

YONG K. PARK

MESTRE EM CIÊNCIA (BIOQUÍMICA)

INSOLUBILIZAÇÃO DA AMILOGLICOSIDASE
EM RESINA :
ESTUDO DE SUAS PROPRIEDADES E CINÉTICA

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

Fevereiro de 1972

FACULDADE DE TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

11 FEV 1972

T.16

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

ÍNDICE

	página
INTRODUÇÃO	
REVISÃO DA LITERATURA	1
MATERIAIS	9
MÉTODOS	10
4.1. Obtenção da amiloglicosidase fúngica	10
4.1.1. Preparo do Meio de Cultura e fermentação	10
4.1.2. Método de fermentação	10
4.1.3. Determinação de Atividade enzimática	11
4.1.4. Determinação do Teor de Proteína	12
4.2. Purificação da Amiloglicosidase Fúngica	12
4.3. Caracterização da Enzima Purificada	13
4.3.1. Determinação da Atividade Enzimática nas Frações Eluídas	13
4.3.2. Diálise do Material Correspondente aos picos 3 e 4	13
4.3.3. Ação da Amiloglicosidase sobre Maltose	14
4.3.4. Determinação do Teor de Proteína nos Picos 3 e 4	14
4.3.5. Determinação da Atividade Enzimática total das Frações 3 e 4	14
4.3.6. Eletroforese das Enzimas das Frações 3 e 4	15
4.3.7. Cinética da Ação Enzimática das Frações 3 e 4	15
4.4. Estudo da Insolubilização da Enzima Purificada	16
4.4.1. Ativação da Resina	16
4.4.2. Insolubilização da Enzima Purificada em Resina	16

	página
5.4.	<i>Grau de Insolubilização da enzima em Resina</i> 24
5.5.	<i>Efeito das Concentrações de Tampão Acetato</i> 25
5.6.	<i>Efeito de Vários pH de Tampão Acetato sobre a Quantidade de Enzima Ligada à Resina</i> 25
5.7.	<i>Efeito da Temperatura nas Atividades Enzimáticas</i> 20
5.8.	<i>Efeito do Tempo de Incubação a Várias Temperaturas nas Atividades Enzimáticas</i> 26
5.9.	<i>Estudo do pH Ótimo para as Atividades das Enzimas Solúvel e Insolubilizada</i> 27
5.10.	<i>Recuperação da Enzima Insolubilizada após a Reação com o Substrato</i> 28
5.11.	<i>Comparação da Cinética da Amiloglicosidase Solúvel e Insolubilizada</i> 29
5.12.	<i>Estudo da Cinética da Reação da Amiloglicosidi- dase Insolubilizada na Coluna</i> 30
6.	<i>RESUMO E CONCLUSÕES</i> 33
7.	<i>QUADROS</i> 36
8.	<i>FIGURAS</i> 46
9.	<i>BIBLIOGRAFIA</i> 65
10.	<i>AGRADECIMENTOS</i> 74

	página
4.5.1. <i>Insolubilização da Amiloglicosidase Concentrada em Resina</i>	17
4.5.2. <i>Método para Estudo do Grau de Insolubilização da Enzima em Resina</i>	18
4.5.3. <i>Efeito da Concentração de Tampão Acetato</i>	18
4.5.4. <i>Efeito do pH na ligação</i>	19
4.5.5. <i>Estudo da Cinética da Reação da Amiloglicosidase Insolubilizada na Coluna</i>	19
4.5.6. <i>Recuperação da Enzima Após a Reação com o Substrato</i>	20
4.6. <i>Estudo Comparativo do Comportamento da Enzima Solúvel e da Enzima Insolubilizada</i>	21
4.6.1. <i>Efeito da Temperatura nas Atividades Enzimáticas</i>	21
4.6.2. <i>Efeito do Tempo de Incubação à Várias Temperaturas, nas Atividades Enzimáticas</i>	21
4.6.3. <i>Método para Estudo do Efeito do pH sobre as Atividades das Enzimas Livre e Ligada</i>	22
4.6.4. <i>Estudo da Comparação da Reação Cinética entre Amiloglicosidase Solúvel e Insolubilizada</i>	22
5. <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	23
5.1. <i>Amiloglicosidase e sua purificação</i>	23
5.2. <i>Cinética da Ação Enzimática das Frações 3 e 4</i>	23
5.3. <i>Ação da Amiloglicosidase</i>	24

I - INTRODUÇÃO

As grandes possibilidades tecnológicas inerentes às enzimas insolubilizadas tem sido responsável pelo considerável desenvolvimento da pesquisa técnica e científica nêsse campo.

A insolubilização das enzimas em água é obtida por formação de complexos entre a enzima e um suporte insolúvel em água, como a celulose ou outros polímeros, de modo que o complexo formado pela enzima e o suporte exibe, ainda, atividade bioquímica. O complexo também pode ser reisolado facilmente da mistura de reação e empregado a seguir, repetidamente, para induzir mudanças químicas específicas em quantidades relativamente grandes de substrato.

No presente trabalho, após purificar a amiloglicosidase obtida de Aspergillus awamori por fermentação submersa, - foi preparado um complexo insolúvel amiloglicosidase-resina do qual foram estudadas algumas características bioquímicas e foi comparada a cinética de reação entre as enzimas, solúvel e insolubilizada.

II - REVISÃO DA LITERATURA

Langmuir et al. (1938) (1, 2) foram os primeiros a relatarem o processo de adsorção para a insolubilização de enzima. A urease foi adsorvida em placas de estearato de bário, previamente tratadas com nitrato de tório e desoxicolato de sódio, formando um complexo enzima-desoxicolato na superfície das placas o qual possuía atividade enzimática.

MITZ (1956), (3), tentou combinar a catalase com celulose trocadora aniônica. Essa combinação era enzimaticamente ativa. Acredita-se que esta foi a primeira preparação de um derivado ativo de enzima resultante da interação eletrostática de uma enzima e um polieletrólito insolúvel.

Usando lisozima desnaturada pelo calor como substrato, - MACLAREN et al. (1956, 1957), (4, 5), prepararam um complexo insolúvel desse substrato com caulinita. Os autores adicionaram então uma solução de quimotripsina ou tripsina à suspensão do complexo. A proteólise do complexo adsorvido ocorreu com a velocidade comparável à da ação da quimotripsina ou tripsina no substrato sem caulinita. MACLAREN et al. concluíram que moléculas de quimotripsina ligadas são removidas da superfície do complexo com uma velocidade comparável àquela encontrada para a reação com a lisozima não complexado. Por outro lado, a velocidade de reação era mais lenta para a quimotripsina adsorvida na caulinita do que quando o substrato era adsorvido em caulinita. Os mesmos autores também observaram que a ação da quimotripsina sobre o substrato (solução de lisozima desnaturada) e sobre substrato adsorvido (lisozima desnaturada em caulinita) revelou que a faixa de p^H ótimo para atividade máxima é menor no caso do substrato absorvido.

NITZ e SUMMARI (1956), (6), obtiveram complexos insolúveis de tripsina e quimotripsina usando como suporte carboximetilcelulose tratada, com diazobenzila. A enzima liga-se ao suporte - por ligações covalentes. O acoplamento com carboximetilcelulose - foi efetuado por uma modificação do método da azida de MICHAEL e EVANS (1949), (7). O complexo insolúvel carboximetilcelulose-quimotripsina revelou-se mais ao calor do que a quimotripsina livre, e não houve variação no pH ótimo da tripsina livre e da combinada. Os complexos insolúveis de tripsina e quimotripsina mostraram-se mais ativos em substratos de pequeno peso molecular.

CEBRA et al. (1961, 1962) (8, 9) prepararam papaína insolúvel em água com um co-polímero preparado com L-leucina e hidrobrometo de p-amino-DL-fenilalanina. A ligação com papaína foi realizada pela adição de papaína cristalina suspensa em solução - de cisteína 0,03 M, à suspensão do co-polímero diazotado em uma solução aquosa de fosfato 0,075 M, cisteína 0,005 M e EDTA 0,002 M a pH 7,6. Os referidos autores (8 e 9) experimentaram, também, a atividade de papaína solúvel e insolúvel com soro albumina original de boi e ovo albumina, verificando que a atividade da papaína insolúvel era semelhante àquela da solúvel.

A insolubilização de enzimas por técnicas de inclusão - foi estudada por BERNFELD et al. (1963) (10), que prepararam géis de poli(acrilamida) inter-cruzada nos quais várias enzimas a antígenos foram retidos. Apenas pequenas quantidades de proteínas escoavam-se dos géis após exaustivas lavagens.

BAR-ELI (1960) (11) e GLAZER (1962) (12) descreveram a preparação de politirosiltripsina insolúvel pela sua ligação com um co-polímero diazotado de p-amino-DL-fenilalanina e L-leucina. Os autores determinaram as propriedades físicas, químicas, e enzimáticas da politirosiltripsina insolubilizada a fim de verificar se

havia alguma diferença nas propriedades de tripsina cristalina e da tripsina insolúvel. Observaram que tripsina insolúvel possui a mesma atividade enzimica sobre o substrato, (éster etílico de benzoil-L-arginina) que a tripsina solúvel.

EPSTEIN et al. (1962) (13), prepararam tripsina insolubilizada usando carboximetilcelulose-hidrazida (CMC-hidrazida foi preparada por esterificação com metanol e HCl, sendo então tratada com hidrazina). A oxidação desta enzima insolúvel não produziu atividade enzimica, mas a enzima insolúvel pode ser ativada por tratamento com agente redutor; EPSTEIN et al. preparam também o complexo carboximetilcelulose-ribonuclease e observaram que a oxidação e posterior redução da enzima resultava na recuperação de 40% da atividade original da enzima.

BAR-ELI et al. (1963) (14), prepararam politirosiltripsina insolúvel em colunas, pelo método descrito por GLAZER, (12), e estudaram a hidrólise da argininametiléster. A hidrólise do substrato foi medida pela concentração de arginina no efluente da coluna. A concentração encontrada era inversamente proporcional a velocidade de escoamento do substrato através da coluna e independente da concentração inicial do substrato. BAR-ELI et al. estabeleceram também a cinética da reação nas colunas por eles preparadas, obtendo a seguinte equação, que expressa a velocidade de reação:

$$\frac{(S_0) - (S_h)}{(S_0)} = \frac{k(E_0) h}{(S_0) V}$$

(S_0) = Concentração de substrato inicial

(S_h) = Concentração de substrato no efluente

(E_0) = Concentração da enzima

- h = Altura da coluna
- V = Taxa de escoamento
- k = Constante

Um derivado de urease insolúvel em água foi obtido por REISEL et al. (1964) (15), ligando a urease prèviamente tratada com p-cloromercuribenzoato ao co-polímero diazotato de p-amino-DL-fenilalanina e L-leucina. Uma coluna de urease assim insolubilizada foi preparada e utilizada na determinação de uréia em fluídos biológicos, assim como para a remoção quantitativa de uréia de soluções aquosas.

HORNBY et al. (1966), (16), e LILLY et al. (1965), (17) descreveram a preparação e as propriedades da ficina químicamente ligada a carboximetilcelulose, empregando o método descrito por MITZ e SUMMARI (6). Em seus trabalhos HORNBY (16) e LILLY (17) verificaram que a ficina insolubilizada mostrava maior resistência à desnaturação. Esta propriedade permitia o uso da enzima por períodos longos de tempo e devido a sua insolubilidade a enzima podia ser retirada do meio de reação, rápida e eficientemente, sem contaminação de substrato e dos produtos.

Se bem que várias enzimas tenham sido ligadas a polímeros para produção de enzimas insolúveis, a cinética destas formas de enzimas não têm sido extensivamente estudada. LILLY et al. (1966), (18), relataram os resultados de estudos da cinética em preparações de carboximetilcelulose-ficina empacotadas em colunas. LILLY et al. derivaram as seguintes equações aplicando a equação de Michaelis-Menten:

$$P_{s_0} - K_m \ln (1-P) = k (E)/Q = C/Q \dots\dots\dots 1$$

$$P_{s_0} - K_m \ln (1-P) + C/Q \dots\dots\dots 2$$

- P = Proporção de converção de substrato
Km = Constante de MICHAELIS-MENTEN
C = Capacidade de reação
Q = Velocidade de fluxo

Os referidos autores concluíram que estas equações mostraram satisfatoriamente a ação do complexo carboximetil-celulose-ficina sobre o substrato.

TOSA et al. (1966) (19) estudaram complexos ativos de aminoacilase insolúvel obtidos pela ligação iônica de aminoacilase fúngica à Sephadex-DEAE-Celulose.

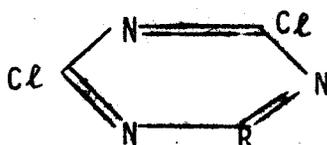
TOSA et al (1966, 1967) (20,21,22) verificaram que a coluna empacotada com este complexo enzimico possibilitava a hidrólise contínua de acetil-DL-metionina em L-metionina e acetil D-metionina. Em seus trabalhos, (1969) (23, 24) estudaram também a cinética da hidrólise de acetil-D-metionina em coluna de DEAE celulose-aminoacilase, verificando que a velocidade de hidrólise do substrato dependia da sua velocidade de escoamento.

TOSA et al. sugeriram o emprego desta enzima insolubilizada na indústria.

HORNBY et al. (1969), (25), relataram que a ATP-creatina fosfotransferase parcialmente purificada, obtida de músculo de coelho, podia ser quimicamente ligada a carboximetilcelulose por suporte poli-iônico, e investigaram depois o efeito no Km aparente, concluindo que Km do complexo desta enzima foi 10 vezes maior do que Km da enzima solúvel.

Se bem que diferentes derivados de enzimas insolubilizadas tenham sido preparadas, somente algumas delas tiveram efeito no Km aparente estudado (26).

KAY et al. (1967), (27), prepararam quimotripsina insolubilizada empregando a celulose e a dicloro-s-triazina. Um dos cloros da dicloro-s-triazina é suficientemente reativo com celulose em solução aquosa para dar um bom rendimento do complexo monocloro-s-triazinilcelulose. Nucleófilos fortes tais como os grupos -NH₂ de amino-ácidos e proteínas, podem reagir com o segundo cloro para formar o complexo celulose-s-triazinil-proteína.



2-amino-4,6-dicloro-s-triazina

O ácido cianúrico também possui as mesmas qualidades da triazina. Aplicando este princípio, folhas de dicloro-s-triazinil celulose podem ser preparadas ligando-se o dicloro-S-triazina a folha de celulose. KAY et al. (1968), (28) ligaram a β -galactosidase, creatina quinase e lactato desidrogenase a derivados de cloro-amino-s-triazinil de folha de DEAE-celulose, e sugeriram, também que é possível se construir um reator "multienzima" empregando-se várias folhas com diferentes enzimas ligadas.

WILSON et al. (1968), (29,30) ligaram por covalência piruvato quinase e lactato desidrogenase a discos de papel de filtro, utilizando o método de KAY et al. (28) e estudaram as propriedades cinéticas dos discos porosos enzimicamente ativos.

WILSON et al. provaram que a cinética destes complexos enzimáticos obedecia as mesmas equações já derivadas por LILLY et. al. (18).

SHARP et al. (1969), (31), ligaram a β -galactosidase a tiras porosas de celulose, utilizando o método descrito em (28), e também estudaram a cinética da reação da enzima, concluindo que estes derivados de enzima insolúvel obedeciam equações de LILLY (18).

KAY et al. (1970), (32), ligaram a quimotripsina a suportes insolúveis, tais como celulose, DEAE-celulose, carboximetilcelulose e Sephadex, utilizando a 2-amino-4,6-dicloro-s-triazina e verificaram que a velocidade de reação da enzima pode ser restringida pela velocidade de difusão do substrato na coluna de enzima insolubilizada. SELF et al. (1969), (33), produziram penicilina-amidase de Escherichia coli ATCC 9637 por fermentação, e ligaram esta enzima a derivados de cloro-s-triazina de DEAE-celulose. O estudo da cinética de sua reação confirmou os dados de LILLY et al. (18, 34).

Usando ácido tamico e sacarase de levedura, NEGORO (35) preparou um complexo insolúvel da enzima, cuja atividade era maior em meio alcalino e alta temperatura (65 e 70 C) do que aquela da enzima solúvel.

USAMI et al. (1970), (36), adsorveram amiloglicosidase em carvão ativo obtendo um complexo de enzima insolubilizada ativa, que apresentava um aumento de 6,3 vezes da constante de Michaelis-Menten em relação enzima livre.

WILSON et al. (1969), (37), ligaram amiloglicosidase - parcialmente purificada obtida de espécies de Aspergillus, a DEAE-celulose, empregando um reagente bifuncional, o 2-amino-4,6-dicloro-s-triazina, e estudaram a ação da enzima insolubilizada em colunas sobre soluções de maltose e dextrina. A coluna foi utilizada para demonstrar a possibilidade de um processo contínuo para aumentar a concentração de glicose de milho hidrolizado

por ácidos.

Os autores estudaram a cinética dessa reação obtendo a mesma equação já obtida por LILLY (18). BACHLER et al. (1970) - (38), ligaram amiloglicosidase fúngica à DEAE-celulose, por ligação iônica, e estudaram o mecanismo deste complexo enzimico insolúvel. Segundo BACHLER et al. (38), a enzima insolubilizada na coluna continuava ativa mesmo após 3 semanas usando solução de amido como substrato.

A obtenção de enzimas amilolíticas de microorganismos tem grande interesse econômico e vários processos tem sido descritos na literatura, assim, PHILLIPS et al. (1951), (39, 40) pesquisaram uma enzima isolada de *Rhizopus delemar* que hidrolisa o amido em glicose, a qual denominaram de glicoamilase. Ainda em 1951, KERR et al. (41), denominaram essa enzima de α -1,4-amiloglicosidase.

PAZUR et al. (1959, 1960), (42, 43), estudaram a atividade da amiloglicosidase fúngica verificando que a mesma catalisa o rompimento das ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 em amido, formando glicose. Recentemente, SHILEY et al. (1964), (44), e CADMUS et al. (1966), (45) pesquisaram a produção de amiloglicosidase de *Aspergillus niger* por fermentação submersa, assim como a produção de glicose a partir de amido de milho por essa enzima. PARK et al. (1970), (46), obtiveram amiloglicosidase por fermentação submersa de *Aspergillus awamori*, e estudaram sua aplicação na obtenção de glicose a partir de amido de mandioca.

3 - MATERIAIS

As seguintes cinco linhagens de fungos do gênero Aspergillus, conservados em meio de Czapek, foram experimentados para verificação de sua capacidade de produzir amiloglicosidase:

1. Aspergillus niger NRRL 337 .
2. Aspergillus awamori NRRL 3112
3. Aspergillus niger NRRL 3122
4. Aspergillus oryzae NRRL 695
5. Aspergillus NRRL 330

REAGENTES - os reagentes usados eram prô-análise das marcas Merck, Baker, Carlo Erba, ou foram purificados no laboratório pelos métodos usuais. Além dos materiais utilizados comumente em laboratório, tais como beakers, erlenmeyers, buretas, etc., foram usados os seguintes equipamentos:

Espectrofotômetro Beckman DB

Aparelho coletor de frações Beckman, modelo 133 A com controle de temperatura.

Bomba peristáltica Technicon.

Potenciômetro Beckman, tipo Zeromatic.

Banho-maria, Magni Whirl, com temperatura controlada.

Agitador magnético Thermolyne.

Fermentador, New Brunswick Scientific Co. Inc. FS 307.

Agitador rotativo, Fermentation Design Inc.

Liofilizador, New Brunswick Scientific Co. Inc.

Conjunto para eletroforese em papel Beckman, tipo Durrum, modelo R.

Conjunto para eletroforese em acetato de celulose Chemetron.

Ultracentrifuga Beckman, Modelo L-2

4 - MÉTODOS

4.1. - Obtenção da amiloglicosidase fúngica

Foram experimentadas cinco linhagens do gênero Aspergillus citados em 3, para a produção da amiloglicosidase. Aspergillus awamori NRRL 3112 produziu a maior quantidade de amiloglicosidase, sendo então utilizado na obtenção de amiloglicosidase.

4.1.1. - Preparo do meio de cultura e fermentação

Aspergillus awamori NRRL 3112 foi incubado a 30°C durante 48 horas em tubo de ensaio contendo meio de levedura-malte (47). Os esporos do fungo foram inoculados em um erlenmeyer de 500 ml., contendo 100 ml, do seguinte meio de cultura : 5% de fubã e 0,25% de extrato de levedura, a pH 5,5 (44). Os frascos foram incubados 35 horas a temperatura de 35°C, sob agitação rotativa de 250 RPM.

4.1.2. - Método de fermentação

A seguir o micélio transferido para um fermentador contendo meio de cultura de fubã a pH 5,5. Este meio de cultura foi previamente esterilizado em autoclave, à temperatura de 121°C durante 1 hora. Depois da inoculação do micélio, no fermentador, a temperatura foi mantida a 35°C, com agitação de 600 RPM, e aeração de 1 volume de ar por volume de meio por minuto durante 5. dias.

O meio de cultura para o fermentador foi preparado da seguinte forma: 2 quilos de fubã e 1,5g de α -amilase bacteriana obtida pelo método descrito por UNDERKOFER (48), foram adicionados a 8 litros de água e o pH da mistura foi ajustado para 6,0 com HCl 1 N. Aqueceu-se a 80°C durante 30 minutos sob agitação, e assim o fubã liquefaz-se pela ação da α -amilase bacteriana. Esfriou-se e ajustou-se o pH do meio de cultura para 5,5 com HCl 1,0 N.

Após a fermentação o material foi filtrado e ao filtrado foi adicionado álcool etílico 95% até uma concentração final de 70% em volume, e deixado em repouso durante uma noite a 4°C. O material precipitado foi separado por decantação e em seguida centrifugado para maior separação do líquido. Após a centrifugação, todo material precipitado foi liofilizado e depois triturado. Este produto é aqui denominado amiloglicosidase concentrada.

Nas preparações enzimáticas obtidas conforme descrição acima, foram feitas as determinações de atividades enzimática e de teor de proteína.

4.1.3. - Determinação de Atividade Enzimática (49)

Foram dissolvidas 200,0 mg da amiloglicosidase concentrada, (preparada pelo método descrito em 4.1.2.) em 200 ml de tampão acetato 0,1M, pH 4,0, e a solução foi centrifugada a 3.000 RPM durante 30 minutos para remoção do material insolúvel; 1,0 ml do sobrenadante foi adicionado a 50 ml de uma solução de amido a 4% em tampão acetato, pH 4,0, e a mistura foi incubada em banho de água a 60°C durante uma hora. A solução foi neutralizada com solução de NaOH 2,0 N e o volume foi completado a 100,0 ml com água destilada. Em 10,0 ml desta so

lução foi determinado o teor de substâncias redutoras usando o método de Somogyi (50), e os valores obtidos calculados como glicose.

A atividade de enzima que produz 1,0 g de glicose, - após uma hora e a temperatura de 60°C, é designada como uma unidade de amiloglicosidase (UA).

4.1.4. - Determinação do Teor de Proteína

Em 1,0 ml de solução enzimática, preparada - como descrito em 4.1.3., foi determinado o teor de proteína utilizando-se o método de Lowry (51). Após a reação, a densidade óptica foi medida a 700 nm em um espectrofotômetro, calculando-se então a quantidade de proteína na amostra de amiloglicosidase concentrada, por comparação com uma amostra padrão de albumina de sêro bovino.

4.2. - Purificação da Amiloglicosidase Fúngica

DEAE-Celulose, 20,0 g, foi lavada por agitação com 400 ml de HCl 0,5N, e o ácido foi separado por filtração através de lã de vidro. O processo foi repetido com água destilada até remover todo HCl, e a seguir com 500,0 ml de NaOH 0,5 M. A celulose foi novamente lavada com água até não haver mais reação alcalina no filtrado e finalmente, equilibrada com tampão acetato 0,1 N, pH 4,0. Após este tratamento, a DEAE-celulose foi colocada numa coluna de 2,0 cm de diâmetro até uma altura de 30 cm. Envolvendo esta coluna havia uma outra com circulação de água, mantida à temperatura de 10°C.

A solução de enzima foi preparada como descrito a seguir: amiloglicosidase concentrada, 200 mg, foi dissolvida em 5 ml de tampão acetato 0,1 M, pH 4,0. A solução foi centrifugada a 3.000 RPM durante 30 minutos, para remoção do material insolúvel, e sobrenadante aplicado no tampo da coluna de DEAE-celulose.

A eluição foi feita inicialmente com 120 ml de tampão acetato 0,1 M, pH 4,0, seguindo-se a aplicação de um gradiente de concentração obtido pela adição de tampão acetato 1 M, pH 4,0 a um reservatório contendo 400 ml de tampão acetato 0,1 M, pH 4,0 volume de entrada do tampão 1,0 M no reservatório foi controlado de tal forma que fôsse igual ao volume do efluente da coluna.

A solução eluída da coluna foi recolhida em tubos mantidos a 4°C e a velocidade de eluição foi de 6 ml cada 10 minutos.

Terminada a eluição, foram medidas as densidades óticas a 280 nm em todos os tubos contendo o material eluído e construiu-se o gráfico representado na Figura 1.

4.3. - Caracterização da Enzima Purificada

4.3.1. - Determinação da Atividade Enzimática nas Frações Eluídas.

O método empregado na determinação da atividade da amiloglicosidase foi descrito em 4.1.3. A determinação foi feita utilizando-se 1,0 ml de solução de cada tubo, e os resultados estão representados no gráfico correspondente a Figura 2.

4.3.2. - Diálise do Material Correspondente aos picos 3 e 4

Os volumes eluídos correspondentes aos picos 3 e 4 (Figura 2), 110 ml e 165 ml respectivamente, foram reunidos

e dializados em sacos de celofane, separadamente, em água corrente por 24 horas, à temperatura ambiente.

Após a diálise, o material foi liofilizado e usado nas experiências seguintes.

4.3.3. - Ação da Amiloglicosidase Sobre Maltose

Um ml da solução de amiloglicosidase purificada, como descrito em 4.3.2., correspondente aos picos 3 e 4 (Figura 2), (1,0 ml de tampão acetato 0,1 N, pH 4,0, contém 1,0 mg de enzima), foi adicionada a 5 ml de solução de maltose 0,5 M em tampão acetato 0,1 N, pH 4,0.

As misturas foram incubadas a 60°C durante 1 hora e em seguida foi feita a cromatografia descendente em papel usando-se 10 μ l de cada solução e 10 μ l cada de um padrão de maltose e de glicose 0,5 N. O solvente empregado foi n-propanol: acetato de etila: água (65:10:25). O cromatograma foi revelado com difenil lamina-anilina (52).

4.3.4. - Determinação do Teor de Proteína nos Picos 3 e 4

A determinação do teor de proteína no material referente aos picos 3 e 4 foi feita como descrito em 4.1.4. com uma solução preparada por dissolução de 10,0 mg de cada fração liofilizada em 1,0 ml de água e empregando-se 0,1 ml da solução final. Os resultados obtidos se encontram no Quadro 1.

4.3.5. - Determinação da Atividade Enzimática Total das Frações 3 e 4

Com 0,1 ml de solução de cada fração, preparada como descrito em 4.3.4., foi determinada a atividade corres-

pondente ao material dos picos 3 e 4, do mesmo modo que em 4.1.3. Os resultados estão indicados no quadro 1.

4.3.6. - Eletroforese das Enzimas das Frações 3 e 4

Foram feitas dois tipos de eletroforese, em papel e em acetato de celulose, empregando as soluções preparadas como em 4.3.4.

A eletroforese em papel foi feita aplicando-se 10 μ l de cada solução em tiras de papel Whatman nº 1. Foi usado tampão de veronol 0,05 M, pH 8,6, e aplicado 150 volts por 16 horas. A revelação foi feita com azul de bromofenol em metanol (53). Os resultados estão representados na Figura 4.

Para a eletroforese em acetato de celulose, foram aplicados 10 μ l de cada amostra em Cellogel RS, em tampão tris-glicina pH 9,5 e as tiras submetidas a um potencial de 200 volts por duas horas. A revelação foi feita com Ponceau S, e lavagem com solução alcoólica de ácido acético (54). Os resultados estão representados na Figura 3.

4.3.7. - Cinética da Ação Enzimática das Frações 3 e 4

Para o estudo da cinética da ação enzimática das frações 3 e 4 da solução de amiloglicosidase purificada como descrito em 4.3.2., 1,0 ml contendo 0,2 mg de enzima de cada fração foi colocado em 50 ml de solução de amido a 1,2,3, e 4 %, em solução tampão de acetato 1,0 M, pH 4,0. As soluções foram incubadas durante 45 minutos a temperatura de 60°C, e a seguir foram determinadas as substâncias redutoras, calculadas como glicose. Foi calculada então a constante de Michaelis-Menten, utilizando-se a equação de Lineweaver-Burk (55) e (56). Os resulta

dos estão representados nos Quadros 2 e 3 e Figura 4.

4.4. - Estudo da Insolubilização da Enzima Purificada

As enzimas correspondentes às frações 3 e 4 foram estudadas quanto a sua capacidade de ligação com resina e manutenção da atividade enzimática.

4.4.1.- Ativação da Resina

Foi empregada para insolubilização da enzima a resina Amberlite IR-45, (OH^-), 14-52 mesh, que é uma resina trocadora de ânions.

Trezentas gramas de resina foram lavadas com acetona, e depois com água destilada. Após a lavagem, a resina foi colocada em um becker, com cerca de três vezes o seu volume de NaOH 1,0 N, e depois de agitar a resina foi decantada da solução de hidróxido de sódio. Lavou-se a seguir a resina várias vezes, até eliminação de todo o hidróxido de sódio, e a seguir com água destilada e HCl 1,0 N.

Após lavar novamente com água destilada, a resina foi equilibrada com tampão, suspendendo-a sucessivas vezes com cerca de três vezes o seu volume de tampão acetato 0,1 M, a pH 4,0 (tampão acetato 0,05 M, a pH 4,0, pode ser empregado em seu lugar, sem que apresente diferenças no resultado). (59).

4.4.2. - Insolubilização da Enzima Purificada em Resina

Cada 10,0 mg de amiloglicosidase purificada conforme 4.3.2 correspondente aos picos 3 e 4, da Figura 2, foi dissolvida em 10,0 ml de tampão acetato 0,1M, pH 4,0.

Estas soluções foram adicionadas a 2,0g de resina ativada e as misturas agitadas com frequência durante 30 minutos.

Decantou-se a solução sobrenadante e lavou-se a resina com mesmo tampão até remoção completa de enzima livre, o que foi verificado pela ausência de atividade enzimática no sobrenadante da lavagem final, pela medida de sua densidade óptica a 280 nm.

O sistema assim obtido constitui o complexo resina-enzima chamado de enzima insolubilizada ou enzima imobilizada, ou enzima ligada.

A atividade do complexo foi determinada como descrito em 4.1.3., usando 2,0g de enzima insolubilizada, e agitando-a constantemente com o substrato. Os resultados se encontram no Quadro 4.

4.5.1. - Insolubilização da Amiloglicosidase Concentrada em Resina

Amiloglicosidase concentrada conforme 4.1.2., 50,0 mg, foi dissolvida em 10,0 ml de tampão acetato 0,1 M, pH - 4,0, e centrifugada durante 30 minutos a uma velocidade de 3.000 RPM, para remoção do material insolúvel. A solução enzimática - sobrenadante foi adicionada a 2,0 g de resina ativada, e a mistura agitada com frequência durante 30 minutos. Decantou-se a solução sobrenadante e lavou-se a resina com o mesmo tampão, até remoção completa de enzima livre como descrito em 4.4.2.

A atividade do complexo foi determinada como descrito em 4.4.2. O resultado se encontra no quadro 4.

Para uso em colunas foram empregados quantidades maiores do complexo insolubilizado, isto é; 1,5 g de amiloglicosidase concentrada como descrito em 4.1.2., foram dissolvidos no tampão acetato, 0,1 N, pH 4,0 e a solução foi centrifugada durante 30 minutos a uma velocidade de 3,000 RPM, para remoção do material insolúvel. A solução enzimica sobrenadante foi adicionada a resina ativada (300g) (4.4.1) e a mistura agitada com frequência durante 30 minutos, após o que a solução foi decantada e a resina lavada com o mesmo tampão acetato até remoção completa da enzima livre. Na lavagem final, a solução sobrenadante foi examinada a 280nm, num espectrofotômetro, para verificar se ainda havia atividade de enzima.

4.5.2. - Método para Estudo do Grau de Insolubilização da Enzima em Resina

A ligação da amiloglicosidase à resina foi feita adicionando-se 2,0 g de resina ativada à várias concentrações de amiloglicosidase concentrada (Ver Figuras 5 e 6, e Quadro 5) dissolvida em tampão acetato 0,05 N, pH 4,0. Agitou-se com frequência, durante uma hora, e lavou-se com o mesmo tampão. A atividade do complexo foi determinada como descrito em 4.1.3.

4.5.3. - Efeito da Concentração de Tampão Acetato

Para estudo do efeito das várias concentrações de tampão acetato, foram misturadas quantidades constantes do complexo enzima-resina (2,0 g) com 8,0 ml de tampão acetato,

pH 4,0 de várias concentrações, representados no Quadro 6, e Figura 7., por 30 minutos e com frequente agitação. Após este tempo, mediu-se a densidade ótica de cada solução sobrenadante a 280 nm e utilizando-se 4,0 ml de cada solução mediu-se a atividade de amiloglicosidase como descrito em 4.1.3.

Também foi determinada a atividade de amiloglicosidase no complexo resina-enzima após lavar o complexo com tampão acetato 0,05 M, pH 4,0.

4.5.4. - Efeito do pH na Ligação

Foi estudado o efeito do pH na ligação da enzima a resina misturando-se 1,0 g de resina ativada e 10,0 mg de amiloglicosidase (preparada como descrito em 4.1.2.), em 8,0 ml de tampão acetato 0,05 M, com o pH variando de 3,6 a 5,0, e agitando por trinta minutos.

Após este tempo, a solução sobrenadante foi decantada, lavando-se a resina várias vezes com o mesmo tampão utilizado para a ligação até a remoção completa da enzima livre, o que foi verificado pela medida da atividade enzimática das soluções de lavagem. Os resultados podem ser observados na Figura 8.

4.5.5. - Estudo da Cinética da Reação da Amiloglicosidase Insolubilizada na Coluna

Este estudo foi realizado passando-se uma solução de amido a 2% através de uma coluna contendo amiloglicosidase insolubilizada, preparada como descrito em 4.5.1., a temperatura

de 45°C e variando o fluxo (Q).

O grau de conversão do amido foi medido do seguinte modo: adicionaram-se 0,1 ml de solução de amido 2% a 5,0 ml de solução de iodo (preparada pela dissolução de 5,5 g de cristais de iodo e 11,0 g de KI e elevando-se o volume a 250 ml, e misturando-se 2,0 ml desta solução com 20 g de KI e elevando-se o volume a 500 ml) e 0,1 ml de efluente a 5,0 ml de solução de iodo. As densidades óticas das soluções foram medidas num espectrofotômetro, a 550 nm. A densidade ótica medida inicialmente foi considerada como sendo a quantidade de amido existente na solução (57). A hidrólise do amido causa uma diminuição na densidade ótica, podendo-se calcular o grau de conversão.

4.5.6. - Recuperação da Enzima Após a Reação com o Substrato

Foram realizados experimentos para recuperação da enzima insolubilizada, empregando-se a amiloglicosidase in solubilizada como descrito em 4.5.1.

Uma grama de amiloglicosidase insolubilizada foi adicionada a 25,0 ml de substrato (amido solúvel 4%, em tampão acetato pH 4,0) e a mistura incubada a 45°C durante uma hora. Após a incubação, centrifugou-se para separar a resina da solução sobrenadante. No sobrenadante foi determinada a quantidade de substâncias redutoras pelo método de Somogyi (50). Calculou-se, então, a atividade relativa e suas perdas após as reações, conforme mostra a Figura 9.

Para determinação da atividade, após a primeira reação, lavou-se a resina várias vezes com tampão acetato 0,05 M, pH 4,0,

e repetiram-se as operações descritas anteriormente.

4.6. - Estudo Comparativo do Comportamento da Enzima Solúvel e da Enzima Insolubilizada

4.6.1. - Efeito da Temperatura nas Atividades Enzimáticas

Misturou-se em tubos de ensaio, 1,0 g do complexo resina-enzima, como descrito em 4.5.1, com 2,0 ml de tampão acetato 0,05 N, pH 4,0, e em outros tubos 0,5 mg/ml de enzima solúvel, como descrito em 4.1.2., com 2,0 ml do mesmo tampão.

Os tubos foram incubados durante 30 minutos as temperaturas de 45 a 80°C, variando a intervalos de 5°C. Após a incubação, resfriou-se rapidamente os tubos em água fria, e determinou-se a atividade enzimática.

A atividade da amiloglicosidase incubada a 45°C foi considerada como controle e, a partir desta, calculou-se a porcentagem de perda de atividade da enzima em ambos os casos. Os resultados são mostrados na Figura 10.

4.6.2. - Efeito do Tempo de Incubação à Várias Temperaturas nas Atividades Enzimáticas

Vários tubos de ensaio contendo 1,0 g de amiloglicosidase insolubilizada preparada como descrito em 4.5.1., com 2,0 ml de tampão acetato 0,05 N, pH 4,0, e outros contendo 0,5 mg/ml de enzima solúvel, como descrito em 4.1.2., foram incubados a temperaturas de 45, 50 e 60°C. O intervalo de tempo foi de 235

horas, e periõdicamente, retirou-se um tubo de cada forma enzimãtica e determinou-se a atividade da amiloglicosidase como descrito em 4.1.2.. A perda de atividade foi calculada em porcentagem, como mostram as Figuras 11, 12 e 13.

4.6.3. - Método para Estudo do Efeito do pH sôbre as Atividades das Enzimas Livre e Ligada

O efeito do pH na atividade da enzima solúvel e insolubilizada (preparada como descrito em 4.5.1.) foi examinada misturando-se respectivamente 1,0 g de enzima insolubilizada, e 1,0 ml de enzima solúvel preparada (0,5 mg/ml) com 50,0 ml de solução de amido a 4% em tampão acetato, como descrito em 4.1.3. a diferentes pH. Incubou-se durante uma hora a 60°C, e mediu-se a atividade enzimãtica nos vários pH (3,6; 4,0; 4,4; 4,8; 5,0; e 5,4), como descrito em 4.1.3. Os resultados são mostrados na Figura 14.

4.6.4. - Estudo da Comparação da Reação Cinética entre Amiloglicosidase Solúvel e Insolubilizada

Em balões volumétricos de 100 ml contendo enzima solúvel e insolubilizada, na concentração de 0,3 UA, foram adicionados 50,0 ml de solução de amido. As soluções de amido foram feitas em tampão acetato 0,05 M, pH 4,0, e os balões foram incubados a 60°C durante uma hora como em 4.1.3.

Apõs a incubação, a quantidade de substâncias reduzidas foi determinada. Assim, foi possível obter o valor de Km que é a constante de dissociação para o complexo enzima-substrato, empregando-se a equação de Lineweaver-Burk.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. - Amiloglicosidase e sua purificação

Amiloglicosidase possui carga negativa a pH 4,0 que é o pH ótimo para a sua atividade enzimática (38). Consequentemente, a purificação da enzima deveria ser possível em resina catiônica. Os resultados obtidos com o uso de DEAE-Celulose empregando o método descrito em 4.2., estão representados na Figura 1. Foram obtidas quatro frações que absorvem luz ultravioleta a 280 nm. Dessas frações, as duas últimas (Figura 2) possuíam atividade característica de amiloglicosidase.

Das frações 3 e 4 foi obtida a enzima, como descrito em 4.3.2., e nos produtos isolados foram determinadas a atividade enzimática e o teor de proteína, como descrito em 4.1.4. e 4.1.3.

A fração 3, cujo volume foi de 110 ml, continha 25,3 mg de proteína total e 63,8 unidades de amiloglicosidase. Na fração 4, cujo volume foi de 165 ml foram encontradas 17,3 mg de proteína total e 43,6 unidades de amiloglicosidase.

Por estes dados verificou-se que as duas frações possuem a mesma atividade enzimática, ou seja 2,52 unidades de amiloglicosidase por mg de proteína.

A eletroforese das duas frações, Figura 3, mostrou que a fração 4 apresentava maior mobilidade, o que indica um peso molecular menor para esta fração.

5.2. - Cinética da Ação Enzimática das Frações 3 e 4

Os resultados foram obtidos pelo método descrito, em 4.3.7. e estão indicados nos quadros 2 e 3, e Figura 4.

Os Quadros 2 e 3 mostram as relações entre a velocidade de reação de amiloglicosidase das frações 3 e 4 e a concentração, de substrato.

A Figura 4 mostra o gráfico de Lineweaver-Burk baseados nos dados dos quadros 2 e 3, e a constante de Michaelis-Menten calculada graficamente que foi de 41,7 mg/ml para ambas as frações. Portanto, cineticamente as duas frações são iguais, embora suas mobilidades eletroforéticas sejam diferentes.

5.3. - Ação da Amiloglicosidase

A ação da amiloglicosidase foi estudada conforme descrito em 4.3.3.. A ação da enzima foi seguida pela cromatografia descrita em 4.3.3. Os resultados obtidos evidenciaram que as enzimas das frações 3 e 4 rompem as ligações glicosídicas α -1,4 da maltose formando glicose, confirmando os resultados de Pazur et al. (42, 43) sobre a amiloglicosidase de Aspergillus niger.

5.4. - Grau de Insolubilização da Enzima em Resina

Amiloglicosidase purificada e amiloglicosidase concentrada foram ligadas em resina ativada usando os métodos descritos em 4.4.1, 4.4.2., e 4.5.1. Os resultados obtidos estão representados no Quadro 5. Como podemos observar pelos resultados, não há diferenças no grau de insolubilização entre a enzima purificada e a enzima concentrada. Baseados nêstes resultados a insolubilização da enzima foi feita, nas demais experiências, usando a enzima concentrada.

O grau de insolubilização da enzima em resina ativada foi estudado conforme descrito em 4.5.2. Os resultados estão representados nas Figuras 5 e 6, e Quadro 5.

Foi verificado, pelos dados apresentados, que adicionando uma solução enzimática de atividade correspondente a 0.34 UA a 2,0 g de resina, somente 0,10 UA foram efetivamente ligados à resina.

Os dados obtidos mostram que há um aumento da quantidade de enzima ligada à resina correspondente ao aumento da concentração da enzima na solução a ser tratada com a resina. O máximo de ligação de enzima à resina foi obtido com uma concentração inicial de 4,08 UA. Com essa concentração, provavelmente, atingiu-se o ponto de saturação dos grupos funcionais da resina.

5.5. - Efeito das Concentrações de Tampão Acetato

O estudo foi feito como descrito em 4.5.3. e os resultados estão representados no Quadro 6 e Figura 7. Pela Figura 7 verifica-se que há correlação entre atividade enzimática no sobrenadante e a densidade ótica (D.O) dessa solução. O aumento da densidade ótica mostrou que houve um aumento da concentração da enzima na solução sobrenadante. Determinou-se também a atividade enzimática no sobrenadante, como descrito em 4.1.3., e correlacionou-se com a densidade ótica.

Verificou-se que até uma concentração de 0,3 M de acetato no tampão não houve perda de enzima pela resina, mas aumentando-se a concentração de tampão acetato acima de 0,3 M começou a haver eliminação da enzima ligada à resina.

5.6. - Efeito de Vários pH de Tampão Acetato sobre a Quantidade de Enzima Ligada à Resina

Foi estudado como descrito em 4.5.4. e os resultados estão representados na Figura 8. Considerou-se que a máxima

proporção obtida de enzima ligada à resina correspondia a 100% de rendimento, obtida entre pH 4,0 e 5,0. Verificou-se um abaixamento de 6% no rendimento da enzima insolubilizada quando o pH caiu a 3,6.

5.7. - Efeito da Temperatura nas Atividades Enzimáticas

Este efeito estudado como descrito em 4.6.1.

Os resultados obtidos estão representados na Figura 10 e no Quadro 7.

Até 50°C as duas enzimas não perderam atividade, mas a 55°C a perda de atividade da enzima insolubilizada foi de 5% enquanto a perda de atividade para a enzima solúvel foi de 2%. A 65°C, a perda de atividade enzimática atingiu 70% para a enzima insolubilizada e 50% para a enzima solúvel. Observou-se que a enzima solúvel é mais termo-estável que a insolubilizada até uma temperatura de 75°C, mas a 80°C as duas formas de enzima perdem completamente suas atividades enzimáticas. Portanto os dados indicam que há uma maior sensibilidade da enzima insolubilizada ao aumento da temperatura.

5.8. - Efeito do Tempo de Incubação a Várias Temperaturas nas Atividades Enzimáticas

Este estudo foi feito como descrito em 4.6.2.

As figuras 11, 12 e 13 mostram a relação entre a termo-estabilidade das enzimas solúvel e insolubilizada a 45, 50 e 60°C, respectivamente, e o tempo de incubação.

Pela Figura 11, verifica-se que para a enzima solúvel, a 45°C houve 27% de perda de atividade enzimática em 67 horas, enquanto para a enzima insolubilizada, nesta mesma temperatura, a perda foi de 40%. Após estes intervalos de tempo, as perdas de atividades enzimáticas de ambas as enzimas são relativamente pequenas até um período de 235 horas. A perda final de atividade enzimática, após este período, foi de 32% para a enzima solúvel e de 42% para a insolubilizada. Isso mostra que, a 45°C, a enzima solúvel é mais termo-estável, mesmo num grande intervalo de tempo, que a enzima insolubilizada.

Existe a mesma tendência a 50°C, onde a porcentagem de perda de atividade em ambas as formas é maior, conforme mostra a Figura 12. Esta perda, ao final de 235 horas, foi de 76% para a enzima solúvel e de 100% para a enzima insolubilizada.

Finalmente, a Figura 13, mostra que há perda de 85% de atividade enzimática para a forma solúvel e de 100% para a insolubilizada ao final de apenas 24 horas, a temperatura de 60°C.

Estes resultados indicam que a amiloglicosidase insolubilizada é termo-lábil quando comparada com a sua forma original (enzima solúvel).

É possível que a enzima ligando-se à resina tenha sua conformação alterada, o que afetaria a sensibilidade dos seus centros ativos ao calor.

5.9. - Estudo do pH Ótimo para as Atividades das Enzimas Solúvel e Insolubilizada

Este estudo foi feito como descrito em 4.6.3. Conforme pode ser observado na Figura 14, as atividades máximas das enzimas nos diferentes pH foram expressas como porcentagem de atividade relativa, considerando que a máxima atividade enzi-

Pela Figura 11, verifica-se que para a enzima solúvel, a 45°C houve 27% de perda de atividade enzimática em 67 horas, enquanto para a enzima insolubilizada, nesta mesma temperatura, a perda foi de 40%. Após estes intervalos de tempo, as perdas de atividades enzimáticas de ambas as enzimas são relativamente pequenas até um período de 235 horas. A perda final de atividade enzimática, após este período, foi de 32% para a enzima solúvel e de 42% para a insolubilizada. Isso mostra que, a 45°C, enzima solúvel é mais termo-estável, mesmo num grande intervalo de tempo, que a enzima insolubilizada.

Existe a mesma tendência a 50°C, onde a porcentagem de perda de atividade em ambas as formas é maior, conforme mostra a Figura 12. Esta perda, ao final de 235 horas, foi de 76% para a enzima solúvel e de 100% para a enzima insolubilizada.

Finalmente, a Figura 13, mostra que há perda de 85% de atividade enzimática para a forma solúvel e de 100% para a insolubilizada ao final de apenas 24 horas, a temperatura de 60°C.

Estes resultados indicam que a amiloglicosidase insolubilizada é termo-lábil quando comparada com a sua forma original (enzima solúvel).

É possível que a enzima ligando-se à resina tenha sua conformação alterada, o que afetaria a sensibilidade dos seus centros ativos ao calor.

5.9. - Estudo do pH Ótimo para as Atividades das Enzimas Solúvel e Insolubilizada

Este estudo foi feito como descrito em 4.6.3. Conforme pode ser observado na Figura 14, as atividades máximas das enzimas nos diferentes pH foram expressas como porcentagem de atividade relativa, considerando que a máxima atividade enzi-

mática correspondia a 100% de atividade obtida entre pH 4,0, e 5,0 para enzima insolubilizada.

A enzima insolubilizada possui uma faixa de pH ótimo para a sua atividade, bem maior que a da enzima solúvel. A atividade da enzima insolubilizada é menos dependente do pH do que a atividade da enzima solúvel.

5.10. - Recuperação da Enzima I. solubilizada após a Reação com o Substrato

Este estudo foi feito como descrito em 4.5.6. De acordo com os resultados apresentados na Figura 9, não houve perda de atividade enzimática até a segunda repetição. Após a terceira repetição, o complexo enzima-resina ainda mantinha 57% de sua atividade original. Ainda na sexta repetição a enzima ligada retinha 24% da atividade.

Geralmente, as enzimas solúveis não podem ser recuperadas após a reação com o substrato, e não há solução para a separação e recuperação da enzima do substrato. Portanto, a recuperação da enzima na operação de sistemas descontínuos (batch system) para reações enzimáticas industriais torna-se impossível. Este é um dos motivos que tornam os processos enzimáticos pouco viáveis economicamente, pois o preço das enzimas é geralmente elevado. Por outro lado, o uso de uma enzima insolubilizada em um processo descontínuo pode oferecer uma vantagem sobre a reação com enzima solúvel, pois a enzima pode ser recuperada e novamente empregada outras reações.

Além disso, a enzima insolubilizada em suporte insolúvel pode ser aplicada em sistema contínuo pelo seu empacotamento em coluna.

5.11. - Comparação da Cinética da Amiloglicosidase Solúvel e Insolubilizada

Este estudo foi feito como descrito em 4.6.4. Conforme mostram os dados dos Quadros 8 e 9, pode-se obter os valores da velocidade de hidrólise relativa para cada concentração diferente do substrato.

SCHWIMMER (56, 58) aplicou a equação de Lineweaver - Burk e calculou o valor de Km da alfa-amilase, empregando como substrato amido. Assim, o valor de Km foi expresso em mg de amido por ml.

Como o peso molecular do amido ainda não foi determinado o valor de Km não pode ser calculado em Mol por litro, como é a forma mais comum de apresentação de resultados. Com base no trabalho de SCHWIMMER (56,58) aplicou-se a equação de Lineweaver - Burk para calcular o Km, usando os dados indicados nos Quadros 8 e 9.

Assim, a recíproca da velocidade de hidrólise relativa (v) é $\frac{1}{v}$, e a recíproca da quantidade de substrato, em mg por ml, é $\frac{1}{s}$.

Obtidos os gráficos de $\frac{1}{s}$ em relação a $\frac{1}{v}$, mostrados nas Figuras 16 e 17, mediu-se a inclinação das retas, nos gráficos, das Figuras 14 e 15, calculando-se também o valor de Km pelo valor da inclinação e o valor de $\frac{1}{v}$. O valor de Km

obtido para a amiloglicosidase solúvel foi de 4,44 mg/ml e o valor de Km para a amiloglicosidase insolubilizada foi de 29,31 mg/ml.

O valor maior de Km obtido para a amiloglicosidase insolubilizada indica que a enzima na forma insolubilizada tem menos reatividade do que na forma solúvel.

5.12. - Estudo da Cinética da Reação da Amiloglicosidase Insolubilizada na Coluna

Este estudo foi feito usando o aparelho descrito em 4.5.5. e representado na Figura 15.

BAR-ELI e KATCHALSKI, (14), estudando a hidrólise do éster metílico da L-arginina em colunas de politirosiltripsina verificaram que substituindo, na equação integrada da fórmula de MICHAELIS-MENTEN, o tempo t pela expressão h/V, onde h = altura da coluna e V = velocidade de fluxo, obtiveram a seguinte equação para o caso de $(S) > K_m$:

$$\left(S_0 \right) - \left(S_t \right) + K_m \ln \frac{\left(S_0 \right)}{\left(S_t \right)} = k \left(E \right) t \dots\dots\dots 1$$

$$\left(S_0 \right) - \left(S_h \right) + K_m \ln \frac{S_0}{S_h} = k \left(E \right) \frac{h}{V} \dots\dots\dots 2$$

$$\frac{\left(S_0 \right) - \left(S_h \right)}{\left(S_0 \right)} = \frac{k \left(E \right) h}{S_0 V} \dots\dots\dots 3$$

S_0 = Concentração inicial de substrato

S_t = Concentração de substrato após o tempo de reação.

- t = Tempo
 (S_h) = Concentração do substrato do efluente
 (E) = Concentração da enzima
 k = Constante de velocidade de reação
 K_m = Constante de Michaelis-Menten

Nestas equações a expressão $\frac{(S_o) - (S_h)}{(S_o)}$ representa a proporção de conversão do substrato na coluna e é inversamente proporcional à velocidade de fluxo do substrato.

Por outro lado, LILLY et al. (18, 33) derivaram a seguinte equação integrada de fórmula de MICHAELIS MENTEN:

$$P s_o = K_m \ln (1 - P) + \frac{C}{Q}$$

$$P = \frac{(S_o) - (S_h)}{(S_o)}, \text{ Proporção de conversão de substrato}$$

C = Capacidade de reação

Q = Velocidade de fluxo

A curva correspondente a equação, derivada por LILLY et al. (18, 33), passa no ponto $P = 1$ quando $Q = 0$, e é assíntota a abcissa para $P = 0$ quando $Q \rightarrow \infty$, como seria de esperar desde que estas reações fôssem de tempo infinito e zero, respectivamente.

Estas propriedades estão ilustradas nas curvas da Figura 18, traçadas para valores fixos de C e K_m , variando-se os valores de Q .

Construiu-se um gráfico de P em relação a Q, usando os dados do Quadro 10, que foram obtidos pelo método descrito em 4.5.5. Como pode ser visto pela Figura 19, a curva obtida apresentou-se semelhante à curva teórica obtida pela equação da cinética de enzima insolubilizada.

WILSON et al. (37) observaram o mesmo fenômeno usando o complexo amiloglicosidase-DEAE celulose, que foi combinado através de ligação covalente.

Portanto, podemos concluir que a amiloglicosidase ligada a resina iônica e ligada a DEAE celulose através de ligação covalente apresentam, cineticamente, a mesma ação enzimática.

6 - RESUMO E CONCLUSÕES

1. Do fracionamento da amiloglicosidase fúngica em DEAE-celulose foram obtidas duas frações diferentes que possuem atividade de amiloglicosida-se, pois ambas rompem ligações glicosídicas α -1,4 da maltose formando glicose.
2. Do ponto de vista cinético, as duas frações mostraram ser idênticas, não diferindo em suas ati-vidades.
3. Usando-se Amberlite IR-45 (OH^-) e tampão aceta-to pH 4,0, foi possível estudar a capacidade de ligação da enzima com a resina aniônica, obten-do-se ligação máxima num intervalo de concentra-ção de 0,05 até 0,3 N.
4. Concentrações de tampão acetato de 0,4 até 1 N liberam a enzima da resina.
5. Foi estudado o efeito do pH nas ligações da en-zima à resina, usando solução tampão acetato 0,05 N, e verificou-se que o máximo de ligação se deu entre pH 4,0 e 5,0.
6. A temperatura mostrou influir sobremaneira na atividade da enzima insolubilizada, bem como na enzima solúvel. Notou-se que elas não perdem a-tividade até uma temperatura de 50°C, porém a

55°C já se verificou uma perda de 5% para a enzima insolubilizada e de 2% para a solúvel. À temperatura de 80°C ambas as formas são praticamente inativadas perdendo toda a atividade enzimática.

7. O estudo dos efeitos da temperatura e do tempo de incubação, para temperaturas de 45, 50 e 60°C, e durante um intervalo de tempo máximo de 235 horas mostraram que a amiloglicosidase solúvel tem uma termo-estabilidade maior que a sua forma insolubilizada. Notou-se que o comportamento das duas formas a 45 e 50°C diferem na porcentagem de perda, durante aquele intervalo de tempo. Já a 60°C o comportamento é diferente, pois após 24 horas as perdas são significativas, sendo de 85% para a forma solúvel e de 100% para a forma insolubilizada.
8. A enzima insolubilizada apresenta uma faixa de pH ótimo maior para a sua atividade do que a enzima na forma solúvel.
9. Verificou-se que a enzima insolubilizada pode ser recuperada após a reação com o substrato, pois de pois da sexta repetição ainda apresentou 24% de sua atividade original, demonstrando uma maior viabilidade econômica para seu emprego em processos industriais.

10. Procedeu-se a uma comparação do Km entre a amiloglicosidase solúvel e a insolubilizada. O valor da constante encontrada para a forma insolubilizada é maior que o da enzima solúvel, confirmando a menor atividade enzimática da enzima insolubilizada.

11. Foi verificada a conversão de amido em glicose, encontrando-se que a característica da velocidade de conversão do amido pela coluna de enzima insolubilizada apresentou a mesma cinética enzimática demonstrada por LILLY.

7 - QUADROS

Quadro 1

Concentração de proteínas totais e atividade da amiloglicosidase efluentes.

	Concentração de proteínas totais (mg)	Atividade da amilo_glicosidase total (UA)	Efluentes totais (ml)
Pico 3	25,3	63,8	110
Pico 4	17,3	43,6	165

Quadro 2

0,2 mg de proteína da fração 3 foi adicionada a 50 ml de substrato (amido em soluções de 1, 2, 3, e 4%) e incubada à temperatura de 60°C, durante 45 minutos. Após a incubação foi feita a determinação das substâncias redutoras.

Fração 3

Amido solúvel (S) mg/ml	$\frac{1}{S}$	Velocidade relativa de hidrólise (v) (%)	$\frac{1}{v}$
10	0,100	39	0,0256
20	0,050	66	0,0151
30	0,033	87	0,0115
40	0,025	100	0,0100

Quadro 3

Os dados referentes à fração 4, obtidos da maneira indicada no quadro 2 para a fração 3.

Fração 4

Amido solúvel (S) mg/ml	$\frac{1}{s}$	Velocidade relativa de hidrólise (v)(%)	$\frac{1}{v}$
10	0,100	40	0,0250
20	0,050	67	0,0149
30	0,033	88	0,0114
40	0,025	100	0,0100

QUADRO 4

**Insolubilização da Amiloglicosidase Purificada
e Concentrada em Resina (2 g.)**

UA = Unidade de Amiloglicosidase

Amiloglicosidase	Amiloglicosidase ligada a resina
Purificada, pico 3	0,35 UA
Purificada, pico 4	0,35 UA
Concentrada	0,35 UA

Quadro 5

Grau de insolubilização de enzima em resina

Atividade da enzima solúvel adicionado por 2 g de resina (UA)	Atividade da enzima ligado à resina (UA.)
0,34	0,10
0,68	0,17
1,36	0,22
2,04	0,28
2,70	0,30
3,40	0,34
4,08	0,35

Diversas concentrações de enzima solúvel dissolvida em tampão acetato 0,05 N, pH 4,0 foram adicionadas a 2 g de resina, previamente equilibrada com o mesmo tampão. Agitou-se com frequência durante uma hora. O sobrenadante foi separado e lavou-se várias vezes a resina com o mesmo tampão. Determinou-se, posteriormente, a atividade enzimica do complexo resina-enzima.

Quadro 6

Liberação da enzima em resina em função
de tampão acetato.

Concentração de tampão acetato Hcl.	Densidade ótica de sobrenadante 280 um X 100	Atividade da amilo- glicosidase de so- brenadante (UA)	Atividade da ami- loglicosidase de resina (UA)
0,1	3,0	0	0,200
0,2	3,0	0	0,200
0,3	3,0	0	0,200
0,4	5,0	0,046	0,180
0,5	6,0	0,070	0,165
0,6	7,0	0,080	0,145
0,7	8,5	0,090	0,120
0,8	9,0	0,110	0,100
0,9	9,5	0,120	0,088
1,0	10,0	0,140	0,085

Quadro 7

Perda (%) de atividade da amiloglicosidase
pelo aquecimento.

Temperatura °C	45	50	55	60	65	70	75	80
% de perda da amiloglicosidase solúvel	0	0	2	14	50	72	90	96
% de perda da amiloglicosidase insolubilizada	0	0	5	20	70	91	95	96

Quadro 8

Relação entre diferentes concentrações de amido solúvel e atividade constante da amiloglicosidase solúvel (0,3 UA).

Concentração de amido solúvel (S) mg/ml	$\frac{1}{s}$	Velocidade de hidrólise relativa v %	$\frac{1}{v}$
10	0,100	78	0,0130
20	0,050	91	0,0110
25	0,040	96	0,0104
30	0,033	97	0,0103
40	0,025	100	0,0100

Quadro 9

Relação entre diferentes concentrações de amido solúvel e atividade constante de amiloglicosidase insolubilizada.
(0,3 UA)

Concentração de amido solúvel [S] mg/ml	$\frac{1}{s}$	Velocidade de hidrólise relativa %	$\frac{1}{v}$
20	0,050	51	0,0196
30	0,033	64	0,0156
40	0,025	71	0,0140
60	0,015	90	0,0111
100	0,010	100	0,0100

Quadro 10

Velocidade de fluxo Q (ml por minuto)	2	5,2	9	12,5	17	23,7	30
$P = \frac{S_0 - S_t}{S_0}$	0,9	0,62	0,44	0,34	0,26	0,2	0,17

S_0 = Concentração inicial de substrato

S_t = Concentração de substrato após o tampão de reação

P = A fração de substrato que reagiu na coluna

Q = Velocidade de fluxo, ml/minuto.

FIGURA I

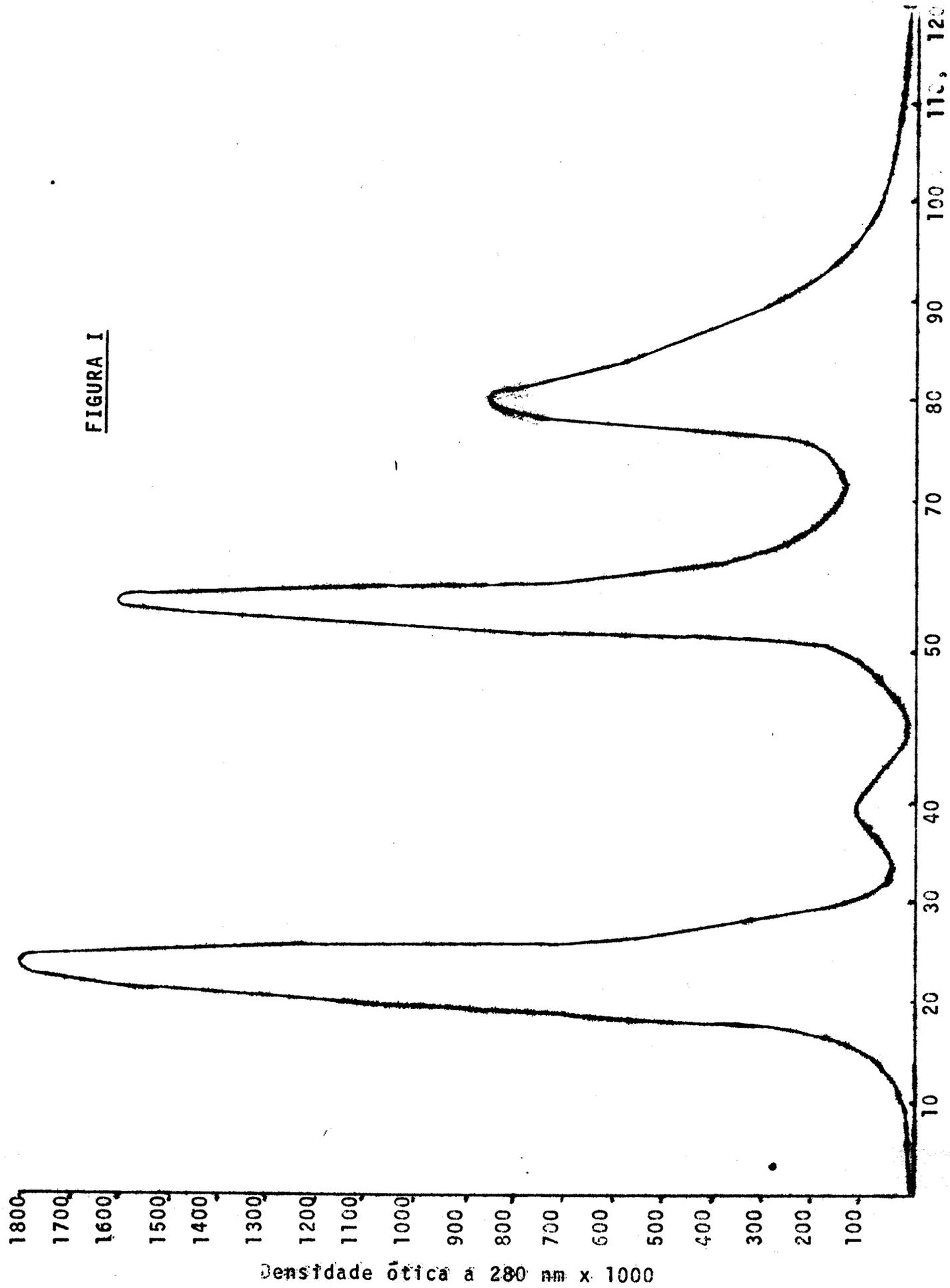


FIGURA 2

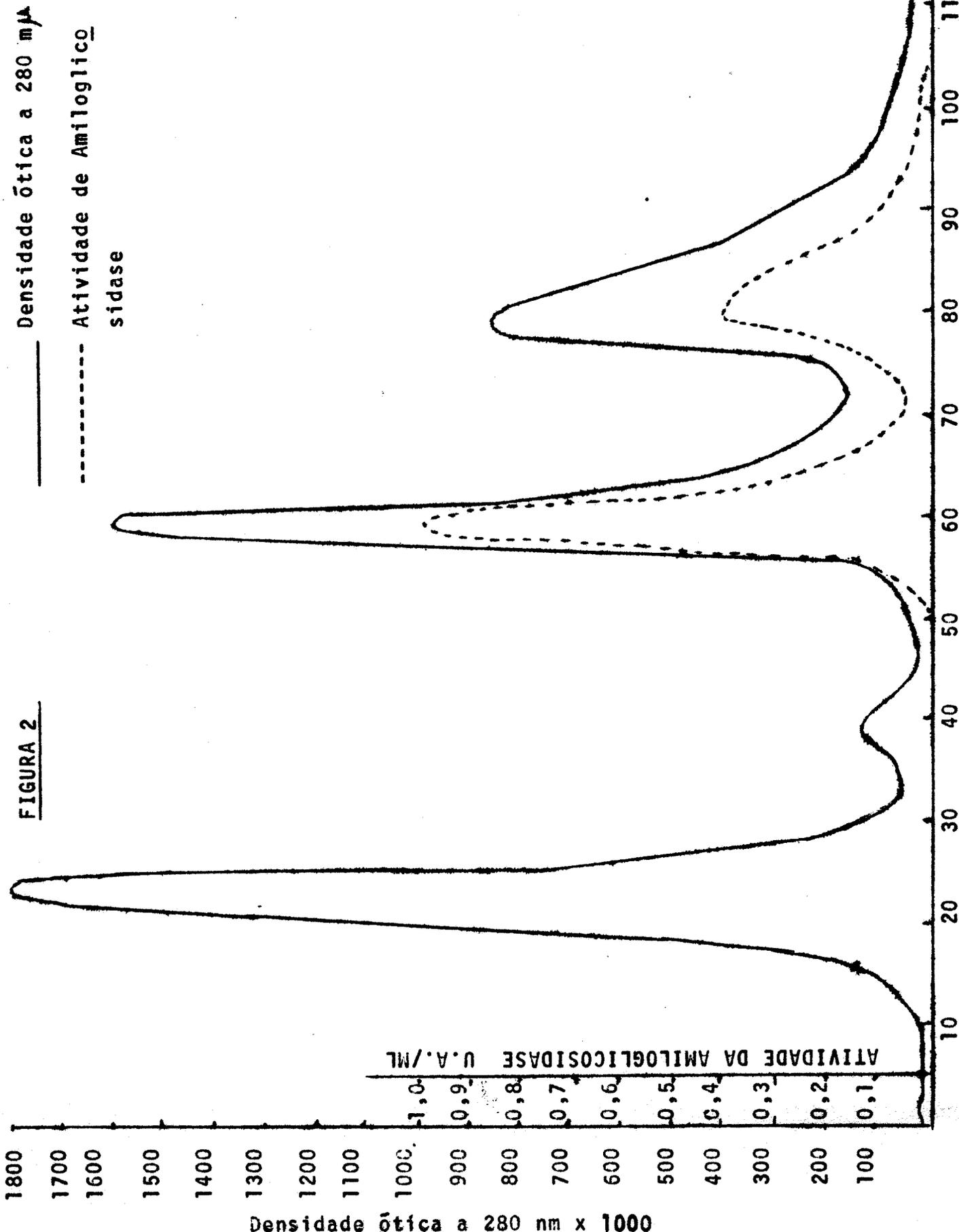


FIGURA 3

Eletroforese em papel e em acetato de celulose

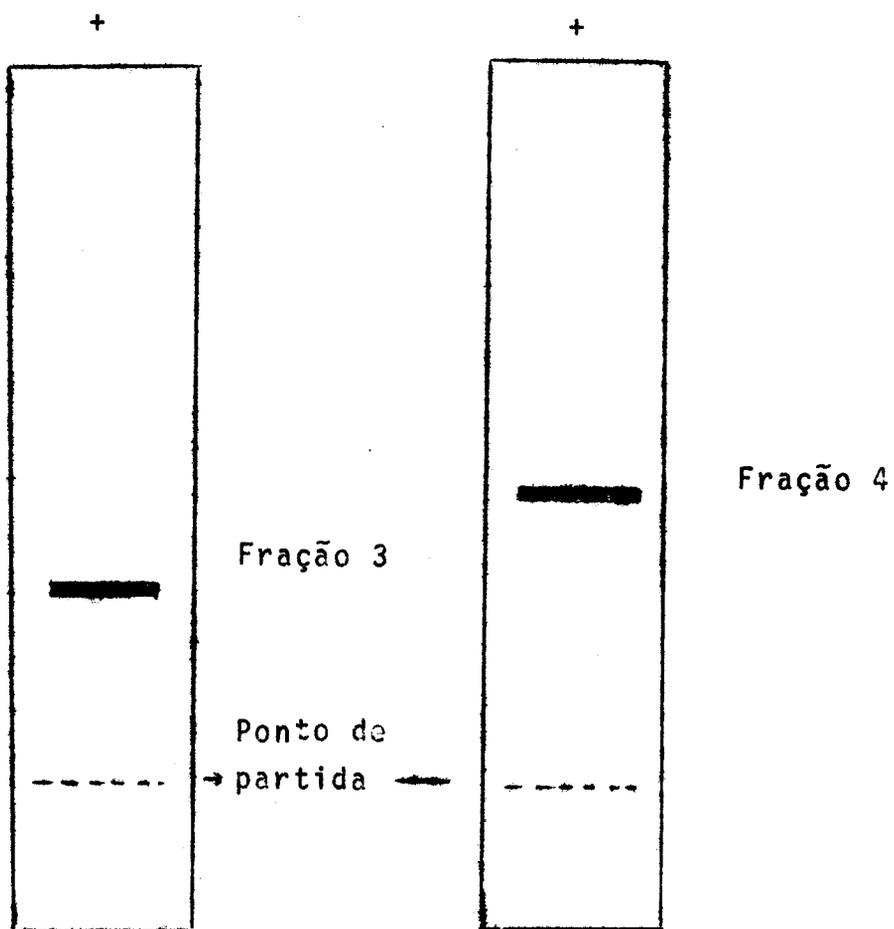


FIGURA 4:

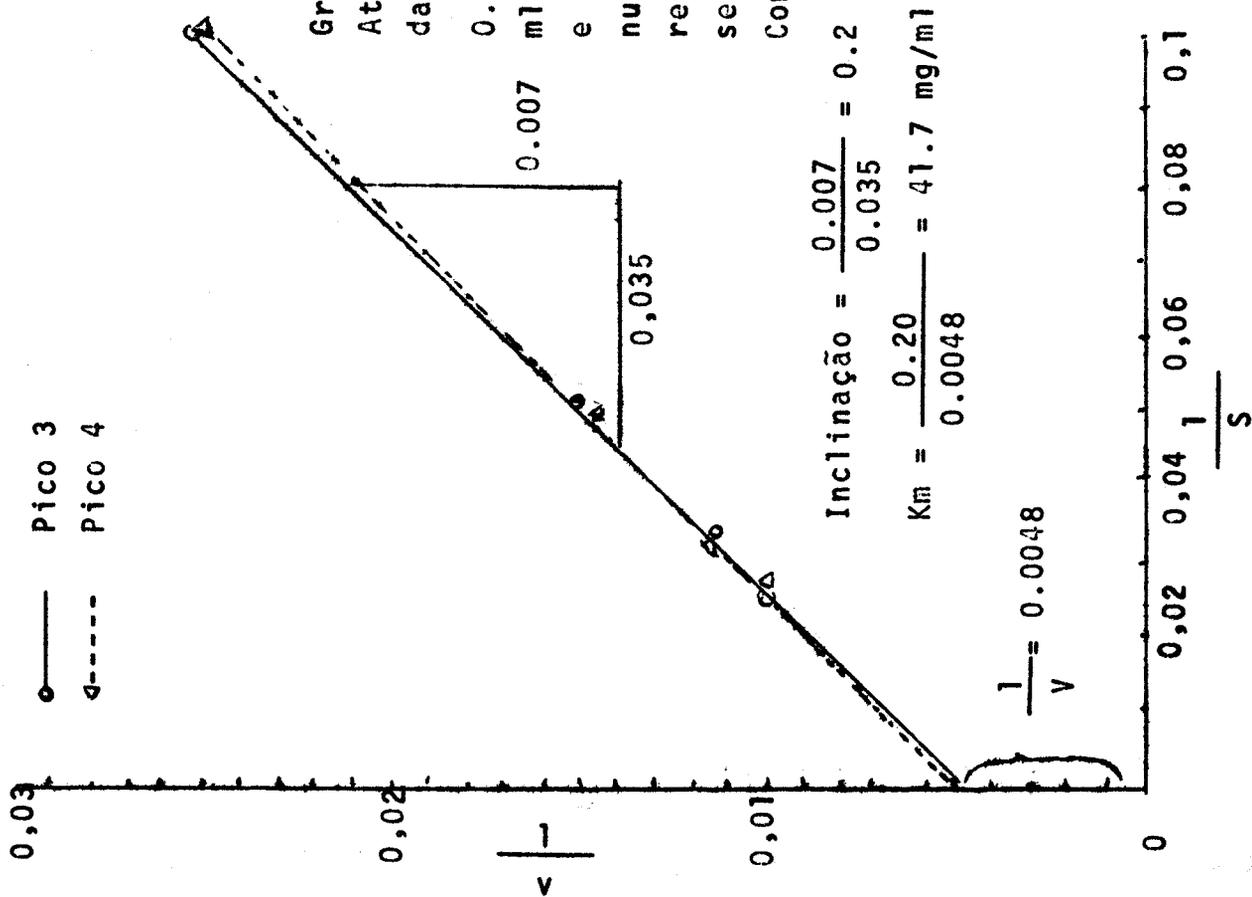


Gráfico de Lineweaver-Birk para Atividade de Amiloglicosidase das Frações 3 e 4.

0.2 mg de Amiloglicosidase e 50 ml de substrato foram misturados e incubados a 60°C durante 05 minutos. Após incubação, substância redutora é determinada, como rlico se.

Com base nos quadros 2 e 3.

FIGURA 5: Grau de Insolubilização da Enzima em Resina.
Este gráfico é baseado nos dados do Quadro 5
UA = Unidade da Amiloglicosidase.

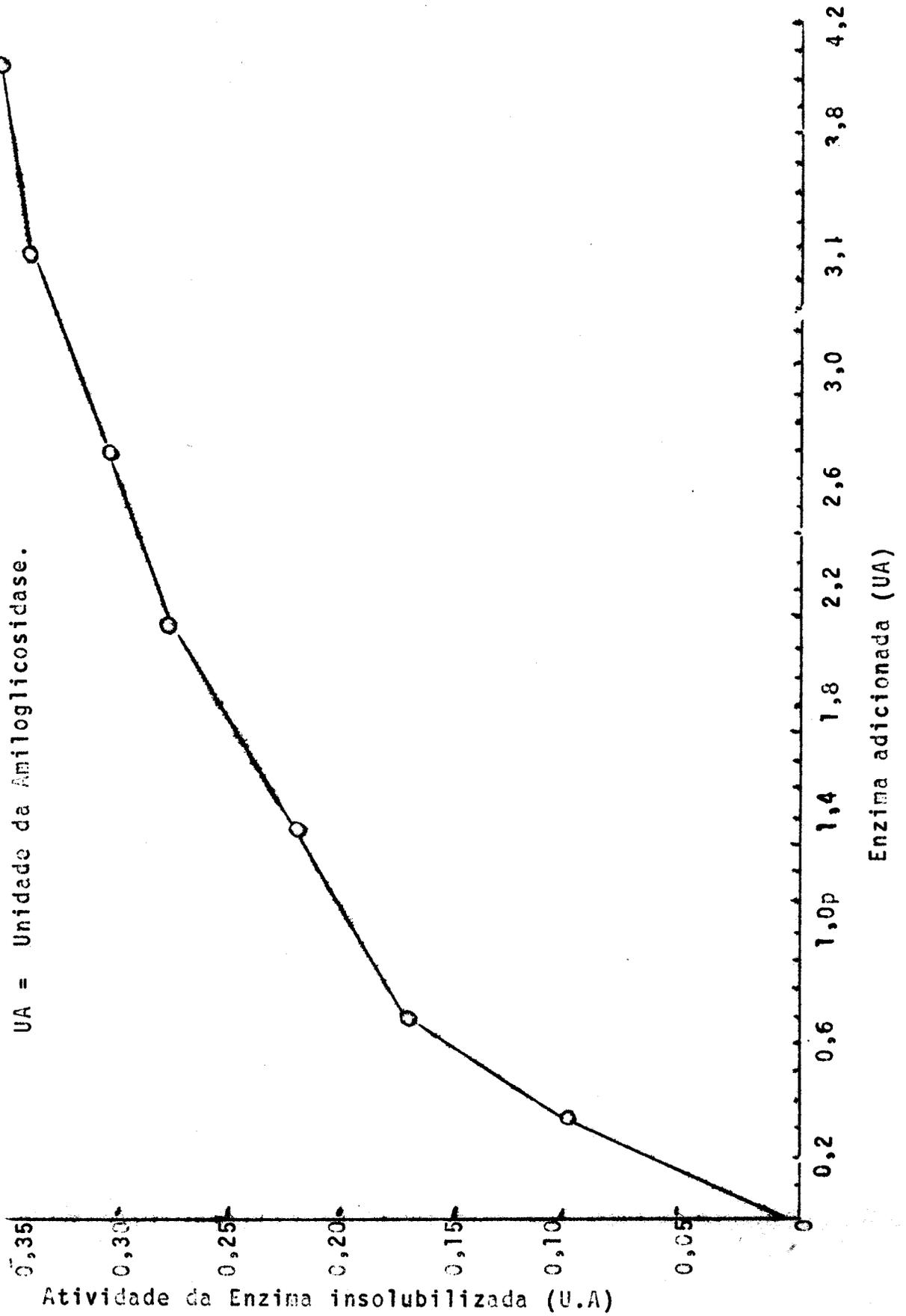


FIGURA 6: A insolubilização relativa foi calculada dividindo-se o valor de atividade da enzima insolubilizada à cada concentração de enzima adicionada, pela atividade máxima de enzima insolubilizada (0,35).

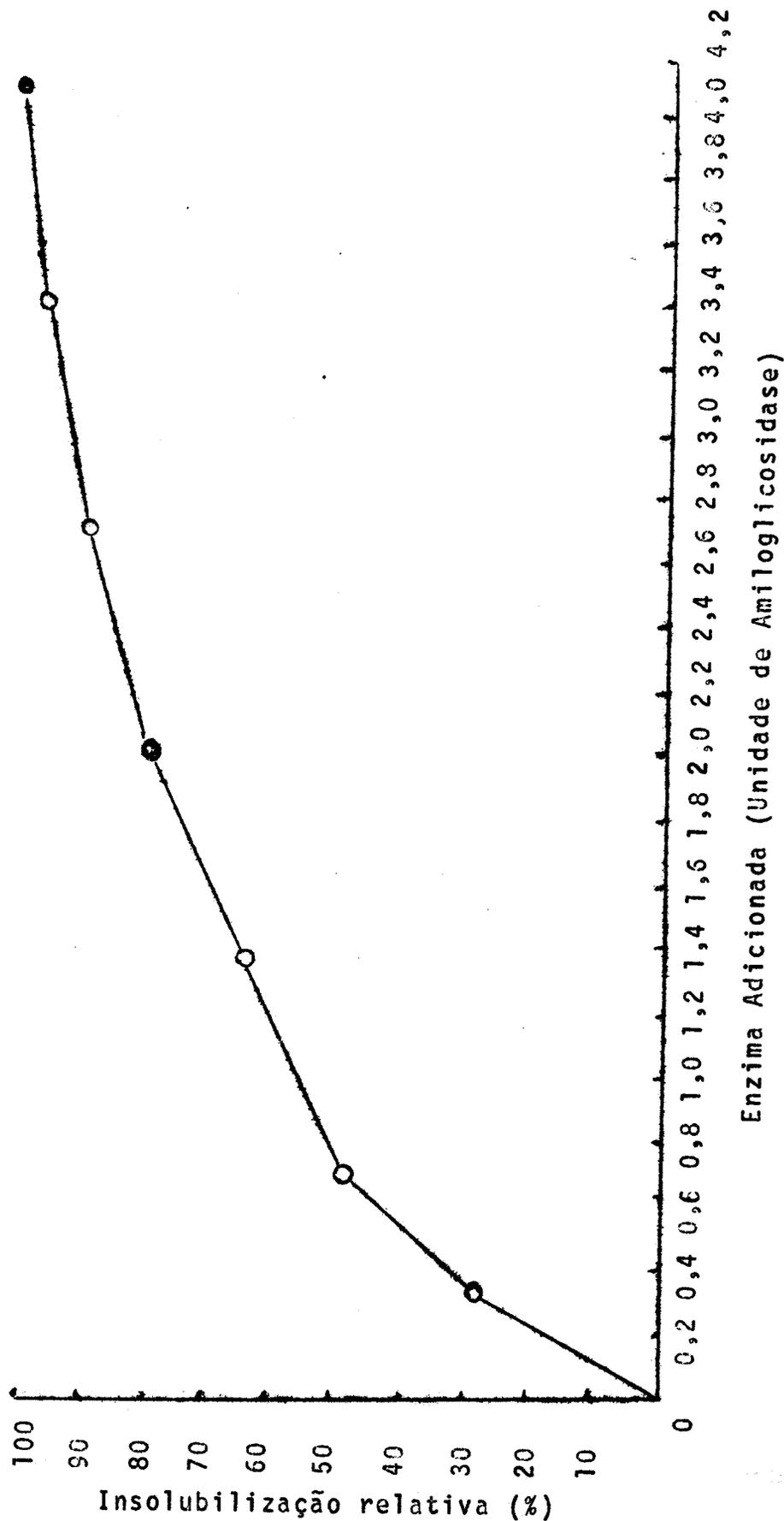


FIGURA 7: Efeito da Concentração de

Tampão Acetato

- — Densidade ótica do sobrenadante
- — Atividade da enzima insolubilizada
- △ — Atividade da amiloglicosidase do sobrenadante

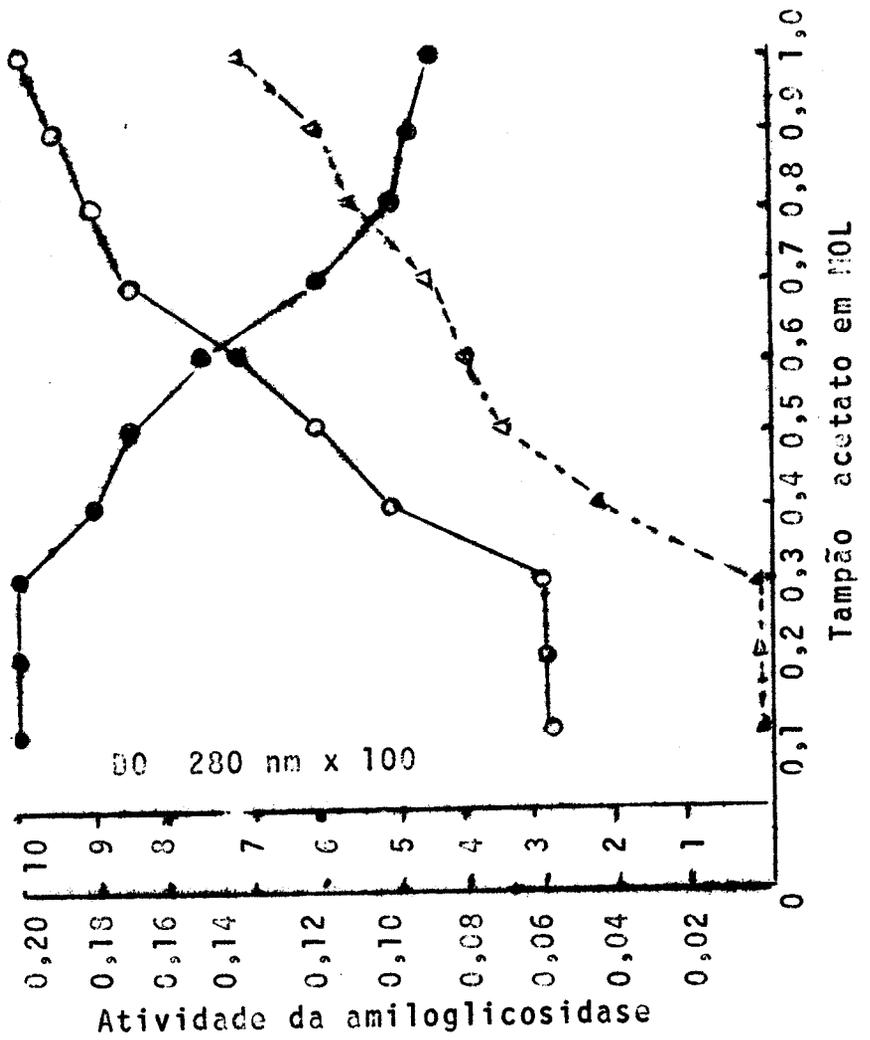


FIGURA 8: Efeito do pH na ligação da enzima a resina.

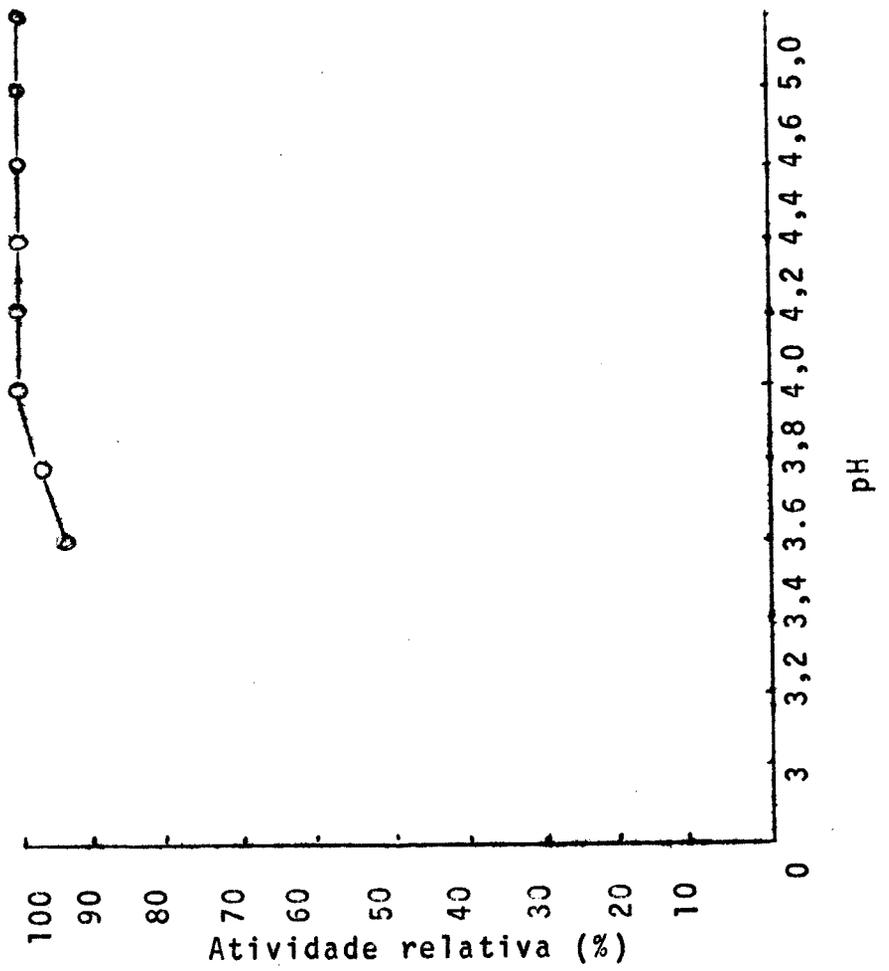


FIGURA 9 : Recuperação da Enzima após a Reação com o substrato.

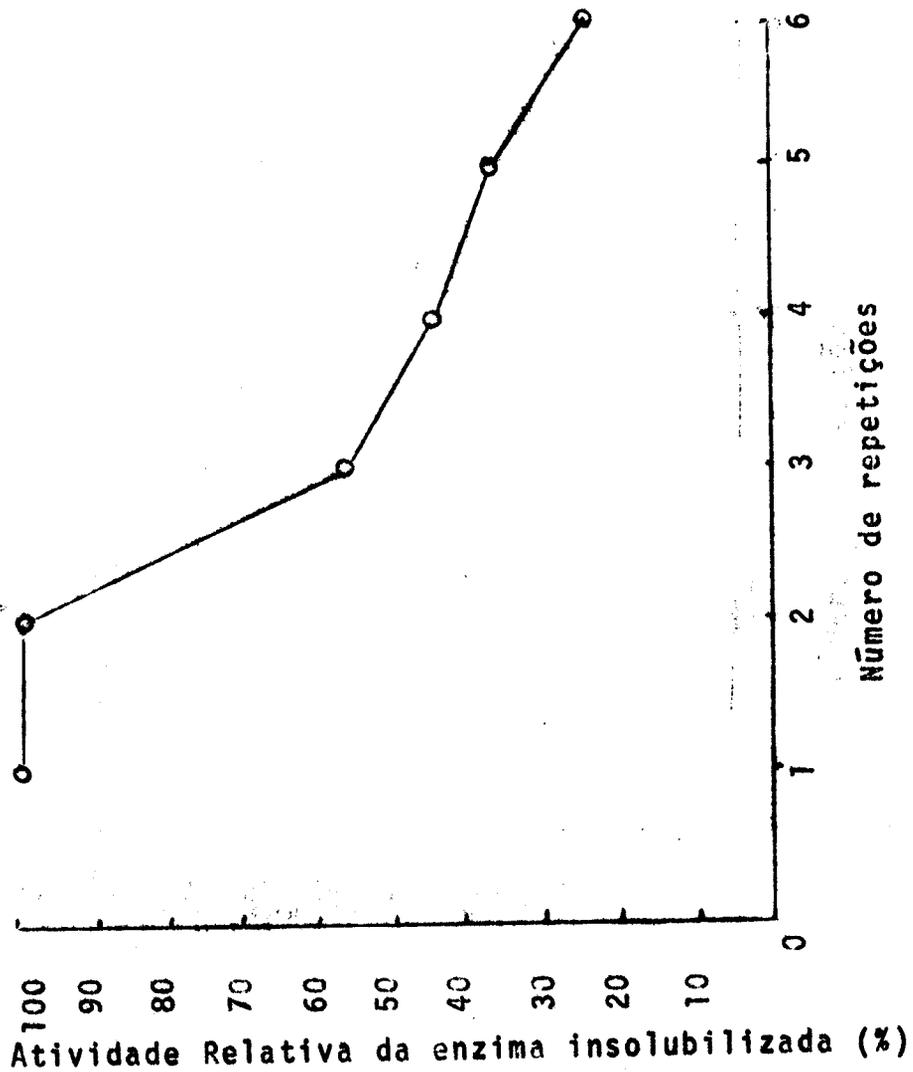


FIGURA 10: Efeito da Temperatura nas Atividades Enzimáticas.

○ — Enzima solúvel
△ - - - - - Enzima insolubilizada

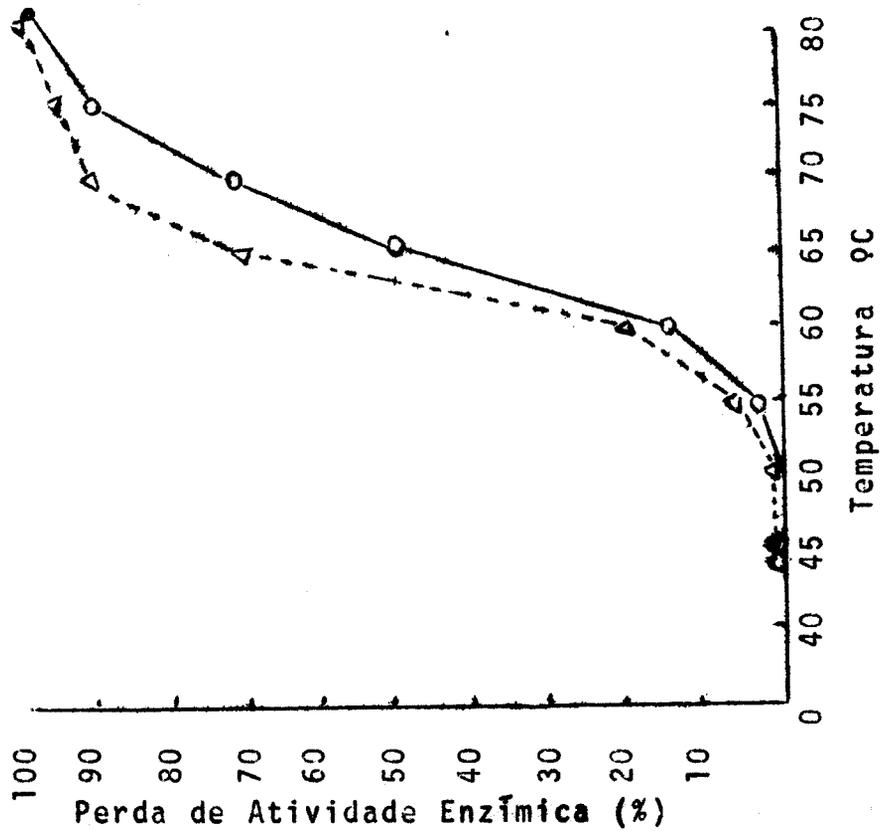


FIGURA 11 : Efeito do Tempo de Incubação à 45°C,
nas Atividades Enzimáticas

● — Enzima solúvel
▲ - - - - Enzima insolubilizada

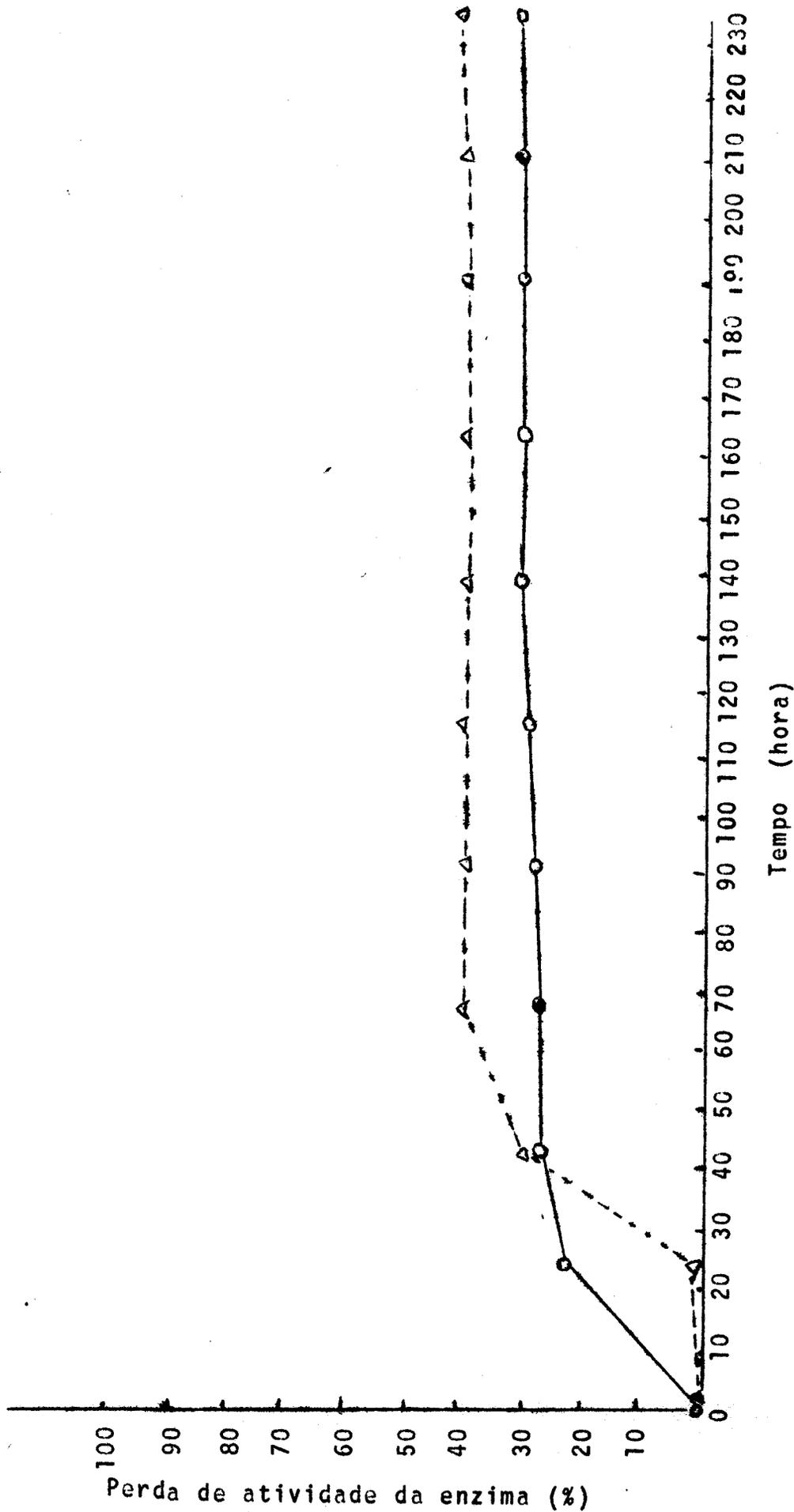


FIGURA 12: Efeito de tempo de incubação a 50°C, nas Atividades Enzimáticas.

—○— Enzima solúvel
- - -△- - - Enzima insolubilizada

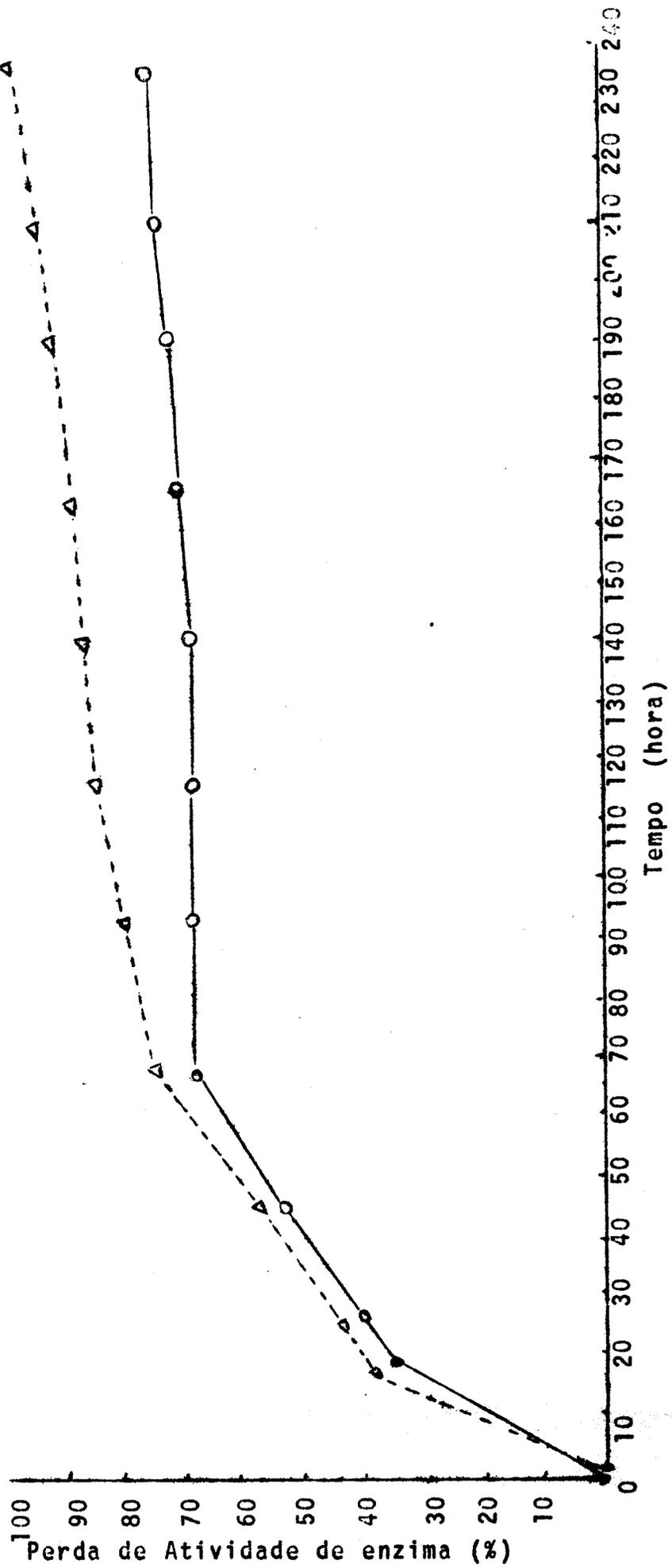


FIGURA 13: Efeito do Tempo de Incubação à 60°C nas Atividades Enzimáticas.

● — Enzima solúvel
△ — Enzima insolubilizada

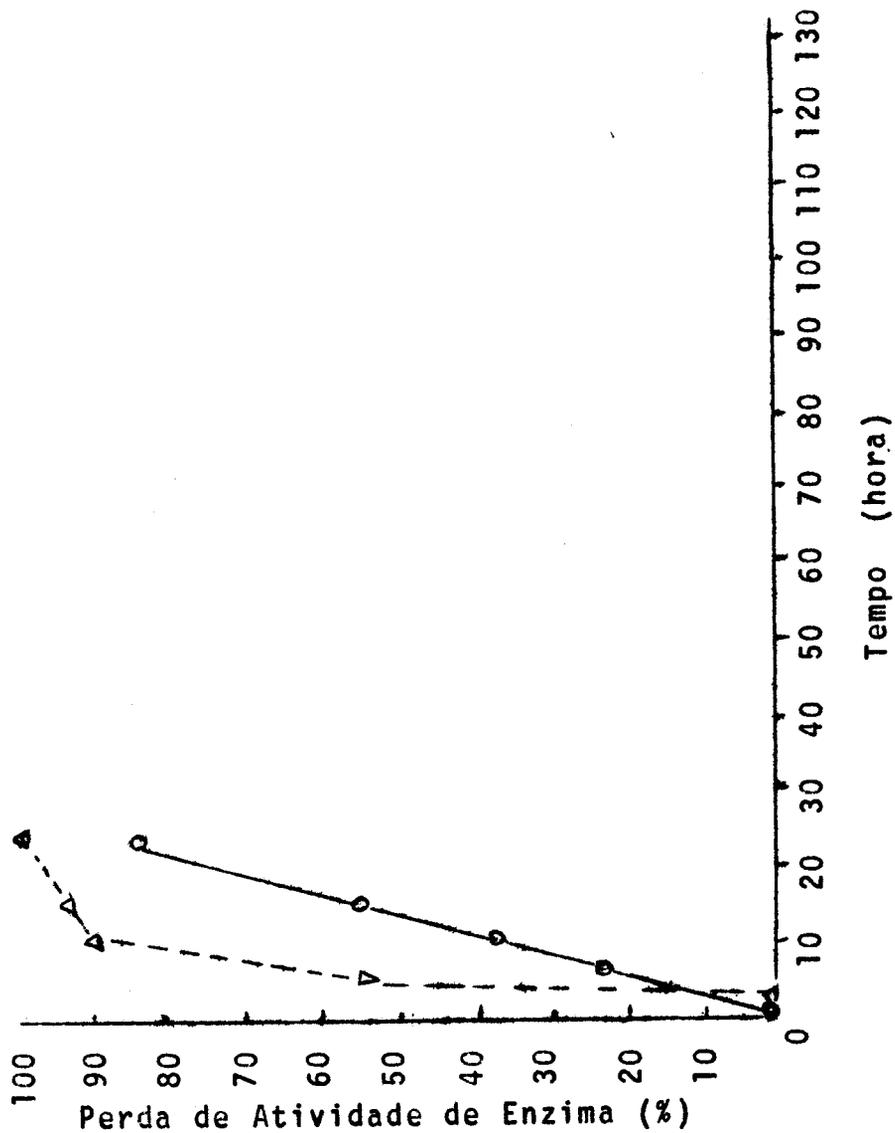


FIGURA 14 : Efeito do pH na Atividade da Enzima solúvel e Insolubilizada

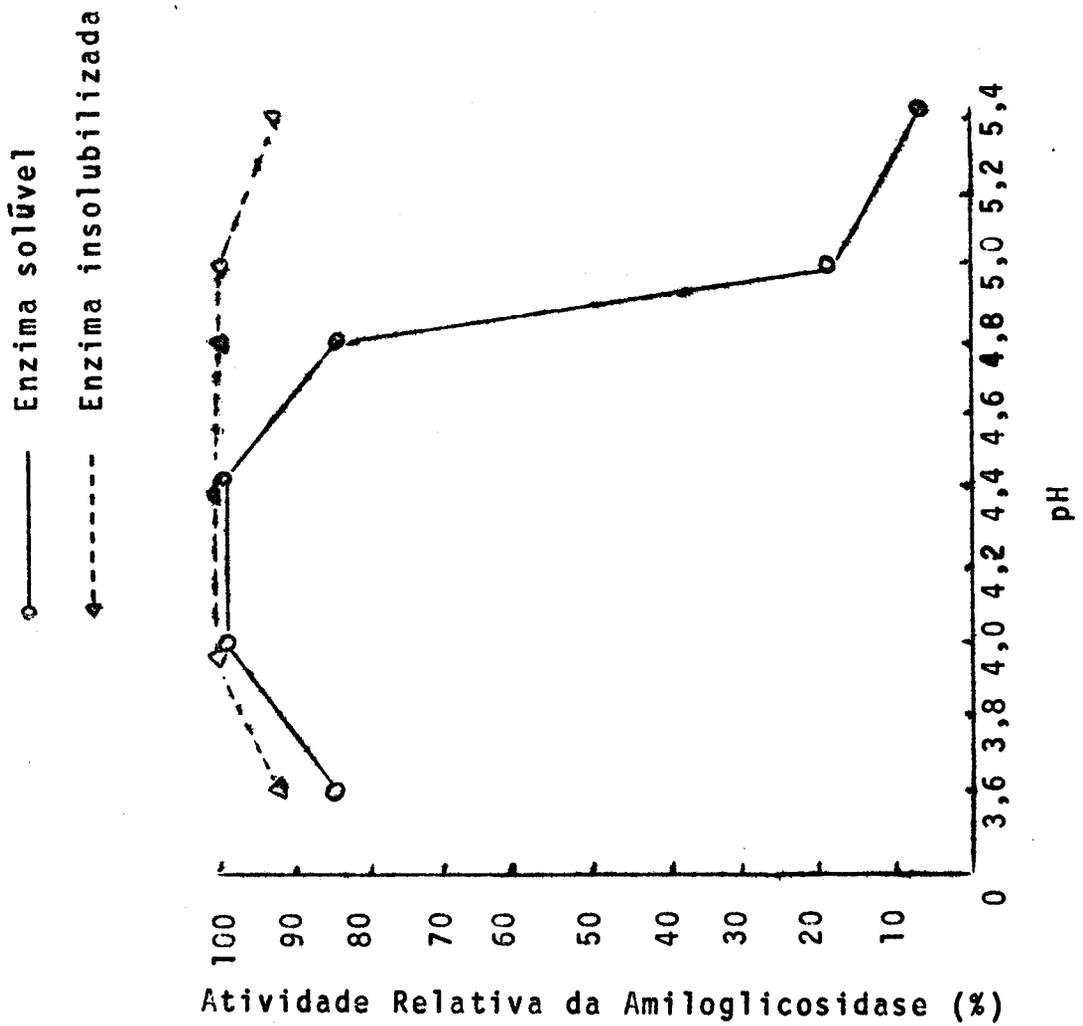


FIGURA 15

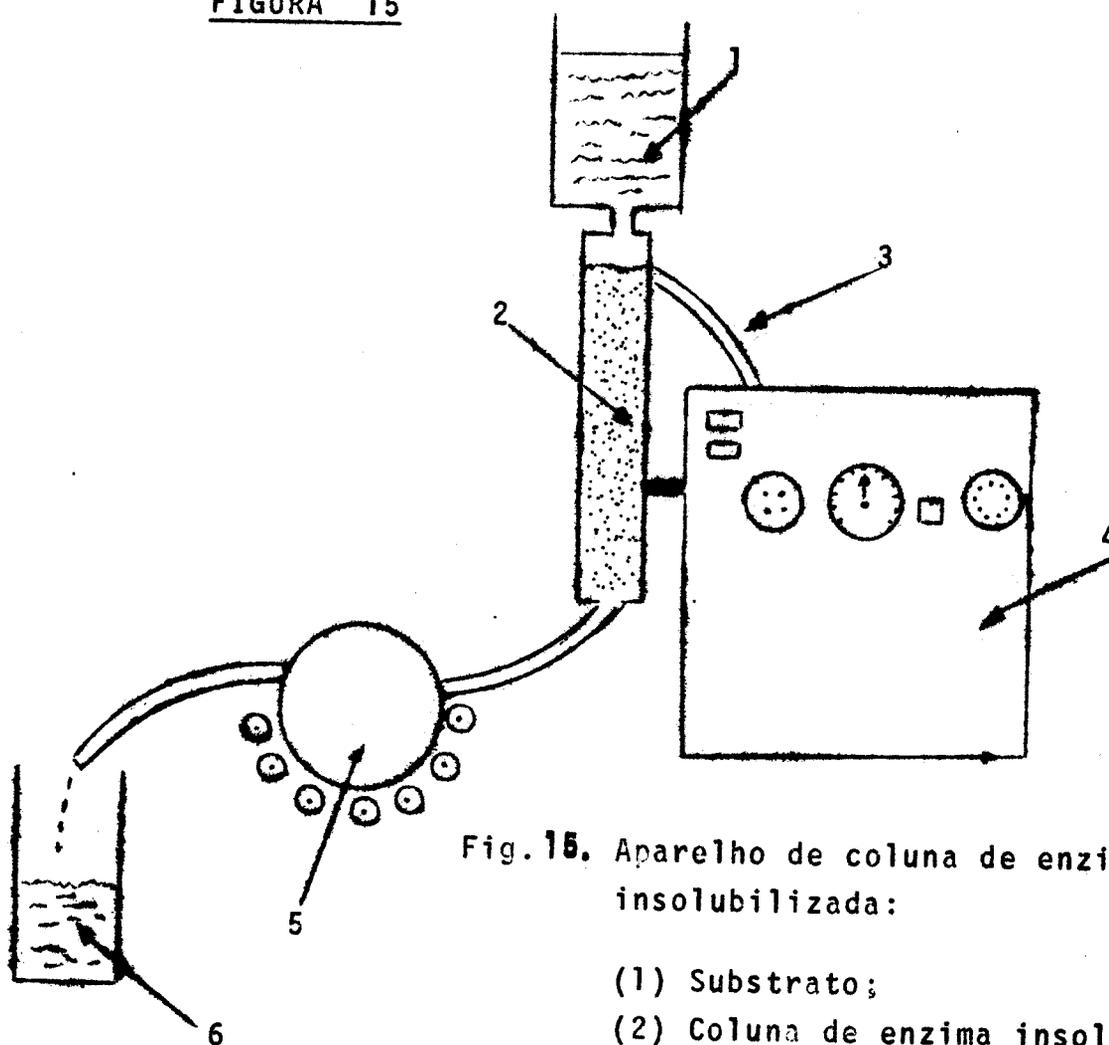


Fig. 15. Aparelho de coluna de enzima insolubilizada:

- (1) Substrato;
- (2) Coluna de enzima insolubilizada
- (3) Circulação de água com temperatura controlada;
- (4) Aparelho coletor de frações;
- (5) Bomba peristáltica;
- (6) Produto degradado.

FIGURA 16 : Gráfico do Método de Lineweaver-Burk para Amilglicosidase Solúvel com base nos dados do Quadro 8

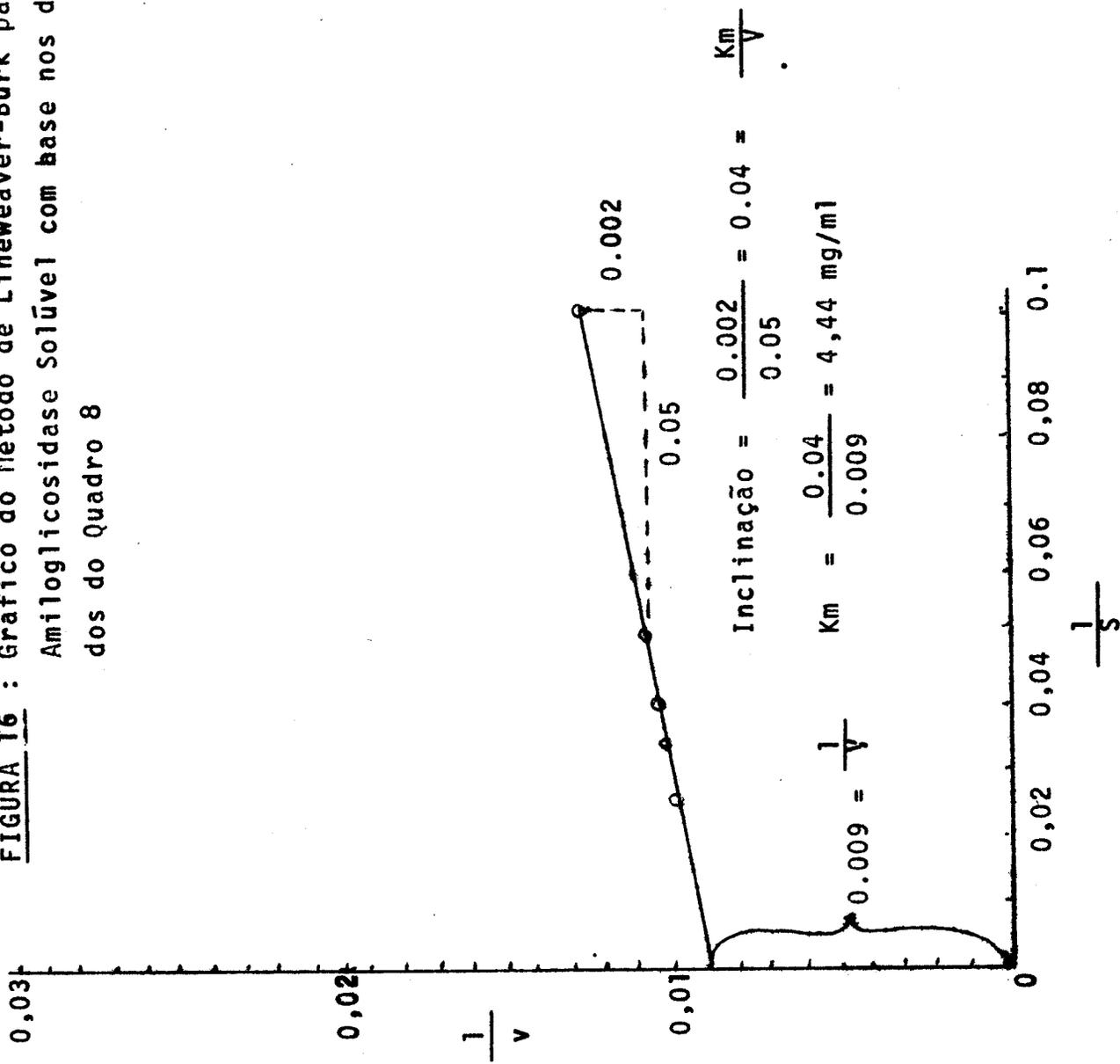


FIGURA 17 : Gráfico do Método de Lineweaver-Burk para Amilglicosidase in solubilizada, com base nos dados do Quadro 9.

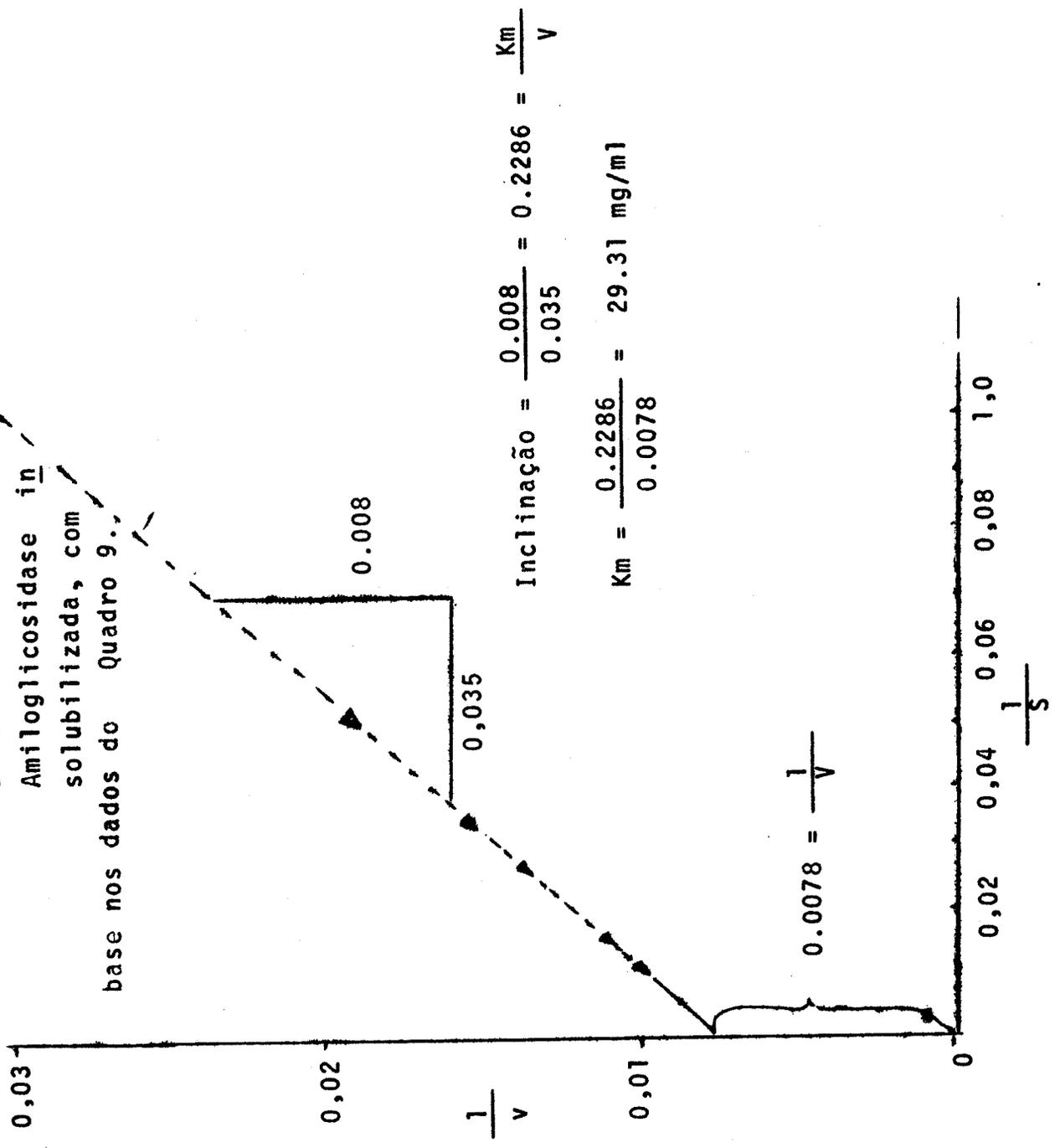


FIGURA 18: Relações teóricas entre a proporção de conversão de substrato (P), a capacidade de reação da coluna (C), e a velocidade de fluxo (Q) para K_m^2 2,5 ml².

1. Curva para $S_0 = 10^{-1} K_m$
2. Curva para $S_0 = K_m$
3. Curva para $S_0 = 4K_m$
4. Curva para $S_0 = 10K_m$

Essas curvas teóricas foram ilustradas por LILLY, (16)

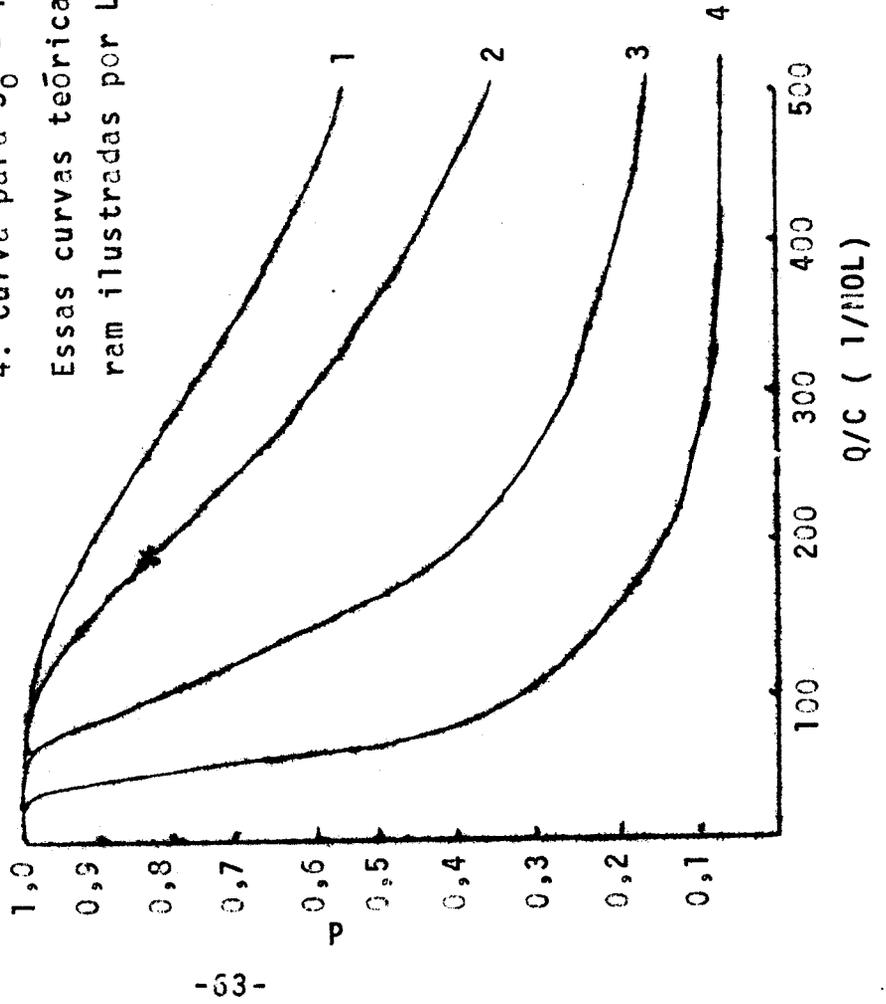
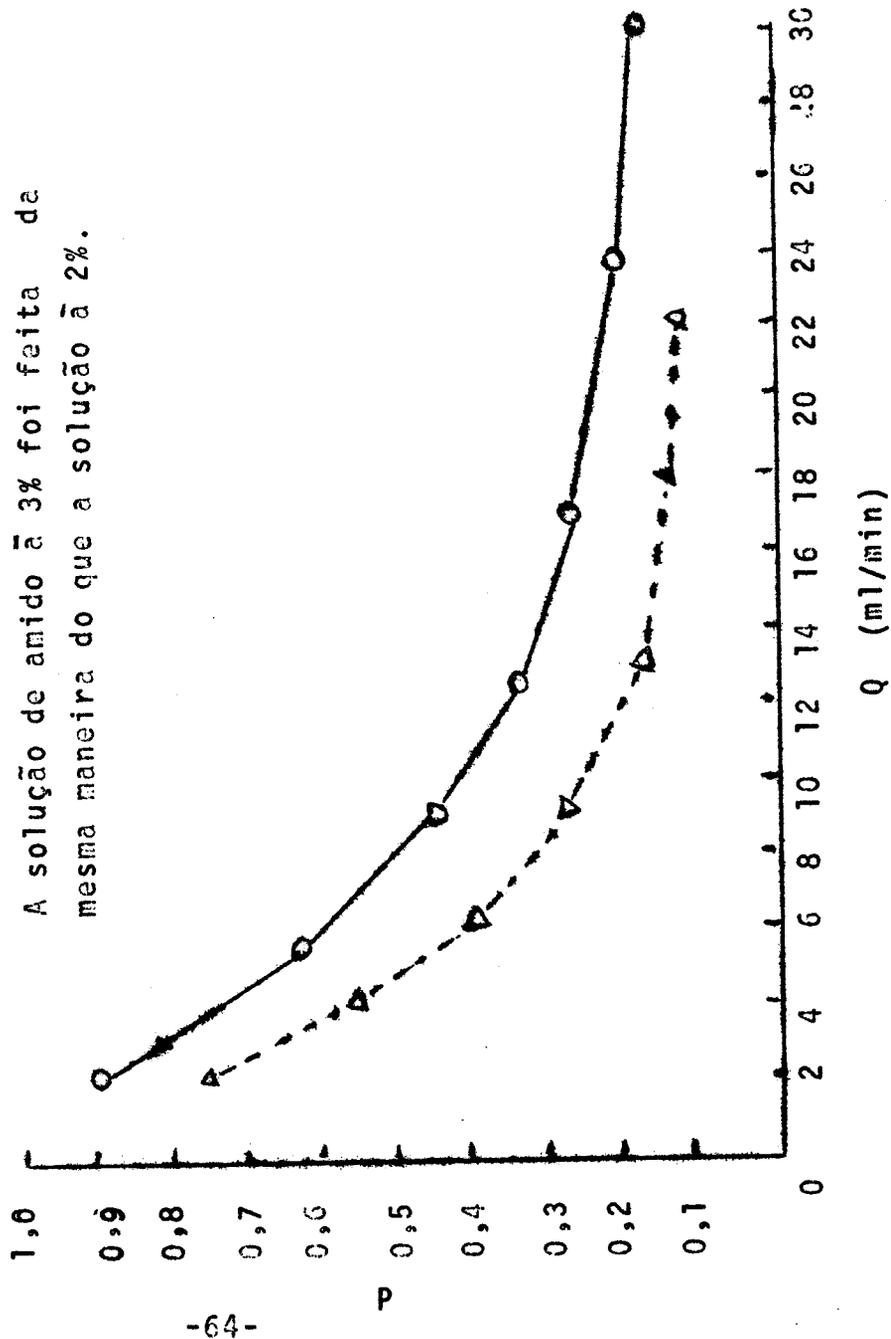


FIGURA 19: Cinética da Reação da Amiloglicosidase Insolubilizada na Coluna.

○ — Concentração de amido a 2%
△ - - - - Concentração de amido a 3%

A solução de amido a 3% foi feita da mesma maneira do que a solução a 2%.



9 - BIBLIOGRAFIA

1. Langmuir, I., and Schaefer, V.J., J. Am. Chem.Soc., 60, 1351, 1938.
2. Langmuir, I., and Schaefer, V.J., J. Chem. Rev., 24, 181, 1939.
3. Mits, M. A., New insoluble active derivative of an enzyme as a model for study of cellular metabolism, Science, 123, 1076, 1956.
4. McLaren, A. D., and Estermann, E.F., The adsorption and Reactions of enzymes and proteins on Kaolinite, III,.
The isolation of enzymes-substrate complexes, Archives of Biochemistry and Biophysics, 61: 158, (1956).
5. McLaren, A.D., and Estermann, E.F., Influence of pH ON THE activity of chymotrypsin at a solid-liquid interface, Archives of Biochemistry and Biophysics, 68: 157, 1957.
6. Mits, M. A. and Summaria, L.J., Synthesis of biologically active cellulose derivatives of enzyme, Nature, 189- 570, 1961.

7. Michael, F. and Evars, J., Makromol. Chem. 3:200, 1949.
8. Cebra, J.J., Givol, E., Silman, H. I. and Katchalski, E.,
A two-stage cleavage of rabbit gamma-globulin
by a water-insoluble papain preparation fol-
lowed by cysteine, J. of Biol. Chem., 236:
1720, 1961
9. Cebra, J. J., Givol, E., and Katchalski, E., Soluble
complexes of antigen and antibody fragments,
J. Biol. Chem., 237: 751, 1962.
10. Bernfeld, P., and Man, J., Antigens and enzymes made in
soluble by entrapping them into lattices of
synthetic polymers, Science, 142: 678, 1963.
11. Bar-Eli, A., and Katchalski, E., A water-insoluble try
psin derivative and its use as a tripsin co
lumn,
Nature, 188: 356, 1960.
12. Clazer, A.N., Bar-Eli, A., and Katchalski, E., Prepara-
tion and characterization of polytyrosyl try
psin, J. Biol. Chem. 237: 1832, 1962.
13. Epstein, C. J., and Anfinsen, C.B. The reversible reduc-
tion of disulfide bonds in trypsin and ribonu-
clease coupled to carboxymethyl cellulose, J.
Biol. Chem. 237, 2175, 1962.

14. Bar-Eli, A., and Katchalski, E., Preparation and properties of water-insoluble derivatives of trypsin. *J. Biol. Chem.*, 238, 1960, 1963.
15. Reisel, E., and Katchalski, E., Preparation and properties of water-insoluble derivatives of urease, *J. Biol. Chem.* 239, 1521, 1964.
16. Hornby, W. E., Lilly, M.D., and Crook, E. M., The Preparation and properties of ficin chemically attached to carboxymethyl-cellulose, *Biochem. J.* 98, 420, 1966.
17. Lilly, M.D. Money, C., Hornby, W. E., and Crook, E.M. *Biochem. J.* 95; 45, 1965.
18. Lilly, M. D., Hornby, W.E., and Crook, E. M., The kinetics of carboxymethylcellulose-ficin in packed beds, *Biochem, J.* 100: 718, 1966.
19. Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., and Chibata, I., Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water-insoluble aminoacylase, *Enzymologia*, 31: 214, 1966.
20. Tosa, T., Mori, T., Fuse, N. and Chibata, I., Studies on continuous enzyme reactions, II Preparation of DEAE-cellulose-aminoacylase column and continuous optical resolution of acetyl-DL-methionine, *Enzymologia*, 31: 225, 1966.

21. Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., and Chibata, I., Studies on continuous enzyme reactions. III Enzymatic properties of the DEAE-cellulose-aminoacylase complex, -Enzymologia, 32: 153, 1967.
22. Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., and Chibata, I., Studies on continuous enzyme reactions. IV. Preparation of a DEAE-Sephadex-aminoacylase column and continuous optical resolution of Acyl-DL-amino acids, Biotechnology and Bioengineering, Vol IX, 603, 1967.
23. Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., and Chibata, I., Studies on continuous enzyme reactions. V. Kinetics and industrial application of aminoacylase column for continuous optical resolution of Acyl-DL-amino acids. Agr. Biol. Chem., 33: 1047, 1969.
24. Tosa, T., Mori, T., Fuse, N., and Chibata, I., Studies on continuous enzyme reactions. VI. Enzymatic properties of the DEAE-Sephadex-Aminoacylase complex., Agr. Biol. Chem., 33: 1053, 1969.
25. Hornby, W.E., Lilly, M. D., and Crook, E. M., Some changes in the reactivity of enzymes resulting from their chemical attachment to water-insoluble derivatives of cellulose, Biochemistry J., 107: 669 1968.

26. Silman, I.H., and Katchalski, E., Water-Insoluble enzymes, Annual Review of Biochemistry, 35: 873, 1966.
27. Kay, G., and Crook, E. M., Coupling of Enzymes to cellulose using chloro-s-triazines, Nature, 216: 514, 1967.
28. Kay, G., Lilly, M. D., Sharp, A. K., and Wilson, R.J. H., Preparation and use of porous sheets with enzyme action, Nature, 217: 641, 1968.
29. Wilson, R.J. H., Kay, G., and Lilly, M.D., The preparation to porous sheets, and the operation of a two-enzyme continuous feed reactor., Biochem. J., 109: 137, 1968.
30. Wilson, R.J. H., Kay, G., and Lilly, M. D., The preparation and kinetics of lactate Dehydrogenase attached to water-insoluble particles and sheets, Biochem. J., 108: 845, 1968.
31. Sharp, A. K., Kay, G., and Lilly, M. D., The kinetics of beta-galactosidase attached to porous cellulose sheets., Biotechnology and Bioengineering, Vol. XI, 363, 1969.
32. Kay, G., and Lilly, M. D., The chemical attachment of chymotrypsin to water-insoluble polymers using 2-amino-4,6-dichloro-s-triazine. Biochimica et Biophysica ACTA, 198: 276, 1970.

33. Lilly, M.D., Sharp, A. K., The kinetics of enzymes attached to water-insoluble polymers, The Chemical Engineers, No. 215, Jan/Feb. pagina CE 12, 1968.
34. Self, D. A., and Lilly, M.D., The conversion of benzyl - penicillin to 6-aminopenicillinic acid using an insoluble derivatives of penicillin amida se, Biotechnology and Bioengineering, Vol.XI, 337, 1969.
35. Negoro, H., Continuous Inversion of sucrose by using insoluble saccharase, J. Fermentation Technology, 48: 689, 1970.
36. Usami, S., and Shirasaki, H., Kinetics of enzyme adsor bed on adsorbent, J. Fermentation Technology, 48: 506, 1970.
37. Wilson, R. J. H., and Lilly, M. D., Preparation and use of insolubilized amyloglucosidase for the pro duction of sweet glucose liquors, Biotechnolo gy and Bioengineering, Vol. XI, 349, 1969.
38. Bachler, H. J., Strandberg, G. W., and Smiley, K. L., Starch conversion by immobilized glucoamylase, Biotechnology and Bioengineering, Vol. XII,85, 1970.

39. Phillips, L. L., and Caldwell, H. L., A study of the purification and properties of a glucose-forming - amylase from *Rhizopus delemar*, gluc-amylase, J. Am. Chem. Soc., 73, 3554, 1951.
40. Phillips, L. L., and Caldwell, H. L., A study of the action of gluc-amylase, a glucose-forming amylase, formed by the mold, *Rhizopus delemar*, J. Am. Chem. Soc., 73, 3563, 1951.
41. Kerr, R. W., Cleveland, F. C., and Katzbeck, W. J., The action of Amyloglucosidase on amylose and amylopectin., J. Am. Chem. Soc., 73: 3916, 1951.
42. Pazur, J. H., and Ando, T., The action of an amyloglucosidase of *aspergillus niger* on starch and malto-oligosaccharides, J. Biol. Chem., 234: 1966, 1959.
43. Pazur, J. H., and Ando, T., The hydrolysis of glucosyl oligosaccharides with alpha-D (1 \rightarrow 4) and alpha-D- (1 \rightarrow 6) bonds by fubgal amyloglucosidase, J. Biol. Chem. 235, 297, 1960.
44. Smiley, K. L., Cadmus, M. C., Hensley, P. E., and Lagoda, A. A., High-potency amyloglucosidase producing mold of the *Aspergillus niger* group, Appl. Microbiology, 12: 455, 1964.

45. Cadmus, H. C., Jayko, L. G., and outros, Enzymatic production of glucose syrup from grains and its use in fermentation, *Cereal Chemistry*, 43: 658, 1966.
46. Park, Y. K., e Papini, R. S., Produção de xarope de glicose do amilo de mandioca pelo método enzima-enzima, *Revista Brasileira de Tecnologia*, Vol. I, Nº 1, 1970.
47. Haynes, W.C., Wickerham, L.J., and Hesseltine, C.W. Maintenance of Cultures of Industrially Important Microorganisms. *Applied Microbiology*, Vol. 3, Nº 6, 361, 1955.
48. Underkofler, L.A., Manufacture and uses of Industrial microbial enzymes. *Chemical Engineering Progress Symposium Series*, 62, Nº 69, 11p, 1966.
49. Diazyme Assay Procedure, Technical information, Assay nº 5-125, Miles Laboratories Inc. USA
50. Somogyi, H., A New Reagent for the Determination of Sugars *J. Biol. Chem.* 160,61, 1945.
51. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis Farr, A., and Randall, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 265, 1951.
52. Roberts, H. R., *Analyst*, 79, 1443, 1957.

53. Ciba Foundation Symposium, Paper Electrophoresis, J. & A. Churchill, London, 1956.
54. Manual of Cellogel Electrophoresis and Immunotechniques, Chemetron, Milano, Italy.
55. Lineweaver, H., and Burk. D., J. Amer. Chem. Soc. 56, 658, 1934.
56. Schwimmer, S., Kinetics of Malt Alpha-Amylase Action, J. Biol, Chem. 186, 181, 1950.
57. Comunicação Pessoal (Dr. Ryu)
58. Dawes, E.A., Quantitative Problems in Biochemistry, Páginas 124, 1962, E. & S. Livingstone Ltd.
59. Colowick Kaplan, Methods in Enzymology, Vol. I, Páginas 140, Academic Press, 1955.

53. Ciba Foundation Symposium, Paper Electrophoresis, J. & A. Churchill, London, 1956.
54. Manual of Cellogel Electrophoresis and Immunotechniques, Chemetron, Milano, Italy.
55. Lineweaver, H., and Burk. D., J. Amer. Chem. Soc. 56, 658, 1934.
56. Schwimmer, S., Kinetics of Malt Alpha-Amylase Action, J. Biol. Chem. 186, 181, 1950.
57. Comunicação Pessoal (Dr. Ryu)
58. Dawes, E.A., Quantitative Problems in Biochemistry, Página 124, 1962, E. & S. Livingstone Ltd.
59. Colowick Kaplan, Methods in Enzymology, Vol. I, Página 140, Academic Press, 1955.

10 - AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Prof. André Tosello, Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, pelas possibilidades oferecidas para que esta tese fôsse desenvolvida.

Ao Dr. Prof. Paulo Bobbio, em especial, pela sua orientação nos trabalhos realizados.

Ao Dr. Lilly, H. D., professor do Departamento de Engenharia Bioquímica, University College London, England, Dr. Smiley, K.L., Chefe do Departamento de Fermentação Industrial, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, USA, Dr. Tosa, T., Research Laboratory, Tanabeseiyaku Co., Ltd, Osaka, Japão, pelas sugestões e discussão das diversas partes da tese, por correspondência.

.000.

STP VET 8
ALQUIMIA DE NACIÃO
DE NACIÃO