

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E ESTUDOS
DAS PROPRIEDADES DA ISOAMILASE DE

Flavobacterium sp

Hélia Harumi Sato

Orientador:

Dr. YONG KUL PARK

Trabalho apresentado à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em "Ciências de Alimentos".

Campinas

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



1911

...

...

...

...

...

...

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Yong Kun Park pela sua orientação na preparação deste trabalho.

Ao Dr. André Tosello, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Dr. Fumio Yokoya, Coordenador do curso de pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudo fornecida.

Ao Dr. H. B. Naylor, da Universidade de Cornell, New York, pela tipificação do microrganismo selecionado.

Ao Dr. Demetrio Edgar Marancenbaum Aguilera pelo seu apoio e amizade.

Ao pessoal técnico do laboratório de Bioquímica de Alimentos e a todos os demais que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xii
RESUMO	xiv
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Seleção de microrganismos produtores de enzi- mas amilolíticas desramificantes	17
3.1.1. Coleta de amostras de solo	17
3.1.2. Isolamento de microrganismos do solo	17
3.1.3. Seleção preliminar de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas des- ramificantes	18
3.1.4. Seleção do microrganismo melhor produ- tor de enzima amilolítica desramifican- te através da fermentação submersa	19
3.1.5. Determinação da atividade de isoamila- se	20

3.1.5.1. Determinação da atividade com reagente de iodo	20
3.1.5.2. Determinação da atividade pelo aumento de açúcares redutores	21
3.1.6. Determinação da atividade de pululana se	21
3.1.7. Determinação da atividade de β -amilase	22
3.2. Estudo da relação entre tempo, alteração de pH no meio de fermentação, crescimento do microrganismo e produção de enzima	22
3.2.1. Preparação do inóculo	23
3.2.2. Fermentação	23
3.2.3. Determinação do crescimento do microrganismo	24
3.3. Produção de isoamilase pelo microrganismo em diferentes meios de cultura	24
3.4. Efeito da concentração de maltose, proteose-peptona e extrato de levedura do meio de cultura na produção de isoamilase	25
3.5. Influência da temperatura de fermentação na produção de isoamilase	26
3.6. Efeito do pH do meio de cultura na produção de isoamilase	27

	Página
3.7. Produção e purificação da isoamilase	27
3.7.1. Produção de isoamilase	27
3.7.2. Fracionamento com sulfato de amônio	28
3.7.3. Cromatografia da isoamilase em coluna de DEAE-celulose	29
3.7.4. Cromatografia da isoamilase em coluna de DEAE-Sephadex A-50	30
3.7.5. Cromatografia da isoamilase em coluna de CM-celulose	31
3.8. Purificação da β -amilase de soja	31
3.9. Estudo da ação da isoamilase sobre diferentes substratos	33
3.9.1. Hidrólise da amilopectina, glicogênio e pululano	33
3.9.2. Cromatografia descendente em papel dos produtos de hidrólise da amilopectina e glicogênio pela isoamilase	33
3.10. Caracterização da isoamilase purificada	34
3.10.1. Efeito do pH na atividade enzimática	34
3.10.2. Efeito do pH na estabilidade da enzima	35
3.10.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática	35
3.10.4. Termoestabilidade da enzima	36
3.10.5. Efeito de sais minerais na atividade enzimática	36

3.10.6. Efeito de inibidores de enzimas na atividade de isoamilases	37
3.10.7. Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática	37
3.10.8. Determinação do peso molecular da i- soamilase através da filtração em gel Sephadex G-200	38
3.10.9. Eletroforese da isoamilase em gel de poliacrilamida	39
3.11. Produção de maltose	40
3.11.1. Produção de maltose a partir do ami- do, amilopectina e glicogênio pela a ção da β -amilase de soja	40
3.11.2. Produção de maltose a partir do ami- do, amilopectina e glicogênio pela a ção simultânea de isoamilase de <u>Fla- vobacterium</u> sp e β -amilase de soja	41
4. RESULTADOS	42
4.1. Seleção de microrganismos	42
4.1.1. Seleção preliminar de microrganismos - produtores de enzimas amilolíticas des- ramificantes	42
4.1.2. Seleção do microrganismo melhor produ- tor de enzima amilolítica desramifican- te através da fermentação submersa	42
4.2. Estudo da relação entre tempo, alteração de	

pH do meio de fermentação, crescimento do microrganismo e produção de enzima	43
4.3. Produção de isoamilase pelo <u>Flavobacterium</u> <u>sp</u> em diferentes meios de cultura	43
4.4. Efeito da concentração de maltose, proteose-peptona e extrato de levedura do meio de cultura na produção de isoamilase	44
4.5. Influência da temperatura de fermentação - na produção de isoamilase	45
4.6. Efeito do pH do meio de cultura na produção de isoamilase	45
4.7. Purificação da isoamilase	45
4.8. Purificação da β -amilase de soja	46
4.9. Estudo da ação da isoamilase sobre diferentes substratos	47
4.9.1. Hidrólise da amilopectina, glicogênio e pululano pela isoamilase	47
4.9.2. Cromatografia descendente em papel dos produtos de hidrólise da amilopectina	47
4.10. Caracterização da isoamilase purificada	48
4.10.1. Efeito do pH na atividade enzimática	48
4.10.2. Efeito do pH na estabilidade da enzima	48

	Página
4.10.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática	48
4.10.4. Termoeestabilidade da enzima	48
4.10.5. Efeito de sais minerais na atividade enzimática	49
4.10.6. Efeito de inibidores de enzimas na atividade enzimática	49
4.10.7. Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática	50
4.10.8. Determinação do peso molecular da isoamilase através da filtração em gel Sephadex G-200	50
4.10.9. Eletroforese da isoamilase em gel de poliacrilamida	50
4.11. Produção de maltose	51
4.11.1. Produção de maltose a partir do amido, amilopectina e glicogênio pela ação de β -amilase de soja	51
4.11.2. Produção de maltose a partir do amido, amilopectina e glicogênio pela ação simultânea de isoamilase de <u>Flavobacterium sp</u> e β -amilase de soja	51
5. DISCUSSÃO	52
5.1. Seleção de microrganismos	52
5.1.1. Seleção preliminar de microrganismos	

produtores de enzimas amilolíticas desramificantes	52
5.1.2. Seleção do microrganismo melhor pro- dutor de enzima amilolítica desrami- ficante através da fermentação sub- mersa	53
5.2. Estudo da relação entre tempo, alteração de pH do meio de fermentação, crescimento do microrganismo e produção de enzima	53
5.3. Produção de isoamilase pelo <u>Flavobacterium</u> <u>sp</u> em diferentes meios de cultura	53
5.4. Efeito da concentração de maltose, proteose -peptona e extrato de levedura no meio de cultura e produção de maltose	54
5.5. Efeito da temperatura de fermentação na pro- dução de enzima	55
5.6. Efeito do pH do meio de cultura na produção de enzima	55
5.7. Purificação da isoamilase de <u>Flavobacterium</u> <u>sp</u>	56
5.8. Purificação da β -amilase de soja	56
5.9. Ação da iosamilase sobre diferentes substra- tos	56
5.10. Caracterização da isoamilase	57
5.10.1. Efeito do pH na atividade enzimática	57

	Página
5.10.2. Efeito do pH na estabilidade enzimática	57
5.10.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática	58
5.10.4. Termoeestabilidade da enzima	58
5.10.5. Efeito de sais minerais na atividade enzimática	59
5.10.6. Efeito de inibidores de enzimas na atividade de isoamilase	60
5.10.7. Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática	60
5.10.8. Determinação do peso molecular da isoamilase através da filtração em gel Sephadex G-200	61
5.10.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida	61
5.11. Aplicação da isoamilase	61
6. CONCLUSÃO	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Isolamento de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas desramificantes.	62
FIGURA 2 - Teste para seleção preliminar de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas desramificantes.	63
FIGURA 3 - Estudo da relação entre crescimento celular, alteração de pH do meio de cultura e atividade de isoamilase durante o crescimento do microrganismo.	64
FIGURA 4 - Produção de isoamilase pelo microrganismo em diferentes temperaturas de fermentação.	65
FIGURA 5 - Fluxograma da produção e purificação da isoamilase.	66
FIGURA 6 - Cromatografia da isoamilase em coluna de DEAE celulose.	67

FIGURA 7 - Cromatografia da isoamilase em coluna de DEAE-Sephadex A-50.	68
FIGURA 8 - Cromatografia da isoamilase em coluna de CM-celulose.	69
FIGURA 9 - Ação da isoamilase sobre diferentes substratos. Aumento de açúcares redutores após hidrólise dos substratos pela isoamilase.	70
FIGURA 10 - Ação da isoamilase sobre diferentes substratos. Aumento de absorbância à 620 nm após hidrólise dos substratos pela isoamilase.	71
FIGURA 11 - Cromatografia descendente em papel dos produtos de hidrólise da amilopectina e do glicogênio pela isoamilase.	72
FIGURA 12 - Efeito do pH na atividade de isoamilase.	73
FIGURA 13 - Efeito do pH na estabilidade da isoamilase.	74

FIGURA 14 - Efeito da temperatura na atividade da iso-amilase.	75
FIGURA 15 - Estabilidade térmica da isoamilase.	76
FIGURA 16 - Efeito da concentração do substrato na atividade de isoamilase.	77
FIGURA 17 - Determinação do peso molecular. Eluição das proteínas em coluna de Sephadex G-200.	78
FIGURA 18 - Determinação do peso molecular. Relação entre volume de eluição e peso molecular das proteínas em coluna de Sephadex G-200.	79
FIGURA 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da isoamilase purificada.	80

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA I - Composição dos meios de cultura.	81
TABELA II - Seleção do microrganismo melhor produtor de isoamilase através da fermentação submersa em diferentes meios de cultura.	82
TABELA III - Isoamilases microbianas.	83
TABELA IV - Produção de isoamilase pelo microrganismo nº 2018 em diferentes meios de cultura.	84
TABELA V - Efeito da concentração do carboidrato - maltose do meio de cultura na produção de isoamilase.	85
TABELA VI - Efeito da concentração de proteose-peptona do meio de cultura na produção de isoamilases.	86

TABELA VII - Efeito da concentração de extrato de <u>levedura</u> do meio de cultura na produção de <u>i-</u> sóamilase.	87
TABELA VIII - Efeito do pH do meio de cultura na <u>produ</u> ção de isoamilase.	88
TABELA IX - Purificação da isoamilase.	89
TABELA X - Efeito de sais na atividade enzimática.	90
TABELA XI - Efeito de inibidores de enzimas na <u>ativi-</u> dade de isoamilase.	91
TABELA XII - Produção de maltose.	92

RESUMO

Duas mil quatrocentas e sessenta linhagens de microrganismos foram isoladas do solo e testadas quanto à capacidade de desramificar a amilopectina. Foram encontradas três linhagens de bactérias produtoras de enzima amilolítica desramificante. Uma das linhagens, classificada como Flavobacterium sp produziu maior quantidade de enzima. A enzima desramificante de Flavobacterium sp hidrolizou as ligações α -1,6 glicosídicas da amilopectina e glicogênio, formando cadeias curtas de amilose mas não hidrolizou as ligações α -1,6 glicosídicas do pululano (polímero de maltotriose unidas pela extremidade por ligações α -1,6 glicosídicas). Portanto, a enzima desramificante de Flavobacterium sp é similar à outras isoamilases (glicogênio glucanohidrolase EC 3.2.1.68).

Estudou-se a produção e a purificação de isoamilase de Flavobacterium sp e determinou-se as características da enzima purificada. A eletroforese em gel de poliacrilamida da enzima purificada indicou uma única banda de atividade. O peso molecular foi estimado em 126.000 através do método de filtração em gel. O pH ótimo e temperatura ótima da enzima foram 6,3 e 40°C respectivamente. A atividade enzimática foi ligeiramente inibida por NiSO_4 , CoCl_2 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, ZnSO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 e fortemente inibi-

da por HgCl_2 e AgNO_3 . Sais minerais como CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl , BaCl_2 e Li_2SO_4 não inibiram a atividade enzimática. Dietilditio-carbamato de sódio (10 mM), ázida de sódio (10 mM), sodium bisulfite (10 mM), iodoacetato (10 mM), p-hidroximercuribenzoate (10 mM), mercaptoetanol (10 mM) não inibiram a atividade enzimática. Por isto, grupos sulfidrilas da molécula da enzima não estão envolvidos na atividade catalítica.

A ação simultânea da isoamilase de *Flavobacterium* e β -amilase de soja hidrolizou quase completamente o amido de batata, amilopectina de milho ceroso e glicogênio de ostra para maltose.

SUMMARY

Two thousand four hundred sixty strains of microorganisms were isolated from soil and examined for their capacity to debranch amylopectin. Three strains of bacteria were found to be producers of debranching enzyme. One strain, which is classified as Flavobacterium sp produced large amounts of the enzyme. The debranching enzyme from Flavobacterium sp hydrolyzed α -1,6 glucosidic linkage of amylopectin and glycogen, forming short chain amylose, but did not hydrolyze α -1,6 glucosidic linkage of pululan (polymer of α -1,6 maltotriose joined endwise). Therefore, the debranching enzyme of Flavobacterium sp is similar to other isoamylases (glucogen glucanohydrolase EC 3.2.1.68).

Production and purification of the *Flavobacterium* isoamylase - were attempted and characterization of the purified enzyme was performed. Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme showed a single band of activity. The molecular weight was 126.000 as estimated by gel filtration method. Optimum pH and temperatura of the purified enzyme were 6,3 and 40°C, respectively. The enzyme activity was inhibited slightly by NiSO_4 , MnSO_4 , CoCl_2 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, ZnSO_4 and CuSO_4 and strongly by HgCl_2 and AgNO_3 . Metal ions such as CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl , BaCl_2 and Li_2SO_4 did not inhibit the enzyme activity. Sodium diethildithio

carbamate (10 mM), sodium azide (10 mM), sodium bisulfite (10 mM), iodoacetate (10 mM), p-hydroxymercuribenzoate (10 mM), mercaptoethanol (10 mM) did not inhibit enzyme activity. Thus sulfydryl groups of the molecule are not involved in the catalytic activity.

The simultaneous action of *Flavobacterium* isoamylase and soy bean β -amylase hydrolyzes almost completely potato starch, waxy maize amylopectin and oyster glycogen to maltose.

1. INTRODUÇÃO

Com a descoberta de enzimas amilolíticas desramificantes em microrganismos por Maruo e Kobayashi, em 1951, numerosos estudos e investigações foram desenvolvidos, visando a sua utilização na determinação da estrutura da amilopectina e glicogênio, na produção de amilose de cadeias curtas e na produção de maltose quando utilizada em combinação com β -amilase.

O presente trabalho visa a seleção de microrganismos produtores de enzima amilolítica desramificante que hidrolisa as ligações α -1,6 glicosídicas da amilopectina e glicogênio, dando como produto de reação amilose de cadeias curtas.

O microrganismo maior produtor de enzima amilolítica desramificante será submetido ao estudo cinético de produção de enzima e estudos em diferentes: meios de cultura, temperatura de incubação e pH, procurando-se, desta forma, a otimização na produção da enzima.

A preparação bruta de Flavobacterium sp será submetida à purificação através do fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-celulose, DEAE-Sephadex A-50 e CM-celulose para a caracterização da enzima quanto à especifici-

dade de substrato e quanto à atividade enzimática.

Estudar-se-á a produção de maltose pela ação simultânea de iso-amilase de Flavobacterium sp e β -amilase de soja.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1930, Nishimura (47, 48) observou que extratos de levedura de cervejaria continham uma enzima que podia liquefazer o amido e acelerar a ação normal das amilases. Quando uma solução de amido de arroz do tipo "glutinous" era incubada com extrato de levedura à 20°C, pH 6,2, a coloração da mistura de reação com reagente de iodo mudava de púrpura para azul púrpura. A enzima foi denominada amilosintease e considerada como uma enzima que sintetizava o amido (45, 49, 50). A ação da amilosintease sobre o amido de arroz apresentou ótimas condições de reação à pH 6,2 e a 20°C. O aquecimento da enzima à 55-60°C durante 10 minutos resultava em completa inativação.

Mais tarde, em 1942, Meyer e Bernfeld (43) observaram que extratos de levedura atacavam o amido e β -dextrina limite de amido.

A ação da amilosintease sobre o amido de arroz do tipo "glutinous" foi examinada por Maruo e Kobayashi (42) em 1951. O produto de reação era de baixo peso molecular, corava em azul púrpura com reagente de iodo e mostrava tendência para retrogradar em solução. Os autores concluíram que a ação da amilosintease sobre o amido de arroz do tipo "glutinous" era desramificante e propuseram o nome isoamilase para descrever essa enzima extraída de levedura.

A primeira enzima desramificante em vegetais, foi relatada em 1951 por Hobson et al (21) em Vicia faba (feijão fava) e em Solanum tuberosum L. (batata) e denominada R-enzima. Os autores verificaram que as preparações de R-enzima de feijão fava e batata desramificavam a amilopectina e sua β -dextrina limite.

Em 1954, Peat et al (55) relataram que a R-enzima não hidrolisava o glicogênio nem sua β -dextrina limite.

Em 1960, Kurasawa et al (31) isolaram e purificaram parcialmente a R-enzima de arroz e verificaram que apresentava ótimo de atividade em pH 5,0 à 5,5. O aquecimento da enzima à 60°C resultava em completa perda de atividade.

Em 1961, Gunja et al (13) verificaram que extrato de levedura de cervejaria (Saccharomyces cerevisiae) continha uma isoamilase que hidrolisava as ligações α -1,6 glicosídicas do glicogênio e amilopectina. A temperatura e o pH ótimo da enzima foram, respectivamente, 25°C e pH 6,0. Observaram que a enzima era inibida por borato (10 mM) e cloreto mercúrico (0,1 mM) mas não era inibida por iodoacetato (10 mM), fenilmercuriacetato (0,01 mM) e p-cloromercuribenzoato (0,01 mM). Verificaram também a presença de isoamilase em extrato de levedura de panificação.

Em 1961, Bender e Wallenfels (8) descobriram a pululanase, uma enzima desramificante produzida pelo Aerobacter aerogenes capaz

de hidrolisar as ligações α -1,6 glicosídicas do pululano (polímero de maltotriose unido na extremidade por ligações α -1,6 glicosídicas), do amido solúvel e da amilopectina. A enzima apresentou atividade ótima à 47,5°C e a pH 5,0. A enzima foi estável na faixa de pH 5,0 à 7,0.

Kjolberg e Manners (28), em 1963, verificaram que as isoamilases de levedura de panificação e de cervejaria apresentam ações similares na hidrólise das ligações α -1,6 glicosídicas da β -límite dextrina de amilopectina e de glicogênio.

Taylor et al (59), 1965, descreveram uma enzima desramificante, extraída de Zea mays L. (milho doce) capaz de hidrolisar as ligações α -1,6 glicosídicas de pululano, e com propriedades semelhantes à R-enzima do feijão fava e batata.

Abdullah et al (1) estudaram a especificidade da pululanase do Aerobacter aerogenes e concluíram que a pululanase requeria que os dois componentes unidos por ligação α -1,6 glicosídicas contivessem duas ou mais unidades de glicose unidas por ligações α -1,4 glicosídicas. Verificaram, também, que o substrato mínimo para a atividade de pululanase é o tetrassacarídeo 6² α maltosil maltose.

Uma enzima do tipo pululanase foi encontrada em Escherichia intermedia por Ueda e Nanri em 1967 (61) que escolheram o termo

isoamilase, apesar da observação que a isoamilase não hidrolisa o pululano (36).

Em 1967, Lee et al (33) relataram a presença, na preparação de Saccharomyces cerevisiae (levedura para panificação), de uma enzima similar à amilo 1,6 glucosidase/oligo 1,4 glucan transferase do músculo de coelho. A enzima descrita provocava um aumento do poder de coloração do glicogênio com iodo e aumento da β -amilolise limite do glicogênio e da amilopectina com liberação de glicose como único carboidrato de baixo peso molecular. Após incubação prolongada (48 horas) com amilopectina de milho ceroso havia formação de um precipitado insolúvel que se corava em azul com iodo.

Bathgate et al (7) em 1968 isolaram e identificaram as enzimas isoamilase e amilo 1,6 glucosidase/oligo 1,4 α -1,4 glucano transferase em extrato de Saccharomyces cerevisiae. No estudo de hidrólise do glicogênio pela isoamilase de levedura, os produtos de hidrólise foram fracionados em coluna de Sephadex G-50. Os carboidratos de baixo peso molecular foram identificados e determinados por cromatografia em papel quantitativa, como uma mistura de maltopentaose (16%); maltohexaose (18%); maltoheptaose (25%); maltoetaose (31%) e maltononaose (10%).

Walker (65) descreveu uma pululanase de Streptococcus mitis similar à produzida pelo Aerobacter aerogenes.

Em 1968, Harada et al (17) isolaram do solo o microrganismo Pseudomonas sp SB 15 produtor de uma isoamilase extracelular capaz de desramificar totalmente o glicogênio e a amilopectina, e obtiveram alto rendimento de isoamilase na fermentação submersa do microrganismo, em meio de cultura contendo maltose, dextrina, amido ou isomaltose.

Em 1969 Yokobayashi et al (67) estudaram a especificidade da isoamilase de Pseudomonas sp e da pululanase de Aerobacter aerogenes e verificaram que a isoamilase não era capaz de hidrolisar as ligações α -1,6 glicosídicas do pululano. A isoamilase e a pululanase degradam a amilopectina por ação simultânea e sucessiva com β -amilase de batata doce. Observaram também que enquanto a isoamilase hidrolisa completamente o glicogênio pela ação sucessiva ou simultânea com β -amilase de batata doce, a pululanase degrada completamente o glicogênio pela ação simultânea mas provoca somente um pequeno aumento na β -amilólise limite do glicogênio por ação sucessiva com β -amilase de batata doce. Os autores sugeriram que a degradação incompleta do glicogênio por ação sucessiva é devida à incapacidade da pululanase de penetrar no interior da molécula do glicogênio. Sugeriram, ainda, que a isoamilase de Pseudomonas pode penetrar no interior da molécula do glicogênio e hidrolisar todas as ligações α -1,6 glicosídicas. Os autores verificaram que cerca de 20-30% da dextrina de amilopectina e 20-25% da β -dextrina limite de glicogênio foi

resistente à ação da isoamilase. Concluíram que a ação característica da isoamilase envolve a hidrólise de todas as ligações α -1,6 glicosídicas do glicogênio, mas as ligações que unem resíduos de maltose à cadeia de resíduos de glicose unidos por ligações α -1,4 glicosídicas não são facilmente hidrolizadas.

Em 1970, Yokobayashi et al (68) estudaram as propriedades da isoamilase purificada de Pseudomonas sp SB 15. A enzima apresentou pH ótimo na faixa de pH 3,0-4,0 e temperatura ótima de atividade à 52°C em tampão acetato pH 3,5 para 10 minutos de reação. A estabilidade térmica foi determinada em tampão acetato 0,1 M, pH 3,5 por aquecimento da solução enzimática na faixa de 30°C à 70°C durante 10 min. Os aquecimentos à 50°C, 55°C e 60°C resultaram num decréscimo de 40%, 77% e 95% da atividade, respectivamente. A isoamilase foi estável à 4°C na faixa de pH 2,5 à 7,5 durante 24 horas e instável a valores de pH inferiores e superiores. A 40°C, o pH exerceu um notado efeito sobre a estabilidade da isoamilase; a atividade enzimática permaneceu a mesma na faixa de pH 3,5-5,5, mas, foi perdida a valores abaixo do pH 2,5 e acima de pH 7,5 durante 2 horas de incubação.

Drumond et al (11), em 1970, verificaram que a R-enzima de batata hidrolisa o pululano.

Em 1970, Gunja Smith et al (14, 15) estudaram a isoamilase de

Cytophaga sp e verificaram que a ação da enzima era similar à isoamilase de Pseudomonas sp. A enzima desramificante de Cytophaga sp não hidrolisa as ligações α -1,6 glicosídicas do pululano, mas hidrolisa facilmente todas as ligações α -1,6 glicosídicas do glicogênio e amilopectina. Outra similaridade foi a falha da isoamilase do Cytophaga sp para hidrolisar todas as ligações α -1,6 glicosídicas de dextrina limite de glicogênio e de amilopectina. A ação sucessiva da isoamilase e β -amilase de batata doce sobre o glicogênio resultou em completa conversão em maltose. A isoamilase de Cytophaga sp apresentou ótimo de atividade a pH 5,5 e a 40°C mas, foi inativada a valores de pH inferiores a 5,0 e após aquecimento a 40°C durante 60 minutos na ausência de substrato. O peso molecular da enzima foi estimado em 120.000 através da centrifugação com gradiente de sacarose.

Suzuki (57) descreveu a obtenção de amilose de cadeias longas e curtas a partir da solução de amido hidrolisada com isoamilases bacterianas e a produção de maltose por combinação de isoamilase de Pseudomonas sp e β -amilase de farelo de trigo.

Em 1971, Lee et al (35) estudaram a especificidade em relação ao substrato de enzima desramificante do milho doce (Zea mays L.) e verificaram que a enzima apresentava propriedades similares à pululanase do Aerobacter aerogenes.

Akai et al (2), 1971, analisaram a distribuição das cadeias lineares α -1,4 glicosídicas do glicogênio de ostra através da hidrólise com isoamilase de Pseudomonas sp e pululanase de Aerobacter aerogenes e da separação dos produtos em coluna de Sephadex G-75. Os autores verificaram que o produto de reação era uma mistura de cadeias de 3 à 50 unidades de glucose. A média do grau de polimerização das cadeias lineares α -1,4 glicosídicas do glicogênio foi 11.

Prosseguindo os estudos, Akai et al (3) investigaram a distribuição das cadeias lineares α -1,4 glicosídicas da amilopectina utilizando isoamilase de Pseudomonas sp pululanase de Aerobacter aerogenes. E sugeriram que as "cadeias B" na amilopectina consistem de cadeias longas (grau de polimerização 40-80) e cadeias curtas (grau de polimerização 20-40).

Gunja-Smith et al (16) descreveram um método enzimático para determinação da média do comprimento de glicogênio e outros polissacarídeos ramificados utilizando-se de isoamilase de Cytophaga sp, pululanase de Aerobacter aerogenes e β -amilase de batata doce.

Harada et al (18), 1972, caracterizaram a isoamilase de Pseudomonas sp quanto à ação sobre amilopectina de milho ceroso e glicogênio de ostra e, compararam com pululanase de Aerobacter

aerogenes. Verificaram que a isoamilase hidrolisa as ligações α -1,6 glicosídicas externas e internas da amilopectina, enquanto que a pululanase hidrolisa as ligações externas da amilopectina, mas as ligações α -1,6 glicosídicas internas são pouco afetadas. Verificaram também que a isoamilase hidrolisa todas as ligações do glicogênio de ostra, enquanto que a pululanase hidrolisa somente 30% das ligações.

Em 1972 Ueda et al (62) purificaram, cristalizaram e estudaram as propriedades da pululanase extracelular de uma cepa de Aerobacter aerogenes. O peso molecular da enzima estimado através de eletroforese em gel de poliacrilamida e ultracentrifugação - foi, respectivamente, 66.000 e 58.000. O pH ótimo e a temperatura ótima foram respectivamente pH 6,5 e 50°C,

Mercier et al (44), 1972, obtiveram altos rendimentos de pululanase intracelular de Aerobacter aerogenes após a adição de pululano, além de glicose e maltose no meio de fermentação. Descreveram, ainda, um método de preparação de pululanase cristalina livre de β -amilase.

Em 1972, Marshall (40), sugeriu a utilização do pululano para a distinção das enzimas desramificantes, pululanase e isoamilase.

Yokobayashi et al (69) estudaram a cinética da isoamilase de Pseudomonas sp SB 15 e obtiveram os valores aproximados de Km

(g/ml); 1×10^{-4} a 2×10^{-4} para amilopectinas e glicogênio, e 2×10^{-3} para pululano. No caso de pululanase de Aerobacter aerogenes, os valores de Km (g/ml) foram 8×10^{-3} a 1×10^{-2} para amilopectinas; 2×10^{-2} a 5×10^{-2} para glicogênios e $1,7 \times 10^{-5}$ para pululano.

Após a purificação e cristalização de pululanase extracelular -⁵ de uma cepa de Aerobacter aerogenes (62), Ohba e Ueda (52) 1975, purificaram e estudaram as propriedades da pululanase intracelular produzida pela mesma cepa. O peso molecular da pululanase intracelular estimado através de filtração em Sephadex G-200 e estudos de ultracentrifugação foi, respectivamente, de 80.000 e 90.000.

Palmer et al (53), 1973, detectaram em extrato bruto de Escherichia coli N.C.T.C. 5928, a presença de uma enzima do tipo isoamilase capaz de hidrolizar β -dextrina limite e fosforilase dextrina limite de glicogênio.

Ueda et al (63), 1974, relataram que a digestão de amilopectina de milho ceroso pela fração denominada glucoamilase II produzida pelo Apergillus awamori var. kawachii, com baixa atividade sobre as ligações α -1,6 glicosídicas foi acelerada pela adição de isoamilase de Pseudomonas sp SB 15.

Sugimoto et al (56), 1974, relataram que o microrganismo Pseudo

monas sp SB 15 produtor de isoamilase extracelular produz, intracelularmente, α -glucosidase e amilases na fermentação submersa em meio de cultura contendo maltose. A cepa mutante (MS₁) derivada de Pseudomonas sp SB 15 produziu isoamilase extracelular constitutivamente e, também, α -glucosidase e amilases intracelulares constitutivamente. A atividade das enzimas produzidas na cepa mutante foi maior daquelas induzidas na cepa original.

Amemura et al (5), 1975, relataram que grupos triptofanos são importantes para a formação do complexo enzima-substrato da pululanase de Aerobacter aerogenes ATCC 9621. A enzima foi inibida por Hg²⁺, N-bromosuccinimida; brometo de 2-hidroxi 5-nitro - benzil; riboflavina 5 fosfato, histamina e imidazol. Ions metálicos e outros cofatores parecem não ser essenciais para a atividade de pululanase.

Jeanningros et al (24), 1975, selecionaram o microrganismo Escherichia coli K 12 produtor de uma enzima desramificante intracelular. Verificaram que a enzima hidrolisa as ligações α - 1,6 glicosídicas e de β -dextrina limite de glicogênio. Após a purificação, a preparação enzimática não apresentou atividade de α -amilase, pululanase e isomaltose. O pH ótimo de atividade sobre o substrato fosforilase dextrina limite de glicogênio foi pH 6,0. A atividade máxima foi observada a 50°C. A atividade enzimática foi inibida por tampão tris 0,1 M, iodoacetato (10 mM),

p-cloromercuribenzoato (1 mM), HgCl (1 mM) e CuSO₄ (1 mM).

Urlaub e Wöbber (64), 1975, identificaram uma isoamilase do Bacillus amyloliquefaciens capaz de desramificar totalmente o glicogênio. A cromatografia em papel dos produtos de hidrólise do glicogênio de ostra e fitoglicogênio de milho doce pela isoamilase indicou a presença de maltodextrinas de comprimento de cadeia de 6 a 8 unidades de glicose e produtos de maior comprimento de cadeia não resolvidos no cromatograma.

Kitagawa et al (27), 1975, realizaram estudos sobre a inibição enzimática e estrutura molecular da isoamilase de Pseudomonas sp. Verificaram que a atividade da isoamilase foi inibida por N-Bromosuccinimida (0,01 mM), brometo de 2-hidroxi 5-nitrobenzil (0,1 mM), iodoacetato (5 mM), fenilmercuriacetato (0,1 mM) e 2,4 dinitrofluorobenzeno (1 mM), mas não foi inibida por ázida de sódio (10 mM), EDTA (5 mM), β-mercaptoetanol (10 mM) e p-cloromercuribenzoato (0,5 mM). A atividade enzimática foi inibida na presença de Hg²⁺, Cu²⁺, Ag⁺, mas não foi inibida na presença de Mn²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ ou Fe³⁺ na concentração 1 mM. Concluíram que resíduos histidil parecem ser importantes enquanto que íons e outros cofatores não são essenciais para a atividade enzimática. A isoamilase parece ser composta de duas subunidades, cada uma com peso molecular 50.000 e que não são ligadas covalentemente.

Em 1975, Allen e Dawson (4), relataram a importância da utilização de enzimas desramificantes na produção de maltose ou xarope com alto teor de maltose a partir do amido.

Enevoldsen (12), 1975, enfatizou as possibilidades de aplicação e o uso potencial de enzimas desramificantes em cervejaria, em combinação com α e β amilases para o aumento de açúcares fermentáveis.

Em 1976, Kuswanto et al (32) descreveram que a isoamilase nas cepas de Pseudomonas sp SB 15 e mutante MS₁ são necessárias para a utilização de amilopectina e de glicogênio como fonte de carbono para crescimento.

Jeanningros et al (25), 1976, continuando os estudos da enzima desramificante de Escherichia coli K 12 relataram que a enzima não pode ser classificada como pululanase porque não hidrolisa o pululano, mas também difere das isoamilases bacterianas devido à inabilidade de hidrolisar o glicogênio. A enzima apresentou maior atividade sobre os substratos fosforilase dextrina limite de glicogênio e de amilopectina.

Em 1977, Kato et al (26) descreveram o uso de gel de amilose tratado como epicloridrina para cromatografia de afinidade da isoamilase de Pseudomonas amyloclavata K 1 C. A isoamilase absorvida no gel de amilose foi eluída especificamente com mal-

to-dextrina. Por esse procedimento, 96 mg de enzima foram 100% purificadas a partir de 20 l de caldo de cultura, com rendimento de 70%.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Seleção de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas desramificantes

Com o objetivo de selecionar microrganismos capazes de produzir isoamilases, foram isoladas do solo e testadas, inúmeras culturas de microrganismos conforme os itens a seguir.

3.1.1. Coleta de amostra do solo

As amostras de terra de diferentes regiões do Estado de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul foram coletadas do interior de matas cerradas ou próximas às margens dos rios, onde as condições ambientais são favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos. Após remoção dos resíduos vegetais e animais, aproximadamente 100 g de terra foram coletadas de uma profundidade máxima de 10 cm e acondicionadas em sacos plásticos. Na coleta de várias amostras de uma mesma região foi guardada uma distância mínima de um quilometro entre as coletas.

3.1.2. Isolamento de microrganismos do solo

Cerca de 1 grama de terra foi adicionada à 10 ml de água destilada esterilizada, agitada e deixada em repouso. Para o isolamento de bactérias, o líquido sobrenadante foi inoculado em pla

cas contendo os meios de cultura esterilizados: agar nutriente + 0,5% de amilopectina e agar nutriente + 0,5% de amido. As placas foram incubadas à 30°C por 24 a 48 horas para o desenvolvimento das bactérias. As colônias isoladas das placas foram repicadas em tubos de ensaio contendo agar nutriente esterilizados e incubadas à 30°C até o desenvolvimento satisfatório das culturas.

Para o isolamento de fungos, o líquido sobrenadante foi inoculado em placas contendo meios de cultura esterilizados: agar batata (extrato de 10 g de batata, 4 g de glicose e 5 g de agar em 100 ml de água destilada) e agar Czapeck + 0,5% de amilopectina. As placas foram incubadas à 30°C por 48 a 96 horas, para o desenvolvimento de fungos. As colônias isoladas das placas foram repicadas em tubos de ensaio contendo agar batata esterilizados e incubados à 30°C até o desenvolvimento das culturas.

Os microrganismos isolados foram testados preliminarmente quanto à produção de enzimas amilolíticas desramificantes, através do teste descrito a seguir.

3.1.3. Seleção preliminar de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas desramificantes

As bactérias e os fungos, isolados de acordo com o item 3.1.2., foram semeados respectivamente nas placas de Petri contendo

meio de cultura agar nutriente + 0,5% de amilopectina e agar Czapeck + 0,5% de amilopectina esterilizados, na forma de segmentos radiais. As placas foram incubadas a 28°C por 24 a 48 horas até o desenvolvimento das bactérias e a 28°C por 48 a 96 horas até o desenvolvimento satisfatório dos fungos. Após a incubação, as placas foram expostas ao vapor de iodo e os microrganismos que apresentaram um halo azul ao redor das colônias foram testados quanto à produção de isoamilase, (item 3.1.4.).

3.1.4. Seleção do microrganismo melhor produtor de enzima através da fermentação submersa

Para a seleção da linhagem que produz maior quantidade de enzima amilolítica desramificante, as bactérias selecionadas de acordo com o item anterior, foram cultivadas em diferentes meios de cultura: nº 1, nº 2, nº 3, nº 4 e nº 5, cujas composições estão indicadas na tabela I.

Os meios de cultura foram distribuídos em frascos de Erlenmeyer de 250 ml num volume de 50 ml, fechados com tampão de algodão para manter as condições assépticas e esterilizados a 121°C por 15 minutos em autoclave Fabbe modelo 103. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 7,0 antes da esterilização, não ocorrendo uma alteração sensível após a mesma.

Os frascos de Erlenmeyer contendo os diferentes meios de cultu-

ra foram inoculados com as bactérias selecionadas de acordo com as condições do item 3.1.3. e incubados a 28°C, a 250 rpm, no agitador rotatório da New Brunswick, modelo 0531. Após 48, 72 e 96 horas de fermentação, os meios de cultura foram centrifugados a 8000 rpm durante 15 minutos e os sobrenadantes foram testados quanto à atividade de isoamilase em tampão acetato pH 3,6 (17) e tampão fosfato pH 6,0 (61) de acordo com o método descrito no item 3.1.5.1.

3.1.5. Determinação da atividade de isoamilase

A atividade de isoamilase (glycogen 6 glucano hydrolase EC 3.2.1.68) foi baseada no método de Kobayashi (29) e, determinada rotineiramente pelo aumento do poder de coloração da amilopectina de milho ceroso com reagente de iodo, de acordo com as condições descritas no item 3.1.5.1.

A determinação da atividade de iosamilase, baseada no aumento do poder redutor (27), foi realizada de acordo com as condições descritas no item 3.1.5.2.

3.1.5.1. Determinação da atividade com reagente de iodo

A atividade de isoamilase foi baseada no método descrito por Kobayashi (29), com ligeiras modificações. A mistura de 5 ml de

solução 1% de amilopectina de milho ceroso em água destilada, 1 ml de solução enzimática e 1 ml de tampão fosfato 0,5 M pH 6,3 ou como indicado, foi incubada a 40°C. Após 1 hora de incubação à 0,5 ml da mistura de reação foi adicionado 0,5 ml de solução de iodo - KI 0,01 N e diluída a 25 ml com água destilada. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro Coleman 295 E à 620 nm contra branco de tempo zero de reação.

Uma unidade de atividade foi definida como aumento de 0,01 na absorbância à 620 nm.

3.1.5.2. Determinação da atividade pelo aumento de açúcares redutores

O sistema de reação foi o mesmo para o ensaio. Após incubação a 40°C por 1 hora, uma alíquota de 1 ml da mistura de reação foi adicionado a 2 ml de reagente Somogyi - Nelson (46). O aumento de açúcares redutores foi determinado pelo método de Somogyi - Nelson. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera açúcares redutores equivalentes a 1 μ mol de glucose em 1 minuto a 40°C.

3.1.6. Determinação da atividade de pululanase

A atividade de pululanase foi determinada pelo método de Takasaki (58), com ligeiras modificações. A mistura de 1 ml de solução 0,7% de pululano em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e 1 ml de

solução de enzima foi incubada a 40°C. Após 30 minutos de incubação, os açúcares redutores formados foram determinados pelo método de Somogyi - Nelson (46), e os valores obtidos calculados como maltotriose.

Uma unidade de pululanase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 mg de maltotriose a partir do pululano, sob as condições de ensaio.

3.1.7. Determinação da atividade de β -amilase

A atividade da β -amilase foi determinada pela incubação de 1 ml de solução enzimática, 9 ml de solução 1% de amido em tampão fosfato 0,05 M pH 6,0 a 40°C durante 30 minutos. O teor de açúcares redutores foi determinado pelo método de Somogyi - Nelson (46) e os valores obtidos, calculados como maltose.

Uma unidade de atividade foi definida como μ mol de maltose/mg proteína/minuto.

3.2. Estudo da relação entre tempo e alteração de pH no meio de fermentação, crescimento do microrganismo e produção de enzima

A linhagem de microrganismo que apresentou maior atividade de isoamilase selecionada de acordo com o item 3.1.4., foi utilizada

da para os estudos de produção de isoamilase.

3.2.1. Preparação do inóculo

Para a preparação do inóculo, 50 ml de meio de cultura em estudo, descrito na Tabela I, contido em frasco de Erlenmeyer de 250 ml foi inoculado com a linhagem selecionada e incubado a 28°C no agitador rotatório a 250 rpm por um período de 24 horas.

3.2.2. Fermentação

A fermentação foi realizada no Mini-Fermentador da New-Brunswick modelo M-1000. A 800 ml de meio de cultura 7 foram adicionados 50 ml de inóculo preparado de acordo com o item 3.2.1. e 2 ml - de óleo de soja estéril como antiespumante. A fermentação foi realizada a 28°C mantendo-se aeração de 1 vvm (volume/volume/minuto) e agitação constante. As amostras de meio de cultura foram retiradas em diferentes tempos de fermentação para a determinação dos parâmetros: alteração de pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo de acordo com o item 3.2.3., atividade de isoamilase em tampão fosfato pH 6,0 de acordo com o item 3.1.5.1. e atividade de pululanase como descrito no item 3.1.6. As atividades de isoamilase e pululanase foram determinadas no sobrenadante do meio de cultura após centrifugação a 8000 rpm durante 15 minutos.

3.2.3. Determinação do crescimento do microrganismo

O crescimento do microrganismo foi determinado espectrofotometricamente pela leitura da absorbância a 660 nm (61). Após fermentação, uma amostra de 10 ml de meio de cultura foi centrifugada a 8000 rpm a 5°C em centrífuga Beckman modelo J 21 B rotor JA 21, durante 15 minutos e o precipitado obtido foi submetido a três lavagens sucessivas com água destilada nas mesmas condições descritas. O precipitado da última lavagem foi ressuspendido em 10 ml de água destilada e quando necessário a suspensão foi diluída para se obter a leitura na faixa de linearidade do método. A leitura de absorbância da amostra foi realizada contra água destilada a 660 nm em espectrofotômetro Coleman modelo 295 E.

3.3. Produção de isoamilase pelo *Flavobacterium* sp em diferentes meios de cultura

Para o estudo da produção de isoamilase pelo *Flavobacterium* sp foram testados os meios de cultura 1, 4, 6, 7, 8, 9 descritos na tabela I. Os frascos de Erlenmeyer de 500 ml contendo 150 ml de meio de cultura a pH 7,0 foram inoculados com 1 ml de suspensão homogênea do microrganismo em água destilada esterilizada e incubados a 28°C em agitador rotatório da New-Brunswick Scientific modelo 0531, a 250 rpm durante 48 horas. Após a fermentação,

a massa celular foi separada pela centrifugação do meio de cultura a 8000 rpm durante 15 minutos e a atividade de isoamilase no sobrenadante foi determinada de acordo com o item 3.1.5.1.

3.4. Efeito da concentração de maltose, proteose-peptona e extrato de levedura do meio de cultura na produção de isoamilase

No estudo do efeito da concentração do carboidrato maltose do meio de cultura na produção de isoamilase, foram utilizados meios de cultura constituídos de 1% de proteose-peptona, 0,5% de extrato de levedura e concentrações de maltose variáveis entre 0% a 3,0%.

Para a verificação do efeito da concentração de proteínas do meio de cultura na produção de isoamilase foram utilizados meios de cultura constituídos de 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de maltose e concentrações de proteose-peptona variáveis entre 0,05% a 3,0%.

No estudo do efeito da concentração do meio de cultura na produção de isoamilase foram utilizados meios de cultura compostos de 1% de proteose-peptona, 0,5% de maltose e concentrações de extrato de levedura variáveis entre 0% a 1%. Os meios de cultura foram ajustados a pH 7,0 com NaOH 1N. Os frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura foram inoculados com 1 ml de suspensão homogênea do microrganismo em água destilada. Os frascos foram incubados em agitador rota-

tório a 250 rpm durante 30 horas, à 28°C. Após o período de incubação foram determinados os seguintes parâmetros: alteração do pH do meio de cultura, crescimento do microrganismo de acordo com as condições descritas no item 3.2.3. e atividade de isoamilase do sobrenadante do meio de cultura, de acordo com o método descrito no item 3.1.5.1.

3.5. Influência da temperatura de fermentação do microrganismo na produção de isoamilase

O estudo da influência da temperatura de fermentação do microrganismo na produção de isoamilase foi realizado em incubador - com gradiente de temperatura da Scientific Industries Inc. N.Y. 11.501, na faixa de temperatura de 23 à 46°C. Os tubos apropriados, contendo 10 ml de meio de cultura nº 6, descrito na tabela I, ajustado a pH 7,0 e esterilizados, foram incubados previamente nas diferentes temperaturas situadas na faixa de 23 a 46°C - durante 15 minutos para a estabilização das temperaturas. Em seguida, os tubos foram inoculados com 0,1 ml de inóculo preparado com o meio de cultura nº 6 de acordo com as condições descritas no item 3.2.1. e incubados nas diferentes temperaturas, com 20 agitações angulares por minuto durante 30 horas. Após o período de incubação foram determinados: a alteração do pH do meio de fermentação, crescimento do microrganismo de acordo com o item 3.2.3. e atividade de isoamilase do sobrenadante do meio de cultura como descrito no item 3.1.5.1.

3.6. Efeito do pH do meio de cultura na produção de isoamilase

Para o estudo do efeito do pH do meio de cultura na produção de isoamilase, 1 ml de suspensão homogênea de microrganismo em água destilada esterilizada foi inoculado em frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura 6 e 9, descritos na tabela I, ajustados a pH 5,0; 6,0 e 7,0 com NaOH 1N e HCl 1N. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 250 rpm durante 35 horas a 28°C.

Após a incubação foram determinados os parâmetros citados no item 3.4.

3.7. Produção e purificação da isoamilase

3.7.1. Produção de isoamilase

A fermentação foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 500 ml contendo 100 ml de meio de cultura 10 descrito na tabela I. Os frascos esterilizados foram inoculados com 1 ml de inóculo preparado de acordo com o item 3.2.1. e incubados no agitador rotatório à velocidade constante de 250 rpm, a 28°C por um período de 24 a 30 horas de incubação. Após a fermentação, o meio de cultura foi submetido à centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos, em centrífuga Beckman modelo J 21 B, rotor J A 20. A atividade de isoamilase no sobrenadante foi determinada de acordo com o i-

tem 3.1.5.1. O sobrenadante foi ajustado a pH 6,0 com HCl 0,1N, a um volume desse sobrenadante resfriado a 5°C, foi adicionado um volume de acetona resfriada a -5°C e a mistura foi mantida em câmara fria a 5°C por aproximadamente 15 horas. O precipitado, obtido por centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos a 5°C foi liofilizado, moído em almofariz de porcelana e denominado preparação bruta de isoamilase.

3.7.2. Fracionamento com sulfato de amônio

Para a purificação, 4 g de preparação bruta contendo 1,4 g de proteína foram suspensos em 400 ml de água destilada e centrifugados a 8000 rpm durante 15 minutos a 5°C. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante foi saturado a 80% com sulfato de amônio. O precipitado formado após uma noite a 5°C foi sedimentado por centrifugação nas mesmas condições descritas acima e o sobrenadante decantado. O precipitado obtido foi dissolvido em 50 ml de água destilada, dialisado contra água destilada a 5°C durante 48 horas e em seguida contra tampão fosfato 0,05 M pH 6,3 a 5°C durante 48 horas. A amostra dialisada foi percolada em coluna de DEAE-celulose de acordo com as condições descritas no item 3.7.3.

3.7.3. Cromatografia da isoamilase em coluna de DEAE-celulose

Tratou-se previamente, 40 g de DEAE-celulose (dietilaminoetil -celulose) com 500 ml de NaOH 1N, filtrou-se em lã de vidro e lavou-se com água destilada para a remoção do NaOH. A seguir, a resina foi tratada com 500 ml de HCl 1N e lavada com água destilada para a remoção do HCl e finalmente equilibrada com tampão fosfato 0,05 M, pH 6,3.

A solução enzimática de isoamilase (62 ml) obtida no item 3.7.2. foi aplicada em coluna de DEAE-celulose de 2,5 cm de diâmetro x 32 cm de comprimento, equilibrada com tampão fosfato 0,05 M pH 6,3. A amostra foi eluída na coluna, pela aplicação de 325 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,3 ; 200 ml de tampão fosfato 0,2M pH 6,3 e 775 ml de tampão fosfato 0,4 M pH 6,3, consecutivamente. As frações de 5 ml foram coletadas a cada 30 minutos. O curso de eluição das proteínas da coluna foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Coleman modelo 124 D. A atividade de isoamilase das frações foi determinada de acordo com o item 3.1.5.1. As frações de número 25 a 85 foram reunidas num total de 250 ml e percoladas em coluna de DEAE-Sephadex A-50 de acordo com as condições descritas no item 3.7.4.

A concentração de proteínas das preparações enzimáticas foi determinada de acordo com o método de Lowry et al (38).

3.7.4. Cromatografia da isoamilase em DEAE-Sephadex A-50

Tratou-se previamente 20 g de DEAE-Sephadex A-50 com 500 ml de NaOH 0,5N e lavou-se com água destilada. A seguir, tratou-se com 500 ml de HCl 0,5N, lavou-se com água destilada para a remoção do HCl e finalmente equilibrou-se em tampão fosfato 0,05 M, pH 6,3.

A solução enzimática obtida no item 3.7.3. foi saturada a 80% com sulfato de amônio e, o precipitado formado após uma noite a 5°C foi separado por centrifugação a 8000 rpm durante 15 minutos. O precipitado foi dissolvido em 10 ml de água destilada, dialisado contra água destilada durante 48 horas a 5°C e em seguida contra tampão fosfato 0,05 M, pH 6,3 durante 24 horas a 5°C. A amostra dialisada (25 ml) foi aplicada em coluna de DEAE-Sephadex A-50 (2,5 cm x 30 cm) e eluída da coluna pela aplicação de 350 ml de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,3 e 900 ml de tampão fosfato 0,1M pH 6,3, consecutivamente. As frações de 5 ml foram recolhidas a cada 30 minutos. O curso de eluição das proteínas da coluna foi seguido pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Coleman modelo 124 D. A atividade enzimática das frações foi determinada de acordo com o item 3.1.5.1.

As frações de nº 11 a 60 contendo atividade de isoamilase foram reunidas num total de 245 ml e percoladas em coluna de CM-celulose de acordo com o item 3.7.5.

3.7.5. Cromatografia da isoamilase em coluna de CM-celulose

Tratou-se, previamente, 30 g de CM-celulose (carboximetil-celulose) com 500 ml de HCl 1N, lavou-se com água destilada para a remoção de HCl. Em seguida tratou-se com 500 ml de NaOH 1N, lavou-se com água destilada para a remoção do NaOH e finalmente equilíbrou-se com tampão fosfato 0,05 M, pH 6,3. A solução enzimática obtida no item 3.7.4. foi percolada em coluna (2,5 diâmetro x 35 cm) de CM-celulose. As proteínas foram eluídas na coluna pela aplicação de 450 ml de tampão fosfato 0,05 M, pH 6,3 ; 100 ml de tampão 0,1 M, pH 6,3 e 750 ml de tampão fosfato 0,2 M pH 6,3, consecutivamente. O curso de eluição das proteínas foi acompanhado pela medida da absorbância a 280 nm e a atividade enzimática das frações foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.1.5.1. As frações de nº 24 a 77 contendo atividade de isoamilase foram reunidas num total de 265 ml e, em seguida, dialisadas contra água destilada a 5°C durante 48 horas. Após a dialise, a solução enzimática foi liofilizada, moída em almofariz de porcelana e conservada em congelador.

3.8. Purificação de β -amilase de soja

Para a purificação da β -amilase de soja, 17 g de preparação bruta de enzima obtidos de farinha de soja desengordurada pela precipitação com solvente orgânico, foram dissolvidos em 1000 ml de água destilada e centrifugados a 1000 rpm durante 10 minutos.

O precipitado foi desprezado. O sobrenadante foi saturado a 80% de sulfato de amônio, decantado durante 15 horas a 5°C e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O precipitado obtido foi dissolvido em 100 ml de água destilada e em seguida dialisado - contra tampão fosfato 0,05 M pH 6,3 por 48 h a 5°C. A água destilada e o tampão fosfato da diálise foram renovados periodicamente. O dialisado obtido foi percolado em coluna de 45 cm x 2,5 cm de DEAE-celulose previamente tratada com NaOH e HCl como citado no item 3.7.3. e equilibrada com tampão fosfato 0,025 M, pH 6,8. Inicialmente, a amostra foi eluída com 200 ml de tampão fosfato 0,025 M, pH 6,8. Em seguida, foi aplicado um sistema em que o tampão fosfato 0,025 M, pH 6,8 contendo 0,4 M NaCl foi adicionado a um reservatório de 500 ml de tampão fosfato 0,025 M pH 6,8 adaptado à coluna cromatográfica a uma velocidade igual a vazão da coluna. As frações de 10 ml foram coletadas a cada 15 minutos. As frações contendo atividade de β -amilase foram reunidas e a solução enzimática foi saturada a 80% com sulfato de amônio. O precipitado após repouso de 15 horas a 5°C foi sedimentado por centrifugação a 10000rpm durante 10 minutos e dissolvido em 50 ml de água destilada. A solução enzimática foi dialisada contra água destilada durante 48 horas a 5°C. Após diálise a solução foi liofilizada, moída em almofariz de porcelana e conservada em congelador.

A atividade de β -amilase foi determinada de acordo com as condi

ções descritas no item 3.1.7.

3.9. Estudo da ação da isoamilase sobre diferentes substratos

3.9.1. Hidrólise da amilopectina, glicogênio e pululano pela isoamilase

Para o estudo da hidrólise de amilopectina, glicogênio de ostra e pululano pela isoamilase o sistema de reação foi constituído de 250 mg de substrato gelatinizado em 15 ml de água deionizada, 1 ml de solução enzimática contendo 1000 unidades de atividade e 9 ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,3. As misturas de reação foram incubadas a 40°C durante 6 horas e as amostras foram retiradas em diferentes tempos de incubação para a determinação de açúcares redutores em termos de glicose, de acordo com o método de Somogyi - Nelson e para a determinação da medida de absorbância a 620 nm dos produtos de reação após coloração com reagente de iodo, de acordo com o item 3.1.5.1.

3.9.2. Cromatografia descendente em papel dos produtos de hidrólise da amilopectina e de glicogênio pela isoamilase

Para a hidrólise, o sistema de reação foi constituído de 20 mg do substrato amilopectina ou glicogênio gelatinizados em 10 ml de água destilada, 9 ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,3 e 1 ml

de solução de isoamilase purificada contendo 100 unidades de a tividade/ml.

Após incubação a 40°C durante 24 horas, as misturas de reação foram aplicadas em papel de cromatografia Whatman nº 3. O sistema de solvente utilizado para a cromatografia descendente em papel foi butanol:piridina:água na proporção 4:6:3 (v:v), respec tivamente.

O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi 48 horas. Como a çúcares padrões utilizou-se uma mistura de glicose (G_1), maltose (G_2), maltotriose (G_3), maltotetraose (G_4), maltopentaose (G_5) e maltohexaose (G_6). Os açúcares redutores foram revelados com $AgNO_3$ e NaOH alcoólico de acordo com o método descrito por Trevelyan (60).

3.10. Caracterização da isoamilase purificada

A isoamilase purificada de acordo com os procedimentos descritos no item 3.7. foi utilizada para o estudo de caracterização da isoamilase.

3.10.1. Efeito do pH na atividade enzimática

Para o estudo do efeito de pH na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 5 ml de solução 1% de amilopectina em água destilada, 1 ml de solução enzimática contendo 40 unidades de atividade e 1 ml de tampão. Os sistemas tampões fo-

ram usados dentro dos limites de sua ação tamponante: citrato fosfato pH 2,6 a 7,0, tampão acetato de sódio/ácido acético de pH 3,6 a 5,6 ou tampão fosfato de sódio de pH 5,7 a 8,0 na concentração 0,5 M. As misturas de reação foram incubadas a 40°C em banho-maria por 1 hora. Após a incubação, a atividade de isoamilase foi determinada pelo método de Kobayashi modificado, citado no item 3.1.5.1., sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

3.10.2. Efeito do pH na estabilidade da enzima

Para o estudo do efeito de pH na estabilidade da enzima, 1 ml da solução enzimática contendo 160 unidades de atividade, foi pré-incubado com 1 ml de tampão 0,1 M de diferentes valores de pH durante 24 horas a 19°C. Foram utilizados os sistemas tampões: citrato-fosfato pH 2,6 a 7,0; fosfato de sódio pH 5,7 a 8,0; ácido bórico - borax pH 7,6 a 9,0 e borax - NaOH pH 9,5 a 10,1. Após a incubação foram adicionados 2 ml de tampão fosfato pH 6,3 0,2 M à solução enzimática e a atividade residual foi determinada pelo ensaio de atividade descrito no item 3.1.5.1.

3.10.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 5 ml de amilopectina 1% em água destilada, 1 ml de solução enzimática contendo 40 unidades

de atividade e 1 ml de tampão fosfato 0,5 M pH 6,3. A mistura foi incubada a diferentes temperaturas entre 23 a 50°C durante 1 hora. A atividade de isoamilase foi determinada de acordo com as condições descritas no item 3.1.5.1.

3.10.4. Termoestabilidade da enzima

Para o estudo da termoestabilidade da enzima, 1 ml de solução enzimática contendo 40 unidades de atividade, foram colocados - em tubos de rosca e pré-incubados a diferentes temperaturas entre 10°C a 50°C durante 1 hora. A pré-incubação da enzima foi efetuada no pH ótimo em tampão fosfato 0,05 M pH 6,3. A atividade residual foi determinada de acordo com as condições descritas no item 3.1.5.1.

3.10.5. Efeito de sais minerais na atividade enzimática

O efeito de sais minerais na atividade enzimática foi verificado dentro da faixa onde não havia interferência com o método de determinação de atividade (item 3.1.5.1.). O sistema de reação foi constituído de 4 ml de solução de amilopectina 1,25% em água deionizada, 1 ml de solução enzimática contendo 40 unidades de atividade, 1 ml de tampão fosfato 0,5 M pH 6,3 e 1 ml de solução contendo um dos seguintes sais: CoCl_2 , NaCl , AgNO_3 , NiSO_4 , Li_2SO_4 , BaCl_2 , MgSO_4 , ZnSO_4 , MnSO_4 , CaCl_2 , CuSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ na concentração necessária para 1 mM de sal em relação ao volume

final da mistura de reação. Após uma hora de incubação a 40°C, a atividade da isoamilase foi determinada de acordo com as condições descritas no item 3.1.5.1.

3.10.6. Efeito de inibidores de enzimas na atividade da isoamilase

O efeito de inibidores foi pesquisado semelhantemente ao efeito de sais minerais na atividade enzimática. O sistema de reação foi constituído de 4 ml de solução 1,25% de amilopectina em água deionizada, 1 ml de solução enzimática contendo 40 unidades de atividade, 1 ml de tampão fosfato 0,5 M pH 6,3 e 1 ml de solução de um dos seguintes reagentes: p-hidroximercuribenzoato de sódio, iodoacetato, bisulfito de sódio, cisteína, ázida sódica, mercaptoetanol, dietilditiotiocarbamato de sódio na concentração necessária para 10 mM em relação ao volume final da mistura de reação. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.1.5.1.

3.10.7. Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática

Para o estudo do efeito da concentração de substrato na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 1 ml de solução enzimática em água deionizada contendo 32 µg de proteína,

5 ml de solução de amilopectina em água deionizada, na concentração variável entre 0,15% a 3% e 1 ml de tampão fosfato 0,5 M pH 6,3. As misturas foram incubadas durante 1 hora no banho-maria a 40°C e a atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.1.5.1. A constante de Michaelis - Menten (Km) e a velocidade máxima (Vmáx) foram determinadas segundo o sistema gráfico de Lineweaver - Burk (37).

3.10.8. Determinação do peso molecular da isoamilase através de filtração em gel Sephadex G-200

Previamente, 20 g de Sephadex G-200 foram entumescidos em 1 litro de KCl 0,1 M durante 5 dias e depois equilibrados com tampão Tris - HCl 0,05 M pH 7,5 contendo KCl 0,1 M (Andrews (6)).

As proteínas: hemoglobina bovina (20 mg), β -galactosidase (10ml) catalase (20 mg) e isoamilase (10 mg) purificada de acordo com os procedimentos descritos no item 3.7. foram percoladas em coluna de 3 cm diâmetro x 48,5 cm de Sephadex G-200 equilibrada com tampão Tris - HCl 0,05 M pH 7,5 contendo HCl 0,1 M (Andrews (6)). As frações de 3 ml foram coletadas a cada 7 minutos. A coluna foi caracterizada quanto ao volume de vazão pelo uso de Blue Dextran 2000, determinado pela absorção a 254 nm. O volume de eluição da hemoglobina bovina foi determinado pela medida de absorbância a 550 nm. Os volumes de eluição da isoamila

se, β -galactosidase e catalase foram determinados pela medida de suas atividades. A atividade da isoamilase foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.1.5.1. A catalase foi determinada pela titulação de peróxido residual com solução de permanganato de potássio em meio ácido (9). A atividade da β -galactosidase foi determinada de acordo com as condições descritas por Park et al (54).

3.10.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A solução de isoamilase contendo 3600 μ g proteína/ml purificada de acordo com os procedimentos descritos no item 3.7., foi utilizada para a eletroforese em gel.

A gel eletroforese foi desenvolvida, modificando-se o método de Davis (10). O aparelho utilizado para a eletroforese consiste de uma frente estabilizadora da FANEM modelo 1050, tubos de vidro de 0,5 cm x 8 cm, suporte para cubas, duas cubas de acrílico de 14 x 14 cm de base por 7 cm de altura, cada qual com um eletrodo na posição central. A cuba superior apresenta oito perfurações ao redor do eletrodo para o encaixe dos tubos.

O gel foi preparado pela mistura de 5 g de Cyanogum (95% de poliacrilamida e 5% de N, N, N' metilenebisacrilamida, 250 mg de amilopectina gelatinizada em 25 ml de água destilada, 50 mg de persulfato de amônio dissolvido em 25 ml de tampão fosfato

0,1 M pH 8,0 e 20 ml de N, N', N' tetrametilediamina. Aplicou -se 10 µl de azul de bromofenol 0,1% e 40 µl de amostra no topo do gel. A eletroforese foi desenvolvida pela aplicação de uma corrente de 5 mA por gel a temperatura ambiente 26°C-28°C, por 3 horas. Após a corrida, os géis foram removidos dos tubos, incubados em tampão fosfato 0,05 M pH 6,3 durante 1 hora e colocados em solução de iodo e KI 0,005 N.

3.11. Produção de maltose

3.11.1. Produção de maltose a partir do amido, amilopectina e glicogênio de ostra; pela ação de β-amilase de soja

Para a hidrólise, o sistema de reação foi constituído de 50 mg de substrato: amido, amilopectina ou glicogênio de ostra gelatinizados em 25 ml de água destilada, 24 ml de tampão fosfato pH 6,0 0,1M, 1 ml de toluol. e 1 ml de solução de β-amilase contendo 50 unidades de atividade, purificada de acordo com os procedimentos descritos no item 3.8. Os balões volumétricos de 50 ml contendo as misturas de reação foram incubados a 45°C durante 2 horas e foram retiradas amostras em diferentes tempos para a determinação de açúcares redutores expressos como maltose, de acordo com o método de Somogyi - Nelson (46).

3.11.2. Produção de maltose a partir do amido, amilopectina e glicogênio de ostra pela ação simultânea de isoamilase de Flavobacterium sp e β -amilase de soja

Na produção de maltose a partir do amido, amilopectina e glicogênio pela ação simultânea de isoamilase e β -amilase o sistema de reação foi constituído de 50 mg de substrato gelatinizado em 24 ml de água destilada; 24 ml de tampão fosfato 0,05 M pH 6,0; 1 ml de solução de isoamilase purificada, contendo 300 unidades de atividade; 1 ml de solução de β -amilase purificada, contendo 50 unidades de atividade e 1 ml de toluol. Os balões volumétricos de 50 ml, contendo as misturas de reação, foram incubados a 40°C durante 3 horas e as amostras foram retiradas em diferentes tempos para a determinação de açúcares redutores expressos como maltose, de acordo com o método de Somogyi - Nelson (46).

4. RESULTADOS

4.1. Seleção de microrganismos

4.1.1. Seleção preliminar de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas desramificantes

Após isolamento de 2.460 linhagens de microrganismos do solo foram selecionadas preliminarmente três bactérias positivas ao teste descrito em 3.1.3. As figuras 1 e 2 ilustram o teste para seleção de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas - desramificantes; observa-se um halo de coloração azul ao redor das colônias produtoras de enzimas amilolíticas desramificantes e um halo incolor ao redor das colônias que produzem α -amilase tendo como fundo a coloração púrpura da amilopectina com reagente de iodo.

4.1.2. Seleção do microrganismo melhor produtor de enzima amilolítica desramificante através da fermentação - submersa

A linhagem nº 2018 que produz maior atividade de isoamilase foi escolhida através de fermentação submersa como descrito no item 3.1.4. A tabela II ilustra os resultados. Esta linhagem que produz isoamilase extracelularmente foi identificada pelo Dr. Naylor

da Universidade de Cornell como Flavobacterium sp.

4.2. Estudo da relação entre tempo, alteração de pH no meio de fermentação, crescimento do microrganismo e produção de enzima

A atividade de isoamilase no extrato aquoso foi verificada em diferentes tempos de crescimento, tendo sido observado que a isoamilase é produzida na fase exponencial de crescimento a atingir o máximo de atividade após 24 horas de fermentação. Foi observado também que, após a produção, a atividade enzimática manteve-se num nível relativamente constante no período de 24 a 60 horas de fermentação. Foi observado um aumento do pH do meio de fermentação de 6,0 para aproximadamente 8,0. Observou-se também que o microrganismo não produz pululanase (item 3.1.6.). A figura 3 ilustra os resultados.

4.3. Produção de isoamilase pelo Flavobacterium sp em diferentes meios de cultura

Entre os vários meios de cultura testados para a produção de enzima, de acordo com as condições citadas no item 3.3., foi obtida a maior produção de enzima em meio de cultura 6 a pH 7,0 constituído de maltose, proteose-peptona e extrato de levedura. A tabela IV ilustra os resultados.

4.4. Efeito da concentração de maltose, proteose-peptona e extrato de levedura do meio de cultura na produção de isoamilase

O efeito da concentração de maltose, proteose-peptona e extrato de levedura do meio de cultura foram pesquisados de acordo com o item 3.4.

No estudo do efeito da concentração de maltose no meio de cultura, foi observada baixa produção de enzima na ausência de maltose. Com concentrações de 0,05 à 0,5% de maltose foi observado um aumento na produção de enzima enquanto que concentrações superiores à 0,5% de maltose resultaram na mesma produção de enzima. A tabela V apresenta tais resultados.

No estudo do efeito da concentração de proteose-peptona do meio de cultura, foi obtida produção máxima de enzima em concentrações variáveis de 0,1% à 0,5% de proteose-peptona. A tabela VI ilustra os resultados.

No estudo do efeito da concentração do extrato de levedura do meio de cultura na produção de enzima, foi verificada produção máxima de isoamilase em meios de cultura com concentrações variáveis de 0,05%-0,7% de extrato de levedura. A tabela VII ilustra os resultados.

4.5. Influência da temperatura de fermentação na produção de isoamilase

O estudo da influência da temperatura de fermentação na produção de isoamilase foi realizado de acordo com o item 3.5. A figura 4 apresenta os resultados, onde a produção ótima de enzima foi observada na faixa de 24-28°C. Observou-se ainda, que a 34°C há um decréscimo acentuado no crescimento celular e na produção de isoamilase e, a 38°C não há crescimento celular.

4.6. Efeito do pH do meio de cultura na produção de isoamilase

O estudo do efeito do pH do meio de cultura na produção de enzima e no crescimento celular foi realizado de acordo com o item 3.6. A tabela VIII apresenta os resultados, os quais indicam maior produção de enzima na fermentação do microrganismo em meio de cultura nº 6 de pH inicial 6,0 e 7,0, contendo maltose. Foi observado que o microrganismo em estudo não cresce em meio de cultura de valores de pH inferiores a pH 5,0.

4.7. Purificação da isoamilase

O fluxograma para purificação de isoamilase do Flavobacterium sp está apresentado na figura 5 e a purificação está sumarizada na tabela IX. A preparação bruta da enzima foi purificada 44,4 vezes após fracionamento com sulfato de amônio seguido de diálise, cromatografia em coluna de DEAE-celulose, DEAE-Sephadex -

A-50 e CM-celulose.

A figura 6 ilustra o fracionamento obtido após eluição das proteínas adsorvidas em DEAE-celulose com tampões de força iônica crescente e a tabela IX indica que foi obtida uma atividade enzimática de 2400 unidades por mg de proteína.

A figura 7 ilustra o fracionamento obtido após eluição das proteínas adsorvidas em DEAE-Sephadex A-50 com tampões de força iônica crescente. Nesta etapa, foi obtida uma atividade enzimática de 3710 unidades por mg de proteína.

A figura 8 ilustra o fracionamento obtido após eluição das proteínas em coluna de CM-celulose com tampões de força iônica crescente. A tabela IX indica que foi obtida uma purificação de 44,4 vezes e uma atividade enzimática de 11.110 unidades/mg de proteína.

4.8. Purificação de β -amilase de soja

A preparação bruta de β -amilase de soja foi purificada 4,5 vezes após fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em DEAE-celulose.

4.9. Estudo da ação da isoamilase sobre diferentes substratos

4.9.1. Hidrólise da amilopectina, glicogênio e pululano pela isoamilase

A ação da enzima amilolítica desramificante sobre diferentes substratos foi verificada de acordo com as condições descritas no item 3.9.1. As figuras 9 e 10 ilustram os resultados.

Foram observados aumentos de açúcares redutores e aumento da coloração da mistura de reação com reagente de iodo, após hidrólise da amilopectina e do glicogênio pela enzima. Foi observado também que não houve aumento de açúcares redutores após incubação da mistura de reação constituída de solução enzimática, pululano e tampão fosfato 0,05 M, pH 6,3, após 6 horas à 40°C.

4.9.2. Cromatografia descendente em papel dos produtos de hidrólise da amilopectina e glicogênio pela isoamilase

Na cromatografia descendente em papel dos produtos da hidrólise da amilopectina e do glicogênio pela isoamilase descrita no item 3.9.2., observou-se que não há produção de glicose e maltose. Na hidrólise da amilopectina e do glicogênio pela isoamilase foram obtidas uma mistura de cadeias lineares α -1,4 glicosídicas superiores à três unidades de glicose. A figura 11 i-

lustra o cromatograma obtido.

4.10. Caracterização da isoamilase purificada

4.10.1. Efeito do pH na atividade enzimática

O efeito do pH na atividade de isoamilase foi determinado de acordo com o item 3.10.1. A figura 12 mostra que a enzima apresenta maior atividade a pH 6,3, em tampão fosfato de sódio.

4.10.2. Efeito do pH na estabilidade da enzima

O estudo referente à influência do pH na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com o item 3.10.2. A figura 13 ilustra a estabilidade enzimática; a enzima em estudo foi estável entre pH 6,0 a 10,0. A isoamilase foi completamente inativada a valores de pH inferiores a 4,0.

4.10.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática

O efeito da temperatura na atividade da isoamilase foi determinada conforme o item 3.10.3. A figura 14 apresenta os resultados, mostrando que a enzima apresenta maior atividade a 40°C.

4.10.4. Termoestabilidade da enzima

O estudo referente à influência da temperatura na estabilidade enzimática foi realizada de acordo com o item 3.10.4. A figura

15 ilustra os resultados.

O aquecimento da enzima à 35°C, 40°C, 45°C e 50°C durante 1 hora resultaram em 5%, 12%, 90% e 97% de inativação, respectivamente.

4.10.5. Efeito de sais minerais na atividade enzimática

O efeito de sais minerais na atividade enzimática foi verificado de acordo com o item 3.10.5. A tabela X apresenta os resultados. Observou-se que a presença de CaCl_2 , NaCl , MgCl_2 , BaCl_2 ou Li_2SO_4 não influi na atividade de isoamilase enquanto que as presença de NiSO_4 , CoCl_2 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, ZnSO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 , AgNO_3 , ou HgCl_2 , na concentração 1 mM de sal em relação ao volume final da mistura de reação, inibe a atividade da enzima.

4.10.6. Efeito de inibidores de enzimas na atividade enzimática

O efeito de inibidores na atividade enzimática foi verificado de acordo com o item 3.10.6. A tabela XI ilustra os resultados.

A atividade enzimática não foi influenciada pela presença de dietilditiotiocarbamato de sódio (10 mM), bisulfito de sódio (10 mM), ázida de sódio (10 mM), cisteína (10 mM), iodoacetato (10 mM), p-hidroximercuribenzoato de sódio (10 mM) ou mercaptoetanol (10 mM).

4.10.7. Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática

O efeito da concentração de substrato amilopectina na atividade enzimática, determinado conforme as condições descritas no item 3.10.7., está demonstrado na figura 16, nos gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver Burk. A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) foram determinadas conforme o sistema gráfico de Lineweaver-Burk obtendo-se o valor de 14,28 mg/ml para o K_m aparente e o valor de 10 μ moles/minuto/mg de proteína.

4.10.8. Determinação do peso molecular da isoamilase através da filtração em gel Sephadex G-200

O peso molecular da isoamilase purificada foi determinado através da filtração em gel Sephadex G-200 descrita no item 3.10.8.

A figura 17 ilustra a eluição das proteínas em Sephadex G-200. O peso molecular da isoamilase foi calculado como sendo 126.000, como está apresentado na figura 18.

4.10.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com as condições descritas no item 3.10.9. A figura 19 apresenta a eletroforese desenvolvida a pH 8,0 em gel contendo subs

trato amilopectina. Observa-se uma faixa azul no gel, indicando a presença de isoamilase.

4.11. Produção de maltose

4.11.1. Produção de maltose a partir do amido, amilopectina e glicogênio pela ação de β -amilase de soja

Na hidrólise do amido, amilopectina e glicogênio pela β -amilase de soja foram obtidos, respectivamente, 59,0%; 55,0% e 31,0% de conversão para maltose.

4.11.2. Produção de maltose a partir do amido, amilopectina e glicogênio pela ação simultânea de isoamilase de *Flavobacterium* sp e β -amilase de soja

Na hidrólise do amido, amilopectina e glicogênio pela ação simultânea de isoamilase de *Flavobacterium* sp e β -amilase de soja foram obtidos, respectivamente, 92,3%; 93,1% e 98,0% de conversão para maltose. A tabela XII apresenta os resultados.

5. DISCUSSÃO

5.1. Seleção de microrganismos

5.1.1. Seleção preliminar de microrganismos produtores de enzimas amilolíticas desramificantes

Através do crescimento dos microrganismos em placas de Petri contendo agar nutriente e amilopectina pode-se selecionar microrganismos produtores de enzimas amilolíticas desramificantes e que não produzem outras enzimas amilolíticas.

Ao redor das colônias produtoras de enzimas desramificantes observa-se um halo de coloração azul após exposição das placas ao vapor de iodo. As enzimas desramificantes rompem as ligações α -1,6 glicosídicas da amilopectina e liberam cadeias lineares α -1,4 glicosídicas curtas e longas como produto. As cadeias lineares α -1,4 glicosídicas de maior comprimento apresentam coloração azul intensa com iodo. Ao redor das colônias produtoras de α -amilase observa-se um halo incolor após exposição das placas ao vapor de iodo, evidenciando a hidrólise da amilopectina em oligosacarídeos de menor peso molecular. No caso de microrganismos que não produzem enzimas amilolíticas a coloração do meio de cultura torna-se púrpura em contato com os vapores de iodo.

5.1.2. Seleção do microrganismo melhor produtor de enzima amilolítica desramificante através da fermentação submersa

Das três linhagens de microrganismos selecionadas preliminarmente pela capacidade de desramificar a amilopectina (item 3.1.3.), foi selecionado o microrganismo Flavobacterium sp como melhor produtor de enzima amilolítica desramificante através da fermentação submersa de acordo com o item 3.1.4.

5.2. Estudo da relação entre tempo, alteração de pH no meio de fermentação, crescimento do microrganismo e produção de enzima

Na fermentação submersa do Flavobacterium sp em meio de cultura 7 a enzima é produzida na fase exponencial de crescimento do microrganismo e atinge o máximo de produção após 24 horas de fermentação. O meio de cultura líquido sofre um aumento de pH de 6,0 para 8,0. Após a produção a enzima permanece estável num nível relativamente constante no período de 24 à 60 horas de fermentação.

5.3. Produção de isoamilase pelo Flavobacterium sp em diferentes meios de cultura

A enzima foi produzida pelo Flavobacterium sp na presença de maltose, glicose, amido e dextrina, sendo obtido maior rendimento

to em meio de cultura contendo maltose, proteose-peptona e extrato de levedura.

Na fermentação submersa do Flavobacterium sp nos meios de cultura nº 1 (Ref. 8) e nº 4 (Ref. 17) descritos na tabela I, foram obtidos baixa produção de enzima desramificante e baixo crescimento celular.

Harada et al (17) obtiveram altos rendimentos de isoamilase na fermentação submersa do Pseudomonas sp SB 15 em meio de cultura nº 4, descrito na tabela I contendo maltose, dextrina, amido ou isomaltose e verificaram que a enzima não foi produzida na presença de glicose como única fonte de carbono.

5.4. Efeito da concentração de maltose, proteose-peptona e extrato de levedura no meio de cultura e produção de maltose

Entre os vários meios de cultura testados foi obtida produção máxima de enzima na fermentação do microrganismo Flavobacterium sp em meio de cultura constituído de 0,5% de maltose, 0,1% de proteose-peptona e 0,1% de extrato de levedura, a pH 7,0.

A presença de maltose em concentrações superiores a 0,5% em meio de cultura constituído de 1% de proteose-peptona e 0,5% de extrato de levedura não resultaram em aumento da produção de enzima. Verificou-se que a presença de proteose-peptona em concen

trações superiores a 0,1% no meio de cultura constituído de 0,5% de extrato de levedura e 0,5% não resultaram em acréscimo na produção de enzima. Observou-se também que a presença de 0,1% de extrato de levedura no meio de cultura constituído de 1% de proteose-peptona e 0,5% de maltose foi suficiente para a produção máxima de enzima.

5.5. Efeito da temperatura de fermentação na produção de enzima

No estudo da temperatura de fermentação do microrganismo verificou-se que o crescimento celular durante a fermentação, na faixa de 24 a 32°C, foi relativamente o mesmo, mas a produção máxima de enzima foi verificada na faixa de temperatura de 24 a 28°C. O Flavobacterium sp não apresenta crescimento a temperaturas superiores a 38°C.

5.6. Efeito do pH do meio de cultura na produção de enzima

No estudo do efeito do pH do meio de cultura na produção de enzima desramificante, foi observado que a produção máxima ocorre a pH 6,0 a 7,0. Observou-se que o microrganismo não apresenta crescimento celular em meio de cultura de pH inferior a 5,0.

Harada et al (17) verificaram que o crescimento celular do Pseudomonas sp SB 15 em meio de cultura nº 4, descrito na tabe-

la I, de pH 5,0 a 7,0 foi relativamente o mesmo, mas a produção de isoamilase foi verificada em meio de cultura de pH 5,0 a 6,0.

5.7. Purificação da isoamilase de *Flavobacterium* sp

No fracionamento da preparação bruta de enzima em coluna de DEAE-celulose equilibrada com tampão fosfato 0,05 M pH 6,3, a enzima não foi adsorvida enquanto que materiais pigmentados a algumas proteínas foram adsorvidas em DEAE-celulose. A enzima também não foi adsorvida em coluna de DEAE-Sephadex A-50. A enzima desramificante de *Flavobacterium* sp é constituída de uma única identidade, o que foi verificado através da eletroforese em gel de poliacrilamida.

5.8. Purificação da β -amilase de soja

A preparação bruta de β -amilase de soja foi purificada 4,5 vezes após fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de DEAE-celulose.

5.9. Ação da isoamilase sobre diferentes substratos

No estudo da especificidade da isoamilase quanto ao substrato (itens 3.9.1. e 3.9.2.) verificou-se que a enzima desramificante de *Flavobacterium* sp hidrolisa as ligações α -1,6 glicosídicas da amilopectina e do glicogênio mas não hidrolisa unidades

de glicose e maltose unidas por ligações α -1,6 glicosídicas às cadeias lineares α -1,4 glicosídicas. A enzima não hidrolisa o pululano podendo, portanto ser classificada como isoamilase (glycogen 6 glucanohydrolase EC 3.2.1.68).

A função bioquímica da isoamilase descoberta em Flavobacterium sp é semelhante à das isoamilases bacterianas extracelulares de Pseudomonas amyloclavata (Pseudomonas sp SB 15) (20) e Cytophaga sp (14) mas apresenta propriedades físicas diferentes tais como pH ótimo de atividade, temperatura ótima, estabilidade ao pH e influência de sais inibidores.

5.10. Caracterização da isoamilase

5.10.1. Efeito do pH na atividade enzimática

A enzima desramificante de Flavobacterium sp apresentou pH ótimo de atividade em pH 6,3 do lado ácido da neutralidade, assim como as isoamilases de Cytophaga sp (14), Pseudomonas amyloclavata (68) e Saccharomyces cerevisiae (13) que apresentaram pH ótimo 5,5; 3,5 e 6,0 respectivamente. A tabela III ilustra o pH ótimo de atividade de isoamilases de diferentes fontes, descritas na literatura.

5.10.2. Efeito do pH na estabilidade enzimática

O comportamento da isoamilase de Flavobacterium sp frente a va

lores de pH na faixa ácida foi semelhante ao da enzima de Cytophaga sp estudada por Gunja Smith et al (14); ambas apresentaram instabilidade a valores de pH inferiores a pH 5,0. A isoamilase de Flavobacterium sp (item 3.10.2.) foi completamente inativada à valores de pH inferiores a pH 4,0. A isoamilase de Flavobacterium sp apresentou estabilidade ao pH diferente da isoamilase de Pseudomonas sp SB 15 estudada por Yokobayashi et al (68). A enzima desramificante de Flavobacterium sp apresentou estabilidade na faixa de pH 6,0 a 10,0 enquanto que a isoamilase de Pseudomonas sp SB 15 apresentou estabilidade na faixa de pH 2,5 a 7,5.

5.10.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática

A temperatura ótima das isoamilases de diferentes fontes se situam na faixa de 25°C a 55°C; a tabela III ilustra a temperatura ótima de isoamilases de diferentes fontes.

A temperatura ótima, 40°C, apresentada pela isoamilase de Flavobacterium sp (item 3.10.3.) foi a mesma encontrada para a isoamilase de Cytophaga sp estudada por Gunja et al (14).

5.10.4. Termoestabilidade da enzima

As enzimas desramificantes do tipo isoamilase descritas na li-

temperatura são termosensíveis.

Gunja et al (14) observaram que a incubação da isoamilase Cytophaga sp por 1 hora a 40°C resultava em completa perda de atividade. A isoamilase de Pseudomonas sp SB 15 também mostrou-se termosensível; o aquecimento da enzima a 50°C, 55°C e 60°C resultou num decréscimo de, respectivamente, 40%, 77% e 95% da atividade.

Nos estudos descritos no item 3.10.4. a isoamilase mostrou-se termosensível; a incubação da enzima a 35°C, 40°C, 45°C e 50°C durante 1 hora, em tampão fosfato 0,05 M pH 6,3 resultou, respectivamente, em 5%, 12%, 90% e 97% de inativação.

5.10.5. Efeito de sais minerais na atividade enzimática

No estudo do efeito de sais minerais (item 3.10.5.) a atividade enzimática foi ligeiramente inibida na presença de NiSO_4 , CoCl_2 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, ZnSO_4 , CuSO_4 e MnSO_4 e, fortemente inibida na presença de AgNO_3 e HgCl_2 na concentração final de 1 mM de sal em relação ao volume final da mistura de reação. A atividade da isoamilase não foi afetada pela presença de MgCl_2 , CaCl_2 , NaCl , BaCl_2 e Li_2SO_4 na concentração descrita acima. Os íons metálicos parecem não ser necessários para a atividade da isoamilase de Flavobacterium sp, da mesma forma que para isoamilases de Pseudomonas sp (27) e Cytophaga sp (41).

5.10.6. Efeito de inibidores de enzimas na atividade de isoamilase

A atividade de isoamilase de Flavobacterium sp não foi inibida na presença de dietilditioicarbamato de sódio (10 mM), âzida de sódio (10 mM), bisulfito de sódio (10 mM), iodoacetato (10 mM), p-hidroximercuribenzoato de sódio (10 mM), mercaptoetanol (10 mM) e cisteína (10 mM). Os grupos sulfidrilas parecem não ser necessários para a atividade da isoamilase de Flavobacterium sp assim como para as isoamilases de Saccharomyces cerevisiae (13) e de Pseudomonas sp SB 15 (27).

5.10.7. Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática

Para a verificação do efeito da concentração de substrato, a atividade enzimática foi determinada (item 3.10.7.) pela medida de grupos redutores expressos como glucose, como descrito por Yokobayashi et al (69). Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da isoamilase de Flavobacterium sp para o substrato amilopectina de milho ceroso foram, respectivamente, 14,28 mg/ml e 10 μ moles/minuto/mg de proteína.

Yokobayashi et al (69) encontraram o valor de K_m $1,7 \times 10^{-4}$ g/ml e $V_{m\acute{a}x}$ 2,5 μ moles/minuto/mg de proteína para amilopectina de milho ceroso.

5.10.8. Determinação do peso molecular da isoamilase através da filtração em gel Sephadex G-200

O peso molecular da enzima foi estimado em 126.000 através da filtração em gel Sephadex G-200. A enzima de Flavobacterium sp apresentou peso molecular próximo aos valores das isoamilases extracelulares de Cytophaga sp (14) e de Pseudomonas amyloclavata (27).

5.10.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Na eletroforese em gel, a atividade detectada com géis contendo amilopectina indicou a presença de uma única banda; a enzima desramificante não é uma isoenzima.

5.11. Aplicação da isoamilase

A isoamilase do Flavobacterium sp pode ser utilizada na produção de cadeias lineares α -1,4 glicosídicas a partir do amido e na produção de maltose quando utilizada em combinação com β -amilase. Na hidrólise do amido, amilopectina e glicogênio pela β -amilase foram obtidos, respectivamente, 59,0%, 55,0% e 31,0% de conversão para maltose. Enquanto que na hidrólise do amido, amilopectina e glicogênio pela ação simultânea de isoamilase - de Flavobacterium sp e β -amilase de soja foram obtidos, respectivamente 92,3%, 93,1% e 98% de conversão para maltose.

FIGURA 1 - ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE EN-
ZIMAS AMIOLÍTICAS DESRAMIFICANTES.

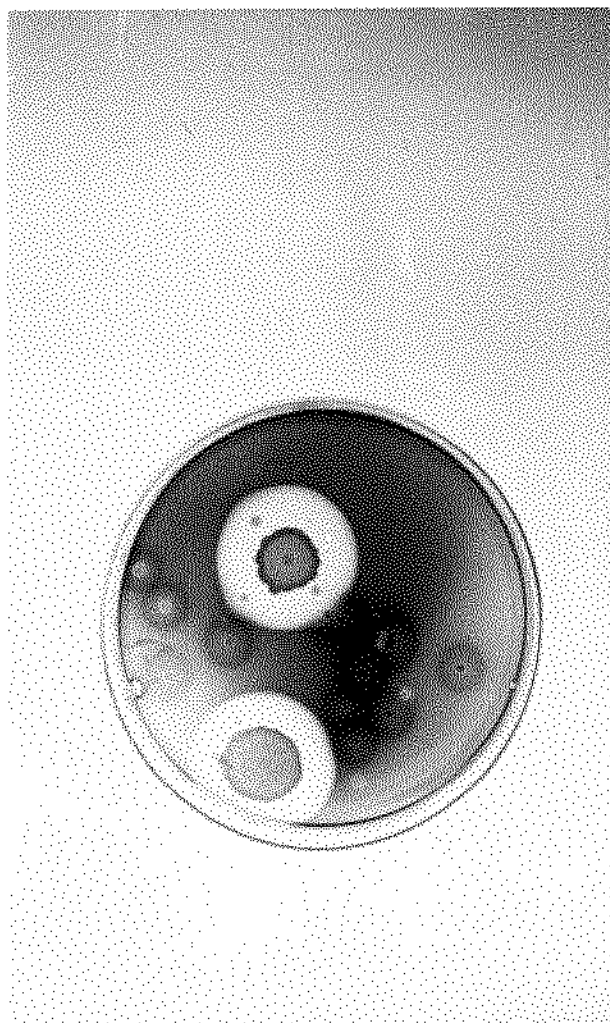


FIGURA 2 - TESTE PARA SELEÇÃO PRELIMINAR DE MICRORGANIS-
MOS PRODUTORES DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS DESRA-
MIFICANTES.

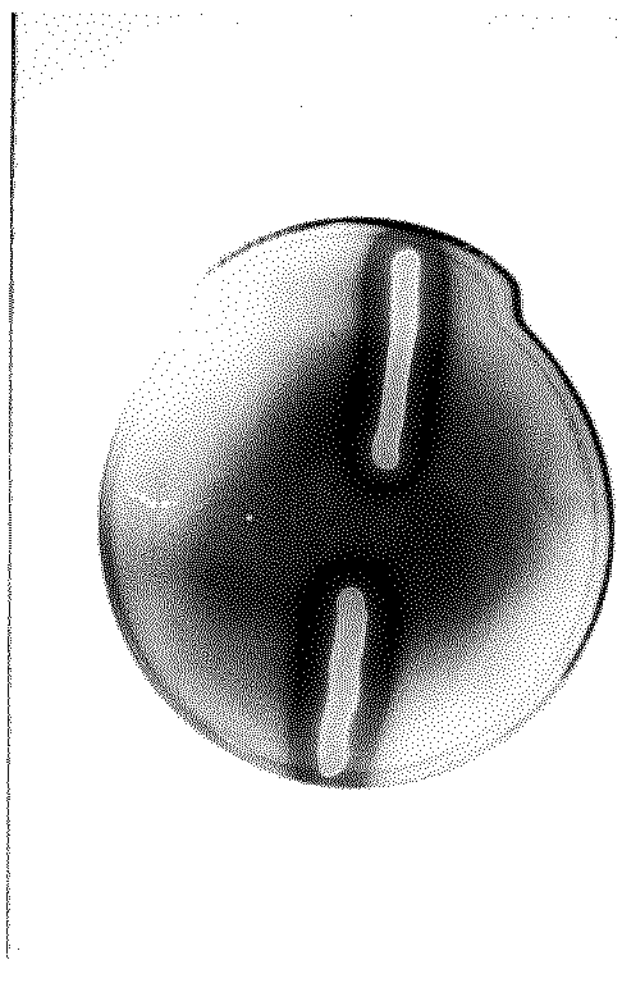
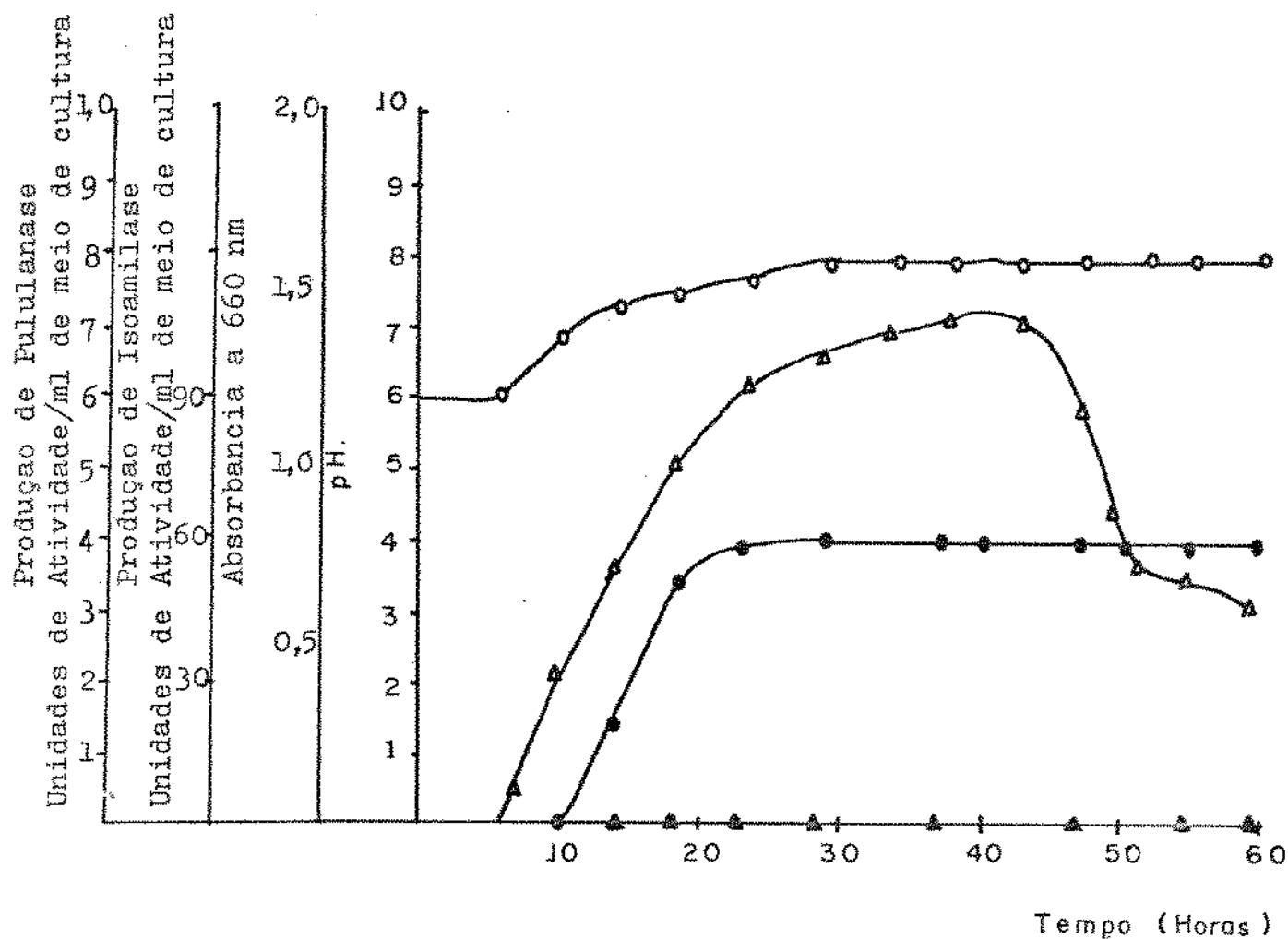
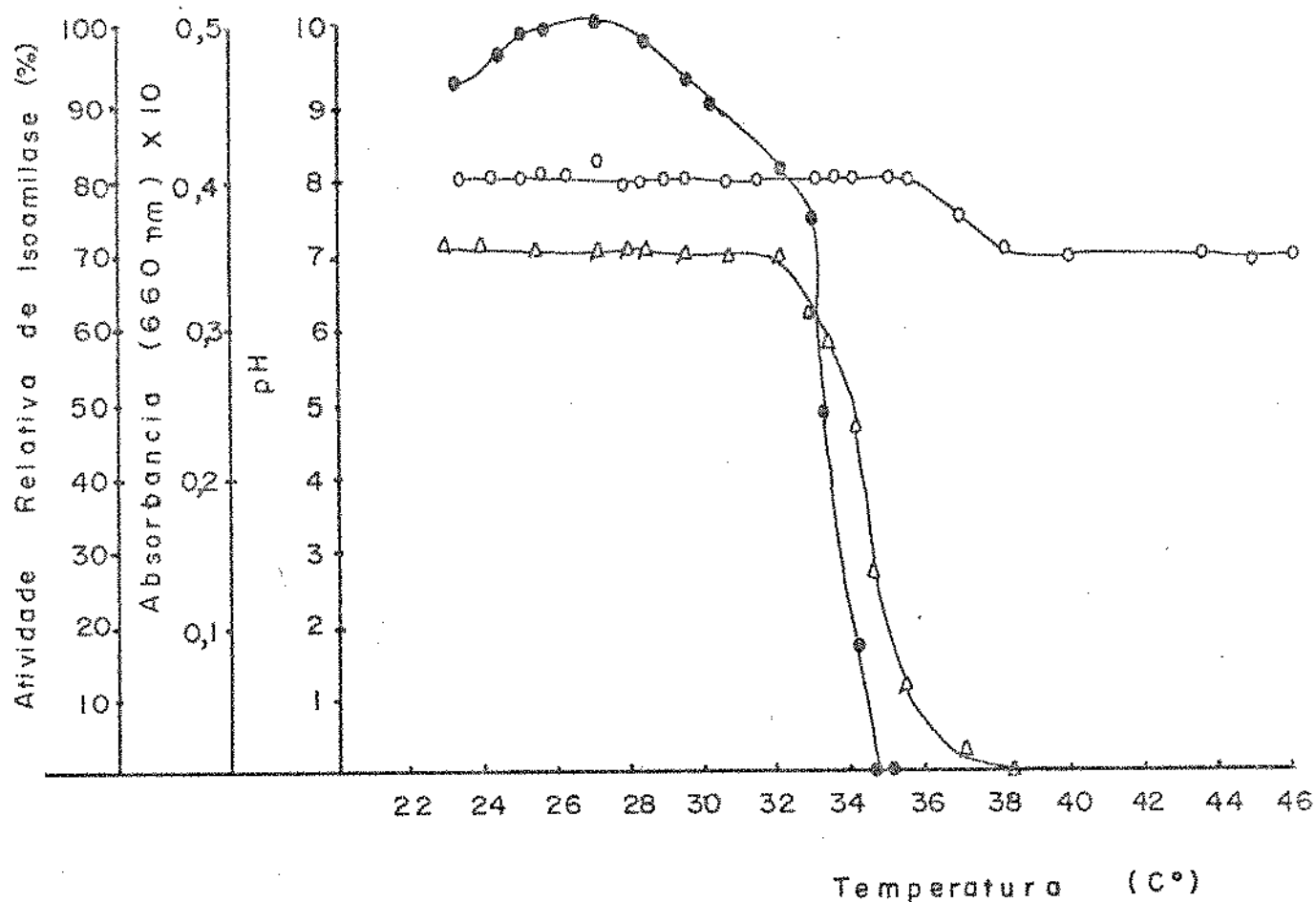


FIGURA 3 - ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE FERMENTAÇÃO, ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO DE CULTURA, CRESCIMENTO DO MICRORGANISMO E PRODUÇÃO DE ENZIMA.



- pH
- Produção de Isoamilase
- ▲ Produção de Pululanase
- △ Absorbância a 660 nm

FIGURA 4 - PRODUÇÃO DE ISOAMILASE PELO Flavobacterium sp
EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE FERMENTAÇÃO



○ pH

● Produção de Isoamilase (Atividade Relativa)

△ Absorbância (660 nm)

FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ISOAMILASE.

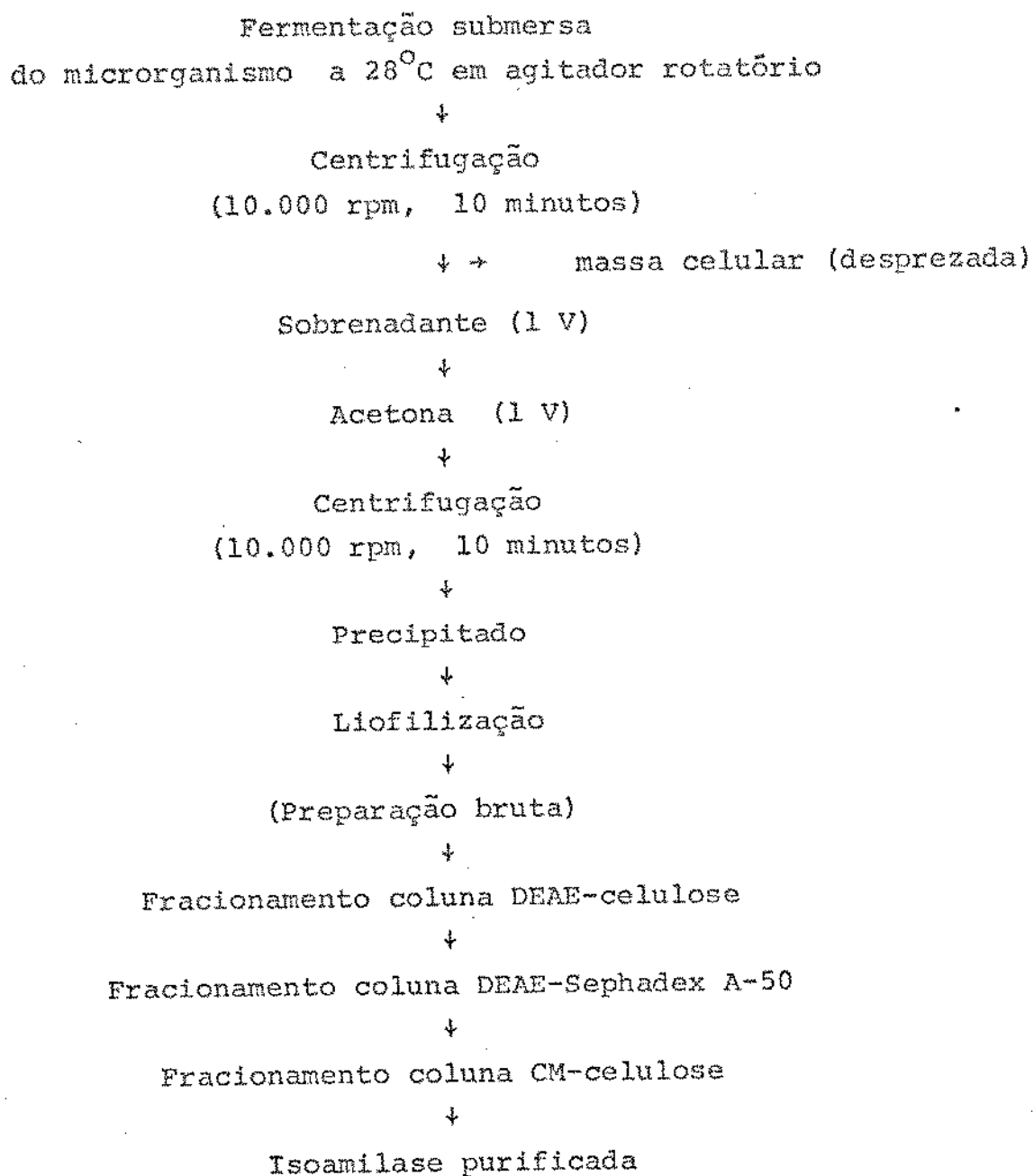
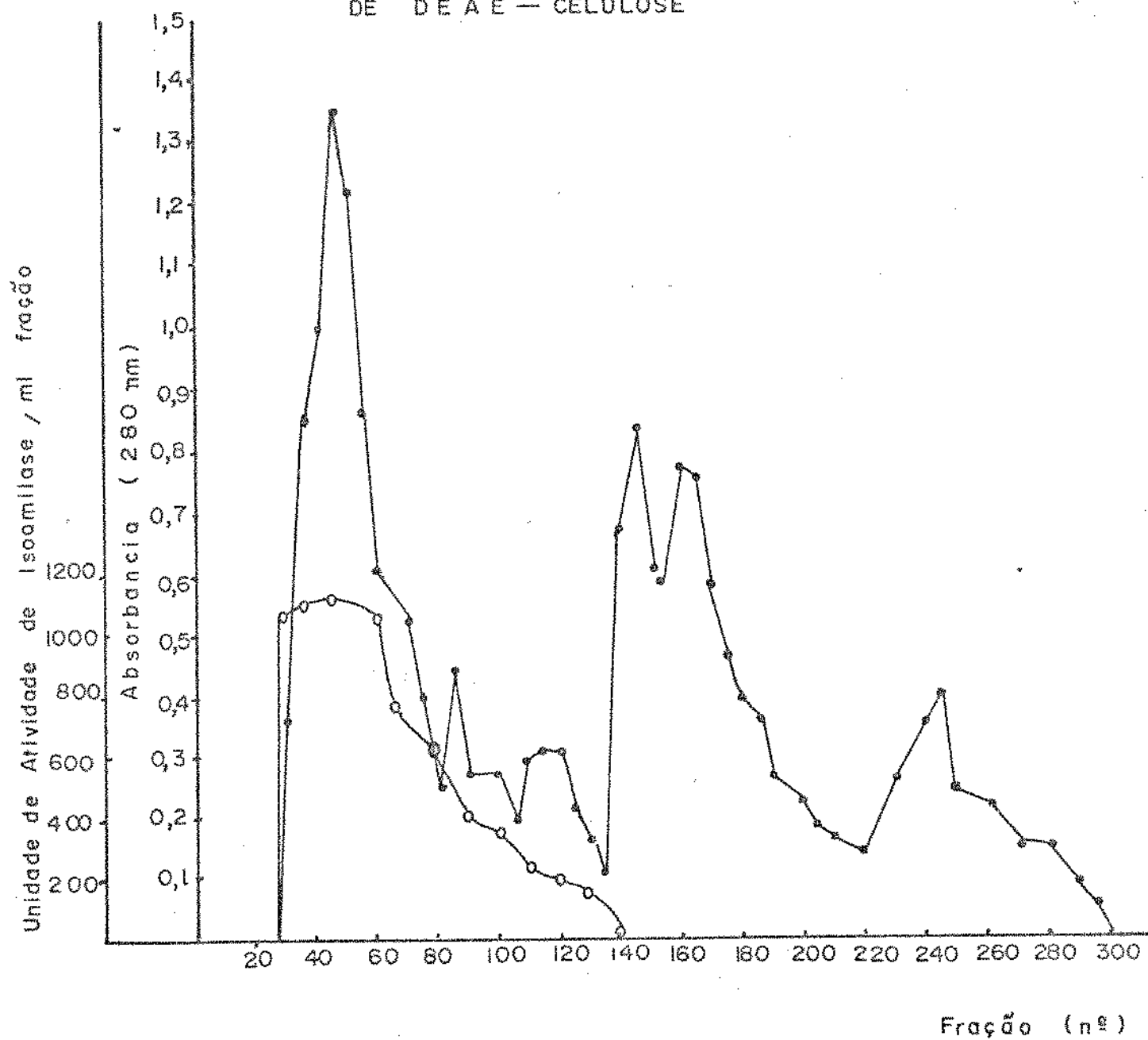


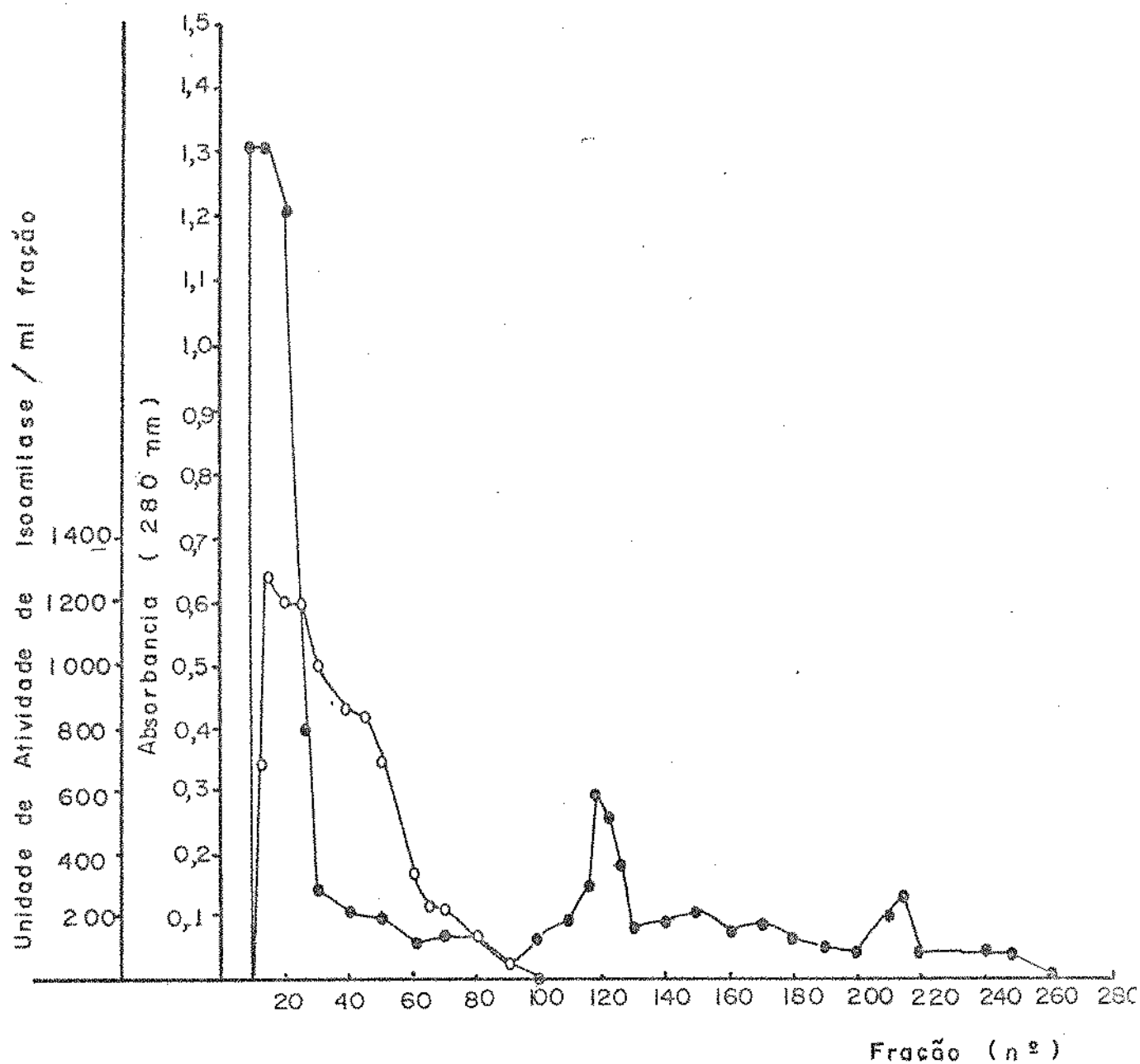
FIGURA 6 - CROMATOGRÁFIA DA ISOAMILASE EM COLUNA
DE DE A E — CELULOSE



● Absorbância a 280 nm

○ Atividade de Isoamilase

FIGURA 7 — CROMATOGRAFIA DA ISOAMILASE EM CO-
LUNA DE DEAE — SEPHADEX A-50



● Absorbância a 280 nm

○ Atividade de Isoamilase

FIGURA 8 - CROMATOGRAFIA DA ISOAMILASE EM CO-
LUNA DE C.M.-CELULOSE

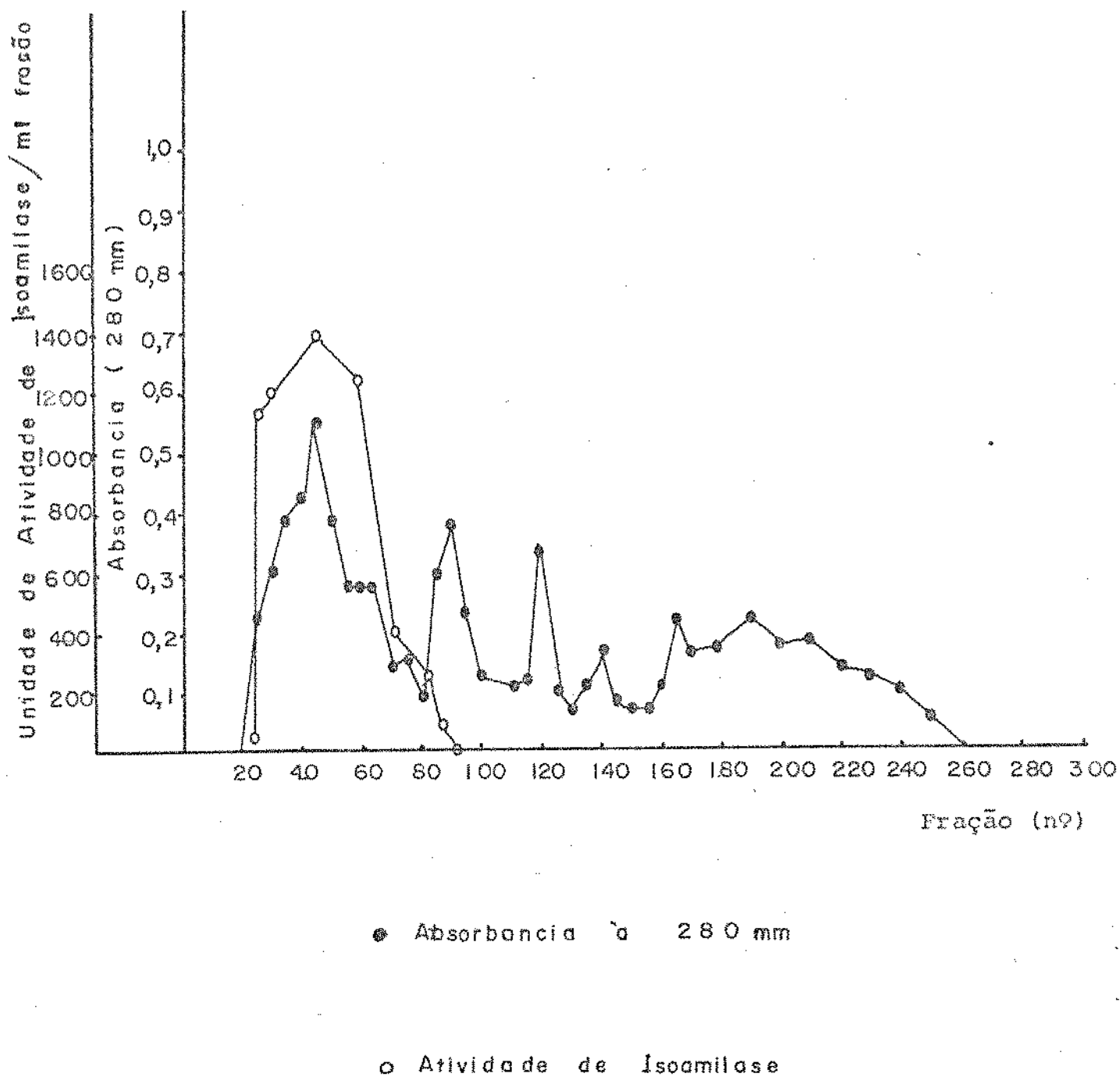


FIGURA 9 - AÇÃO DA ISOAMILASE SOBRE DIFERENTES SUBSTRATOS. AUMENTO DE AÇÚCARES REDUTORES APÓS HIDRÓLISE DOS SUBSTRATOS PELA ISOAMILASE.

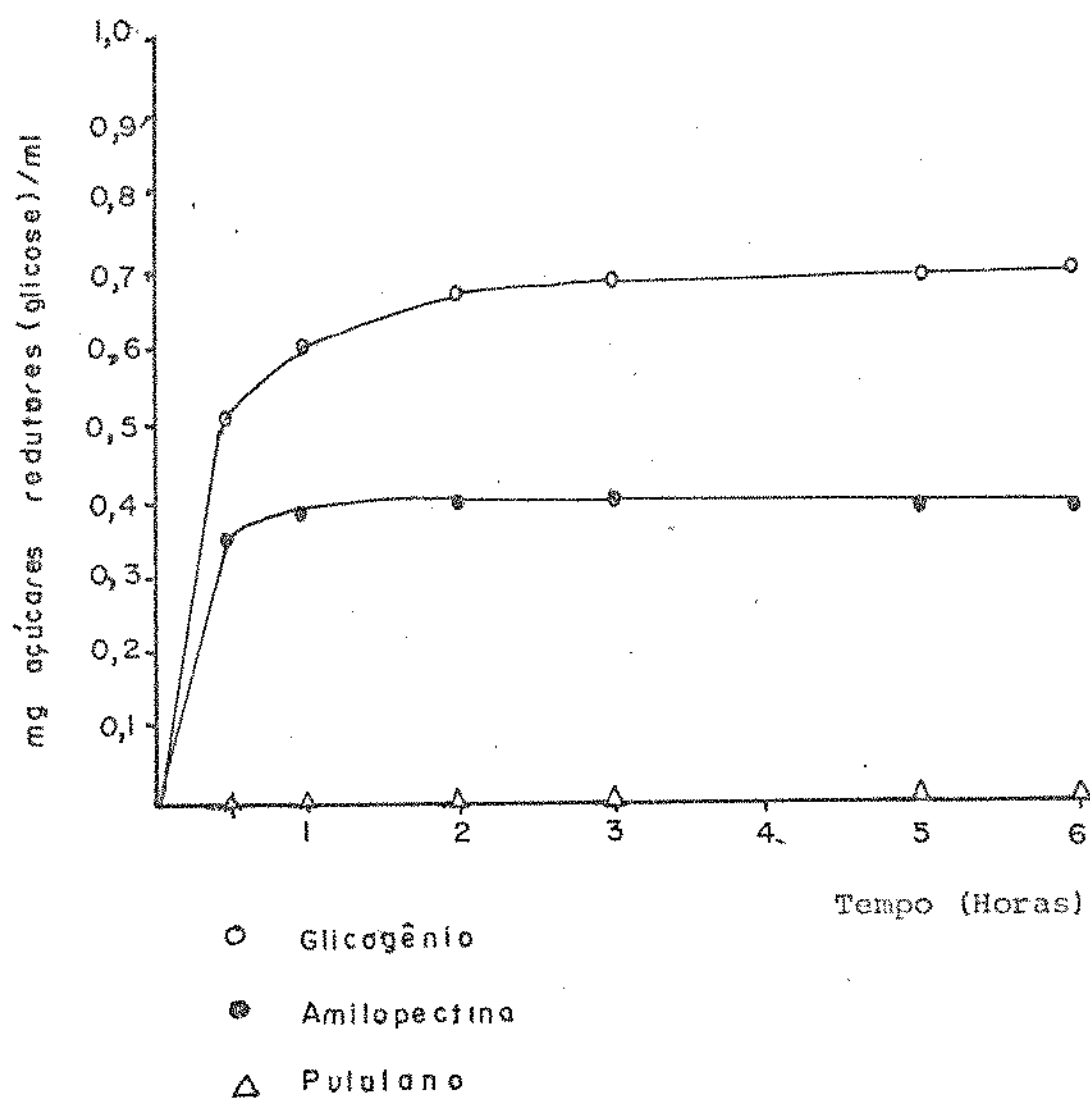


FIGURA 10- AÇÃO DA ISOAMILASE SOBRE DIFERENTES SUBSTRATOS.
AUMENTO DE ABSORBANCIA A 620 nm APÓS A HIDRÓ-
LISE DOS SUBSTRATOS PELA ISOAMILASE

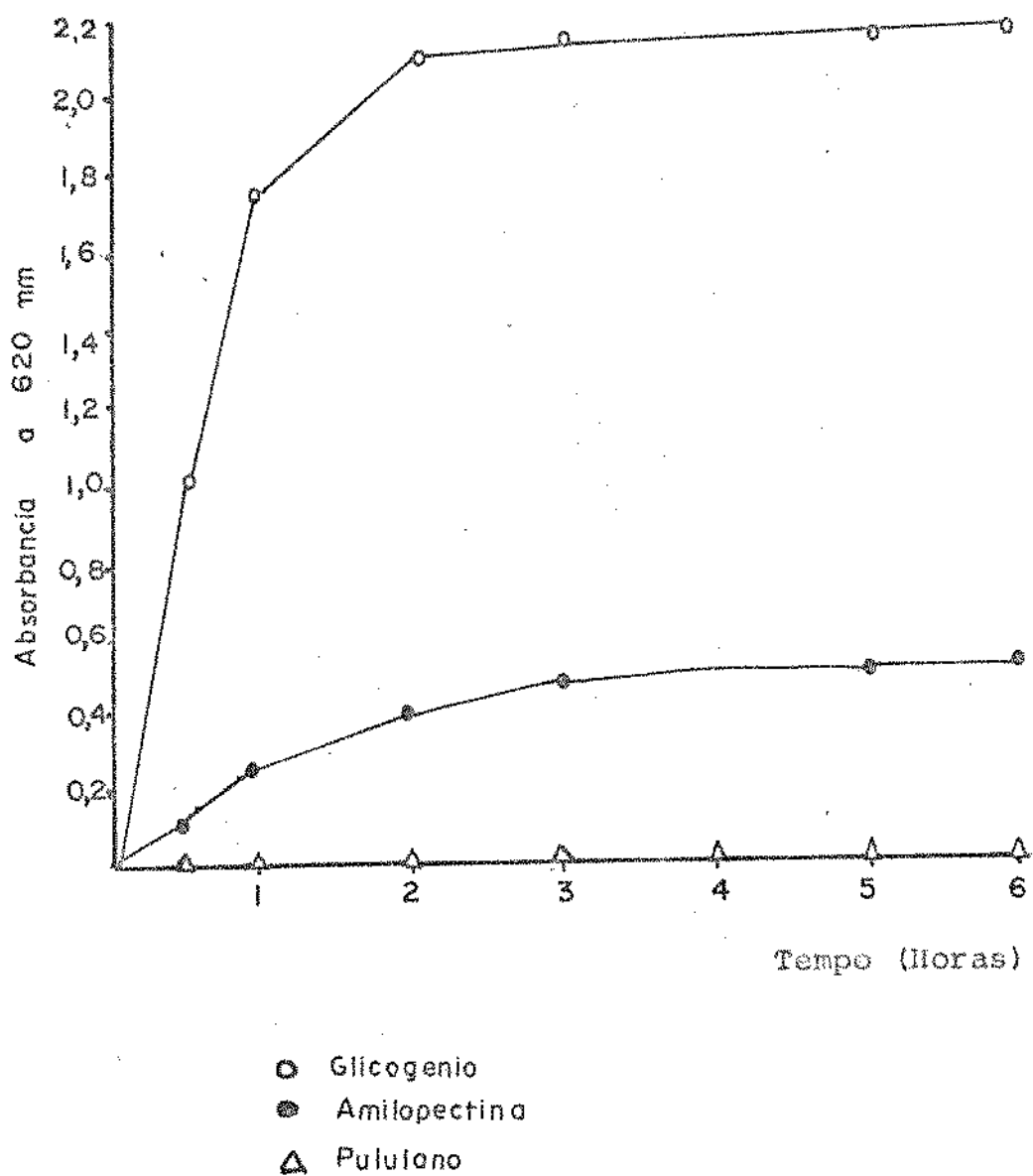
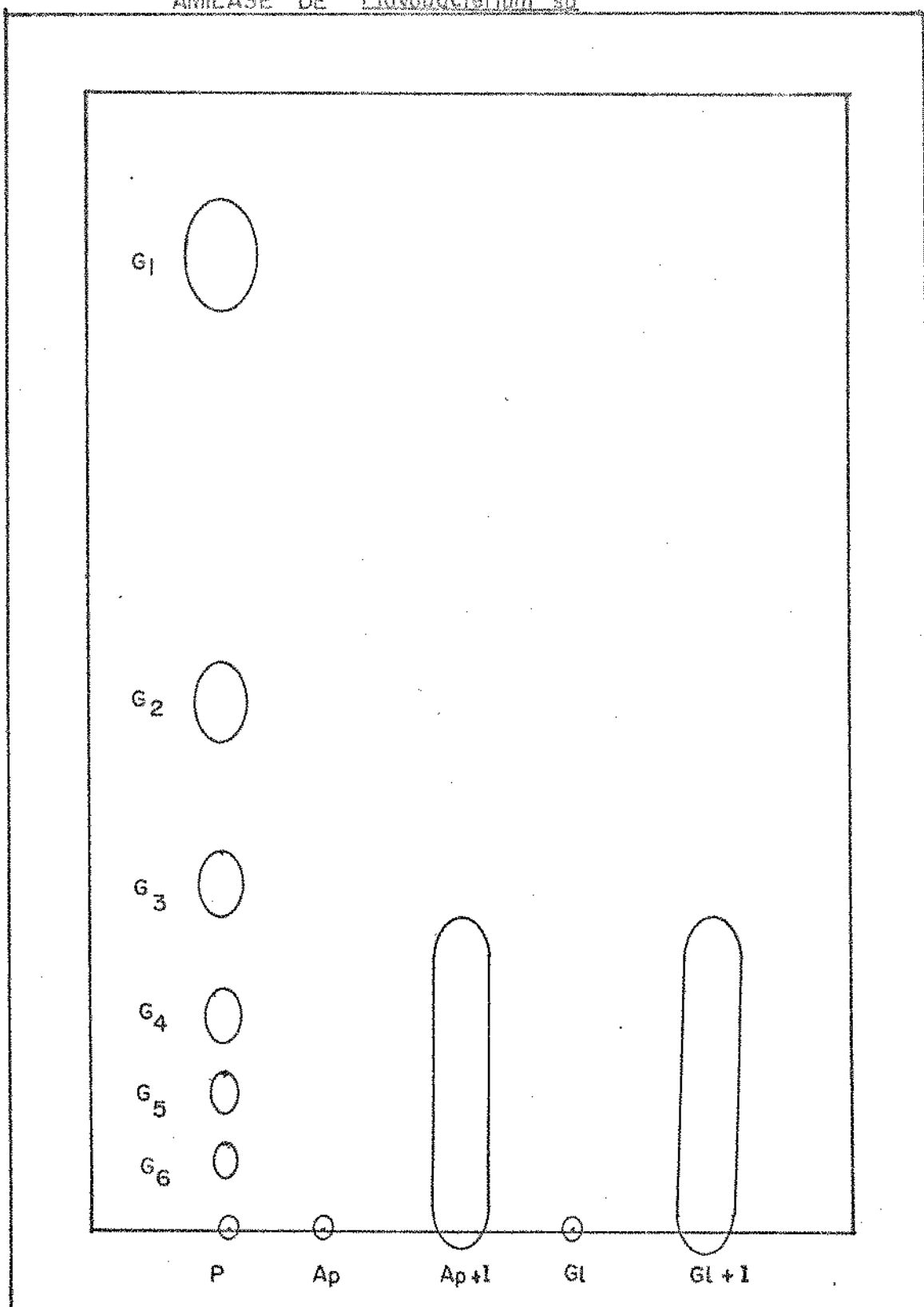
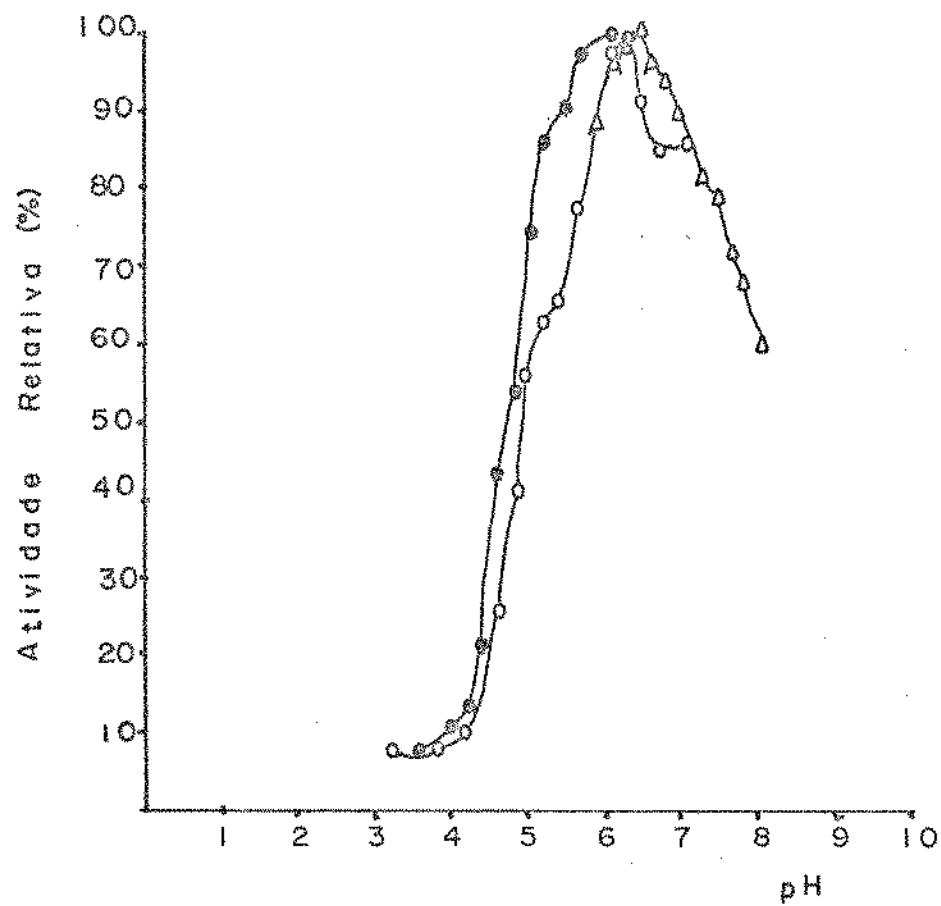


FIGURA II - CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DOS PRODUTOS DE
DE HIDRÓLISE DA AMILOPECTINA E GLICOGENIO PELA ISO-
AMILASE DE *Flavobacterium* sp.



P — PADRÕES
Ap — AMILOPECTINA CONTROLE
Ap+I — HIDROLISADO AMILOPECTINA + ISOAMILASE
Gl — GLICOGENIO CONTROLE
Gl+I — HIDROLISADO GLICOGENIO + ISOAMILASE

FIGURA 12 - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DE ISOAMILASE

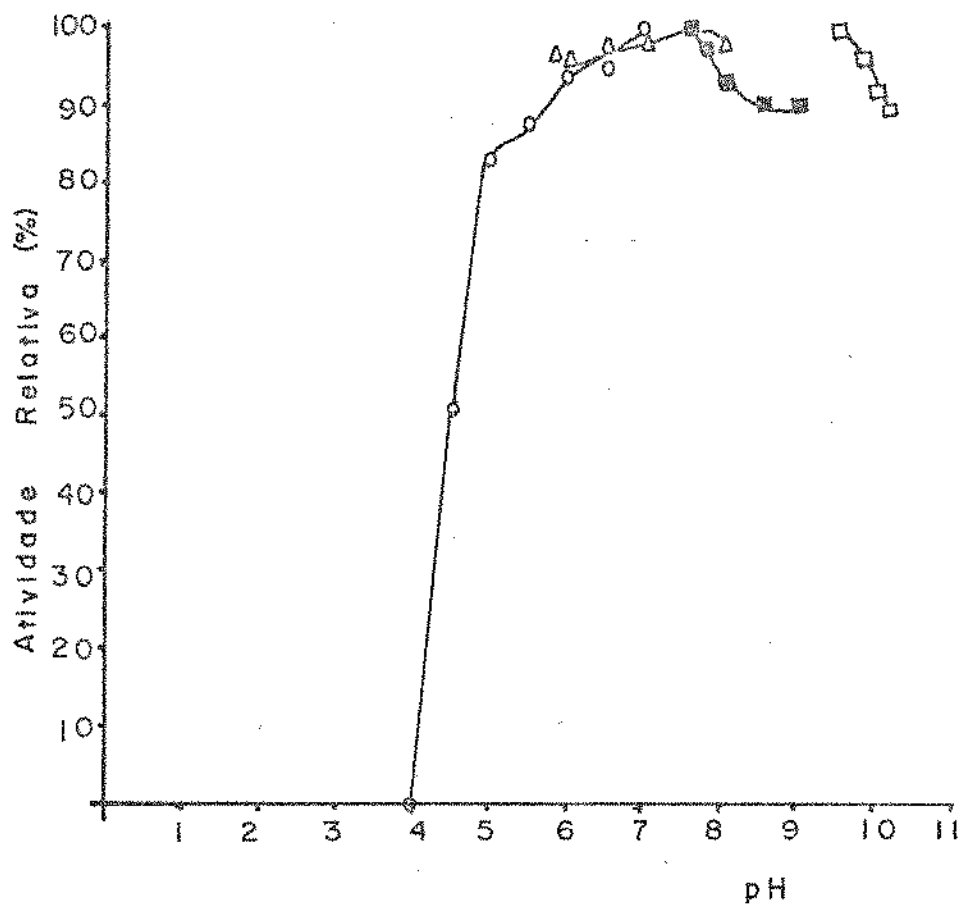


○ tampão citrato-fosfato

△ tampão fosfato

● tampão acetato

FIGURA 13— EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA ISOAMILASE



- tampão citrato - fosfato
- △ tampão fosfato
- tampão Borato - Borato de sódio
- tampão Borax - NaOH

FIGURA 14- EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE
DE ISOAMILASE

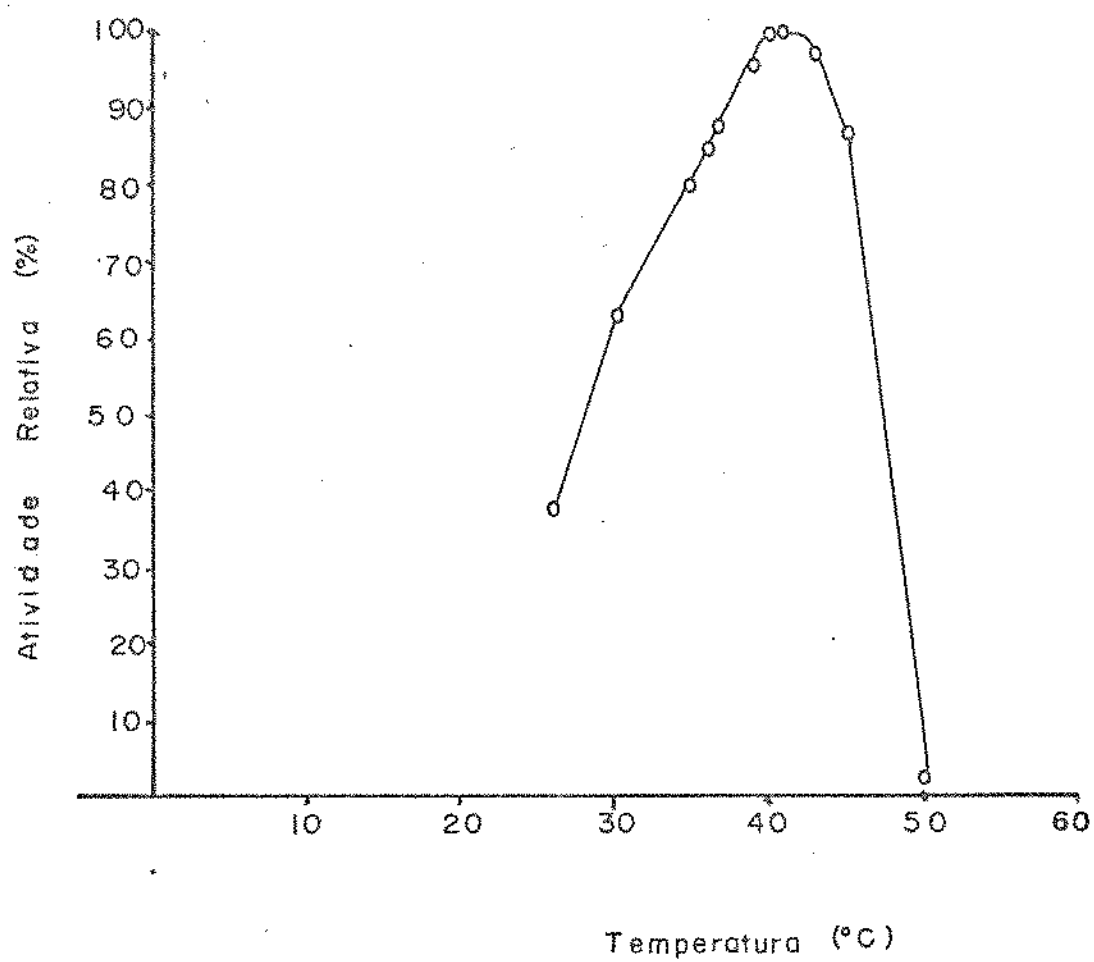


FIGURA 15 - ESTABILIDADE TERMICA DA ISOAMILASE

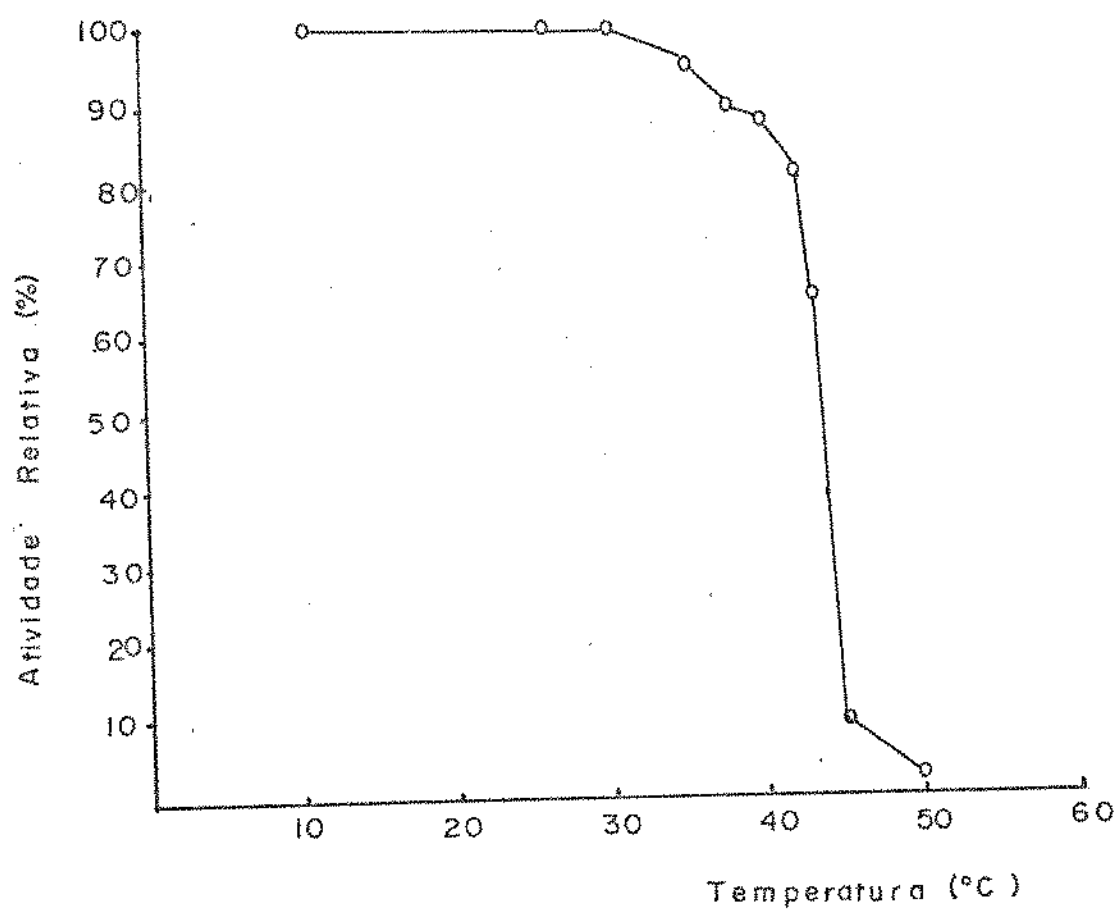
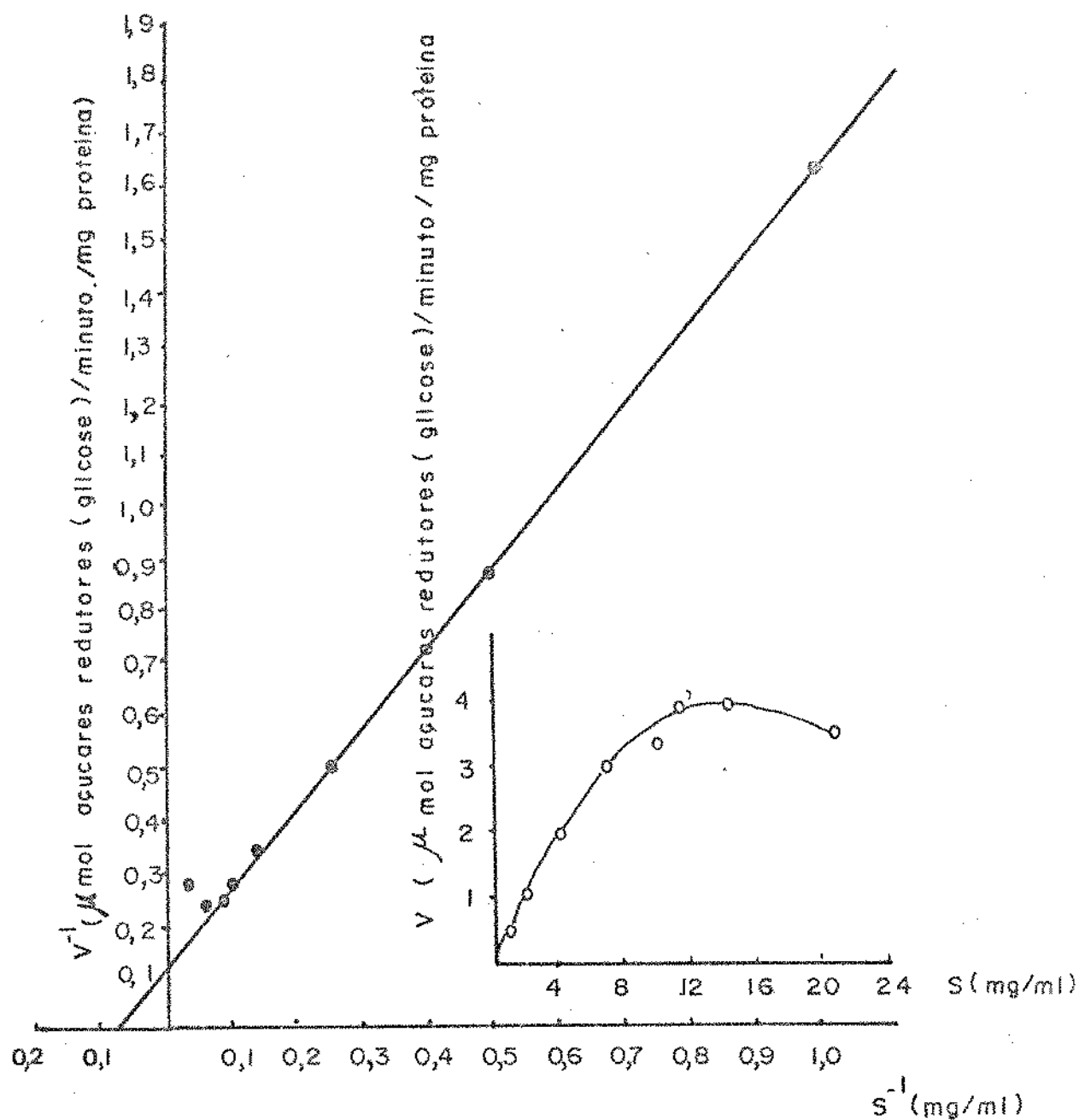


FIGURA 16—EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA
ATIVIDADE DE ISOAMILASE



● Seg. LINEWEAVER-BURK

○ Seg. MICHAELIS-MENTEN

FIGURA 17-- ELUIÇÃO DAS PROTEÍNAS EM COLUNA DE SEPHADEX G200

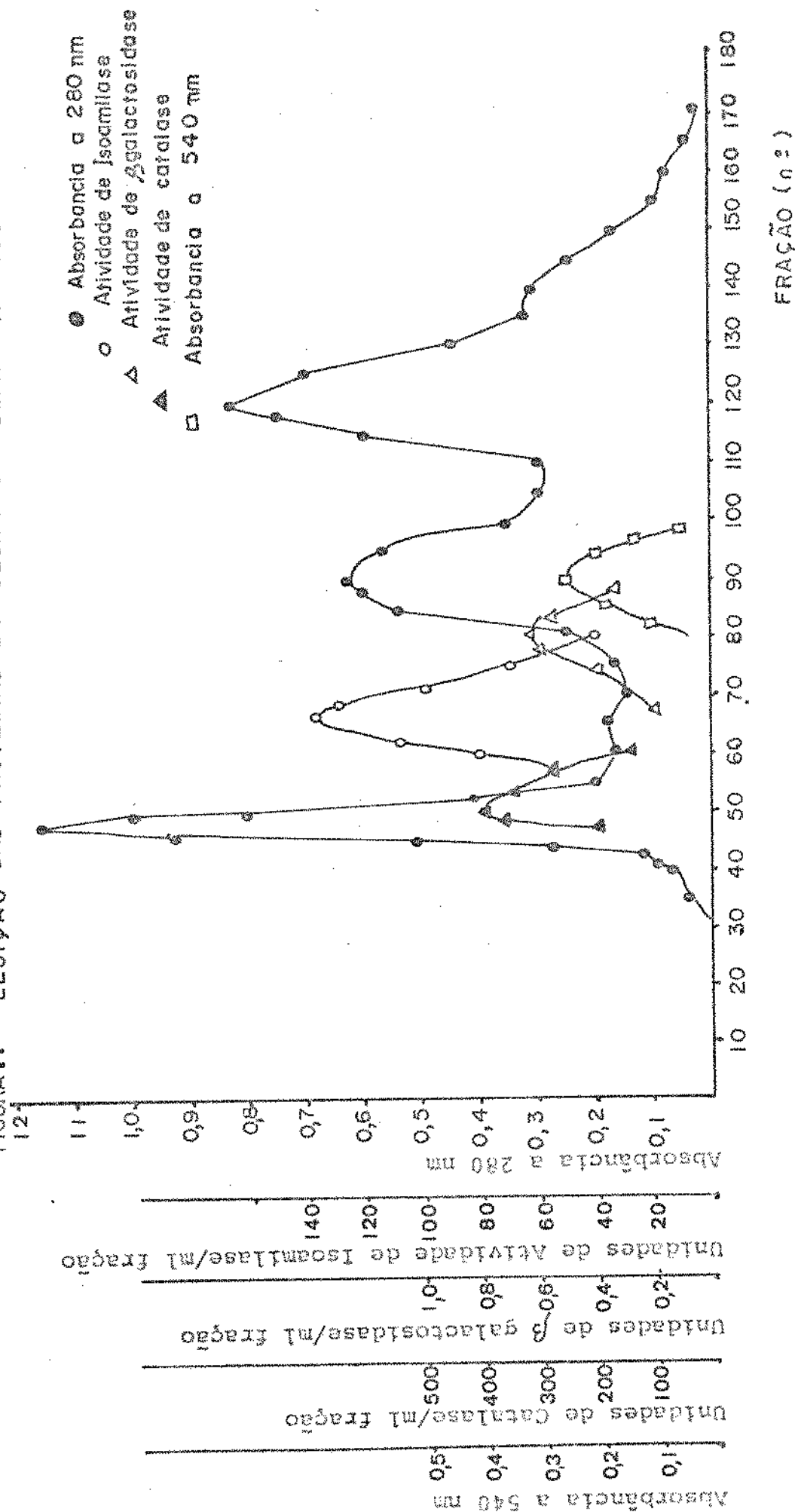


FIGURA 18 — RELAÇÃO ENTRE VOLUME DE ELUIÇÃO E
PESO MOLECULAR DAS PROTEÍNAS EM CO-
LUNA DE SEPHADEX G 200

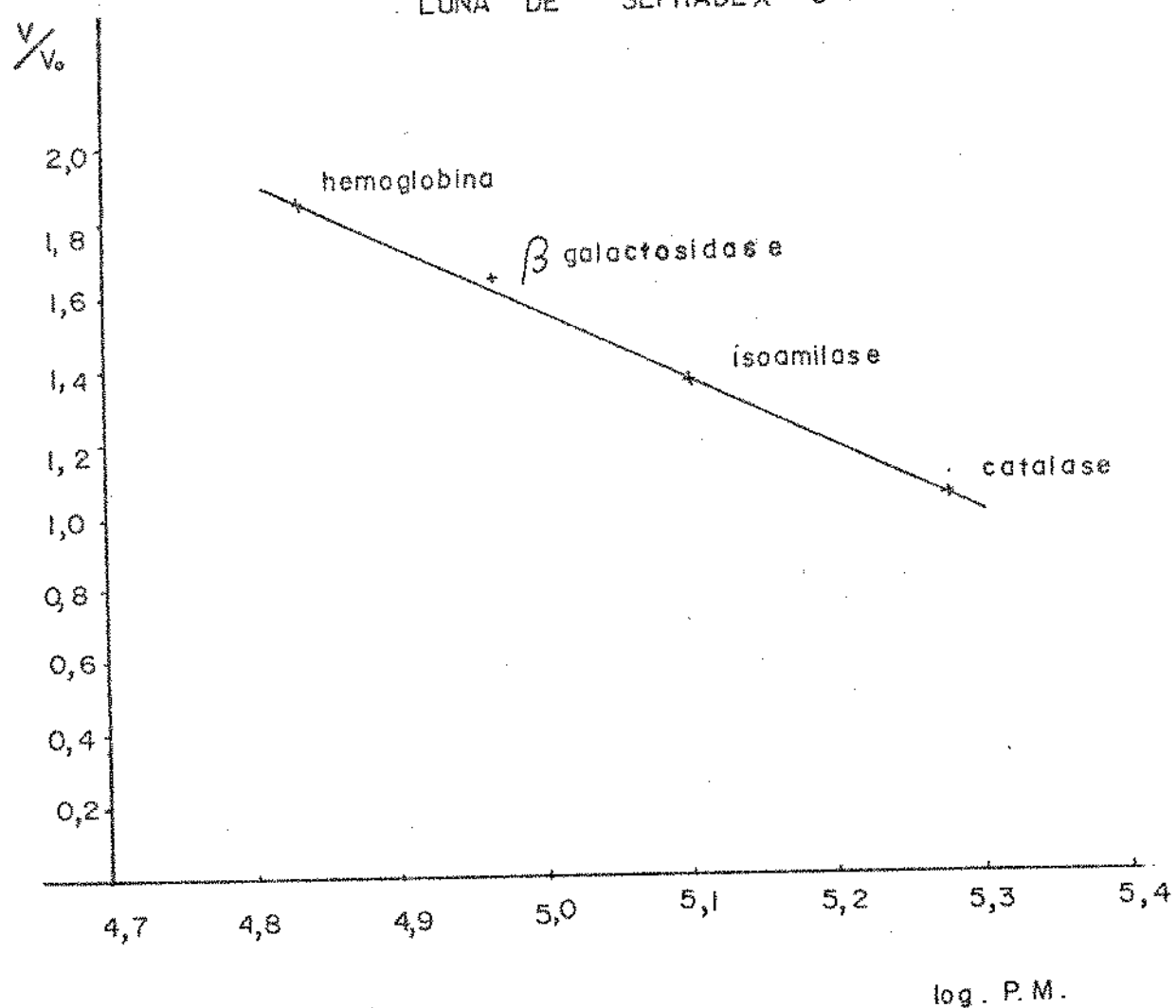


FIGURA 19 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DA ISO
AMILASE PURIFICADA.

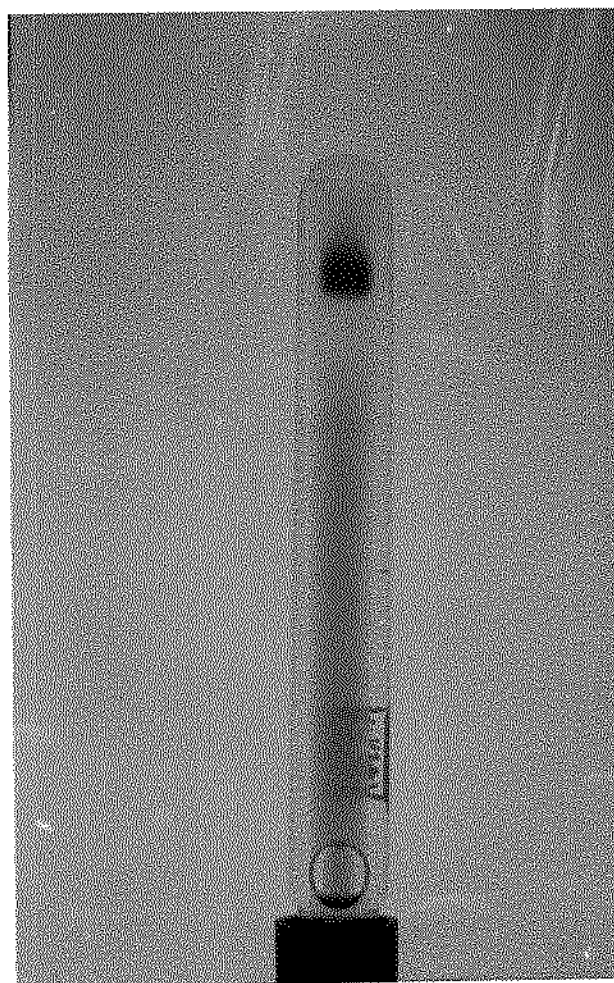


TABELA I - Composição dos meios de cultura.

	Meio 1 (Ref. 8)	Meio 2 (Ref.17)	Meio 3 (Ref.17)	Meio 4 (Ref.17)	Meio 5 (Ref.17)	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10
Glicose						0,500%			1,000%	
Maltose	0,500%	1,000%				0,500%				0,500%
Dextrina				1,000%			1,000%			
Amido			1,000%					1,000%		
Amilopectina					1,000%					
Proteose P.	0,800%					1,000%	1,000%	1,000%	1,000%	0,200%
Ex.levedura						0,500%	0,500%	0,500%	0,500%	0,100%
Glutamate de sódio		0,400%	0,400%	0,400%						
K ₂ HPO ₄	0,100%	0,100%	0,100%	0,100%	0,100%					
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,050%	0,050%	0,050%	0,050%	0,050%					
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001%									
(NH ₄) ₂ HPO ₄		0,150%	0,150%	0,150%	0,150%					
KCl	0,050%									
NaNO ₂	0,500%									
FeCl ₃ .6H ₂ O		0,001%	0,001%	0,001%	0,001%					
MnCl ₂ .4H ₂ O		0,001%	0,001%	0,001%	0,001%					
NaCl		0,001%	0,001%	0,001%	0,001%					

TABELA II - Seleção do microrganismo melhor produtor de isoamilase através da fermentação submersa em diferentes meios de cultura.

Meio de cultura nº	Fermentação (horas)	Atividade de isoamilase em tampão acetato pH 3,5 - unidades de atividade/ml de meio de cultura			Atividade de isoamilase em tampão acetato pH 6,0 - unidades de atividade/ml de meio de cultura		
		nº 2018	nº 2132	nº 2185	nº 2018	nº 2132	nº 2185
		Bactéria			Bactéria		
Meio 1 (Ref. 8)	48	-	-	-	-	2,0	-
	72	-	-	-	-	-	-
	96	-	-	-	-	-	-
Meio 2 (Ref. 17)	48	-	-	-	14,0	-	-
	72	-	-	-	5,0	-	-
	96	-	-	-	-	-	-
Meio 3	48	-	-	-	22,0	7,0	-
	72	-	-	-	10,0	5,0	-
	96	-	-	-	5,0	-	-
Meio 4	48	-	-	2,0	50,0	6,0	-
	72	-	-	5,0	20,0	5,0	-
	96	-	-	3,0	5,0	-	-
Meio 5	48	-	-	-	30,0	-	-
	72	-	-	-	14,0	-	-
	96	-	-	-	4,0	-	-

TABELA III - Isoamilases microbianas.

Enzima	Fonte	pH ótimo	temp. ótima
Isoamilase intracelular	<u>Saccharomyces cerevisiae</u> (13)	6,0 à 6,2	25°C
Isoamilase extracelular	<u>Pseudomonas sp</u> (17)	3,5	52°C
Isoamilase extracelular	<u>Cytophaga sp</u> (14)	5,5	40°C
Isoamilase intracelular	<u>Escherichia coli</u> (63)		
Isoamilase intracelular	<u>Bacillus amyloliquefaciens</u> (65)		

TABELA IV - Produção de Isoamilase pelo microrganismo nº 2018 em diferentes meios de cultura descritos na Tabela I.

Meio nº	Unidades de atividades/ml do meio de cultura
1	11,0
4	36,0
6	55,0
7	46,0
8	47,0
9	47,0

TABELA V - Efeito da concentração do carboidrato no meio de cultura e produção de Isoamilase.

% de maltose inicial no meio de cultura	pH do meio de cultura após fermentação	Massa celular medida de absorbância à 660 nm (x10)	Unidades de atividade/ml de meio de cultura
0,00	9,0	0,24	6,0
0,05	9,0	0,26	26,0
0,10	8,9	0,27	46,0
0,20	8,8	0,27	50,0
0,50	8,4	0,27	66,0
1,00	8,2	0,29	64,0
1,50	8,2	0,30	66,0
2,00	8,1	0,29	66,0
2,50	8,1	0,29	66,0
3,00	7,8	0,19	64,0

TABELA VI - Efeito da concentração de proteose peptona do meio na produção de Isoamilase.

% de proteose peptona inicial no meio de cultura	pH do meio de cultura após fermentação	Massa celular medida de absorbância à 660 nm (x10)	Unidades de atividade/ml de meio de cultura
0,05	7,2	0,24	63,0
0,10	8,1	0,24	66,0
0,20	8,4	0,25	65,0
0,50	8,5	0,25	67,0
0,75	8,5	0,28	60,0
1,00	8,5	0,28	57,0
1,50	8,5	0,29	53,0
2,00	8,4	0,29	34,0

TABELA VII - Efeito da concentração de extrato de levedura do meio de cultura na produção de Isoamilase.

% de extrato de levedura inicial no meio de cultura	pH do meio de cultura após fermentação	Massa celular medida de absorbância à 660 nm (x10)	Unidades de atividade/ml de meio de cultura
0,00	7,0	0,02	20,0
0,05	7,4	0,13	61,0
0,10	7,3	0,16	63,0
0,15	7,4	0,21	64,0
0,20	7,4	0,23	65,0
0,25	7,6	0,21	64,0
0,30	7,7	0,20	65,0
0,35	7,9	0,20	64,0
0,40	7,4	0,21	62,0
0,45	7,6	0,23	63,0
0,50	7,7	0,24	66,0
0,70	8,2	0,28	63,0
1,00	8,4	0,27	59,0

TABELA VIII - Efeito do pH dos meios de culturas na produção de Isoamilase.

Meio de cultura nº	pH inicial do meio de cultura	pH final do meio de cultura	Massa celular medida de absorbância à 660 nm (x10)	Unidades de atividade/ml de meio de cultura
6	5	5,0	-	-
6	6	8,0	0,30	68,0
6	7	8,1	0,30	72,0
9	5	5,0	-	-
9	6	8,0	0,28	17,0
9	7	8,2	0,30	13,0

TABELA IX - Purificação da isoamilase.

Etapa de purificação	Atividade específica (unidades de atividade de/mg de proteína)	Purificação
Preparação bruta	250	1,0
Fracionamento com sulfato de amônio	800	3,2
Cromatografia DEAE-celulose	2400	9,6
Cromatografia DEAE-Sephadex A-50	3710	14,8
Cromatografia CM-celulose	11.110	44,4

TABELA X - Efeito de sais minerais na atividade enzimática.

Sal	Conc. mM	Atividade Relativa %
CaCl_2	1 mM	100,0
NaCl	1 mM	100,0
BaCl_2	1 mM	100,0
Li_2SO_4	1 mM	100,0
MgCl_2	1 mM	100,0
NiSO_4	1 mM	91,1
CoCl_2	1 mM	74,3
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	1 mM	69,2
ZnSO_4	1 mM	87,5
CuSO_4	1 mM	63,4
MnSO_4	1 mM	67,5
AgNO_3	1 mM	40,0
HgCl_2	1 mM	0,0

TABELA XI - Efeito de inibidores de enzimas na atividade de isoamilase.

Composto	Conc. (mM)	Atividade Relativa %
dietilditiotiocarbamato de sódio	10 mM	100
bisulfito de sódio	10 mM	100
cisteína	10 mM	100
azida de sódio	10 mM	99
iodoacetato	10 mM	100
mercaptoetanol	10 mM	100
p-hidroximercuribenzoato	10 mM	100

TABELA XII - Produção de maltose.

Substrato	Conversão para maltose %	
	Ação da β -amilase	Ação simultânea de Isoamilase e β -amilase
Amido	59,0	92,3
Amilopectina	55,0	93,1
Glicogênio	31,0	98,0

6. CONCLUSÃO

6.1. O microrganismo isolado do solo e selecionado como maior produtor de enzima desramificante foi caracterizado como Flavobacterium sp.

6.2. O microrganismo Flavobacterium sp não foi descrito anteriormente na literatura como produtor de isoamilase.

6.3. A enzima desramificante amilolítica de Flavobacterium sp é uma isoamilase (glycogen 6 glucanohydrolase EC 3.2.1.68) portanto hidrolisa todas as ligações α -1,6 glicosídicas da amilopectina e do glicogênio e não hidrolisa unidades de glicose e maltose unidas por ligações α -1,6 glicosídicas às cadeias lineares α -1,4 glicosídicas. A enzima não hidrolisa as ligações α -1,6 glicosídicas do pululano.

6.4. O microrganismo Flavobacterium sp produz isoamilase extracelularmente. Esta é produzida na fase exponencial de crescimento e atinge o máximo de produção após 24 à 30 horas de fermentação à 28°C em meio de cultura constituído de 0,1% de proteose-peptona, 0,1% de extrato de levedura e 0,5% de maltose, à pH 7,0. A temperatura ótima de incubação para a produção de enzima foi 24-28°C.

6.5. Características da isoamilase

6.5.1. Apresenta pH ótimo de atividade em tampão fosfato pH 6,3 e temperatura ótima à 40°C.

6.5.2. Apresenta estabilidade na faixa de pH 6,0 à 10,0. A enzima é termosensível, o aquecimento à 35°C, 40°C, 45°C e 50°C durante 1 hora resultaram respectivamente em 5%, 12%, 90% e 97% de inativação.

6.5.3. A presença de NiSO_4 , CoCl_2 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, ZnSO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 , AgNO_3 ou HgCl_2 inibem a atividade de isoamilase enquanto que a presença de CaCl_2 , NaCl , MgCl_2 , BaCl_2 ou LiSO_4 na concentração 1 mM de sal em relação ao volume final da mistura não afetam a atividade enzimática.

6.5.4. Os íons metálicos parecem não ser necessários para a atividade enzimática da isoamilase.

6.5.5. Os grupos sulfidrilas parecem não ser necessários para a atividade enzimática da isoamilase.

6.5.6. Os valores de K_m e $V_{m\text{áx}}$ da isoamilase para o substrato amilopectina foram respectivamente 14,28 mg/ml e 10 $\mu\text{moles de açúcar redutor /minuto/mg de proteína}$.

6.5.7. A isoamilase do Flavobacterium sp apresenta-se numa forma simples. Na eletroforese em gel de poliacrilamida realizada a pH 8,0 a atividade da isoamilase detectada em gel contendo amilopectina indicou a presença de uma única banda que se deslocou em direção ao anodo.

6.5.8. A isoamilase apresenta peso molecular 126.000, estimado através de filtração em gel Sephadex G-200.

6.6. A hidrólise do amido, amilopectina e glicogênio pela ação simultânea de isoamilase e β -amilase de soja resultou em 92,3%, 93,1% e 98,0% de conversão para maltose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDULLAH, M.; CATLEY, B.J.; LEE, E.Y.C.; ROBYT, J.; WALLENFELS, K. & WHELAN, W.J. The mechanism of carbohydrase action. II. Pullulanase, an Enzyme Specific for the Hydrolysis of Alpha-1+6 Bonds in Amylaceous Oligo and Polysaccharides. *Cereal Chemistry*, 43, 111-118, J. 1966.
2. AKAI, H.; YOKOBAYASHI, K.; MISAKI, A. & HARADA, T. Complete hydrolysis of branching linkages in glycogen by Pseudomonas Isoamylase: Distribution of Linear Chains. *Biochimica et Biophysica Acta* 237, 422-429, 1971.
3. _____; _____; _____ e _____. Structural Analysis of Amilopectin Using Pseudomonas Isoamylase. *Biochimica et Biophysica Acta* 252, 427-431, 1971.
4. ALLEN, W.G. & DAWSON, H.G. Technology and Uses of Debranching Enzymes. *Food Technology* 70-80, May 1975.
5. AMEMURA, A.; KITAGAWA, H. & HARADA, T. Role of the Tryptophan Group in the Action of Pullulanase of Aerobacter aerogenes. *J. Biochem.* 77, 575-578, 1975.

6. ANDREWS, P. The Gel Filtration Behaviour of Protein Related to their Molecular Weights over a Wide Range. *Biochem. J.* 96, 595-605, 1965.
7. BATHGATE, G.N. & MANNERS, D.J. The Specificity of Yeast α -(1,6) glucosidase. *Biochem. J.* 107; 443-445, 1968.
8. BENDER, H. & WALLENFELS, K. Untersuchungen an Pullulan. *Biochemische Zeitschrift* 334, 79-95, 1961.
9. CHANCE, B. & MAEHLY, A.C. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. ed. *Methods in enzymology*. New York, Academic Press, - 1955. v. 2, p. 764-768.
10. DAVIS, B.J. Disc. eletrophoresis. 2- Method and appllica-
tion to human serum proteins. *Ann* , N.Y. Acad. Sci. -
121, 404-427, 1964.
11. DRUMMOND, G.S.; SMITH, E.E. & WHELAN, W.J. On the Specifi-
city of Starch Debranching Enzymes. *FEBS Letters* 9 (3)
136-140, 1970.
12. ENEVOLDSEN, B.S. Debranching Enzymes in Brewing. *European
Brewery Convention Proceedings of the 15th Congress*, 684
-697, 1975.

13. GUNJA, Z.H.; MANNERS, D.J. & MAUNG, K. Studies on Carbohydrate. Metabolizing Enzymes 7 - Yeast Isoamylase. Biochem. J. 81, 392-398, 1961.
14. GUNJA-SMITH, Z.; MARSHALL, J.J.; SMITH, E.E. & WHELAN, W.J. A Glycogen Debranching Enzyme from Cytophaga. FEBS Letters 12 (2) 96-100, 1970.
15. _____; _____; _____; _____ e _____. A Revision of the Meyer Bernfeld Model of Glycogen and Amylopectin. FEBS Letters, volume 12 (2) 101-104, 1970.
16. GUNJA-SMITH, Z.; MARSHALL, J.J. & SMITH, E.E. Enzymatic Determination of the Unit Chain Length of Glycogen and Related Polysaccharides. FEBS Letters, volume 13 (5) - 309-311, 1971.
17. HARADA, T., YOKOBAYASHI, K. & MISAKI, A. Formations of Isoamylase by Pseudomonas. Applied Microbiology volume 16 (10), 1439-1444, 1968.
18. HARADA, T.; MISAKI, A.; AKAI, H.; YOKOBAYASHI, K. & SUGIMOTO, K. Characterization of Pseudomonas Isoamylase by its Actions on Amylopectin and Glycogen: Comparison with Aerobacter Pullulanase. Biochem. Biophys. Acta 268, 497-

-505, 1972.

19. HARADA, T.; KATO, K.; SUGIMOTO, T.; KUSWANTO, K. Extra-cellular Isoamylase and Intracellular Specific α -amylase and Usual α -glucosidase of Pseudomonas deramosa. Abstracts Fifth International Fermentation Symposium, Berlin 1976, Session 14, Microbial Enzymes of Industrial Interest, 14.06, 1976.
20. HARADA, T. Extracellular Isoamylase and Intracellular Specific α -Amylase and a Usual α -Glucosidase in Pseudomonas amyloclavata. Memb. Inst. Sci. Ind. Res., Osaka Univ., 34, 49-61, 1977.
21. HOBSON, P.N.; WHELAN, W.J. & PEAT, S. The Enzymic Synthesis and Degradation of Starch. Part XIV - R-Enzyme. H. Chem. Soc. Part II, 1451-1459, 1951.
22. HODGE, J.E.; RENDLEMAN, J.A. & NELSON, E.C. Usefull Properties of Maltose. Cereal Sci. Today, vol. 17, 180, 1972.
23. HULLINGER, C.H.; VAN PATTEN, E. & FRECK, J.A. Food Applications of High Amylase Starches. Food Technology, 22-24, 1973.

24. JEAMNINGROS, R.; CREUZET, N.; FRISCON, C. & CATTANEO, J.
A Debranching Enzyme in Escherichia coli. Biochemical So-
ciety Transactions, vol. 3, 336-337, 1975.
25. _____; _____; _____; e _____. Purification and
Properties of a Debranching Enzyme from Escherichia coli.
Biochimica et Biophysica Acta, 438, 186-199, 1976.
26. KATO, K.; KONISHI, Y.; AMEMURA, A. & HARADA, T. Affinity
Chromatography of Pseudomonas Isoamylase on Cross Linked
Amylose Gel. Agric. Biol. Chem. 41 (10), 2077-2088, 1977.
27. KITAGAWA, H.; AMEMURA, A.; HARADA, T. Studies on the -
Inhibition and Molecular Properties of Crystalline Pseudo-
monas Isoamylase. Agric. Biol. Chem., 39 (5), 989-994 ,
1975.
28. KJOLBERG, O. & MANNERS, D.J. Studies on Carbohydrate Me-
tabolizing Enzymes 9 - The Action of Isoamylase on Amyla-
se. J. Biochemistry 86, 258-262, 1963.
29. KOBAYASHI, T. Studies on Isoamylase. Part VIII On the de-
termination of Isoamylase Activity Bull. Agr. Chem. Soc.
19 (3), 163-166, 1955.

30. _____. J. Japan. Soc. Starch Sci., 17, 61, 1969.
31. KURASAWA, H.; HAYAKAMA, T. & IGAUE, I. Biochemical study of rice starch. Part XII Isoamylase fraction in seed rice at the milky stage. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 34:183, 1960.
32. KUSWANTO, K.R.; KATO, K.; AMEMURA, A. & HARADA, T. Isoamylase Production and Growth on Glucose, Maltose and α -glucans of Pseudomonas deramosa SB 15 and its Mutant Strains. J. Ferment. Technol., 59(4), 192-196, 1976.
33. LEE, E.Y.C.; NIELSEN, L.D. & FISCHER A New Glycogen Debranching Enzyme System in Yeast. Arch. Biochem. Biophys. 121, 245, 1967.
34. LEE, E.Y.C.; MERCIER, C. & WHELAN, W.J. A Method for the Fine Structure of Amylopectin. Arch. Biochem. Biophys. 125, 1028-1029, 1968.
35. LEE, E.Y.C.; MARSHALL, J.J. & WHELAN, W.J. The Substrate Specificity of Amylopectin - Debranching Enzymes from Sweet-Corn. Arch. Biochem. Biophys., 143, 365-374, 1971.
36. LEE, E.Y.C. & WHELAN, W.J. Glycogen and starch debranching enzymes. In "The Enzymes" ed. P.D. Boyer, 5, 191-233, 3rd. ed. Academic Press, New York, 1971.

37. LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. 56, 658-666, 1934.
38. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.F. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol.Chem. 193, 265.275, 1951.
39. MARSHALL, J.J.; GUNJA-SMITH, Z. & SMITH, E.E. Cytophaga Isoamylase Specificity and Application to Analysis of Glycogen and Amylopectin Fine Structures. Fed. Amer. - Soc.; Ex. Biol., 30 (3), 1064, 1971.
40. MARSHALL, J.J. The Structure, Function and Metabolism of the Cereal Carbohydrates. Part 1 The Biosynthesis and Enzymic Degradation of Starch. Wallerstein Communication XXXV (116), 49-98, 1972.
41. MARSHALL, J.J. Application of Enzymic Methods to the Structural Analysis of polysaccharides. Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 30, 257-370, 1974.
42. MARUO, B.; KOBAYASHI, T. Enzymic Scission of the Branch Links in Amylopectin Amylosynthase. Nature 167, 606-607, 1951.

43. MEYER, K.H. & BERNFELD, P. Helv. Chim. Acta, 25, 399, 1942.
44. MERCIER, C.; FRANTZ, M. & WHELAN, W. An Improved Purification of Cell Bound Pullulanase from Aerobacter aerogenes. Env. J. Biochem., 26, 01-09, 1972.
45. MINAGAWA, Y. Amylosynthase. Chemical Abstracts, 26, - 5583, 1932.
46. NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi Method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153, 375-380, 1944.
47. NISHIMURA, S. Biochem. Z , 223, 161, 1930.
48. _____. Biochem. Z , 225, 264, 1930.
49. _____. J. Agric. Chem. Soc. Japan. 7 (20), 388, 1931.
50. _____. Amylosynthase. Chem. Abst. 25, 2449, 1931.
51. OHBA, R. & UEDA, S. Purification, Crystallization and Some Properties of Intracellular Pullulanase from Aerobacter aerogenes. Agr. Biol. Chem., 37 (12), 2821-2826, 1973.

52. OHBA, R. & UEDA, S. Some Properties of Crystalline Extra and Intracellular Pullulanase from Aerobacter aerogenes. Agr. Biol. Chem. 39 (5), 967-972, 1975.
53. PALMER, T.N.; WÖBBER, G. & WHELAN, W.J. The Pathway of Exogenous and Endogenous Carbohydrate Utilization in Escherichia coli: A Dual Function for the Enzymes of the Maltose Operon. Eur. J. Biochem. 39, 601-612, 1973.
54. PARK, Y.K.; DE SANTI, M.S.S. & PASTORE, G.M. Production and Characterization of β -galactosidase from Aspergillus oryzae. Journal of Food Science 44 (1), 100-103, 1979.
55. PEAT, S.; WHELAN, W.J.; HOBSON, P.N. & THOMAS, J.G. The Enzymic Synthesis and Degradation of Starch. Part XIX - The Action of R-Enzyme on Glycogen. J. Chem. Soc. 4440-4445, 1954.
56. SUGIMOTO, T.; AMEMURA, A.; HARADA, T. Formations of Extracellular α -glucosidase and Amylases by Pseudomonas SB 15 a Mutant Strain. Applied Microbiology 28 (3) 336-339, 1974.
57. SUZUKI, S. Novel Industrial Processes for Enzymic Conver-

sion of Starch. Third Int. Cong. Food Science and Technology (Inst. of Food Technologists, Chicago), 484-490, 1970.

58. TAKASAH, Y. Productions and Utilizations of amylase - pullulanase from Bacillus cereus var. mycoides. Agric. Biol. Chem., 40 (8), 1515-1522, 1976.

59. TAYLOR, P. & WHELAN, W.J. Enzymic Transfer of 1+6 linked α Maltosyl Residues by an Enzyme Preparation from Sweet Corn. Biochem. J. 95, 26 p., 1965.

60. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P. & HARRISON, J.G. Nature, - 166, 444-445, 1950.

61. UEDA, S. & NANRI, N. Production of Isoamylase by Escherichia intermedia. Applied Microbiology 15 (3), 492-496, 1967.

62. UEDA, S. & OHBA, R. Purification, Crystallization and Some Properties of Extracellular Pullulanase from Aerobacter aerogenes. Agr. Biol. Chem. 36 (13), 2381-2391, 1972.

63. 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 Amylolysis by the Glucoamylase Fractions. *Die Starke*, 26 (11), 1974.
64. URLAUB, H. & WÖBBER, G. Identification of Isoamylase. A Glycogen Debranching Enzyme from Bacillus amyloliquefaciens. *FEBS Letters*, 5 (1), 01-04, 1975.
65. WALKER, G.J. Metabolism of the Reserve Polysaccharide of Streptococcus mitis. *Biochem. J.*, 108, 33-40, 1968.
66. YAGISAWA, M.; KATO, K.; KOBAYASHI, Y. & UEDA, S. J. Ferment. Technol., 50 (9), 572-579, 1972.
67. YOKOBAYASHI, K.; MISAKI, A. & HARADA, T. Specificity of Pseudomonas Isoamylase. *Agr. Biol. Chem.*, 33 (4), 625-627, 1969.
68. _____; _____ e _____. Purification and Properties of Pseudomonas Isoamylase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 212, 458-469, 1970.

69. YOKOBAYASHI, L.; AKAI, K.; SUGIMOTO, T.; HIRAO, M.; SUGIMOTO, K. & HARADA, T. Comparison of the Kinetic Parameters of Pseudomonas Isoamylase and Aerobacter Pullulanase. - Biochimica et Biophysica Acta, 293, 197-202, 1973.