: 15th Cong.*, 688-697, 1975.
18. FLEETWOOD, J. G.; WEIGEL, H. Substrate Cleavage point with glucamylase. *Nature*, 8 (196): 984,1962.
19. FOGARTY, W. M.; KELLY, C. Amylases, amyloglucosidases and related glucanases. In: *Economic Microbiology - Microbiol enzymes and bioconversions* , ed. A. H. Rose, ed. Academic Press, London, 5: 115-170, 1980.
20. FROST, G. M.; MOSS, D. A. Production of enzymes by fermentation. In: *Biotechnology*, ed. H. J. Rehm; G. Reed, ed. VCH, Germany, 7a: 129-132, 1987.

21. 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.
22. GERHARTZ, W. Industrial uses of enzymes. In: *Enzymes in industry: Product and applications*. VCH, Cambridge, NY, 77-81, 1990.
23. HAYASHIDA, S.; NOMURA, T; YOSHINO, E. ; HANGO, M. The formation and properties of subtilisin-modified glucoamylase. *Agric. Biol. Chem.*, 40 (1) : 141-146, 1976.
24. HEHRE, E. J.; OKADA, G.; GENGHOF, D. S. Configuration specificity: unappreciated key to understand enzymic reversions and de novo glycosidic bond synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 135: 75-80, 1969.
25. HYUN, H. H.; SHEN, G.-J.; ZEIKUS, J. G. Diferential amylosaccharide metabolism of *Clostridium thermosulfurogenes* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *J. Bacteriol.*, 164 (3): 1153-1161, 1985.
26. INGLE, M. B.; ERICKSON, R. J. Bacterial α -amilases. *Adv. Appl. Microbiol*, 24: 257-277, 1978.
27. KANLAYAKRIT, W.; ISHIMATSU, K.; NAKAO, M.; HAYASHIDA, S. Characteristics of raw-starch-digesting glucoamylase from thermophilic *Rhizomucor pusillus*. *J. Ferment. Technol.*, 65 (4): 379-385, 1985.
28. KERR, R.W.; CLEVELAND, F. C.; KATZBECK, W.J. The action of amyloglucosidase on amylose and amylopectin. *J. Am. Chem. Soc.*, 73: 3916-3921, 1951.
29. KOBAYASHI, M. ; MATSUDA, K. Action of the glucoamylase on dextrans as an exo-dextranase. *Agric. Biol. Chem.*, 42 (1): 181-183, 1978.
30. LENNEY, J. F.; SHIVELY, L. R. Production of dextrose from starch. *United States Patent Office*, 3, 039, 936, 1962.
31. LINEBACK, D. R.; GEORGI, C. E.; DOTY, R. L. Glucoamylase (α -1,4-glucan glucohydrolase) production by *Aspergillus niger* as influenced by medium composition. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 12 (1): 27-38, 1966.

32. LINEBACK, D. R.; RUSSELL, I. J.; RASMUSSEN, C. Two forms of glucoamylase of *Aspergillus niger*. Arch. Biochem. Biophys., 134: 534-553, 1969.
33. LINEBACK, D. R.; BAUMANN, W. E. Properties of a glucoamylase from *Aspergillus phoenicis*. Carbohydr. Res., 14: 341- 353, 1970.
34. LINEBACK, D. R.; AIRA, L. A. Structural characterization of the two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. Cereal Chem., 49: 283-298; 1972.
35. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
36. MACALLISTER, R. V. Nutritive sweeteners made from starch. Adv. Carbohid. Chem. Biochem., 36: 15-56, 1979.
37. MARSHALL, J. J.; WHELAN, W. J.; Incomplete conversion of glycogen and starch by crystalline amyloglucosidase and its importance in the determination of amylaceous polymers. FEBS Letters, 2 (2): 85-88, 1970.
38. 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.
39. MIAH, M. N. N. ; UEDA, S. Multiplicity of glucoamylase of *Aspergillus oryzae*. Part 2 Enzymatic and physicochemical properties of three forms of glucoamylase. Die Starke, 29 (7) : 235-239, 1977.
40. MILES LABORATORIES, INC. Technical informations - determination of liquefying amylase (Modified Wolgemuth Method) Assay, N°2-124.
41. MURAYAMA, T.; ISHIKAWA, T. Mutation in *Neurospora crassa* affecting some of the extracellular enzymes and several growth characteristics. J. Bacteriol., 115 (3): 796-804,1973.
42. NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153: 379-380, 1944.

43. NODA, T.; TAKAHATA, Y.; NAGATA, T. ; MONMA, M. Digestibility of sweet potato raw starches by glucoamylase. *Starch/Starke*, 44 (1) : 32-35, 1992.
44. NORMAN, B. E. New developments in starch syrup technology. In: *Enzymes and food processing*, ed. G. G. Birch; N. Blake-Brough; K. J. Parker, ed. Appl. Science Publisher, London, 15-50, 1981.
45. OHBA, R.; UEDA, S. Some properties of crystalline extra and intracellular pullulanases from *Aerobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.*, 39 (5): 967-972, 1975.
46. OHNISHI, H.; SAKAI, H. OHTA, T. Purification and some properties of a glucoamylase from *Clostridium* sp. G0005. *Agric. Biol. Chem.*, 55(7): 1901-1902, 1991.
47. ONO, K.; SHINTANI, K.; SHIGETA, S.; OKA, S. Various molecular species in glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.*, 52 (7): 1689-1698, 1988a.
48. ONO, K.; SHINTANI, K.; SHIGETA, S.; OKA, S. Comparative studies of various molecular species in *Aspergillus niger* glucoamylase. *Agric. Biol. Chem.*, 52 (7): 1699-1706, 1988b.
49. ONO, K.; SHIGETA, S.; OKA, S. Effective purification of glucoamylase in Koji, a solid culture of *Aspergillus oryzae* on steamed rice, by affinity chromatography using an immobilized acarbose (Bay g-5421). *Agric. Biol. Chem.*, 52(7): 1707-1714, 1988c.
50. PARK, Y. K.; PAPINI, R. S. Produção de xarope de glicose do amilo de mandioca pelo método enzima-enzima. *Rev. Bras. Tecnol.*, 1: 13-16, 1970.
51. PARK, Y. K.; LIMA, D. C. Produção de amiloglicosidase fúngica por fermentação submersa e sua purificação. *Rev. Bras. Tecnol.*, 3: 67-74, 1972.
52. PARK, Y. K.; AZUMA, E. H. Screening of yeast strains capable of hyperproducing amylolytic enzymes. *Biotechnol. Letters*, 12 (5): 373-376, 1990.

53. PAZUR, J. H. ; ANDO, T. The hydrolysis of glucosyl oligosaccharides with α -D-(1 \rightarrow 6) bonds by fungal amyloglucosidase. *J. Biol. Chem.*, 235 (2): 297-302, 1960.
54. PAZUR, J. H.; KLEPPE, K. The hydrolyses of α -D-Glucosides by amyloglucosidase from **Aspergillus niger**. *J. Biol. Chem.*, 237 (4): 1002-1006, 1962.
55. PAZUR, J. H.; OKADA, S. Properties of the glucoamylase from **Rhizopus delemar**. *Carbohydr. Res.*, 4: 371-379, 1967.
56. PAZUR, J. H., KNULL, H. R ; CEPURE, A. Glycoenzymes : structure and properties of the two forms of glycoamylase from **Aspergillus niger**. *Carbohydr. Res.*, 20 : 83-96, 1971.
57. PHARMACIA LKB BIOTECHNOLOGY INC. *Technical informations*. Calibration kit for molecular weight determination using electrophoresis. 22p., 1988.
58. PHILLIPS, L. L. ; CALDWELL, M. L. A study of the purification and properties of a glucose - forming amylase from **Rhizopus delemar**, gluc Amilase. *J. Amer. Chem. Society*, 73 : 3559-3563, 1951a.
59. PHILLIPS, L. L. ; CALDWELL, M. L. A study of the action of gluc amylase, a glucose-producing amylase, formed by the mold, **Rhizopus delemar**. *J. Amer. Chem. Society*, 73 : 3563-3568, 1951b.
60. RAMACHANDRAN, N.; SREEKANTIAH, K. R.; MURTHY, V. S. Influence of media composition on the production of alpha-amylase and amyloglucosidase by a strain of **Aspergillus niger**. *Starch/Starke*, 31 (4): 134- 138, 1979.
61. REDDY, O. V. S.; BASAPPA, S. C. Selection and characterization of **Endomycopsis fibuligera** strains for one-step fermentation of starch to etanol. *Starch/Starke*, 45 (5) : 187-194, 1993.
62. REHM, J. ; REED, G. Production of enzymes by fermentation. In: *Enzyme Technology Biotechnology*. Frost, G. M.; Moss, D. A. VCH, N.Y., 7a: 122-132, 1987.

63. ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J. L. Produção de enzimas. In: Tratado de Microbiologia. ed. Manole Ltda., 1: 154- 159, 1988.
64. RUSSEL, I. J. ; LINEBACK, D. R. Incorporation of ¹⁴ C into the Carbohydrate moieties of a fungal glucoamylase. Carbohyd. Res., 15: 123-135, 1970.
65. SATO, H. H. Estudo das características bioquímicas da pululanase de Klebsiella sp e sua aplicação. Tese de doutorado apresentado à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 1991.
66. SEARLE, B. A ; TUBB, R. S. Regulation of amyloglucosidase production by **Saccharomyces diastaticus**. J. Inst. Brew., 87: 244-247, 1981.
67. SILLS, A. M ; STEWART, G. G. Production of amylyolytic enzymes by several yeast species. J. Inst. Brew., 88 : 313-316, 1982.
68. SIMÕES-MENDES B. Purification and characterization of the extracellular amylase of the yeast **Schwanniomyces alluvius**. Can. J. Microbiol., 30: 1163-1170, 1984.
69. SIMON, J. Les sirops de glucose issus du maïs. Ann. Nutr. Alim., 32: 681-688, 1978.
70. SLOMINSKA, L.; STAROGARDZKA, P. Studies on the application of maltogenic amylase in the production of maltose containing syrup. Starch/Starke, 38 (6): 205-210, 1986.
71. SLOMINSKA, L.; MACZYNSKI, M. Studies on the application of pullulanase in starch saccharification process. Starch/ Starke, 37 (11): 386-390, 1985.
72. SMITH, J. S.; LINEBACK, D. R. Hydrolysis of native wheat and corn starch granules by glucoamylases from **Aspergillus niger** and **Rhizopus delemar**. Die Starke, 28 (7): 243- 249, 1976.
73. SPENCER-MARTINS; VAN UDEN, N. Extracellular amylyolytic system of the yeast **Lipomyces kononenkoae**. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol, 6: 241-250,1979.

74. TAKAHASHI, T.; INOKUCHI, N.; IRIE, M. Purification and characterization of a glucoamylase from *Aspergillus saitoi*. J. Biochem., 89 (1): 125-134, 1981.
75. TAKAO, S.; SASAKI, H.; KUROSAWA, K.; TANIDA, M.; KAMAGATA, Y. Production of a raw starch saccharifying enzyme by *Corticium rolfsii*. Agric. Biol. Chem., 50(8): 1979-1987, 1986.
76. TAKASAKI, Y. Productions and utilizations of β -amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*. Agric. Biol. Chem., 40 (8): 1515-1522, 1976.
77. TAYLOR, P.M.; NAPIER, E. S. ; FLEMING, I.D. Some properties of a glucoamylase produced by the thermophilic fungus *Hemicola lanuginosa*. Carboh. Res., 61: 301-308; 1978;
78. TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. G. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166: 444-445, 1950.
79. TSUBOI, A.; YAMASAKI, Y. ; SUZUKI, Y. Two forms of glucoamylase from *Mucor rouxianus*. 1. Purification and crystallization. Agric. Biol. Chem., 38 (3), 543-550, 1974.
80. UEDA, S; OHBA, R ; KANO, S. Fractionation of the glucoamylase system from black-koji mold and the effects of adding isoamylase and alpha-amylase on amyolysis by the glucoamylase fractions. Die Starke, 26 (11): 374-378, 1974.
81. UEDA, S. ; KANO, S. Multiple forms de glucoamylase of *Rhizopus* species. Die Starke, 27(4): 123-128, 1975.
82. VAN LANEN, J.; SMITH, M. B. Process of producing glucamylase and an alcohol product. United States Patent Office, 3, 418, 211, 1968.
83. WATANABE, K ; FUKIMBARA, T. The composition of saccharogenic amylase from *Rhizopus javanicus* and the isolation of glycopeptids. Agric Biol. Chem., 37 (12), 2755-2761, 1963.
84. WEBER, K.; OSBORN, M. J. The reability of molecular weight determination by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244: 4406-4412, 1969.

85. WEIBEL, M. K.; Mc MULLEN, W. H ; STARACE, C. A. Microbial enzymes in the production of nutritive sweeteners from starch. In: *Developments in industrial microbiology*, ed. Publication of the Society for Industrial Microbiology, 19 : 103-116.
86. WILSON, J. ; INGLEDEW, W.M. Isolation and characterization of **Schwanniomyces alluvius** amyolytic enzymes. *Appl. Environm. microbiol.*, 44 (2): 301-307, 1982.
87. YAMASAKI, Y.; SUZUKI, Y. ; OZAWA, J. Purification and properties of two forms of glucoamylase from **Penicillium oxalicum**. *Agric. Biol. chem.*, 41 (5), 755-762, 1977a.
88. YAMASAKI, Y.; SUZUKI, Y. ; OZAWA, J. Properties of two forms of glucoamylase from **Penicillium oxalicum**. *Agric. Biol. Chem.*, 41 (8): 1443-1449, 1977b.
89. YAMASAKI, Y.; SUZUKI, Y.; OZAWA, J. Three forms of a α -glucosidase and a glucoamylase from **Aspergillus awamori**. *Agric. Biol. Chem.*, 41 (11) : 2149-2161, 1977c.
90. YAMASAKI, Y.; TSUBOI, A.; SUZUKI, Y. Two forms of glucoamylase from **Mucor rouxianus**. II. Properties of the two glucoamylases. *Agric. Biol. Chem.*, 44 (11), 2139-2148, 1977d.