BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Recebido em 27/02/0
NÃO CIR

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Identificação e caracterização de enzimas amilolíticas de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.)

Tatiana da Costa Raposo Pires

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Flavio Finardi Filho

São Paulo
2002

953

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004287

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Pires, Tatiana da Costa Raposo
P667i Identificação e caracterização de enzimas amilolíticas de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.) / Tatiana da Costa Raposo Pires. -- São Paulo, 2001.
74p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Finardi Filho, Flavio

1. Ciência dos alimentos I. T. II. Finardi Filho, Flavio, orientador.

641 CDD

Tatiana da Costa Raposo Pires

Identificação e caracterização de enzimas amilolíticas de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.)

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho
orientador/presidente

Profa. Dra. Antonia Miwa Iguti
1°. examinador

Profa. Dra. Úrsula Maria Lanfer Marquez
2°. examinador

São Paulo, 23 de janeiro de 2002

Dedico este trabalho a minha filha Estela por ter sido minha companheira ao longo da elaboração deste trabalho, em seus primeiros momentos de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Flávio Finardi Filho pela orientação, apoio e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos colegas de laboratório pela companhia, colaboração, amizade e pelos momentos de alegria.

As amigas e professoras Cynthia, Eliana e Antônia, da Escola de Engenharia Mauá (EEM), pelo incentivo e carinho.

Ao Sr. Amélio Berti, Engenheiro Agrônomo do Núcleo de Produção de Sementes e Mudas de São Bento do Sapucaí, pelo fornecimento de amostras de raízes de mandioquinha-salsa, utilizadas neste trabalho.

As professoras Antonia Iguti, Beatriz Cordenunsi e Ursula Márquez pelas sugestões durante o exame de qualificação.

Aos professores José Alfredo Áreas, Michele Vitolo, Ruy Sérgio da Silva, Ronaldo Pitombo, (Universidade de São Paulo) e Marcelo Nitz (Escola de Engenharia Mauá), e a aluna Raquel Cardoso Santiago (Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo) pela ajuda prestada no decorrer da elaboração deste trabalho.

A todos os alunos e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, que direta ou indiretamente participaram da elaboração deste trabalho.

Em especial, a todas as pessoas que estiveram ao meu lado, se preocupando e torcendo por mim e ao Marcelo, pelo amor e paciência.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS i

LISTA DE TABELAS iv

RESUMO v

ABSTRACT vi

1 – INTRODUÇÃO 1

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3

2.1 – Polissacarídeos 3

2.2 – Amido 3

2.3 – Degradação enzimática do amido 5

2.4 – Amilases 6

2.4.1 – α-amilases 7

2.4.1.1 – Peso molecular 8

2.4.1.2 – Presença de cálcio 9

2.4.1.3 – Estrutura das α-amilases 10

2.4.1.4 – Influência de outros íons na atividade α-amilásica 11

2.4.1.5 – Efeito do pH e temperatura na estabilidade α-amilásica 12

2.4.2 – β-amilases 16

2.4.2.1 – Peso molecular 17

2.4.2.2 – Influência de íons na atividade β-amilásica 18

2.4.2.3 – Estrutura das β-amilases 20

2.4.2.4 – Efeito do pH e temperatura na estabilidade β-amilásica 20

2.4.3 – Enzimas amilolíticas de plantas 23

2.4.4 – Estudos realizados com amilases em tubérculos ricos em amido 25

3 – OBJETIVO **27**

4 – MATERIAL E MÉTODOS **28**

4.1 – Material 28

4.2 – Métodos 28

4.2.1 – Extrato enzimático 28

4.2.2 – Determinação do teor de proteínas 29

4.2.3 – Determinação da atividade hidrolítica total 30

4.2.4 – Tempo de incubação do extrato enzimático 31

4.2.5 – Efeito da temperatura 32

4.2.6 – Efeito do pH 32

4.2.7 – Efeito de íons 33

4.2.8 – Efeito de diferentes concentrações de Ca^{+2} 33

4.2.9 – Parâmetros cinéticos 33

4.2.10 – Eletroforese 34

4.2.11 – Metodologia de superfície de resposta 35

4.2.12 – Atividade de água (Aw) 37

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO **38**

5.1 – Determinação do tempo de incubação do extrato enzimático 38

5.2 – Temperatura 40

5.3 – pH 45

5.4 – Presença de íons 48

5.5 – Efeito de diferentes concentrações de Ca^{+2} na atividade amilásica 52

5.6 – Energia de ativação aparente 54

5.7 – Determinação de K_m e $V_{máx}$ aparentes 56

5.8 – Eletroforese 58

5.9 – Metodologia de superfície de resposta 60

5.10 – Atividade de água (Aw) 64

5.11 – Determinação do teor de proteínas 65

5.12 – Determinação da atividade hidrolítica 66

6 – CONCLUSÃO 68

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura da amilose e da amilopectina.....5

FIGURA 2 – Estruturas proteicas de α-amilases.....11

FIGURA 3 – Estruturas proteicas de β-amilases.....20

FIGURA 4 – Efeito da temperatura na atividade amilásica de extrato de raízes de mandioquinha-salsa: determinação do tempo de incubação do extrato enzimático.....39

FIGURA 5 – Efeito da temperatura na atividade amilásica do extrato de raízes de mandioquinha-salsa: determinação da temperatura ótima de atividade enzimática.....42

FIGURA 6 – Atividade amilásica residual: efeito da temperatura na estabilidade térmica enzimática do extrato de raízes de mandioquinha-salsa em até 4 h de incubação.....43

FIGURA 7 – Atividade amilásica residual: efeito da temperatura na estabilidade térmica enzimática do extrato de raízes de mandioquinha-salsa em até 25 h de incubação.....44

FIGURA 8 – Efeito do pH na atividade amilásica do extrato de raízes de mandioquinha-salsa: determinação do pH ótimo de atividade enzimática.....46

FIGURA 9 – Atividade amilásica residual: efeito do pH na estabilidade da atividade enzimática do extrato de raízes de mandioquinha-salsa após pré-incubação do extrato a 5 e 50°C por 15 minutos e 5°C, por 24 hs.....47

FIGURA 10 – Efeito de diferentes concentrações de Ca^{+2} na atividade amilásica do extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa.....53

FIGURA 11 – Efeito da temperatura na atividade amilásica do extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa – gráfico de Arrhenius.....55

FIGURA 12 – Efeito da concentração de substrato na atividade amilásica do extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa – gráfico de Michaelis-Menten.....57

FIGURA 13 – Efeito da concentração de substrato na atividade amilásica do extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa – gráfico de Lineweaver-Burk.....57

FIGURA 14 – Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida.....59

FIGURA 15 – Superfície de metodologia de resposta para o efeito do pH e temperatura na atividade amilásica de extrato de raízes de mandioquinha-salsa.....63

FIGURA 16 – Superfície de metodologia de resposta para o efeito do pH e temperatura na atividade amilásica de extrato de raízes de mandioquinha-salsa.....63

FIGURA 17 – Variação da atividade de água (Aw) de raízes de mandioquinha-salsa.....64

FIGURA 18 – Variação da quantidade de proteína em extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa.....65

FIGURA 19 – Variação da atividade hidrolítica do extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa.....67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Massa molar de diferentes fontes de α-amilases.....9

TABELA 2 Propriedades bioquímicas e físico-químicos de α-amilases salivar e pancreática.....13

TABELA 3 – Energia de ativação de α-amilases.....15

TABELA 4 – Massa molar de diferentes fontes de β-amilases.....18

TABELA 5 – Propriedades bioquímicas e moleculares de β-amilases cristalinas.....22

TABELA 6 – Condições experimentais de determinação de atividade enzimática em valores reais e em escala.....35

TABELA 7 – Efeito da adição de íons na atividade amilásica do extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa mediante a pré-incubação do extrato a 50 e 70°C, por 15 minutos, e sem pré-incubação deste.....49

Tabela 8 – Variáveis independentes e de resposta em experimentos para a determinação de parâmetros ótimos de atividade amilásica.....61

Tabela 9 – Análise de regressão múltipla para o modelo de segunda ordem para a resposta: atividade enzimática.....61

RESUMO

A mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.) possui um período de conservação pós-colheita de cerca de uma semana, que contrasta com o seu ciclo de cultivo, em torno de 10 meses. Os mecanismos de deterioração das raízes ainda não são conhecidos e tampouco foram estudadas as principais vias enzimáticas de degradação do amido, sua principal reserva energética. O objetivo deste trabalho foi de identificar e caracterizar bioquimicamente o extrato enzimático dessas raízes, que possuem atividade amilolítica. Os resultados mostraram que as enzimas apresentam pH e temperatura ótimos de atividade enzimática em torno de 6,2 e 46°C, respectivamente, confirmados por Análise de Superfície de Resposta. Foram detectadas três bandas com atividade amilolítica em gel de poliacrilamida. Os valores de E_a, K_m e $V_{máx}$ aparentes encontrados para o extrato enzimático foram de 7,53 kcal/mol, 0,41 mg/mol e 1,11 mg/mL/min, respectivamente. A hidrólise do amido aumenta 95% na presença de Ca^{+2} e a enzima mantém apenas cerca de 47% da sua atividade original na presença de EDTA. Os resultados mostraram a presença de duas possíveis isoformas de α-amilase e uma β-amilase no extrato enzimático *in vitro*, podendo estar ativas na raiz íntegra. Um ensaio de acompanhamento da atividade amilásica das raízes durante o armazenamento por 9 dias mostrou um aumento na atividade de água acompanhado de perda de textura e de oscilação na atividade hidrolítica. No entanto, tais alterações devem ocorrer também devido a ação de enzimas exógenas de mofos, que participam do processo de deterioração da mandioquinha-salsa.

ABSTRACT

Roots of Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Brancroft) have a post-harvest conservation time of approximately one-week, a very short period related to its long cultivation cycle, around 10-11 months. The mechanisms of post-harvest deterioration of the roots are unknown as well as the main enzymatic pathways such as the starch degradation, have not been studied. The purpose of this investigation was to identify and characterize the amylolitic activity of this root. The results showed that the optimum enzymatic conditions for the maximum activity are 46°C and pH 6.2 confirmed by Surface Ternary Plots. Three bands with amylolitic activity were detected in native PAGE. The kinetic values were E_a 7.53 kcal/mol, K_m 0.41 mg/mol and V_{max} 1.11mg/mL/min. The starch hydrolysis speed increases almost twice when Ca^{+2} is present and remained only 20% on the presence of EDTA. The results showed two possible isoforms of α-amylase and one β-amylase in the crude extract. An essay following the amylolitic activity during a 9-day storage period showed an increase of water activity associated to a loose of texture and a oscillating starch hydrolytic activity, although these behavior may have the contribution of exogenous enzymes from molds on the deteriorative process of the Peruvian carrots.

1 – INTRODUÇÃO

A mandioquinha-salsa é, provavelmente, a planta mais antiga cultivada na América do Sul e corresponde à espécie *Arracacia xanthorrhiza*, descrita por Bancroft, em 1825, pertencendo à família *Umbelliferae* (Apisciae). De acordo com a região produtora no Brasil, a mandioquinha-salsa é também conhecida como batata-baroa, batata-cenoura, cenoura-amarela, batata-fiusa, batata-tupinambá, batata-arracacha, batata-jujuba ou batata-suíça e, em outros países, com nomes de apio andino (Porto Rico e Venezuela), zanahoria blanca (Equador), virraca (Peru), arracacha (Colômbia e Bolívia) e peruvian carrot (Estados Unidos e Inglaterra) (Casali & Sedyama, 1997).

A mandioquinha-salsa é originária da região andina da América do Sul, compreendida por Venezuela, Equador, Peru, Bolívia e sobretudo pela Colômbia, local de cultivo intensivo e extensivo, onde se encontra a maior diversidade de plantas da espécie. No Brasil, a mandioquinha-salsa, foi introduzida por volta de 1900, trazida das Antilhas (Casali & Sedyama, 1997), sendo cultivada e consumida nas regiões Sudeste e Sul do País. Para fins alimentícios, apenas as raízes da planta são utilizadas, desprezando-se as porções aéreas, compostas por ramas e pelo pedúnculo (Pereira, 1995).

Em relação ao valor alimentício da mandioquinha-salsa, as raízes tuberosas comumente consumidas constituem um alimento de alto valor nutritivo, especialmente quando comparada com outras espécies amiláceas como a mandioca, batata, cará e batata doce. Caracteriza-se como um alimento essencialmente energético, apresentando 25 g de carboidratos, em média, por 100 g de raiz. Embora se constitua uma boa fonte de vitamina A e niacina, apresenta também consideráveis níveis de minerais, como cálcio, fósforo e ferro (Pereira, 1995).

A mandioquinha-salsa é recomendada em dietas para crianças, pessoas idosas e convalescentes, principalmente pelo seu conteúdo de

cálcio, fósforo e niacina. Dos carboidratos totais, a maior fração corresponde ao amido, que representa cerca de 80% (Pereira, 1995).

A conservação da mandioquinha-salsa, no entanto, é um ponto crítico na comercialização das raízes. Comparativamente ao seu ciclo de produção, que varia de 10 a 11 meses, as raízes possuem um período curto de conservação pós-colheita, no máximo de 7 dias, quando mantidas à temperatura ambiente. Este fato tem implicações diretas no manuseio, na distribuição e na disponibilidade do produto e faz com que os preços sofram flutuações acentuadas ao longo do ano (Henz, 1995; Pereira, 1995; Santos, 1997).

Os mecanismos de deterioração pós-colheita da mandioquinha ainda não foram suficientemente elucidados. Sabe-se que a prática de lavagem das raízes acelera o processo de deterioração, observando-se a perda acentuada de textura e o desenvolvimento de mofo nas extremidades; este mecanismo pode ser retardado pela manutenção das raízes sob refrigeração, porém acarreta custos adicionais sem eliminar o problema. Uma hipótese para explicar esta via de deterioração seria a hidrólise enzimática dos carboidratos e conseqüente fornecimento de açúcar para o crescimento microbiano.

A ação de enzimas amilolíticas na mandioquinha ainda não é conhecida, ao contrário de outros tubérculos, similares a ela em relação ao alto teor de amido em sua composição, como a mandioca (Matos da Veiga e col., 2000), a batata (Goristein, 1993) e a batata doce (Hagenimana e col., 1994), e tampouco há estudos de qualquer outra participação enzimática na deterioração destas raízes. A exemplo de outros organismos, o passo inicial no estudo de amilases é a caracterização bioquímica das enzimas através de parâmetros cinéticos como K_m, $V_{máx}$, pH ótimo e temperaturas de ativação e de desnaturação (De Mot & Verachtert, 1987; Matos da Veiga e col., 2000; Silvanovich & Hill, 1977; Swain & Dekker, 1966; Thoma e col., 1959).

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Polissacarídeos

Os polissacarídeos são macromoléculas formadas pela união de açúcares simples ou monossacarídeos através de ligações glicosídicas. Podem ser divididos em duas grandes classes: os homopolissacarídeos ou homoglicanas, que são constituídos por um único monossacarídeo, como a celulose e o amido, e os heteropolissacarídeos ou heteroglicanas, constituídos por mais de um monossacarídeo, como os alginatos e as gomas guar e locusta (The British Nutrition Foundation, 1990).

Os polissacarídeos de menor peso molecular são os mais solúveis e possuem maior capacidade de hidratação por molécula. Essencialmente existem três tipos básicos de polissacarídeos: os de *reserva*, que possuem a função de reserva de energia em plantas, como o amido, os polissacarídeos *estruturais*, responsáveis pela formação da estrutura no tecido vegetal e são insolúveis, como a celulose e pectina e, finalmente, os polissacarídeos *isolados*, como as gomas, que conferem propriedades funcionais específicas a determinados tipos de alimentos (The British Nutrition Foundation, 1990).

2.2 – Amido

O amido possui características químicas e físicas únicas, além de suas qualidades nutricionais, diferentes dos outros carboidratos (Bemmiller & Whistler, 1996). É a fonte de reserva mais importante de todas as plantas, estando presente em sementes, raízes, tubérculos e algumas sementes de cereais (The British Nutrition Foundation, 1990). As fontes mais importantes de amido são os grãos de cereais, representando cerca de 40 a 90% de seu peso seco, de leguminosas entre 30 e 70% e os tubérculos, de 65 a 85%, em base seca.

O consumo de amido representa cerca de 70-80% das calorias consumidas nas dietas humanas em geral (Casali & Sedyama, 1997). A

maior parte da produção mundial de amido é proveniente da extração de amido de batata e milho e o restante, da extração de trigo, sorgo e sagu. Entretanto, alguns estudos têm sido realizados no sentido de viabilizar o uso de recursos alternativos na produção de amido, tais como a extração de amido de triticale, arroz, mandioca e amaranto (Casali & Sedyama, 1997; Guzmán-Maldonado & Paredes-López, 1995).

O amido é constituído por uma mistura de dois polissacarídeos, a amilose e amilopectina, em proporções que variam com a espécie e o grau de maturação (Figura 1) (McCann & Barnett, 1986; Wong, 1989).

A amilose é uma molécula formada por uma cadeia linear de unidades de α-D-glicoses unidas por ligações α-1,4. Representa o menor componente do amido (15-25%) e possuiu um peso molecular típico de até 60.000 Daltons (Bemmiller & Whistler, 1996; Dunn, 1974). Apresenta uma estrutura helicoidal, α-hélice, formada por pontes de hidrogênio entre os radicais hidroxila das moléculas de glicose. O interior da α-hélice contém somente átomos de hidrogênio e é lipofílico, enquanto os grupos hidroxilas posicionam-se no lado externo da α-hélice. Essa estrutura possui a capacidade de acomodar átomos de iodo formando compostos de cor azul intensa (The British Nutrition Foundation, 1990; Whitaker, 1994).

A amilopectina é o maior componente do amido (75-85%). Apresenta uma estrutura ramificada constituída por cadeias de 20 a 25 unidades de α-D-glicopiranoses unidas em ligações α-1,4. Essas cadeias estão unidas entre si através de ligações α-1,6 e contém apenas uma extremidade redutora na cadeia. A amilopectina é constituída por cadeias de 10 a 500 milhões de unidades de glicopiranoses e apresenta uma estrutura esférica; possui um peso molecular maior que 1 milhão de Daltons, mais de 10.000 resíduos de glicose, o que faz com que a amilopectina seja uma das maiores – senão a maior – das moléculas encontradas na natureza (Figura 1) (Bemmiller & Whistler, 1996; Collins, 1987).

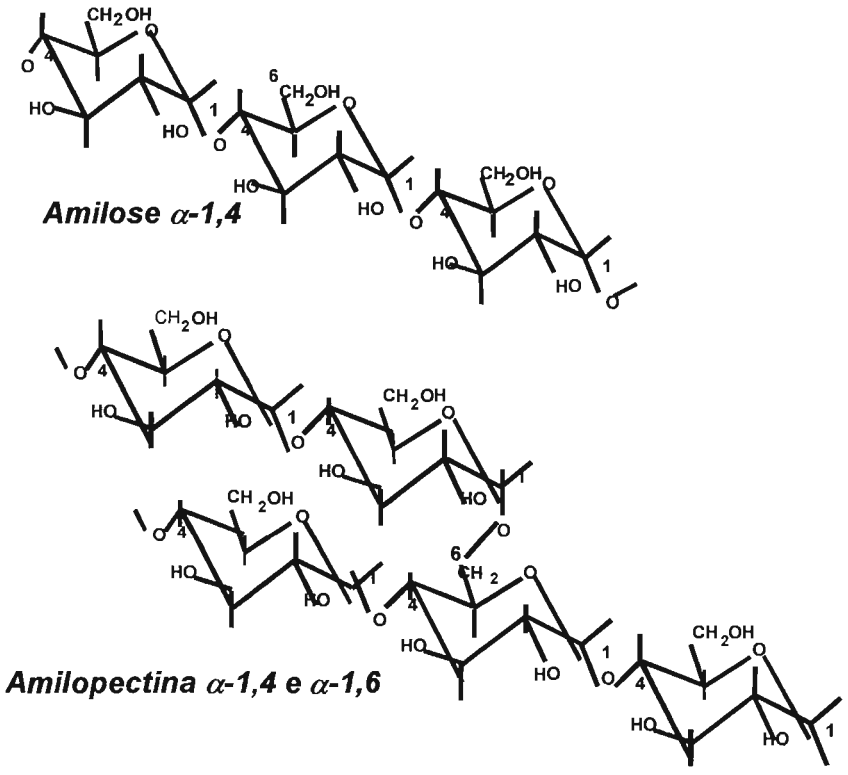

Figura 1 – Estrutura da amilose e da amilopectina em um grânulo de amido (Adaptado de Wong, 1989).

2.3 – Degradação Enzimática do amido

O modo de ação de enzimas amilolíticas sobre o amido depende da origem do amido e de seu grau de gelatinização. Nas plantas, em seu estado nativo, o amido esta presente na forma insolúvel; entretanto, se uma suspensão de amido for aquecida a temperaturas acima de 60°C, as ligações de hidrogênio, que são responsáveis pela manutenção da estrutura, se quebram, os grânulos incham e o amido se dispersa na solução. Este processo de gelatinização é basicamente um pré-requisito para a maioria dos processos onde se deseja hidrólise amilolítica (Suckling, 1990).

Uma vez que a fração de amilose contém somente ligações glicosídicas α-1,4, as enzimas α- e β-amilases hidrolisam completamente a

molécula a resíduos de maltose e maltotriose (Whitaker, 1994). Ao contrário, a amilopectina proporciona uma hidrólise incompleta. Quando a amilopectina é sujeita a hidrólise exaustiva pela α-amilase, somente pequenos oligômeros de duas a seis unidades de glicose restam ao final do processo, contendo resíduos com ligações α-1,4 e α-1,6. A β-amilase hidrolisa a cadeia em resíduos de maltose a partir da extremidade não-redutora e sua ação cessa nas proximidades da ligação α-1,6. Dessa forma, uma grande quantidade de polímeros fica remanescente (Whitaker, 1994).

A α-amilase ataca grânulos nativos de amido enquanto a β-amilase não é capaz de hidrolisá-los. No caso de enzimas bacterianas, a β-amilase atua parcialmente nos grânulos e apresenta um pequeno efeito na taxa de amido hidrolisado pela α-amilase, ou seja, não contribui para a hidrólise do amido pela α-amilase. Esse pequeno efeito pode ser causado pela diferença de distribuição de produtos ou talvez uma inativação não-específica da α-amilase através da adição da proteína. A β-amilase pode vir a competir sucessivamente com a α-amilase pela degradação destas dextrinas a açúcares simples. A existência desses intermediários levou a β-amilase a ser descrita como um "complemento" da α-amilase e mais tarde considerada uma enzima fundamental na degradação do amido (Dunn, 1974).

2.4 – Amilases

As amilases são classificadas em três grupos, de acordo com seu modo de ação e formação de produtos: as α-amilases, que hidrolisam ligações no interior do substrato (endoamilases), as β-amilases, as quais hidrolisam unidades da extremidade não redutora do substrato (exoamilases) e as α-glucan glicosidades (glicoamilases), que hidrolisam unidades de glicose da extremidade não redutora da molécula de substrato. As propriedades de cada uma dessas categorias de amilases tem sido estudadas com o objetivo de elucidar as características, principalmente de especificidade, a natureza protéica, bem como as condições para a

produção dessas enzimas (Kulp, 1975; Yamamoto, 1994). As amilases são largamente distribuídas em organismos vivos uma vez que essas enzimas são conhecidas por estarem presentes desde em microrganismos a plantas superiores e animais (Yamamoto, 1994).

2.4.1 - α-amilases

A α-amilase (1,4-α-D-glucan glicanohidrolase, EC 3.2.1.1) ocorre naturalmente em plantas superiores, tecidos animais e microrganismos. A ação da α-amilase depende não só da natureza do substrato como também da natureza da enzima a ser utilizada (Suckling, 1990). A enzima age sobre o amido de uma maneira essencialmente aleatória, no interior da cadeia, através da hidrólise somente de ligações glicosídicas α-1,4, produzindo açúcares redutores (Fisher & Stein, 1959; Guzmán-Maldonado & Paredes-Lopéz, 1995). A designação α-amilase é devido ao fato dos produtos de degradação serem açúcares com a configuração óptica α (Greenwood & Milne, 1968).

A ação da α-amilase na fração amilose do amido ocorre em dois estágios. Inicialmente há uma degradação rápida da molécula de amilose com a formação de maltose e maltotriose. Essa etapa é resultante do ataque aleatório da enzima sobre o substrato. Nessa fase ocorre uma diminuição brusca na viscosidade. O segundo estágio é muito mais lento que o primeiro, envolvendo uma lenta hidrólise dos oligossacarídeos e conseqüente formação de moléculas de glicose e maltose como produtos finais (Whitaker, 1994; Kulp, 1975).

A hidrólise da α-amilase na fração de amilopectina do amido produz glicose, maltose e uma série de α-dextrinas limite, oligossacarídeos de quatro ou mais resíduos de glicose, todos eles contendo ligações α-1,6 glicosídicas. Uma hidrólise adicional sobre os produtos do primeiro estágio de ação da enzima ocorre lentamente, afetando a hidrólise de algumas

ligações na região de ramificação da molécula (Bemmiller & Whistler, 1996; Kulp, 1975).

2.4.1.1 – Peso molecular

O peso molecular da maioria das α-amilases têm sido determinado na ordem de 50.000 Daltons, onde cada molécula contém pelo menos um íon Ca^{+2} por molécula de proteína (Whitaker, 1994; Kulp, 1975; Wong, 1989). A Tabela 1 apresenta a massa molar de diferentes fontes de α-amilase. Em geral, as enzimas apresentam valores muito próximos de peso molar, com duas exceções, ambas em enzimas provenientes de microrganismos, tais como as α-amilase de *Bacillus subtilis e de Bacillus stearothermophilus,* que apresentam um tamanho fora do comum (Greenwood & Milne, 1968; Whitaker, 1994).

Tabela 1 – Massa molar de diferentes fontes de α-amilases.

Fonte	Massa molar[a]
Pâncreas suíno	45.000
Amilase salivar	55.200 - 69.000
Bacillus subtilis	
monômero	48.200[b]
dímero	96.900 – 97.600[c]
Bacillus stearothermophilus	15.600[d]
Aspergillus oryzae	51.000
Aveia, centeio, trigo	45.000[e]
Cevada germinada	45.000[e,f]
Sorgo germinado	48.000[g]
Trigo germinado	45.000[e]
Grãos de soja e fava	45.000[e]

Fonte: Greenwood & Milne, 1968. [a] A massa molar foi calculada através de medidas de difusão e sedimentação. [b] Calculado através de estudos de equilíbrio de sedimentação. [c] Determinado através de dispersão de luz. [d] Valores medidos por pressão osmótica, 15.400. [e] Valor mínimo determinado por peneira molecular. [f] Valor medido por pressão osmótica, 59.500.

2.4.1.2 – Presença de cálcio

Como mencionado anteriormente, a α-amilase contém pelo menos um íon Ca^{+2} por molécula de proteína (Wong, 1989), cuja presença é essencial para a estabilização da enzima. O cálcio pode ser facilmente removido da molécula de α-amilase através do uso de agentes quelantes tais como oxalato, citrato, polifosfato e EDTA ou através de diálise. Com a completa remoção do cálcio, a enzima torna-se essencialmente inativa e mais susceptível a desnaturação térmica, ácida ou por compostos dissociantes, como uréia e guanidina (Fisher & Stein, 1959; Hagenimana e col., 1994). No entanto, se a remoção de cálcio durante a exposição ao agente quelante ocorrer devido a ação de proteases ou por condições desfavoráveis de pH, temperatura ou força iônica, a desnaturação da enzima pode ser reversível (Fisher & Stein, 1959; Whitaker, 1994).

Dois exemplos de instabilidade da enzima frente a variações de pH do meio são dados pelas amilases de pâncreas suíno e de *Bacillus subtilis* (Fisher & Stein, 1959). Em ambos os casos, as enzimas livres de cálcio apresentaram perda de resistência em pHs alcalinos.

O cálcio não participa diretamente da formação do complexo enzima-substrato, mas mantém a molécula da enzima em ótima conformação para sua máxima atividade e estabilidade. Na prática, sempre há cálcio suficiente para manter a molécula biologicamente ativa. O cálcio estabiliza as estruturas secundária e terciária da proteína, conferindo uma arquitetura compacta na estrutura da molécula de α-amilase. Traços de cálcio presentes no amido são geralmente suficientes para compensar a ausência deste íon na enzima, mesmo no caso de enzimas livres de cálcio. Entretanto, a adição de sais de cálcio é normalmente recomendada para ativar a proteção máxima da enzima contra a desnaturação térmica (Fisher & Stein, 1959; Kulp, 1975).

Foi estudado o efeito da remoção do cálcio de α-amilase proveniente de fava, através do uso de EDTA e tripsina. Verificou-se que, na presença do quelante, apenas 3% de atividade α-amilásica original permanece intacta no extrato, enquanto que na presença de tripsina, a atividade amilásica se manteve em 90% de sua atividade original. Ao contrário, a adição de íons cálcio na presença de EDTA aumentou em 30% a atividade amilásica em relação a sua atividade original. Esses resultados indicam que a enzima necessita de íons cálcio para a manutenção de sua atividade (Greenwood e col., 1965).

2.4.1.3 – Estrutura das α-amilases

A Figuras 2A e 2B representam as estruturas protéicas de α-amilases. Estas estruturas possuem íons Ca^{+2}, representados por esferas cinzas. A Figura 2B, que representa a amilase salivar, apresenta além do íon Ca^{+2} um íon Cl^- e um grupo ácido piroglutâmico em sua cadeia.

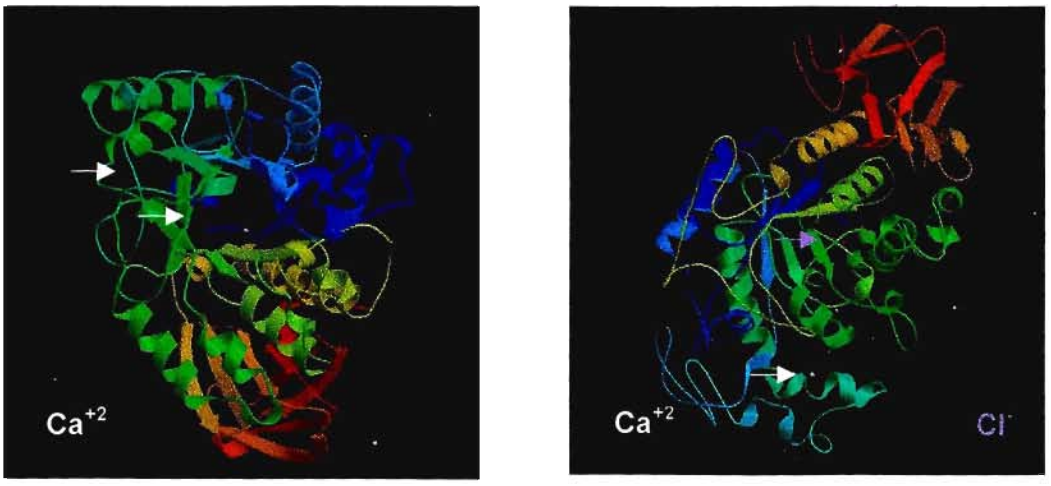

Figura 2 – Estruturas proteicas de α-amilases provenientes de (A) *Aspergillus oryzae*, contendo dois íons Ca^{+2} (Swift e col., 2001) e (B) de amilase salivar, contendo um íon Ca^{+2} e um íon Cl^- (Ramasubbu, 2001).

2.4.1.4 – Influência de outros íons na atividade α-amilásica

A presença de outros íons pode provocar a inibição ou a inativação de enzimas amilolíticas em função de ligações mais estáveis e do tamanho do íon, resultando em mudanças conformacionais das moléculas.

Experimentos realizados com fava mostraram que o cloreto de mercúrio, em concentrações de 10^{-3} a 10^{-4} M, provocou a inibição completa da atividade α-amilásica. Em concentrações mais baixas, 10^{-5} e 10^{-6} M, foi observada uma inibição de 85% e 52%, respectivamente (Greenwood e col., 1965). Além das causas citadas anteriormente, essa inibição pode ter ocorrido devido a competição dos íons Hg^{+2} com Ca^{+2} ou ainda devido à ligação Hg^{+2} com cisteína.

2.4.1.5 – Efeito do pH e temperatura na estabilidade α-amilásica

O pH é um fator que influencia diretamente os parâmetros de atividade ótima e de estabilidade enzimática das α-amilases. Em plantas superiores, mamíferos, bactérias e fungos, as α-amilases são geralmente estáveis a faixas de pH que variam de 5,5 a 8,0. Os valores de pH nos quais se observa ótima atividade enzimática para plantas superiores, bactérias e fungos encontram-se numa faixa entre 5,0 e 6,0. Para α-amilases de mamíferos, o pH ótimo varia de 6,0 a 7,0, dependendo da presença de halogênios (Greenwood & Milne, 1968; Whitaker, 1994). A α-amilase de *Bacillus subtilis* também apresenta valores de pH ótimo variando de 5,0 a 7,0 enquanto a de *Bacillus stearothermophilus* apresenta um pH ótimo em torno de 3,0. Vale lembrar que esta enzima distingue-se das demais pelas características de sua molécula (vide Tabela 1).

Em batata (*Solanum tuberosum* L.) a máxima atividade α-amilásica foi obtida entre valores de 7,2 e 8,0 de pH, em contraste com a maioria das α-amilases de outras fontes vegetais, que situa-se em torno de 6,0 (Witt & Sauter, 1996), como foi visto anteriormente.

As α-amilases apresentam uma curva sinoidal quando a atividade enzimática é expressa contra o pH. A atividade máxima de amilases esta na região ácida entre os pHs 4,5 e 7,0. Entretanto a forma da curva e o pH ótimo varia de acordo com a origem da enzima. Algumas propriedades de α-amilases salivar e pancreática estão apresentadas na Tabela 2 (Yamamoto, 1994).

Tabela 2 – Propriedades bioquímicas e físico-químicos de α-amilases salivar e pancreática.

	Fonte	
	Saliva humana	**Pâncreas humano**
pH ótimo	6,8-7,0	6,8-7,0
pH - estabilidade	4,0-10,0	4,0-10,0
Estabilidade térmica (°C)	50	50
Peso molecular (Daltons)	62,000	56,000
SH (mol/mol proteína)	1	1
Ativação com Cl^-	+	+

Fonte: Yamamoto, 1994.

Comparando os dados referentes a α-amilases pancreática e salivar apresentados na Tabela 2, pode-se dizer que ambas enzimas são praticamente idênticas em relação a suas características bioquímicas, prevendo-se portanto estruturas e mecanismos de ação semelhantes.

Em trabalhos com fava (*Vicia faba*, Linn), foram identificadas enzimas com atividade amilolítica cujo pH ótimo encontra-se em torno de 5,6. A enzima apresentou-se bastante estável em pHs alcalinos, enquanto uma desnaturação irreversível ocorre em pHs inferiores a 5,6 (Greenwood e col., 1965).

O pH ótimo de atividade enzimática para α-amilases de cotilédones de ervilha (*Pisum sativum* L.) e da parte aérea da planta são muito similares e apresentam valores na faixa de 5,5 a 6,5. Devido a capacidade de hidrólise de β-dextrina limite, essas enzimas foram identificadas como α-amilases (Beers & Duke, 1990).

Para α-amilases provenientes de feijão-de-corda Pituba (*Vigna unguiculata* L.), o pH no qual a enzima atinge sua atividade máxima esta compreendido no intervalo de 6,0-6,5. Nesse vegetal, a atividade enzimática também diminui bruscamente em pHs inferiores a 4,0 (Bastos e col., 1994).

Quatro isoformas de α-amilases foram isoladas de trigo Manitou. As quatro isoenzimas apresentaram pH ótimo de atividade enzimática entre 5,5 e 5,6 (Tkachuk & Kruger, 1972).

Em relação à temperatura, as α-amilases, que contém cálcio na molécula, são menos sensíveis a altas temperaturas quando comparadas a β-amilases, enzimas que não necessitam de íons estabilizadores. Essa propriedade adquire grande importância no processamento de alimentos, como por exemplo no caso de produtos de panificação. Assim como suas características anteriormente citadas, a estabilidade térmica das α-amilases apresenta diferentes faixas de resistência (Kulp, 1975).

A maioria das α-amilases purificadas perde sua atividade rapidamente em temperaturas acima de 50°C. Entretanto, na presença de excesso de íons cálcio, a inativação pode ocorrer de forma bastante lenta. Como já foi dito anteriormente, os íons cálcio são essenciais tanto para a atividade quanto para a estabilidade térmica da α-amilase, especialmente no caso de α-amilases provenientes de cereais, onde a ligação com o cálcio é bastante fraca (Greenwood & Milne, 1968). α-Amilases extraídas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus stearothermophilus* são particularmente estáveis a altas temperaturas. O *Bacillus stearothermophilus* é ainda mais resistente a inativação térmica em relação ao *Bacillus subtilis*, apresentando uma temperatura de ativação enzimática entre 55 e 70°C (Kulp, 1975).

As α-amilases de fava (*Vicia faba*, Linn) exibem uma temperatura ótima de atividade enzimática a 45°C. Ensaios de estabilidade térmica indicaram que 90% da atividade enzimática é mantida quando a enzima é exposta a esta temperatura, durante uma hora. Quando a temperatura é aumentada, entre 55 e 65°C, ocorre uma rápida diminuição na estabilidade enzimática (Greenwood e col., 1965).

Em relação a estabilidade térmica, as α-amilases obtidas de trigo Manitou, não sofreram nenhuma perda de atividade mesmo após 4 h de exposição, a 50°C. Com o aumento da temperatura, a 60 e 70°C, as

enzimas apresentaram perda de cerca de 80% de sua atividade máxima, após 3 h e 0,5 h, respectivamente (Tkachuk & Kruger, 1972).

Dos parâmetros cinéticos de α-amilase de ervilha (*Pisum sativum* L.) foi verificado que a constante de Michaelis (K_m) é de 1,6 mg/mL, através da utilização de amido como substrato (Beers & Duke, 1990).

A energia de ativação de α-amilases de diversas fontes foram compiladas e são mostradas na Tabela 3 (Greenwood & Milne, 1968; Greenwood e col., 1965; Tkachuk & Kruger, 1972).

Tabela 3 – Energia de ativação de α-amilases.

Fonte	**Energia de ativação (Kcal/mol)**
Pâncreas suíno[1]	13,5
Pâncreas humano[1]	13,5
Amilase salivar[1]	13,5; 13,7
Bacillus subtilis[1]	11,0; 15,0
Aspergillus oryzae[1]	10,7
Bacillus sthearothermophilus[1]	14,0
P. saccharophila[1]	8,5; 14,4
Soja[1]	6,0; 14,0
Fava[2]	5,0; 14,0
Centeio[1]	11,0; 14,0
Trigo[3,1,1]	8,7; 11,0; 14,0
Aveia[1]	9,0; 14,0
Cevada[1]	7,05; 13,0
Cevada germinada[1]	7,1; 13,0
Sorgo germinado[1]	12,0
Ervilha[1]	7,6

Fonte: adaptado de Greenwwod & Milne, 1968[1], Greenwood e col., 1965[2] e Tkachuk & Kruger, 1972[3].

2.4.2 - β-amilases

A β-amilase (1,4-α-D-glucan maltohidrolase, EC 3.2.1.2), também chamada de amilase sacarogênica, está presente somente em plantas superiores e em alguns microrganismos, não ocorrendo, portanto, em mamíferos (Bemmiller & Whistler, 1996; French, 1959).

A β-amilase hidrolisa ligações glicosídicas α-1,4 de amido e glicogênio com inversão na configuração da glicose sobre a posição C(1) de α para β. Essa mudança conformacional é a razão pela qual a enzima possui a denominação β. As β-amilases são exoamilases que atacam bandas glicosídicas, partindo da extremidade não redutora até toda a cadeia ser convertida em maltose ou até que a ação da enzima seja bloqueada por algum agente químico ou físico. Uma vez que as enzimas hidrolisam alternadamente ligações glicosídicas, o produto desta reação é a maltose quando a enzima age direto sobre cadeia da molécula, produzindo um número regular de resíduos glicosídicos. De outro modo, quando a enzima age na cadeia da molécula produzindo um número de resíduos irregulares, a glicose e a maltotriose são também produtos finais da reação. A quebra da maltotriose, resultando em glicose e maltose, se procede de forma muito mais lenta em relação a β-amilolise inicial e necessita de altas concentrações da enzima (Guzmán-Maldonado & Paredes-López, 1995; Wong, 1989).

A β-amilase não hidrolisa ligações glicosídicas α-1,6 na amilopectina e sua ação cessa no ponto de ramificação; por essa razão, a degradação da amilopectina pela β-amilase é incompleta (French, 1959; Whitaker, 1994).

O ataque de β-amilase sobre o substrato pode resultar em:

(a) degradação simples da cadeia, na qual a cadeia do polímero é digerida;

(b) degradação múltipla da cadeia, na qual toda a cadeia é igualmente degradada ou

(c) múltiplo ataque, que é um intermediário entre a degradação simples e a múltipla.

No primeiro caso, a degradação simples, a enzima ataca a molécula e continua agindo sobre esta até que haja uma completa degradação. No segundo caso, de degradação múltipla da cadeia, a molécula da enzima ataca uma dada molécula de substrato com posterior formação de uma molécula de maltose, que se torna livre para dissociar da molécula de substrato e então ocorrerá um novo ataque aleatório numa nova molécula de amilose. Esse modo de ação irá provocar um encurtamento simultâneo na molécula de substrato e, num estágio intermediário da reação, somente parte da molécula de substrato terá sido degradada. Finalmente, no terceiro caso, o múltiplo ataque, a molécula da enzima tendo atacado um dado substrato, persiste em atacar este mesmo substrato outras vezes até que a enzima e o substrato parcialmente degradado se dissociem (French, 1959; Greenwood & Milne, 1968; Kulp, 1975).

Em trabalhos de caracterização e identificação enzimática, a β-amilase pode ser diferenciada em relação a α-amilase devido a propriedade desta em hidrolisar alguns substratos tais como β-dextrina limite, o qual a β-amilase não digere (Subbaramaiah & Sharma, 1990). Em estudos de mutarrotação, os produtos gerados pela ação da β-amilase sobre a amilose, na presença de carbonato de sódio, apresentam uma rotação óptica indicando que os produtos hidrolíticos possuem uma configuração β-anomérica (Subbaramaiah & Sharma, 1990; Yamamoto, 1994).

2.4.2.1 – Peso molecular

Em geral, β-amilases possuem um maior valor de massa molar em relação às α-amilases. Na Tabela 4 estão representadas as massas molares de β-amilases provenientes de diferentes fontes (Arai e col., 1991; Greenwood & Milne, 1968).

Tabela 4 – Massa molar de diferentes fontes de β-amilases.

Fonte	Massa molar[a]
Cevada	20.000-80.000
Xarope de malte	55.900; 54.200[b]
Grão de soja	61.700
Batata doce	50.000-152.000[19,22]
Trigo	64.200
Ichoimo*	60.000[b]

Fonte: Greenwood & Milne, 1968 e Visuri & Nummi, 1972. [a] A massa molar foi calculada através de medidas de S_{20}, D_{20} e V. [b] O peso molar foi calculado através de estudos de sedimentação de equilíbrio. [h] Calculado através de gel de poliacrilamida pelo método de Davis e Laemmli.
* Tipo de raiz popular no Japão, semelhante ao Inhame.

2.4.2.2 – Influência de íons na atividade β-amilásica

Ao contrário das α-amilases, as β-amilases não necessitam de metais para a manutenção de sua estabilidade. Entretanto, também sofrem alterações em sua atividade enzimática devido a presença de íons (Wong, 1989). β-Amilases provenientes de ervilhas apresentaram uma inibição em sua atividade enzimática quando na presença de altas concentrações de Hg^{+2} e Cu^{+2} enquanto que na presença de outros íons metálicos, tais como Ca^{+2}, Fe^{+3}, Na^{+} e Zn^{+2}, não houve alteração em sua atividade enzimática (Lizotte e col., 1990).

Em β-amilases de mostarda (*Sinapis alba*), verificou-se que a presença de Ag^{+}, Pb^{+2}, Cu^{+2} e Hg^{+2} provocaram inibição na atividade enzimática. Na presença desses íons, a enzima apresentou atividades residuais correspondentes a 70, 77, 82 e 90% de sua atividade enzimática original, respectivamente. A enzima também foi inibida na presença de ρ-cloromercuribenzoato, com inativação em torno de 97% da atividade inicial. O fato da enzima apresentar alto grau de inibição por ρ-cloromercuribenzoato e metais pesados, tais como Ag^{+}, fez com que os autores concluíssem que a enzima necessita de grupos sulfidrila para a

manutenção de sua atividade, assim como outras β-amilases (Greenwood & Milne, 1968; Kulp, 1975; Subbaramaiah & Sharma, 1990).

Estudos realizados com β-amilases de ginseng apresentaram uma alta redução na atividade enzimática quando na presença de Fe^{+2}, Hg^{+2}, Pb^{+2}, Cu^{+2} e Sn^{+2}, apresentando, em média, uma redução de 80% na atividade amilásica. A enzima também apresentou alto grau de inibição na presença de ácido ρ-cloromercuribenzóico (Yamasaki e col., 1989).

Nesses estudos fica evidente a essencialidade dos resíduos sulfidrilas de cys na atividade enzimática de β-amilase. A enzima é susceptível a metais pesados que normalmente se ligam aos grupos sulfidrilas de proteínas, bem como é inativada pela ação de reagentes específicos para esses resíduos, como ρ-cloromercuribenzoato, ρ-mercuribenzoato, o-iodosobenzoato, N-etilmaleimida, ácido L-ascórbico, íons de prata, cobre e mercúrio, bem como por oxidação. Além destes mecanismos, a β-amilase é também sensível à oxidação, no entanto esta inativação pode ser prevenida pela adição de albumina sérica e glutationa reduzida nas preparações purificadas da enzima (Kulp, 1975; Yamasaki e col., 1989).

2.4.2.3 – Estrutura da β-amilase

As Figuras 3A e 3B representam as estruturas protéicas de β-amilases. Na estrutura de β-amilase de soja (3A), observa-se a presença de um íon sulfato.

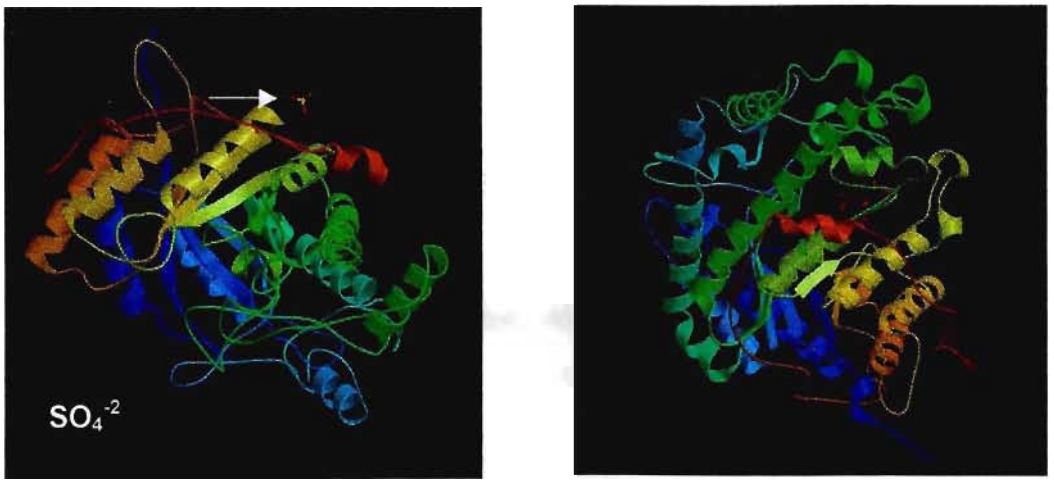

Figura 3 – Estruturas proteicas de β-amilases provenientes de (A) soja reagindo com β-maltose e maltal (Mikami e col., 2001) e (B) de batata doce (Lee e col., 2001).

2.4.2.4 – Efeito do pH e temperatura na estabilidade β-amilásica

O pH ótimo de atividade β-amilásica varia entre 5,0 e 6,0. A enzima é relativamente estável a pHs ácidos, um dado que pode ser utilizado durante o processo de purificação para a remoção de α-amilase. A enzima apresenta-se estável a pHs 8,0-9,0 a 20°C por até 24 hs. Em relação a pHs mais ácidos, a β-amilase proveniente de grãos de soja é mais estável quando comparada a enzima correspondente de outras fontes, tais como trigo e cevada (Greenwood & Milne, 1968; Whitaker, 1994; Kulp, 1975). As β-amilases de grãos de soja apresentam um pH ótimo entre 5,0 e 6,0. O pré-

tratamento da enzima em pHs entre 3,0 e 5,0 resulta em diminuição da atividade enquanto que a manutenção da enzima em pHs entre 6,0 e 9,0, por mais de duas horas, não afeta a atividade enzimática. O pH ótimo para a atividade enzimática da β-amilase de ervilha foi determinado em torno de 6,0 (Gertler & Birk, 1965; Lizotte e col., 1990) enquanto que para a enzima de ginseng, o pH ótimo encontra-se em torno de 5,0 (Yamasaki e col., 1989).

Algumas propriedades de β-amilases cristalinas de trigo, batata doce e soja são comparadas na Tabela 5. Pode-se observar, pela tabela, que todas as β-amilases sofreram inibição por ácido ρ-cloromercuribenzóico (ρCMB), um reagente sulfidrílico inibidor de grupos SH. Essa inibição pode ser minimizada através da adição de agentes redutores tais como cisteína ou mercaptoetanol (Witt & Sauter, 1996). Com exceção à β-amilase proveniente de batata doce, as outras enzimas apresentam um peso molecular semelhante, na faixa entre 57.000 a 64.200 Daltons.

Tabela 5 – Propriedades bioquímicas e moleculares de β-amilases cristalinas.

	Fonte					
	Trigo	**Raíz forte**	**Batata doce**	**Soja**	**Ichoimo**	**Ginseng**
pH ótimo	5,2[2]; 5,3[1]	6,0-6,5[3]	4,0-5,0[1,2]	5,0-6,0[1,2,3]	6,0[2]	5,0[3]
pH - estabilidade	4,5-9,2[1,2]	5,7-6,5[3]	4,0-9,0 5,0-8,0[2]	5,0-8,0[1,3] 5,0-10,0[2]	4,3-8,5[2]	5,0-7,0[3]
Energia de ativação:						
0-20°C	13,000[1]					
20-40°C	9,300[1]					
Ponto isoelétrico	6,0[1,2]	4,9[3]	4,8[1,2]	5,1-5,9[2,3]	5,0-5.2[2]	5,3[3]
Inativação com Cu^{+2} e Hg^{+2}	+[1]		+[1]			+[3]
Peso molecular (Da)	64.200[2]	58.000-62.000[3]	197.000[2]	57.000-61.700[2]	60.000[2]	63.000[3]
Temperatura ótima (°C)	≥ 50[2]		60[2]	45[2]	55[2]	50[3]
Grupos SH	+[1]		+[1]	+[1]		
Inibição por ρCMB	+[2]	+[3]	+[2]	+[2]	+[2]	+[3]
Km		1.1[3,*]	0.073[3,**] 0.021[3,***]	2.5[3,****]		0.61[3,***]

Fonte: French, 1959[1], ARAI e col., 1991[2] e Yamasaki e col., 1989[3].

* (mg amilopectina /mL); ** (mM amilose); *** (% amido); **** (mM amilopectina);

As características de estabilidade térmica β-amilásica dependem muito de sua procedência. As β-amilases provenientes de cereais e leguminosas são menos estáveis termicamente do que suas respectivas α-amilases e por essa razão são mais rapidamente inativadas pelo calor. Quando uma solução é aquecida a 70°C contendo α- e β-amilases na presença de íons cálcio, ocorre a inativação da β-amilase. A β-amilase de grão de soja perde cerca de 50% de sua atividade quando aquecida a 65°C por 30 min a pH 5,5 e é inativada após 30 min de exposição a 70°C. No entanto, a β-amilase de batata doce pode ser aquecida a 60-65°C sem perda apreciável de sua atividade, apresentando uma temperatura ótima de

atividade enzimática entre 50 e 55°C (French, 1959; Greenwood & Milne, 1968; Kulp, 1975; Wong, 1989). No caso de β-amilase de ervilha, a desnaturação térmica ocorre quando a enzima é exposta a temperaturas superiores a 40°C (Lizotte e col., 1990), enquanto β-amilases de ginseng é inativada, após 10 minutos de reação, a 65°C e pH 5,0 (Yamasaki e col., 1989).

A energia de ativação de β-amilases de ervilhas, malte de cevada e trigo, calculada a partir das temperaturas 20 e 30°C, foi determinada na ordem de 6,3, 5,5 e 9,3 kcal/mol de maltose produzida através da utilização de amido solúvel como substrato, respectivamente (Lizotte e col., 1990).

Em relação a dados cinéticos, a Constante de Michaelis (K_m) foi determinada para β-amilases de ervilhas. O valor obtido foi de 1,67 mg/mL, através da utilização de amido como substrato (Lizotte e col., 1990). Para β-amilase de ginseng, o valor de K_m e $V_{máx}$ obtidos foram de 0,61% e 1,1 x 10^{-7}(M/mim), respectivamente, para hidrólise com amido (Yamasaki e col., 1989). Os valores de K_m e $V_{máx}$ apresentados por diversos autores são difíceis de serem comparados devido à especificidade de cada experimento.

2.4.3 – Enzimas amilolíticas de plantas

As α-amilases são raramente encontradas em sementes secas. Sabe-se que estas podem ser sintetizadas durante a germinação das sementes. Ao contrário, as β-amilases são sintetizadas na fase de amadurecimento porém não são sintetizadas durante a germinação. Entretanto, sementes de arroz e mostarda apresentaram um aumento na atividade β-amilásica durante a germinação. Em sementes secas de cereais, a β-amilase esta presente de duas formas: livre, correspondendo à enzima ativa e ligada, correspondendo à inativa. Durante a germinação das sementes, a β-amilase ligada é convertida na forma livre. Esse comportamento não foi observado em sementes secas de soja, lentilha e ervilhas contendo α-amilase e

tampouco a atividade enzimática aumenta durante a germinação das sementes (Yamamoto, 1994).

Estudos realizados com sementes de alfafa (*Mendicago sativa* L.) e cravo (*Trifolium repens*) apresentaram ambas as formas α- e β-amilásicas. Foram identificadas cinco isoformas de β-amilases em sementes secas e em plantas criadas a partir das sementes em alfafa. Quase todas as formas de β-amilases encontradas em alfafa apresentaram-se na forma livre e algumas isoformas mostraram um aumento durante a germinação. Estes resultados foram um pouco diferentes em relação a outros trabalhos realizados com β-amilases de grãos de cereais, tais como trigo e cevada. Por outro lado, α-amilases de sementes secas de alfafa apresentaram-se diferentes das β-amilases, uma vez que a quantidade de α-amilase diminui durante a germinação das sementes (Yamamoto, 1994).

Bulbos de tulipa (*Tulipa gesneriana*) vem sendo estudados extensivamente no que diz respeito a sua composição de carboidratos, tendo o amido como sua maior fonte de reserva. O papel da α-amilase na degradação do amido foi descrito por alguns autores. Em termos de caracterização enzimática, as amilases apresentaram pH e temperatura ótimos de atividade enzimática de 6,0 e 55°C. A atividade enzimática diminui substancialmente em temperaturas acima de 60°C. Essa enzima apresentou um valor de K_m de 1,28 mg/mL (utilizando amido como substrato). O aumento da concentração de íons Ca^{+2} aumenta a atividade enzimática da enzima, aumentando sua termoestabilidade. Esta enzima apresentou-se como uma típica endoamilase uma vez que hidrolisa alguns substratos tais como β-dextrina limite (Ranwala & Miller, 2000).

Na presença de íons metálicos, tais como Ca^{+2} e Co^{+2}, as endoamilases provenientes de bulbos de tulipa apresentaram um aumento em sua atividade enzimática enquanto que a presença de Mg^{+2} e Mn^{+2} não provocou nenhum tipo de alteração. A presença de outros íons, tais como Zn^{+2}, Hg^{+2}, Cu^{+2} e Ag^{+}, e de EDTA inibiram parcialmente a atividade endoamilásica (Ranwala & Miller, 2000).

Experimentos realizados com folhas de álamo indicaram que a α-amilase possui o papel mais importante na degradação do amido neste material em relação a outras enzimas. Para a identificação da enzima, após a sua purificação, foram realizados experimentos com diferentes substratos específicos. Comparada ao amido solúvel, a enzima apresentou menos de 1% de atividade quando o substrato utilizado foi o PNP-maltooligosacarídeo, substrato específico para β-amilase. Também não foi detectada a atividade enzimática em nenhum grau para outros substratos testados, tais como maltose, maltotriose e maltotetraose. Por outro lado, a enzima apresentou um alto grau de atividade enzimática na presença de amilose, amilopectina e β-dextrina limite, indicando uma caracterização consistente da enzima como α-amilase (Witt & Sauter, 1996).

Ensaios de caracterização enzimática foram realizados em folhas de álamo, indicando que o pH ótimo de atividade enzimática é altamente dependente do tipo de substrato utilizado durante os ensaios. Com amido azure, o pH ótimo de atividade enzimática encontra-se na faixa de 6,5 enquanto na presença de altas concentrações de DTT (10 mM), o pH ótimo encontra-se na faixa de 7,3. A razão para a dependência do pH a diferentes tipos de substrato não é muito clara; os autores sugerem que bandas eletroforéticas individuais da enzima podem apresentar diferentes valores de pH ótimos e substratos específicos (Witt & Sauter, 1996).

2.4.4 – Estudos realizados com amilases em tubérculos ricos em amido

Em relação à mandioquinha-salsa, nenhum estudo foi realizado até hoje no sentido de determinar as características bioquímicas de enzimas amilolíticas provenientes deste tubérculo. Entretanto, muitos trabalhos já foram realizados com outros tipos de raízes tuberosas, tais como batata, batata-doce, mandioca, inhame e ichoimo.

Trabalhos realizados com ichoimo, uma raiz tuberosa bastante consumida no Japão e similar ao inhame, mostraram que a β-amilase

proveniente deste tubérculo apresenta uma atividade enzimática máxima em pH 6,0. A enzima apresentou-se estável em pHs entre 4,3 e 8,5. Em relação à temperatura ótima de atividade enzimática, a enzima apresentou uma ótima atividade enzimática em torno de 55°C enquanto que a 70°C ocorre completa inativação. Na presença de concentrações de ácido ρ-cloromercuribenzóico (ρCMB) menores que 10^{-5} M ocorre uma completa inibição na atividade β-amilásica desse tubérculo. A atividade amilásica relativa se mantém a 100, 68 e 8% em concentrações mais baixas de ρCMB, 10^{-8}, 10^{-7} e 10^{-6}, respectivamente (Arai e col., 1991).

Foram realizados ensaios de atividade enzimática para α- e β-amilases provenientes de batata doce. Os resultados indicaram pHs ótimos de atividade enzimática entre 5,8 e 6,4 para atividade α-amilásica e entre 5,3 e 5,8, para atividade β-amilásica. A temperatura ótima de atividade enzimática foi de 71,5 e 53°C para α- e β-amilase, respectivamente. Foi observado, também, que a α-amilase necessita não só de íons Ca^{+2} como também de íons Mg^{+2} para a manutenção de sua atividade enzimática, apesar de apresentarem diferentes efeitos tanto na atividade quanto na estabilidade α-amilásica. No caso da β-amilase, não foi observada nenhuma dependência de íons metálicos para a sua ativação. Os valores de K_m e $V_{máx}$ encontrados para α- e β-amilases de batata doce foram de 2,08 mg/mL e 0,407 U/mL para α-amilase e 3,71 mg/mL e 0,969 U/mL para β-amilase (Hagenimana e col., 1994).

Para β-amilase de inhame, foram determinados valores de temperatura e pH ótimos de ativação enzimática de 60°C e 5,0, respectivamente (Takase e col., 1990), enquanto para amilases de mandioca, os valores de temperatura e pH ótimos determinados para atividade amilásica total foram de 60°C e 6,0 (Matos da Veiga e col., 2000).

3 – OBJETIVO

Os objetivos do presente trabalho foram de identificar e caracterizar as enzimas amilolíticas presentes no extrato aquoso de raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Cv. Amarelo comum). O desenvolvimento experimental teve como etapas a determinação de(a):

1. parâmetros de temperatura e de pH ótimos de atividade enzimática;
2. estabilidade térmica e em função do pH;
3. influência de íons na atividade amilolítica do extrato enzimático;
4. parâmetros cinéticos das enzimas amilolíticas do extrato enzimático, tais como K_m, V_{max} e E_a aparentes;
5. atividade de água (A_w) de amostras comerciais de mandioquinha-salsa e determinação da atividade amilolítica do extrato enzimático dessas raízes durante um período de estocagem de 9 dias.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – MATERIAL

Raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. cv Amarelo comum), colhidas no mesmo dia, cultivadas na região de São Bento do Sapucaí (SP), não lavadas, constituíram o material deste trabalho. As raízes foram embaladas em sacos de polietileno e armazenadas sob congelamento (–18°C) até a sua utilização.

Um lote de cerca de 60 raízes selecionadas foi adquirido no comércio local e mantido a temperatura ambiente (em torno de 25°C) para os ensaios do acompanhamento da atividade enzimática, atividade de água e quantidade de proteínas ao longo do período de armazenamento.

Diversos reagentes, tais como amido de batata, EDTA, Coomassie Brilhant Blue, acrilamida, fosfato de sódio, foram adquiridos da empresa Sigma Co. Os demais reagentes de uso comum em laboratório eram de grau analítico.

4.2 – MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos, pelo menos, por três vezes.

4.2.1 – Extrato enzimático

As raízes de mandioquinha-salsa foram descongeladas e lavadas para a remoção de terra e impurezas. Após a remoção da casca, a raiz foi cortada em pequenos cubos (± 2,0cm de aresta); rotineiramente cerca de 250 g de amostra foram homogeneizadas com 100 mL de água destilada em liquidificador comum. Após a trituração, o homogenato foi filtrado e centrifugado (duas vezes, para que fosse possível remoção de parte do

material decantado entre cada uma das centrifugações) a 13.000 x *g*, por 30 min, a 4°C. Em seguida, a amostra foi dialisada contra água destilada à temperatura de 4°C, por um período mínimo de 12 h, e armazenada em tubos Eppendorf de 1,5 mL, a –18°C, até a sua utilização; para cada 250 g de mandioquinha triturada na presença de 100 mL de água, foram obtidos 180 mL de extrato bruto após a diálise; os tubos foram descongelados conforme a necessidade para execução dos ensaios. O pH do extrato enzimático obtido após a diálise permaneceu em torno de 7,0.

No caso das raízes comerciais de mandioquinha-salsa armazenadas a temperatura ambiente, foram preparados extratos enzimáticos referentes a 1, 3, 4 e 8 dias de armazenamento. Para o preparo do extrato enzimático, foram escolhidas de maneira aleatória 4 raízes de mandioquinha-salsa. O preparo do extrato enzimático e suas condições de armazenamento foram as mesmas descritas anteriormente.

4.2.2. – Determinação do teor de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Bradford, 1976, utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão. Para a determinação da curva padrão, foram pipetados de 0 a 70 μL de uma solução contendo 1mg/mL de BSA em cada tubo de ensaio e o volume foi completado com água destilada até 100 μL. Após a adição de 5 mL do reagente de Bradford (Comassie Brilhante Blue G-200, 0,01%; etanol, 4,7%; ácido fosfórico, 8,5% e água destilada, 86,79%), foi feita a leitura de absorbância a um comprimento de onda de 595 nm. A curva padrão (absorbância vs concentração de BSA conhecida) foi utilizada na determinação da quantidade de proteína do extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa.

4.2.3 – Determinação da atividade hidrolítica total

Para detecção da atividade hidrolítica, foi empregado o método da medida do complexo amido-iodo modificado (Street, 1974). Para tanto, foram utilizados 100 μL de uma solução de extrato enzimático e NaCl 0,1M (1:1), incubados na presença de 200 μL de uma solução de amido de batata 0,1%, 500 μL de solução tampão fosfato pH 6,9, 20 mM de $CaCl_2$ e 200μL de uma solução de HCl 0,01M, adicionados no momento da reação. A reação foi interrompida pela adição de 400μL de solução de iodo I_2 10 mM e KI 14 mM. Para a determinação de valores de referência, não foi feita a adição de extrato enzimático e 100 μL de água destilada foram adicionadas nos tubos de reação. A leitura de absorbância foi feita num comprimento de onda de 578 nm após a adição de 8,6 mL de água, completando 10 mL de volume de reação. Uma unidade de atividade amilásica (U) foi definida como sendo a quantidade de amido (em nanogramas) hidrolisada por minuto por miligrama de proteína presente no extrato enzimático, a 37°C.

O cálculo da atividade enzimática foi determinado a partir das seguintes condições:

Atividade enzimática = $[(E_o - E_1) / E_o] \times A \times (1/t) \times (1/M)$ [U];

Onde:

E_o = Leitura de absorbância, a 578 nm, dos valores de referência, correspondentes a não adição do extrato enzimático (branco de reação);

E_1 = Leitura de absorbância, a 578 nm, dos valores correspondentes a adição do extrato enzimático;

A = 200 ng de amido adicionados nos ensaios de atividade (para cada 200 μL de solução de amido 0,1% adicionados nos tubos, estão presentes 200 ng de amido);

t = tempo de reação, equivalente a 15 minutos;

M = Quantidade de proteína, em mg, presentes no extrato enzimático (para cada 50μL de extrato enzimático, adicionados nos ensaios de atividade, estavam presentes cerca de 0,01 mg de proteína).

A medida do complexo amido-iodo modificado, descrita anteriormente, foi utilizada nos ensaios para a determinação do tempo de incubação do extrato enzimático, determinação da temperatura e pH ótimos de ativação enzimática, estabilidade térmica e em função do pH, presença de íons, influência de diferentes concentrações de Ca^{+2}, bem como na determinação de parâmetros cinéticos e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), descritos a seguir.

4.2.4 – Tempo de incubação do extrato enzimático

Para a determinação do tempo de incubação do extrato enzimático a ser utilizado em ensaios posteriores, o extrato enzimático foi incubado em diferentes temperaturas (40, 50 e 60°C), por intervalos de tempo que variaram de 0 a 120 min, na presença de substrato. A metodologia utilizada para a determinação da atividade hidrolítica foi a medida do complexo amido-iodo modificado, descrita anteriormente. Neste ensaio, a escolha das temperaturas estudadas baseou-se nas temperaturas ótimas de ativação enzimática para diferentes tipos de α- e β-amilases citadas na literatura (Greenwood & Milne, 1968; Kulp, 1975; Matos da Veiga e col., 2000; Tkachuk & Kruger, 1972).

4.2.5 – Efeito da temperatura

A temperatura ótima de atividade enzimática foi determinada através da incubação do extrato enzimático em temperaturas que variaram de 25 a 70°C, em solução tampão fosfato pH 6,9, na presença de substrato, durante 15 minutos. A temperatura ótima de atividade enzimática foi descrita como a temperatura na qual houve a maior diminuição da intensidade de cor do complexo amido-iodo, avaliada segundo os procedimentos descritos anteriormente.

Para a determinação da estabilidade térmica, o extrato enzimático foi pré-incubado em diferentes temperaturas (entre 20 e 70°C), por diferentes intervalos de tempo. A atividade amilásica residual foi determinada a 50°C, por 15 min, a pH 6,9.

4.2.6 – Efeito do pH

Nos ensaios para a avaliação do pH ótimo de atividade hidrolítica, o extrato enzimático foi incubado em soluções tamponadas: entre os pHs 3,7 e 5,5 foi utilizada uma solução tampão acetato 0,2 M; entre os pHs 6,0 e 8,0, tampão fosfato 0,2 M; entre pH 8,0 e 10,0, tampão de ácido bórico–cloreto de potássio 0,1 M. Em todas as soluções acima foi adicionado o substrato, seguindo-se uma incubação por 15 minutos, a 50°C.

A avaliação do efeito do pH sobre a estabilidade amilásica foi determinada através da pré-incubação do extrato enzimático em diferentes valores de pH (de 4,0 a 10,0), durante 15 minutos a 5 e 50°C e por 24 h, a 5°C. Em seguida foi determinada a atividade amilásica residual, a 50°C, por 15 min, a pH 6,0.

4.2.7 – Efeito de íons

Para verificar o efeito da presença de cátions na atividade amilásica, o extrato enzimático foi pré-incubado a 50 e 70°C, por 15 minutos. Em seguida, foi determinada a atividade amilásica na presença de íons Ca^{+2}, Mg^{+2}, Mn^{+2}, Cu^{+2} e de EDTA. O EDTA foi usado na concentração final de 2,5 mM. Os cátions utilizados foram adicionados através de soluções de $CaCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$ e $CuSO_4$ nas concentrações de 0,2 mM, 0,2 mM, 2,5 mM e 1,0 mM, respectivamente. Para a obtenção de valores de referência, os mesmos ensaios foram realizados sem a incubação prévia do extrato enzimático a 50 ou 70°C.

4.2.8 – Efeito de diferentes concentrações de Ca^{+2}

O efeito das diferentes concentrações de Ca^{+2} na atividade enzimática foi avaliado através da incubação do extrato enzimático em soluções tampão fosfato 0,2 M, pH 6,0, e tampão maleato de sódio, 0,2 M, pH 6,0, contendo diferentes concentrações de $CaCl_2$, que variaram de 0 a 2,0 mM, durante 15 minutos, a 50°C.

4.2.9 – Parâmetros cinéticos

Para a determinação da energia de ativação catalisada pela enzima, foi construído o gráfico de Arrhenius considerando as temperaturas de 25 a 70°C. O valor da E_a foi obtido através do cálculo da tangente na reta do gráfico construído em temperatura absoluta versus o logarítimo da atividade enzimática (U).

O gráfico de Michaelis-Menten foi obtido através da determinação da atividade enzimática com variação da concentração de substrato (50 a 300ng/mL). O gráfico de Lineweaver-Burk foi construído através da inversão dos valores de concentração de amido versus atividade enzimática. Os

valores de K_m e $V_{máx}$ foram calculados a partir do ponto que intercepta o eixo 1/S e 1/V no gráfico de Lineweaver-Burk.

4.2.10 – Eletroforese

Foi utilizada a eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida descrita por Finardi-Filho e Lajolo, 1982, para a identificação das bandas de atividade amilásica bem como para a revelação de proteínas do extrato, quando corada com Coomassie Brilhante blue R. A composição do gel de eletroforese utilizado na detecção das bandas protéicas foi de: acrilamida/Bis, 25%; amido a 0,5%; Tris-HCl, 12,5%, solução a 10% de persulfato de amônio, 0,8%, TEMED, 0,06% e água destilada, 51,6%. A revelação de atividade enzimática foi realizada após a corrida eletroforética do extrato, sendo o gel inserido em solução tampão fosfato 0,2 M pH 6,0, em banho-maria a 37°C, durante 1 h, para que fossem detectadas as bandas protéicas com atividade amilolítica. O mesmo procedimento foi repetido sem a adição de amido no gel, para que o extrato enzimático não ficasse retido na parte superior do gel de eletroforese. Neste experimento, após a corrida do extrato enzimático no gel de eletroforese, o gel foi inserido, em paralelo, em soluções tampão fosfato 0,2 M pH 6,0 e tampão maleato 0,2 M pH 6,0, contendo amido a 0,5%, em banho-maria a 37°C, durante 1 hora, para que fossem detectadas as bandas protéicas com atividade amilolítica. O extrato enzimático utilizado nessa determinação foi previamente liofilizado.

4.2.11 – Metodologia de Superfície de Resposta

Modelo Experimental – O Delineamento Central Composto (DCC) foi usado com duas variáveis e seis replicatas no ponto central. As duas variáveis de processo estudadas incluíram a variação de pH e temperatura.

Os quatro pontos experimentais (-1,-1), (-1,1), (1,-1) e (1,1) formaram o modelo fatorial 2^2. Quatro pontos axiais adicionais (2,0), (-2,0), (0,2) e (0,-2) aumentaram a região de dependência. As seis replicatas do ponto central (0,0) completaram o Delineamento Central Composto (DCC).

As condições experimentais do ponto central foram:

pH = 6,0

Temperatura = 50°C

Os números experimentais, escala de valores e valores reais são dados na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições experimentais de determinação de atividade enzimática em valores reais e em escala.

Experimentos	Valores de Escala		Valores Experimentais	
	x_1	x_2	pH	Temperatura (°C)
1	-1	-1	5,5	45
2	-1	1	5,5	55
3	1	-1	6,5	45
4	1	1	6,5	55
5	0	0	6,0	50
6	0	0	6,0	50
7	0	0	6,0	50
8	1,414	0	6,7	50
9	-1,414	0	5,3	50
10	0	1,414	6,0	57
11	0	-1,414	6,0	43
12	0	0	6,0	50
13	0	0	6,0	50
14	0	0	6,0	50

As escalas de valores foram:

x_1 = (pH – 6,0) / 0,5 onde o pH variou de 5,3 a 6,7

x_2 = (Temperatura – 50) / 10 onde a temperatura variou de 43 a 57°C

Atividade enzimática – o extrato enzimático foi incubado nos diferentes pHs e temperaturas (Tabela 6), por 15 minutos, de acordo com a metodologia do complexo amido-iodo, descrita anteriormente.

Análise de dados – O Delineamento Central Composto (DCC) torna possível aproximar dados medidos experimentalmente (y_{obs}) utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) , expressa em:

$$y_{obs} = b_o + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1x_1 + b_{22}x_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + e$$

$$e = y_{obs} - y_{cal}$$

onde b_o é a constante; b_1 e b_2 expressam o efeito de cada variável no processo, b_{12} mostra o efeito de interação entre as variáveis e b_{11} e b_{22} apresenta o efeito dos quadrados das variáveis. y_{obs} representa a variável dependente (atividade enzimática), x_1 e x_2 representam o pH e temperatura de atividade enzimática, respectivamente. A diferença entre os dados experimentais (y_{obs}) e o modelo (y_{cal}) nos dá o resíduo (e). Os resultados foram determinados pelo programa Statistica. A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi estimada através de regressão linear múltipla para os 14 experimentos no delineamento central composto (DCC). As replicatas no ponto central possibilitam a estimação do erro puro da análise, o qual é utilizado para prever se o modelo nos dá um "lack-of-fit" significante (Rutgersson e col., 1997). A confiança do modelo é calculada através do valor de R^2 (variação da resposta do modelo).

4.2.12 – Atividade de água (Aw)

Para a avaliação da atividade de água de raízes comerciais de mandioquinha-salsa, três raízes selecionadas ao acaso foram descascadas e trituradas em gral. Dois gramas de raízes trituradas foram acondicionados recipientes próprios para esse tipo de determinação, em triplicata. A determinação de atividade de água foi feita a 25°C, nos dias referentes ao 1°, 4°, 5° e 9° dias de armazenamento. Para a leitura de atividade de água, as amostras permaneceram cerca de 4h em contato com o analisador para que houvesse estabilidade na leitura. O equipamento utilizado para esta determinação foi o AW-center, modelo NOVAZINA.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Determinação do tempo de incubação do extrato enzimático

Com base em resultados de atividade amilolítica em outros vegetais (Greenwood & Milne, 1968; Kulp, 1975; Matos da Veiga e col., 2000; Tkachuk & Kruger, 1972), o extrato de mandioquinha-salsa foi incubado em temperaturas de 40, 50 e 60°C na presença de substrato por intervalos de tempo de até 120 min (Figura 4). No ensaio, foi verificado que os perfis de atividade amilásica seguem comportamentos distintos em função da temperatura.

A incubação a 40°C revelou a atividade segundo uma curva sigmóide, com um breve período de indução da enzima, até 10 min, seguida de rápida elevação na degradação do substrato até cerca de 30 min. A partir desse ponto, a curva de atividade sofre uma inflexão, com redução da velocidade de degradação do amido. O mesmo comportamento inicial é constatado na incubação a 60°C, porém ocorre uma diminuição expressiva na hidrólise de substrato a partir de 60 minutos de reação, em conseqüência da queda de atividade enzimática.

Um perfil sigmóide foi registrado na temperatura intermediária de incubação (50°C), na qual a curva de atividade se assemelha a uma reação de primeira ordem até cerca de 30 min, não apresentando períodos de indução como nos casos anteriores de 40 e 60°C. Na temperatura de 50°C, a atividade enzimática atinge sua velocidade máxima desde os primeiros minutos de incubação.

Em função desse experimento, foi fixado o tempo de reação de 15min para a realização dos ensaios posteriores de atividade amilásica, considerando que nesse período a velocidade de hidrólise do substrato seria máxima, prevalecendo sobre a velocidade de desnaturação da enzima.

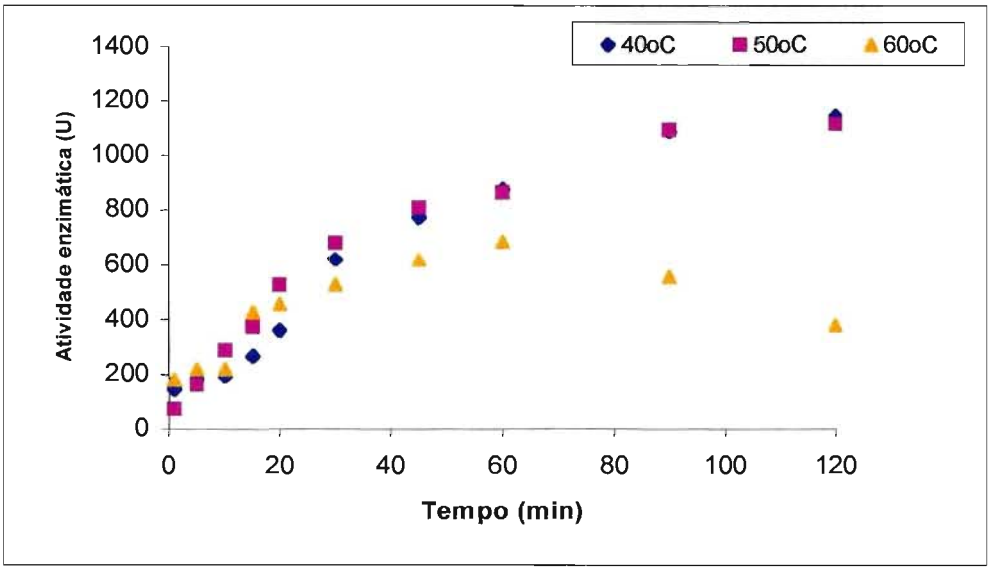

Figura 4 – Efeito da temperatura na atividade amilásica de extrato de raízes de mandioquinha-salsa: determinação do tempo de incubação do extrato enzimático. O gráfico representa a medida de atividade enzimática após diferentes tempos de exposição (até 120 minutos) a temperaturas de 40, 50 e 60°C. Uma unidade de atividade enzimática (U) representa quantidade de amido (em nanogramas) hidrolisada por minuto por miligrama de proteína presente no extrato enzimático.

5.2 – Temperatura

Os resultados a seguir (Figuras 5 a 7) fazem parte de um conjunto de ensaios realizados com o extrato enzimático de mandioquinha-salsa visando a determinação da temperatura de melhor atividade enzimática na hidrólise do amido.

A Figura 5 apresenta um perfil próprio de atividade em função da temperatura de incubação, com valor máximo detectado a 50°C. Nota-se que há uma certa redução de atividade entre 50 e 60°C, porém com manutenção de cerca de 80% de atividade nesta segunda temperatura. No entanto, o extrato enzimático apresenta um rápido declínio em sua atividade quando incubado em temperaturas superiores a 60°C, com um resíduo de apenas 20% da atividade máxima a 70°C.

Este comportamento indica que a temperatura de melhor atividade amilolítica do extrato situa-se muito próxima da temperatura de desnaturação. Em comparação com resultados de outros vegetais, a atividade amilásica da mandioquinha-salsa mostrou-se abaixo, porém não muito distante, das temperaturas ótimas de enzimas de mandioca, 60°C (Matos da Veiga e col., 2000) e β-amilases de inhame, também 60°C (Takase & col., 1990), de 55°C para amilases de ichoimo (Arai e col., 1991) e de 71,5°C e 53°C para α- e β-amilases de batata doce, respectivamente (Hagenimana e col., 1994).

Os ensaios de estabilidade térmica das enzimas amilolíticas de mandioquinha-salsa foram realizados em temperaturas que variaram de 20 a 70°C, por até 25 h (Figuras 6 e 7). Os resultados confirmaram as expectativas de maior conservação da atividade hidrolítica em temperaturas de 20 e 30°C. Nessas condições, o extrato enzimático manteve 90 e 75% de atividade, respectivamente, após 25 h de incubação (Figura 7). Em temperaturas superiores, apesar de num primeiro momento promover a atividade amilolítica conforme foi visto na Figura 5, há desestabilização das enzimas a partir de 40°C e de forma mais acentuada a 50°C, porém

mantendo atividades residuais acima de 65% em ensaios de até 5 h de incubação (Figura 7).

Os resultados mostram que a instabilidade das enzimas é maior nas temperaturas de 60 e 70°C, com perda progressiva de atividade enzimática desde os primeiros minutos do ensaio. (Figura 6) A estabilidade do extrato enzimático, medida através da atividade amilásica residual, segue uma tendência linear até a temperatura de 50°C, com perda exponencial de atividade nas temperaturas de 60 e 70°C (Figuras 6 e 7).

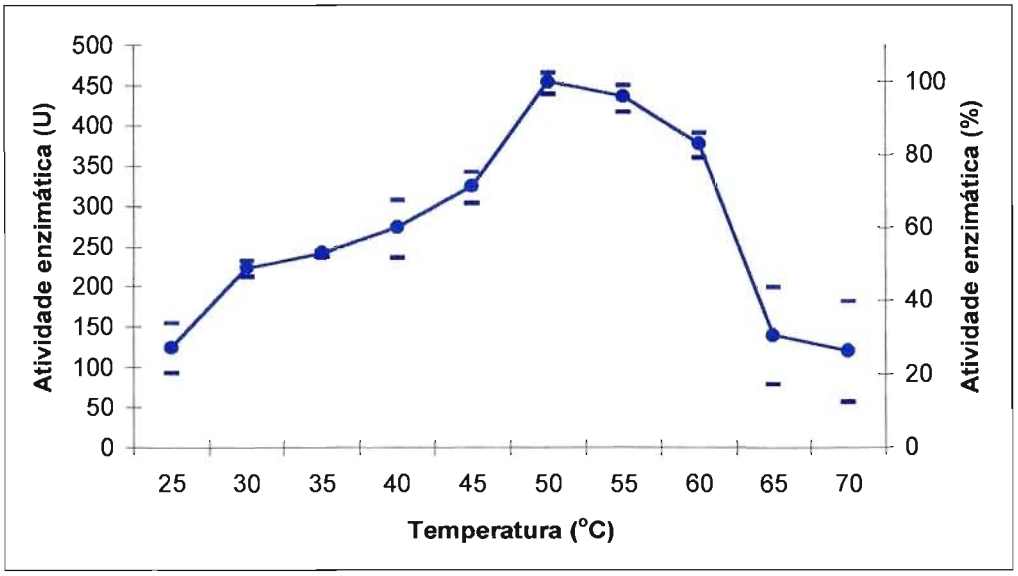

Figura 5 – Efeito da temperatura na atividade amilásica do extrato de raízes de mandioquinha-salsa: determinação da temperatura ótima de atividade enzimática. O gráfico representa os valores médios de atividade enzimática determinados para cada temperatura, bem como o desvio padrão de cada conjunto de determinações. Uma unidade de atividade enzimática (U) representa quantidade de amido (em nanogramas) hidrolisada por minuto por miligrama de proteína presente no extrato enzimático. A atividade enzimática foi expressa também em atividade enzimática relativa (%); a 50°C, o extrato enzimático apresenta-se com atividade máxima (100%), que corresponde a 451 U.

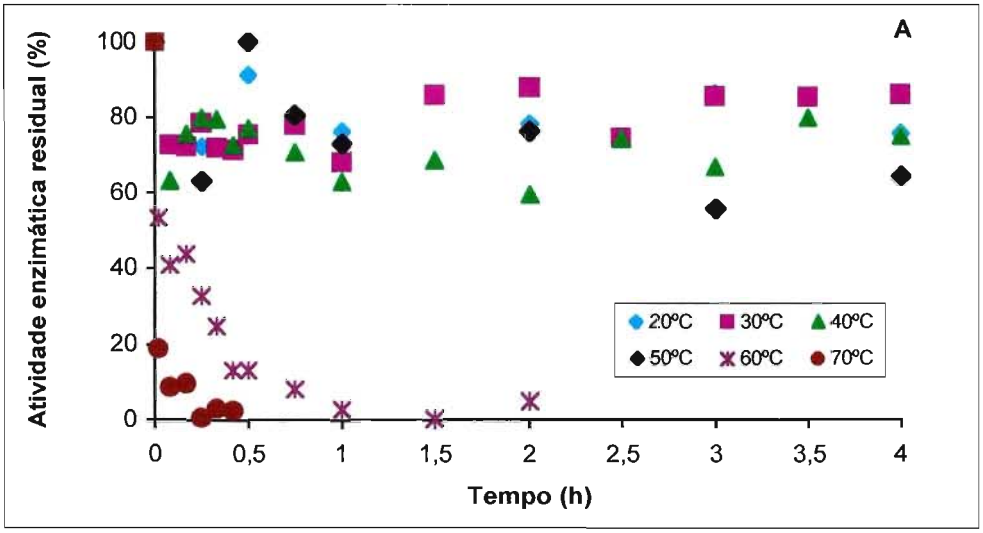

Figura 6 – Atividade amilásica residual: efeito da temperatura na estabilidade térmica enzimática do extrato de raízes de mandioquinha-salsa em até 4 h de incubação. A atividade amilásica residual foi determinada após diferentes tempos de exposição, em temperaturas que variaram de 20 a 70°C. A atividade enzimática foi expressa, também, em atividade enzimática relativa (%). A 50°C, após o período de incubação de 30 minutos, o extrato enzimático apresenta-se com atividade máxima (100%), que corresponde a 649 U.

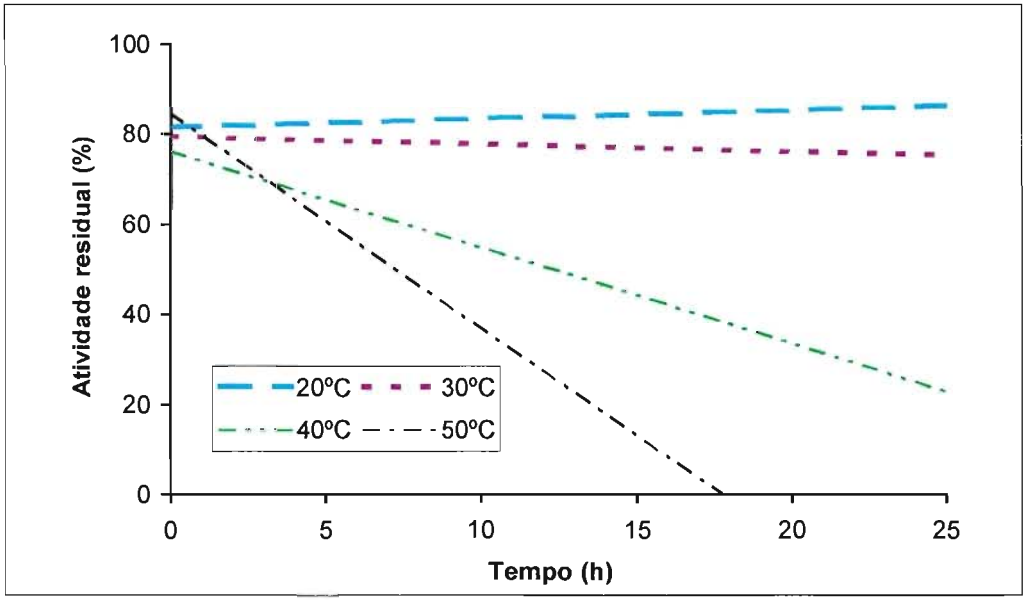

Figura 7 – Atividade amilásica residual: efeito da temperatura na estabilidade térmica enzimática do extrato de raízes de mandioquinha-salsa em até 25 h de incubação. A atividade amilásica residual foi determinada após diferentes tempos de exposição, em temperaturas que variaram de 20 a 50°C (curvas de tendências). A atividade enzimática foi expressa em atividade enzimática relativa (%). A 50°C, após o período de incubação de 30 minutos, o extrato enzimático apresenta-se com atividade máxima (100%), que corresponde a 649 U.

5.3 – pH

O efeito da variação do pH do meio é demonstrado através dos resultados de dois ensaios (Figuras 8 e 9). A Figura 8 mostra que o pH ótimo para a determinação da atividade amilásica situa-se em torno de 6,0, com mínima dispersão entre os resultados individuais. Em pH 6,0, o extrato enzimático apresenta-se com atividade máxima, que corresponde a 620 U. Em procedimento semelhante, o mesmo resultado foi apresentado em extratos de mandioca (Matos da Veiga e col., 2000) e ichoimo (Arai e col., 1991), provavelmente pela similaridade de natureza de ambas amostras, enquanto para β-amilases de inhame o pH ótimo de atividade enzimática encontrado foi de 5,0 (Takase e col., 1990). Em amilases de cereais, os valores de pH de máxima atividade encontram-se entre 5,0 e 6,0 para α-amilase e entre 4,0 e 6,0 para β-amilase (Thoma e col., 1959).

No segundo ensaio, após incubação por 15 min em duas temperaturas distintas, as enzimas tornaram-se relativamente mais estáveis a pHs alcalinos quando a incubação ocorre a 5°C, quando comparadas a incubação a 50°C (Figura 9). Nessa temperatura, as amilases demonstraram a capacidade de manter uma alta atividade amilásica em pHs entre 6,0 e 9,0. Hageninama e col. (1994) obtiveram resultados similares para α-amilases de batata-doce. Diversos estudos anteriores mostram que α-amilases provenientes de plantas são geralmente estáveis em pHs entre 5,5 e 8,0 (Swain & Dekker, 1966). Uma provável explicação para essa diferença de comportamento parece estar relacionada ao grau de ionização das moléculas e às mudanças conformacionais que pode ocorrer na estrutura protéica da enzima em pH alcalino, potencializadas pela alta temperatura.

Após 24 h de incubação a 5°C, a curva de estabilidade enzimática em função do pH apresentou-se muito similar à curva de estabilidade quando o extrato foi incubado a 50°C, por 15 minutos. No entanto, foi observada uma perda acentuada de atividade em pH 6,0, em torno de 45%, e um aumento de atividade de 10%, em média, para pHs alcalinos (pHs 9,0 e 10,0).

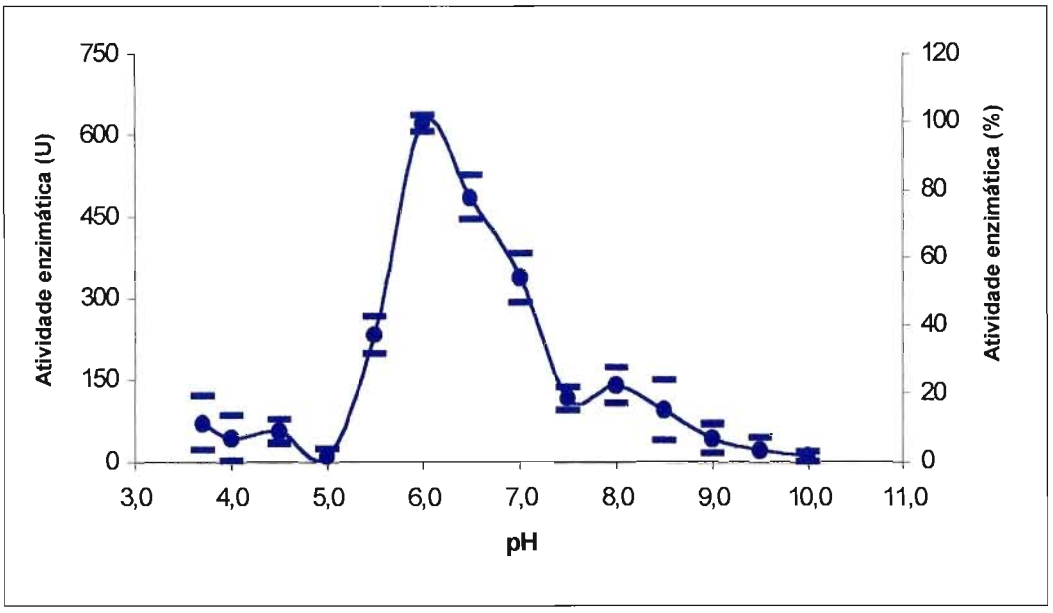

Figura 8 – Efeito do pH na atividade amilásica do extrato de raízes de mandioquinha-salsa: determinação do pH ótimo de atividade enzimática. O gráfico representa os valores médios de atividade enzimática determinados para cada pH e respectivo desvio padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) representa a quantidade de amido (em nanogramas) hidrolisada por minuto por miligrama de proteína presente no extrato enzimático. A atividade enzimática foi expressa, também, em atividade enzimática relativa (%). A pH 6,0, o extrato enzimático apresenta-se com atividade máxima (100%), que corresponde a 620 U.

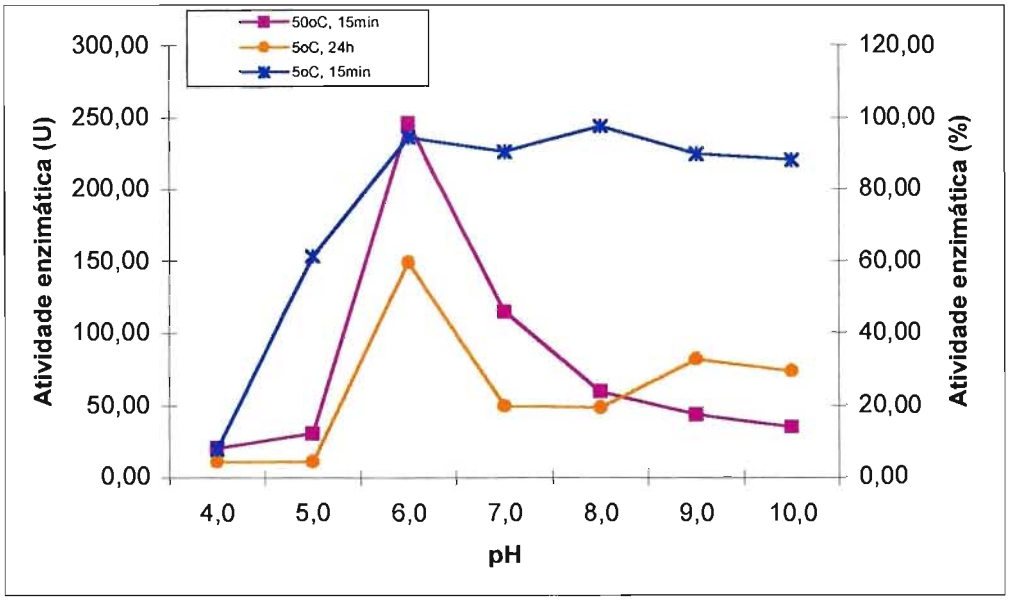

Figura 9 – Atividade amilásica residual: efeito do pH na estabilidade da atividade enzimática do extrato de raízes de mandioquinha-salsa após pré-incubação do extrato a 5 e 50°C por 15 minutos e 5°C, por 24 hs. Uma unidade de atividade enzimática (U) representa quantidade de amido (em nanogramas) hidrolisada por minuto por miligrama de proteína presente no extrato enzimático. A atividade enzimática foi expressa, também, em atividade enzimática relativa (%). A pH 6,0, após a pré-incubação do extrato enzimático a 50°C, por 15 minutos, o extrato enzimático apresenta-se com atividade máxima (100%), que corresponde a 245 U.

5.4 – Presença de íons

Os resultados apresentados na Tabela 7 indicam que a presença de $CaCl_2$ aumenta a atividade amilásica em 95% em relação à atividade enzimática do extrato não-incubado previamente. A presença de EDTA, agente quelante de cátions, reduz 53% da atividade amilásica original, demonstrando que as enzimas são dependentes de íons Ca^{+2}. A incorporação de $MgCl_2$ ao extrato original também aumenta a atividade amilásica, porém em 34%. Quando o EDTA é adicionado na presença de Ca^{+2}, a atividade amilásica é reduzida a 73% da atividade amilásica original, enquanto na presença de Mg^{+2}, a atividade é reduzida a 34%. A adição de $CuSO_4$ diminui a atividade em 39%. Quando $MnCl_2$ é adicionado, praticamente não ocorre alteração na atividade amilásica, mostrando que o Mn^{+2} não substitui os anteriores, Ca^{+2} e Mg^{+2}, na ativação da amilase.

No ensaio em que o extrato foi pré-incubado a 50°C, os resultados mostraram uma diminuição de somente 5% da atividade amilásica total. A adição de Ca^{+2} aumenta a atividade amilásica em 60% enquanto que a adição de Mg^{+2} praticamente não causa alteração. A adição de EDTA, neste caso, reduz a atividade em 23%. No entanto, o EDTA não provocou alteração significativa quando na presença de Ca^{+2} e Mg^{+2} (em relação a sua ação na ausência destes íons), onde a atividade foi reduzida a 25% em ambos os casos. Esses resultados indicam que, no caso da pré-incubação a 50°C, a adição de Ca^{+2} não causa alteração significativa no aumento da atividade amilásica quando na presença de EDTA, ao contrário do que foi observado em ensaios onde o extrato não sofreu incubação prévia. Estranhamente, apenas nesta condição, a presença de Mn^{+2} aumentou a atividade amilásica em torno de 15%.

Tabela 7 – Efeito da adição de íons na atividade amilásica do extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa mediante a pré-incubação do extrato a 50 e 70°C, por 15 minutos, e sem pré-incubação deste*.

	Atividade enzimática (%)			Atividade enzimática (U)		
Tratamento	Sem pré-incubação	50°C, 15 min	70°C, 15 min	Sem pré-incubação	50°C, 15 min	70°C, 15 min
Sem adição de íons	100	95	6	275	262	17
Ca^{+2}	195	152	10	537	419	28
Mg^{+2}	134	96	8	369	264	22
EDTA	47	22	23	129	61	63
Ca^{+2}, EDTA	73	24	13	201	66	36
Mg^{+2}, EDTA	34	24	13	94	66	36
Mn^{+2}	98	114	20	270	314	55
Cu^{+2}	39	26	14	107	72	39

* Uma unidade de atividade enzimática (U) representa quantidade de amido (em nanogramas) hidrolisada por minuto por miligrama de proteína presente no extrato enzimático.

Em todos os casos, a pré-incubação a 70°C diminuiu a atividade amilásica. Nesta temperatura, grande parte das enzimas presentes no extrato é desnaturada, perdendo sua atividade enzimática. As α-amilases provenientes de plantas possuem íons cálcio em sua estrutura (Thoma e col., 1959). Apesar de não participarem do sítio ativo, o cátion estabiliza a estrutura da enzima. Os resultados acima mostram a possível existência de α-amilases no extrato de mandioquinha-salsa. A presença necessária de Ca^{+2}, ou de Mg^{+2}, é um indicativo da ação de α-amilases e a detecção de um nível residual de atividade através da remoção destes íons com EDTA, pode

vir a ser um indício da ação de β-amilases, que não necessitam de nenhum tipo de metal para a sua ativação.

Resultados semelhantes sobre o papel protetor do Ca^{+2} foram obtidos em estudos com α-amilases de ervilha (*Pisum sativum* L.) e de feijão-de-corda Pituba (*Vigna unguiculata* L.). As α-amilases de ervilha apresentaram-se extremamente termosensíveis quando na ausência de Ca^{+2}. No entanto, a pré-incubação com $CaCl_2$ a 30°C, por 4 h foi suficiente para a preservação de 77% da atividade amilásica. A pré-incubação da enzima na ausência de cálcio, a 30°C, por 25 min, provocou uma redução significativa na atividade amilásica (19%). A presença de Ca^{+2} contribui para a proteção da enzima contra a inativação térmica (Beers & Duke, 1990).

Em relação às α-amilases de feijão-de-corda, as enzimas apresentaram-se extremamente sensíveis a altas temperaturas quando na ausência de Ca^{+2}, havendo perda total de sua atividade quando expostas a 70°C, por 5 mim. A adição de íons cálcio ajuda a estabilizar termicamente a enzima (Bastos e col., 1994).

Alguns metais pesados têm mostrado poder de inibição da atividade amilásica, tais como o mercúrio, a prata, o cobre e o chumbo (Swain & Dekker, 1966). Nos extratos de mandioquinha o Mn^{+2} parece não afetar a atividade enzimática, exceto quando incubados a 50°C. No entanto, o Cu^{+2} desestabiliza a enzima mantendo os níveis de atividade semelhantes aos dos tratamentos com EDTA. Estes comportamentos não têm correspondência com enzimas de fontes diferentes. Em α-amilase produzida por bactérias, por exemplo, os íons Mg^{+2}, Mn^{+2} e Ca^{+2} no meio de reação não causam alteração nos valores de atividade amilásica, enquanto que a presença de Cu^{+2} diminui a atividade amilásica em 51% (Santos, 1997).

Hageninama e col. (1994), trabalhando com batata-doce, utilizaram concentrações mais altas de EDTA, $CaCl_2$ e $MgCl_2$, 10 mM, 5 mM e 5 mM, respectivamente, em seus experimentos. No presente trabalho, as concentrações destes íons foram adaptadas às condições experimentais para evitar a interferência do iodo utilizado na detecção de atividade

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

enzimática. Em relação aos outros íons, Aguilar e col. (2000) realizaram experimentos com amilases de *Lactobacillus manihotivorans* utilizando $MnCl_2$ e $CuSO_4$ em concentrações finais de 10 mM. Em ambos trabalhos os autores obtiveram resultados de organismos com maior atividade amilásica, que tanto poderiam ser explicados pela maior expressão das enzimas quanto pela maior atividade específica, justificando-se o emprego de reagentes menos sensíveis do que o método do iodo/iodeto. Como os cátions Mn^{+2} e Cu^{+2} precipitavam nas concentrações utilizadas nos trabalhos acima descritos, foram testadas concentrações mais baixas em ensaios preliminares, sem prejuízo dos efeitos constatados pelos íons.

5.5 – Efeito de diferentes concentrações de Ca^{+2} na atividade amilásica

A Figura 10 representa o efeito de diferentes concentrações de Ca^{+2} na atividade enzimática do extrato de raízes de mandioquinha-salsa, quando incubadas em dois tipos de solução tampão: maleato de sódio 0,2 M, pH 6,0 e fosfato 0,2 M, pH 6,0. O tampão maleato foi utilizado no sentido de evitar a ação de fosforilases, que poderiam ser ativadas em tampão fosfato, bem como para evitar a formação de cristais de fosfato de cálcio nas concentrações mais altas do cátion.

A atividade enzimática apresenta uma certa estabilidade quando incubada em tampão maleato de sódio a partir de concentrações de Ca^{+2} na ordem de 0,2 mM. Entretanto, quando a incubação ocorre em tampão fosfato, observa-se um aumento na atividade enzimática do extrato em concentrações de até 1,0 mM de Ca^{+2}. A partir dessa concentração, a atividade enzimática permanece estável na presença de até 2,0mM de Ca^{+2}.

Comparando os valores de atividade amilásica na presença de íons (Tabela 7), pode-se observar que a atividade enzimática praticamente dobrou na presença de concentração de 0,2 mM de íons Ca^{+2}, o que não ocorreu no experimento seguinte, quando o extrato enzimático foi incubado em diferentes concentrações de Ca^{+2}. Nesta concentração de 0,2 M, houve um aumento de 25% e 18% na atividade enzimática (Figura 10) quando o extrato foi incubado em tampão fosfato e tampão maleato de sódio, respectivamente.

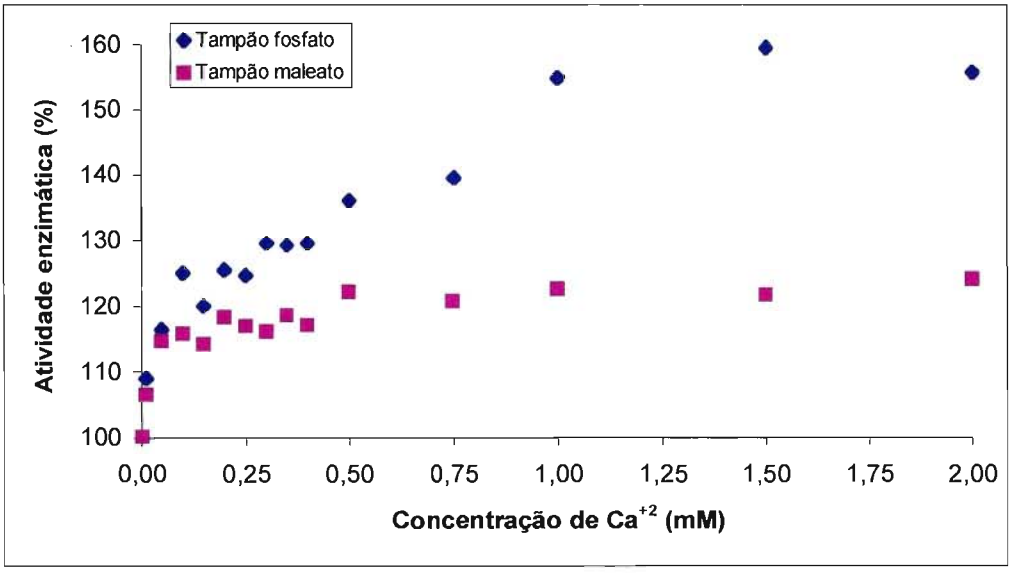

Figura 10 – Efeito de diferentes concentrações de Ca^{+2} na atividade amilásica do extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa em tampão fosfato pH 6,0 (representado pela curva azul) e em tampão maleato de sódio 0,2 M, pH 6,0 (representado pela curva rosa). A atividade enzimática foi expressa em atividade enzimática relativa (%). Sem adição de íons Ca^{+2}, o extrato enzimático apresenta-se com atividade amilásica de 100%, que corresponde a 632 U e 621 U para os extratos incubados na presença de tampão fosfato e tampão maleato de sódio, respectivamente.

5.6 – Energia de ativação aparente

O valor de E_a, obtido através do valor da tangente na reta entre os valores crescentes de atividade no gráfico de Arrhenius, foi de 7,53 kcal/mol (Figura 11). Calculando a E_a de α-amilase de batata doce descrita por Hageninama e col. (1994), o valor obtido foi de, aproximadamente, 8,40 kcal/mol, similar ao obtido no presente trabalho. Swain & Dekker (1966) obtiveram um valor de E_a de 7,6 kcal/mol.

A E_a de α-amilases de plantas, animais e microrganismos, estão representados na Tabela 3 (página 15). Os valores variam de 5 kcal/mol para α-amilases de fava até 15 kcal/mol para α-amilases de *Bacillus subtilis* (Greenwood e col., 1965; Greenwood & Milne, 1968; Tkachuk & Kruger, 1972). A energia de ativação de β-amilases de ervilhas, malte e trigo, foi determinada na ordem de 6,28, 5,5 e 9,3 kcal/mol de maltose produzida através da utilização de amido solúvel como substrato, respectivamente (Lizotte e col., 1990).

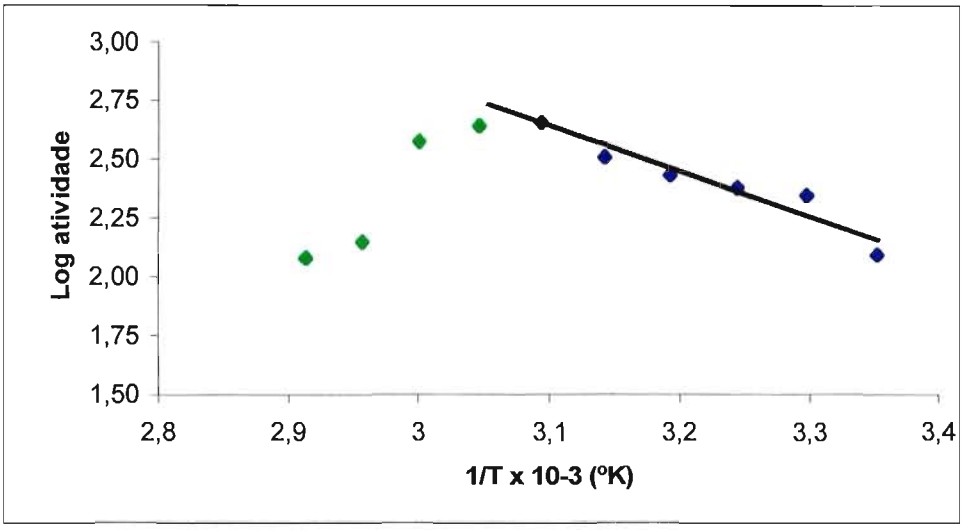

Figura 11 – Efeito da temperatura na atividade amilásica do extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa – gráfico de Arrhenius. A equação da reta tangente: $y = -1,8574\,x + 8,3844$; $R^2 = 0,9169$.

5.7 – Determinação de K_m e V_{max} aparentes

Os gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burke são mostrados nas Figuras 12 e 13. Os valores de K_m e V_{max} obtidos através do gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 13) foram de 0,41 mg/mL e 1,11 mg/mL/min, respectivamente. Comparativamente, os valores de K_m e V_{max} encontrados em diversos trabalhos mostram a diversidade de comportamento das enzimas amilolíticas. Aguilar e col. (2000) encontraram para α-amilase bacteriana valores de 3,44 mg/mL e 0,45 mg/mL/min, respectivamente. Hageninama e col. (1994) obtiveram K_m = 2,08 mg/mL e V_{max} = 0,407 mg/mL/min para α-amilases de batata doce e de 3,71 mg/mL e 0,969 mg/mL/min para β-amilases. Swain & Dekker (1966) obtiveram um valor de K_m de 0,2 mg/mL para α-amilases de ervilhas.

Os valores de K_m e V_{max} obtidos por outros autores são diferentes dos valores obtidos neste trabalho devido a diversos fatores, tais como a fonte da enzima, o grau de purificação da amostra, o tipo de enzima envolvida e suas características estruturais e físico-químicas. Todas essas enzimas citadas, ao contrário das analisadas neste estudo, foram previamente purificadas e concentradas, o que lhes confere, conseqüentemente, maiores valores de constantes cinéticas, sobretudo se as enzimas forem extracelulares, como as de origem bacteriana. O baixo valor de K_m determinado no presente trabalho pode ser devido à baixa atividade amilásica presente no extrato bruto ou a baixa concentração das enzimas amilolíticas nas raízes de mandioquinha-salsa.

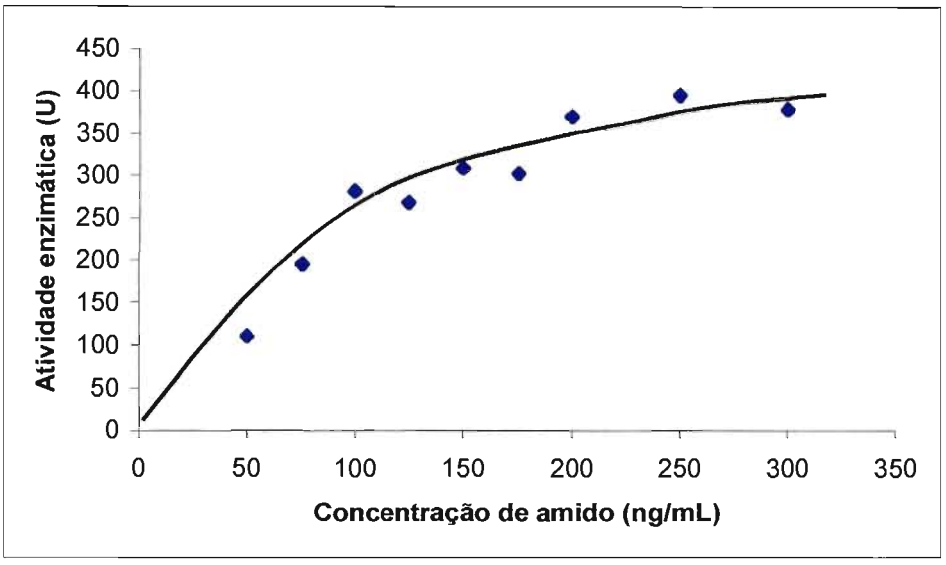

Figura 12 – Efeito da concentração de substrato na atividade amilásica do extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa – gráfico de Michaelis-Menten.

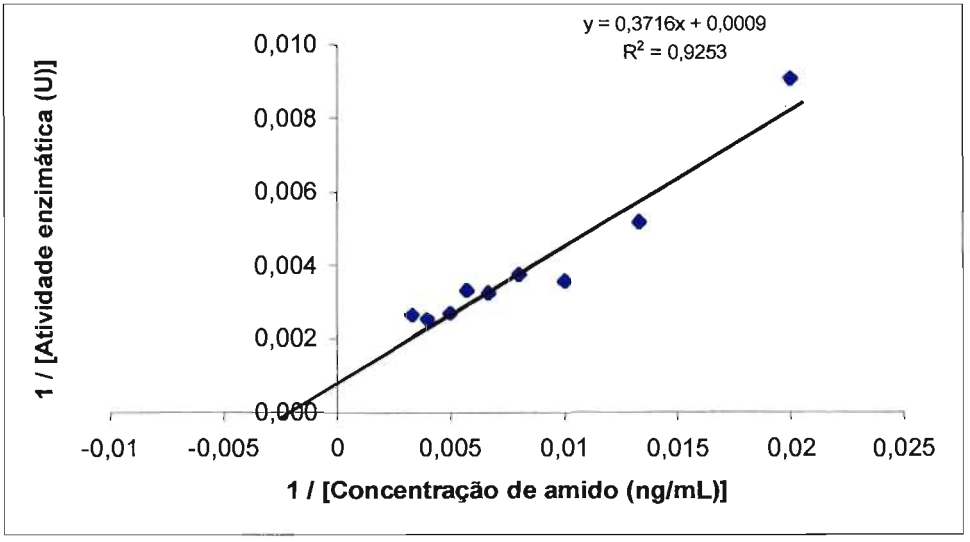

Figura 13 – Efeito da concentração de substrato na atividade amilásica do extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa – gráfico de Lineweaver-Burk.

5.8 – Eletroforese

O extrato enzimático utilizado para a determinação da eletroforese foi previamente liofilizado uma vez que a concentração original das enzimas presentes nesse extrato era muito baixa. Sem a liofilização da amostra, não foi possível a detecção de bandas protéicas no gel de eletroforese deste extrato.

Três bandas protéicas com atividade amilolítica, presentes no extrato enzimático, foram detectadas em gel de eletroforese (Figura 14). Através do deslocamento das bandas pode-se notar a migração de duas bandas próximas (a e b) de intensidade similar e de uma terceira banda isolada (c) de atividade menor do que as anteriores. Pelas características apresentadas é possível supor que se tratam de duas α-amilases e uma β-amilase.

Os valores de retenção para cada uma das bandas a, b e c, detectadas no gel de eletroforese, foram de 0,022, 0,065 e 0,228, respectivamente.

Não foi observada nenhuma mudança de comportamento das bandas protéicas com atividade hidrolítica quando o gel de eletroforese foi preparado sem a incorporação de amido; tanto em solução tampão maleato de sódio 0,2 M quanto em solução de tampão fosfato 0,2 M, as bandas protéicas se mantiveram com o mesmo perfil, afastando a hipótese da ação de fosforilases sobre o gel de eletroforese.

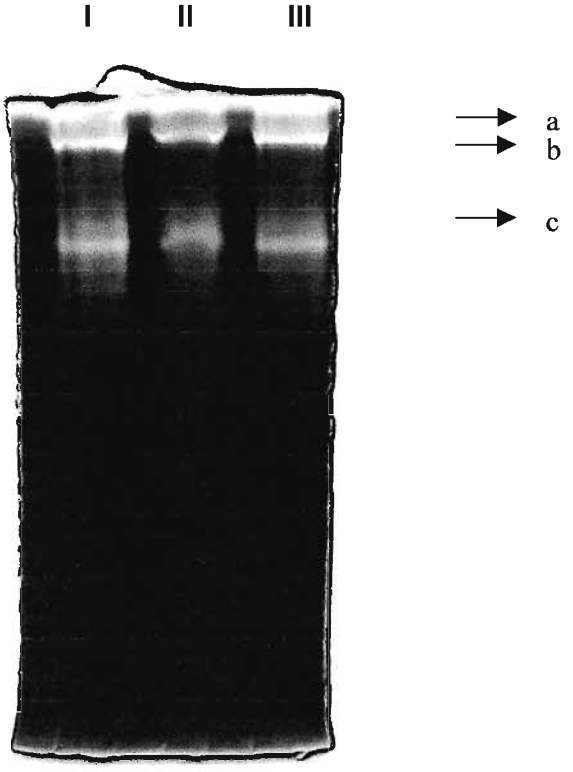

Figura 14 – Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida 25% e amido a 0,5%, de extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa. A placa foi pré-incubada em tampão fosfato pH 6,0 para que fosse feita a revelação com iodo. A figura apresenta três bandas protéicas (a, b e c) com atividade hidrolítica sobre o amido. I, II e III representam repetições do mesmo extrato enzimático.

5.9 - Metodologia de superfície de resposta

Atividade Enzimática

Os resultados dos 14 experimentos estão apresentados na Tabela 8. Os resultados foram avaliados estatisticamente por regressão linear múltipla. A Metodologia de Superfície de Resposta, incluindo os 14 experimentos do modelo, foi estimada. O modelo matemático, expresso em escala de variáveis, foi:

$$y_{cal} = 759{,}54 + 200{,}79\,x - 204{,}34\,x^2 - 133{,}67\,y - 152{,}87\,y^2 + 38{,}16\,xy$$

O pH (x), o termo quadrático do pH (x^2), a temperatura (y) e o termo quadrático da temperatura (y^2) foram significativos ($P<0{,}05$) e influenciam na atividade amilásica. O modelo apresentou um "lack-of-fit" significativo (9686,6) e R^2=0,98818. Geralmente o modelo é considerado excelente se R^2 é maior que 0,9. Assim, esse modelo pode ser considerado estatisticamente significativo. A Tabela 9 representa os valores de análise de regressão múltipla para o modelo.

Tabela 8 – Variáveis independentes e de resposta em experimentos para a determinação de parâmetros ótimos de atividade amilásica.

Experimento	pH	Temperatura (°C)	Atividade amilásica*
1	5,5	45	331
2	5,5	55	51
3	6,5	45	682
4	6,5	55	555
5	6,0	50	747
6	6,0	50	773
7	6,0	50	779
8	6,7	50	614
9	5,3	50	83
10	6,0	57	217
11	6,0	43	686
12	6,0	50	770
13	6,0	50	745
14	6,0	50	743

*A atividade enzimática é dada por quantidade de amido (em nanogramas) hidrolisada por minuto, por miligrama de proteína presente no extrato enzimático de mandioquinha-salsa.

Tabela 9 – Análise de regressão múltipla para o modelo de segunda ordem para a resposta: atividade enzimática.

Variável Independente	Coeficiente de regressão	Valor-t	Nível de significância
Constante	759,537	50,1790	0,000000
x_1	200,792	15,3164	0,000000
x_2	-204,342	-14,9735	0,000000
x_1^2	-133,669	-10,1963	0,000007
x_2^2	-152,871	-11,2019	0,000004
x_1x_2	38,158	2,0583	0,073549

	Soma dos quadrados	DF	Média quadrática	F	Valor-P
Modelo	9686,6	3	3228,9	12,315	0,009558
Erro	1310,9	5	262,2		

$R^2 = 0,98818$

A temperatura e pH ótimos de atividade enzimática para amilases de mandioquinha foram determinados, inicialmente, através de metodologias convencionais. Os experimentos de caracterização enzimática iniciaram-se pela determinação da temperatura ótima de atividade enzimática, a um pH fixo citado na literatura, que poderia não ser o pH ótimo de atividade enzimática. Em seguida foram realizados ensaios para a determinação do valor ótimo de pH para a atividade amilásica, já utilizando dados experimentais de temperatura ideal, obtido no experimento anterior.

A aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta foi utilizada para determinar, simultaneamente, quais seriam os valores de pH e temperatura que maximizam a atividade amilásica, a partir de dados já conhecidos experimentalmente. Assim, os resultados iniciais foram refinados a partir do modelo estatístico empregado.

Através dos gráficos de Metodologia de Superfície de Resposta (Figuras 15 e 16), pode-se observar que a atividade enzimática máxima encontra-se no pico da superfíe (Figura 15) ou no centro da elipse formada (Figura 16). Na figura 26 pode-se observar que o ponto central da elipse corresponde aos pontos (0,45;-0,4). A partir deste experimento, pode-se dizer que a temperatura ótima de atividade enzimática é em torno de 46°C, enquanto que o pH, em torno de 6,2. Esses valores apresentaram-se muito próximos aos valores estipulados inicialmente para o ponto central (pH 6,0 e 50°C), os quais foram determinados experimentalmente como sendo os valores ótimos de pH e temperatura de atividade enzimática.

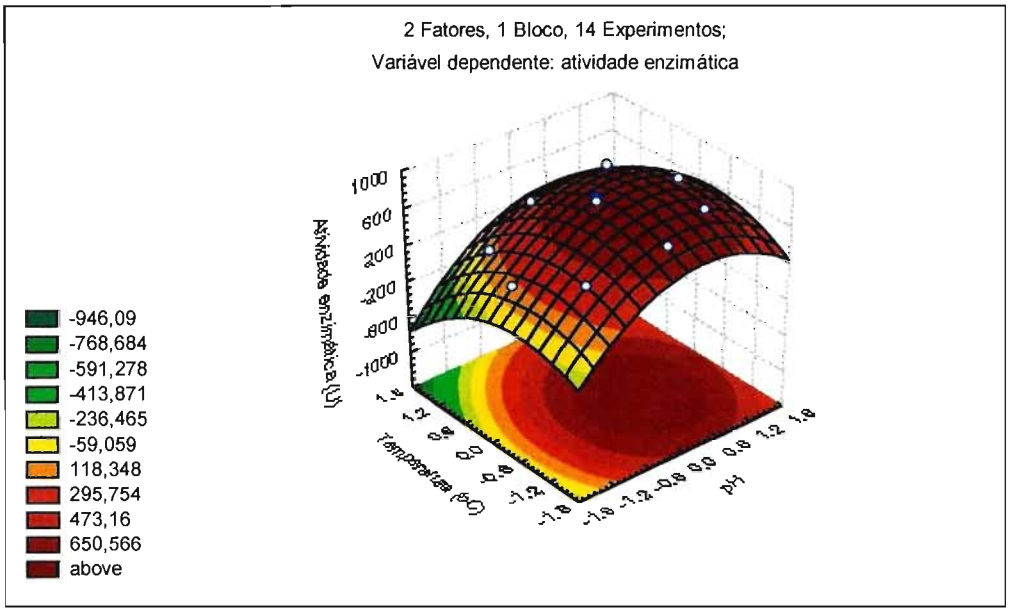

Figura 15 – Superfície de metodologia de resposta para o efeito do pH e temperatura na atividade amilásica de extrato de raízes de mandioquinha-salsa.

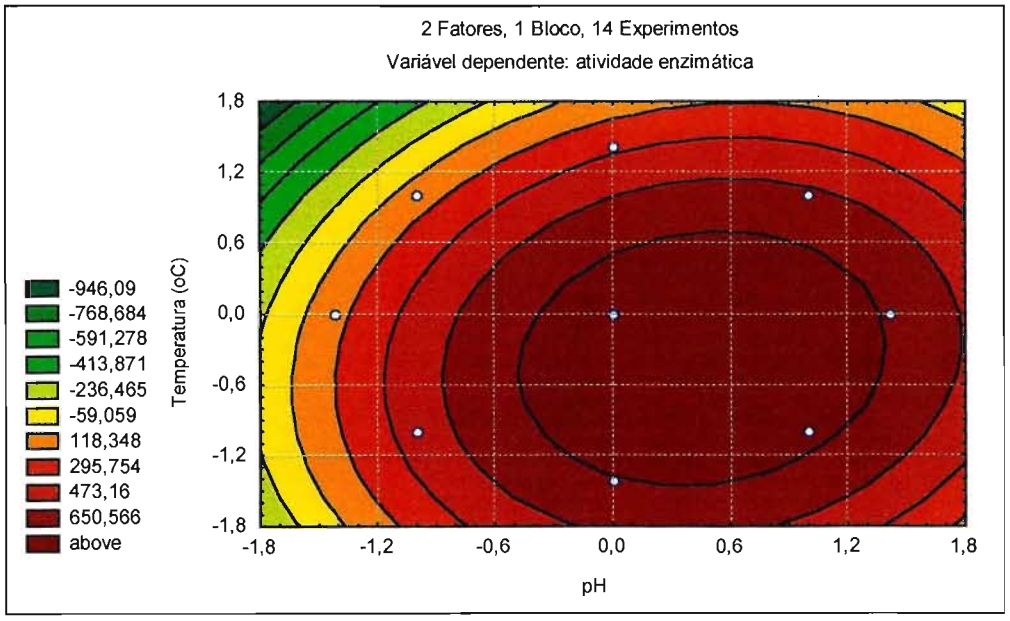

Figura 16 – Superfície de metodologia de resposta para o efeito do pH e temperatura na atividade amilásica de extrato de raízes de mandioquinha-salsa.

5.10 – Atividade de água (Aw)

As raízes de mandioquinha-salsa armazenadas à temperatura ambiente, em torno de 25°C, foram submetidas à determinação de atividade de água. Após um período de armazenamento de 9 dias, as raízes apresentaram um aumento considerável na atividade de água, que variou de 0,955 no primeiro dia de estocagem até 0,974 após nove dias de armazenamento (Figura 17). O aumento da atividade de água nas amostras está diretamente relacionado ao amolecimento das raízes, principalmente em amostras que apresentaram maior grau de injúria superficial, evidenciada por pontos de escurecimento, seguido de alterações teciduais e posterior desenvolvimento de bolores. Entre os dias 4 e 5 de armazenamento, houve um aumento de 0,965 a 0,972.

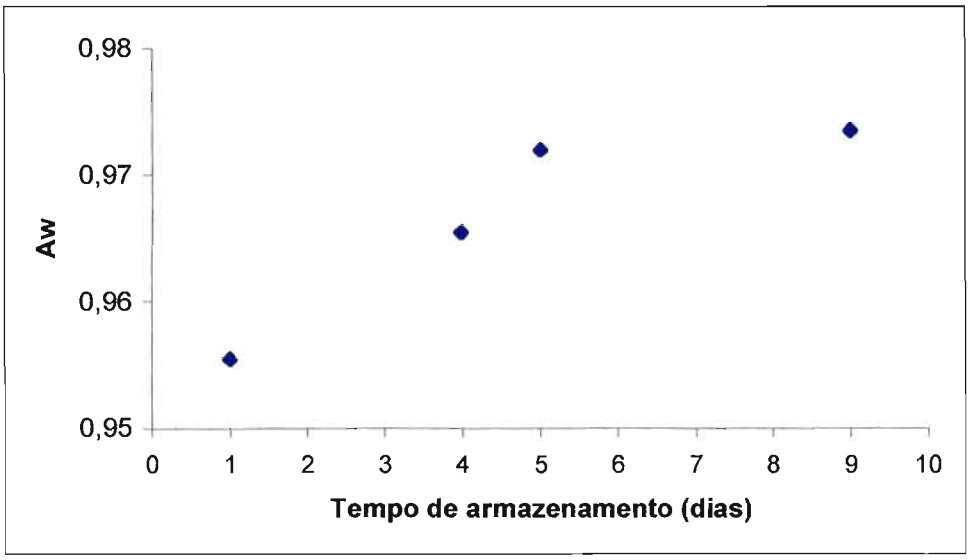

Figura 17 – Variação da atividade de água (Aw) de raízes de mandioquinha-salsa após um período de armazenamento de 9 dias em temperatura ambiente (em média 25°C).

5.11 – Determinação do teor de proteínas

O extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa armazenadas a temperatura ambiente (em torno de 25°C) foi submetido à determinação da quantidade de proteína. Após um período de armazenamento de 8 dias, o extrato enzimático apresentou uma oscilação na quantidade total de proteínas (Figura 18). No quarto dia de armazenamento pode-se observar um aumento na quantidade de proteína do extrato enzimático, que coincide com o aumento de Aw nos dias 4 e 5 (Figuras 17 e 18).

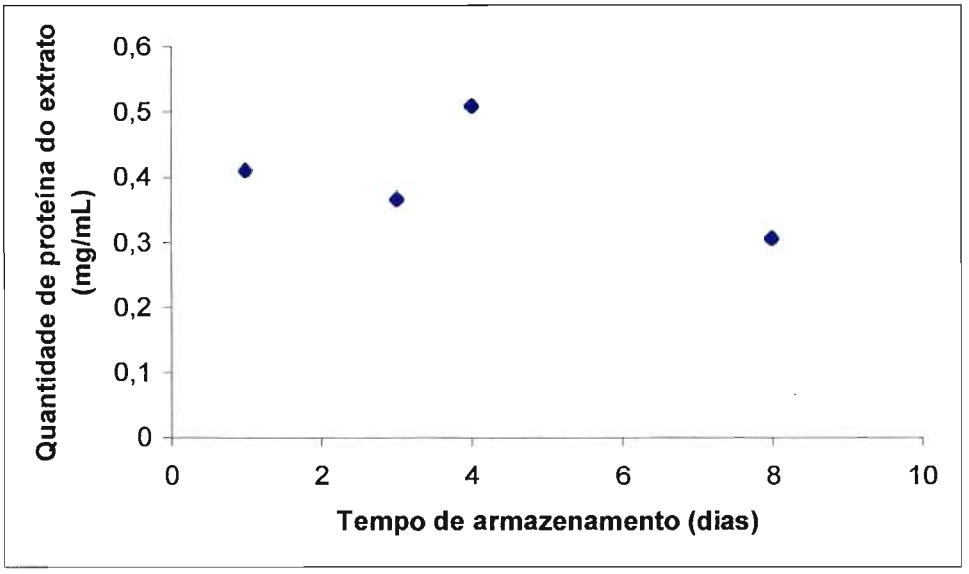

Figura 18 - Variação da concentração de proteína em extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa durante um período de armazenamento de 9 dias em temperatura ambiente (em média 25°C).

5.12 – Determinação da atividade hidrolítica

O extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa armazenadas a temperatura ambiente (em torno de 25°C) foi submetido à determinação da atividade hidrolítica do amido. O extrato enzimático apresentou uma oscilação na atividade hidrolítica durante o período de armazemento (Figura 19). No entanto, foi observado um aumento na atividade hidrolítica no quarto dia de armazenamento, que esta diretamente relacionada com o aumento da concentração de proteína do extrato enzimático e com o aumento da atividade de água das raízes (Figuras 17, 18 e 19). O perfil da curva de atividade hidrolítica do extrato enzimático das raízes (Figura 19) é muito semelhante ao gráfico de concentração de proteína (Figura 18).

O aumento da atividade amilolítica do extrato enzimático, bem como sua concentração de proteínas e atividade de água das raízes, pode estar relacionado ao curto período de estocagem das raízes de mandioquinha-salsa a temperatura ambiente. Porém, apenas a ação desse grupo enzimático não é suficiente para explicar as alterações constatadas de escurecimento, perda de textura e propagação de crescimento microbiano superficial. Outras enzimas intracelulares podem estar contribuindo nessas alterações. No entanto, seriam necessários novos experimentos com enzimas intra e extracelulares (provenientes de microrganismos responsáveis pela degradação deste tubérculo) para a confirmação desta hipótese.

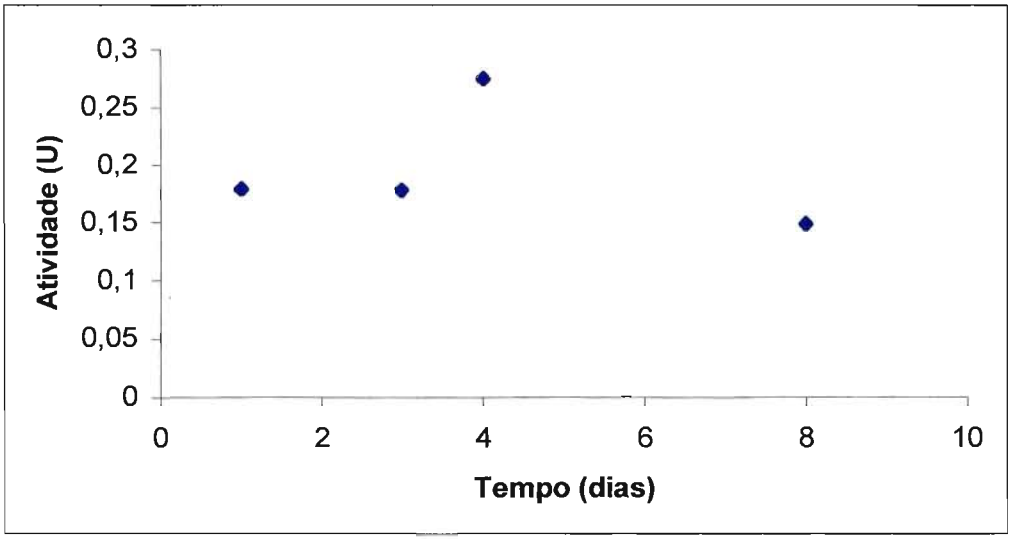

Figura 19 - Variação da atividade hidrolítica do extrato enzimático de raízes de mandioquinha-salsa durante um período de armazenamento de 9 dias em temperatura ambiente (em média 25°C).

6 – CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos no presente trabalho a respeito da atividade amilolítica em raízes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Cv. Amarelo comum), é possível concluir que:

1. há pelo menos três bandas protéicas com atividade amilolítica ativas no extrato enzimático de mandioquinha-salsa;
2. o extrato enzimático apresentou uma máxima atividade hidrolítica a 46°C e pH ótimo em torno de 6,2;
3. a 5°C, a atividade amilásica mostrou-se tão alta em pH 6,0 quanto em pH 9,0 em ensaios de estabilidade;
4. a hidrólise do amido pelas enzimas aumenta na presença de Ca^{+2} e mantém 47% de sua atividade original na presença de EDTA;
5. raízes comerciais de mandioquinha-salsa armazenadas sob temperatura ambiente apresentaram um aumento na atividade de água de suas raízes, bem como uma oscilação na quantidade de proteínas e atividade hidrolítica do extrato enzimático;
6. o conjunto de resultados demonstra que as enzimas amilolíticas endógenas não são as principais responsáveis pelo mecanismo de deterioração da mandioquinha-salsa.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, G., MORLON-GUYOT, J., TREJO-AGUILAR, B., GUYOT, J.P. Purification and characterization of an extracellular α-amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*, Surrey, v.27, p.406-413, 2000.

ARAI, T., KAWABATA, A, TANIGUCHI, H. Purification and some properties of ichoimo β-amylase. *Agriculture and Biological Chemistry*, Tokyo, v.55 (2), p.399-405, 1991.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. Metodologia de Superfície de Resposta. In: **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Editora da Unicamp, Campinas,1996, cap.5, p.133-186.

BASTOS, J.L.P., PRISCO, J.T., GOMES-FILHO, E. Purification and characterization of a cotyledonary α-amylase from cowpea seedlings. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina,v.6 (1), p.33-39, 1994.

BEERS, E.P., DUKE, S.H. Characterization of α-amylase from shoots and cotyledons of pea (*Pisum sativum L.*) seedlings. *Plant Physiology*, Rockville, v.92, p.1154-1163,1990.

BEMMILLER, J.N., WHISTLER, R.L. Carbohydrates. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3ª ed., Marcel Dekker, New York, USA, 1996, 1069p.

BRADFORD, M.M. A Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry*, New York, v.72, p.248-254, 1976.

BUGG, T. **An introduction to enzyme and coenzyme chemistry**. 8ª ed, Cambridge, Mass. Blackwell Science, 1997. 247p.

CASALI, V.W.D., SEDYAMA, M.A.N. Origem e botânica da mandioquinha-salsa. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.19, n.190, p.13-14, 1997.

CHÁVEZ-JÁUREGUI, R.N., SILVA, M.E.M.P., ARÊAS, J.A.G. Extrusion cooking for amaranth (*Amarantus caudatus* L.). *Journal of Food Science*, Chicago, v.65, n.6, p.1009-1015, 2000.

COLLINS, P.M. **Carbohydrates**. Chapman and Hall, London and New York, 1987, 719p.

DE MOT, R., VERACHTERT, H. Purification and characterization of extracellular α-amylase and glucoamylase from yeast *Candida antartica* CBS 6678. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v.164, p.643-654, 1987.

DUNN, G. A model for starch breakdown in higher plants. *Phytochemistry*, Oxford, v.13, p.1341-1346, 1974.

FINARDI-FILHO, F., LAJOLO, F.M. Identificação eletroforética de α-amilase em géis de poliacrilamida-amilopectina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.2, p.21-32, 1982.

FISHER, E., STEIN, E. α-amylases. In: BOYER, P.D., LARDY, H., and MYRBACK, K. **The Enzymes**. 2 rd Rev, Ed. Academic Press, New York, 1959, v.4, p. 313-343.

FRENCH, D. β-amylases. In: BOYER, P.D., LARDY, H., and MYRBACK, K. **The Enzymes**, 2 nd Rev, Ed. Academic Press, New York, 1959, v.4, p.345-368.

GERTLER, A., BIRK, Y. Purification and characterization of a β-amylase from soya beans. *Biochemistry Journal*, v.95, p.621-627, 1965.

GORISTEIN, S. Kinetic studies during enzyme hydrolysis of potato and cassava starches. *Stärke/Starch*, Weinheim, v.45, n.3, p.91-95, 1993.

GREENWOOD, C.T., MacGREGOR, A.W. and ANN MILNE, E. The α-amylases from broad beans: purification and properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, v.112, p.459-465, 1965.

GREENWOOD, C.T., MILNE, E.A. Starch degrading and synthesizing enzymes: a discussion of their properties and action pattern. In: WOLFROM, M.L., TIPSON, R.S. **Advances in carbohydrate chemistry**. Academic Press, New York and London, 1968, v.23, p.305-343.

GUZMÁN-MALDONADO, H., PAREDES-LÓPEZ, O. Amylolytic enzymes and products from starch: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* Boca Raton, v.35 (5), p.373-403, 1995.

HAGENIMANA, V., VÉZINA, L.P., SIMARD, R.E. Sweet potato α- and β-amylases: characterization and kinetic studies with endogenous inhibitors. *Journal of Food Science,* Chicago, v.59, n.2, p.373-377, 1994.

HENZ, G.P. Métodos de Conservação Pós-colheita de Mandioquinha-salsa. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE A MANDIOQUINHA-SALSA, 5., 1995, Venda Nova do Imigrante, ES. Palestra e Trabalhos Técnicos... Venda Nova do Imigrante: SOB, 1995. p.21-24.

KULP. K. Carbohydrases. In: REDD, G. **Enzymes in Food Processing**. Academic Press, New York, 1975, p.53-117.

LEE, B.I., CHEONG, C.G., SUH, S.W. Crystal structure of β-amylase from sweet potato. Disponível em http://www.rcsb.org Acesso em 11 set. 2001.

LIZOTTE, P.A., HENSON, C.A., DUKE, S.H. Purification and characterization of pea epicotyl β-amylase. *Plant Physiology*, Rockville, v.92, p.615-621, 1990.

MATOS DA VEIGA, E., PICANÇO MAGALHÃES, C., FINARDI-FILHO, F. Isolamento e caracterização inicial de amilases em raízes de mandioca (*Manihot suculenta*). In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. Fortaleza, 2000, vol.2, Resumo p.5.89.

McCANN, A.K., BARNETT, J.A. The utilization of starch by yeasts. *Yeast,* Chichester, v.2, p.109-115, 1986.

MIKAMI, B., DEGANO, M., HEHRE, E.J., SACCHETTINI, J.C. Crystal Structures of soybean β-amylase reacted with β-maltose and maltal: active site components and their apparent roles of catalysis. Disponível em: http://www.rcsb.org Acesso em 11 set. 2001.

PEREIRA, A.S. O valor nutritivo da mandioquinha-salsa. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE A MANDIOQUINHA-SALSA, 5., 1995, Venda Nova do Imigrante, ES. Palestra e Trabalhos Técnicos... Venda Nova do Imigrante: SOB, 1995. p.14-16.

RAMASUBBU, N. Human salivary amylase. Disponível em: http://www.rcsb.org Acesso em 11 set. 2001.

RANWALA, A.P., MILLER, W.B. Purification and characterization of an endoamylase from tulip (*Tulipa gesneviana*) bulbs. *Physiologia Plantarum*, Kobenhavn, v.109, p.388-395, 2000.

RUTGERSSON, A., BERGMAN, E-L., LINGNERT. H., SANDBERG, A.S. Optimization of temperature, time and lactic acid concentration to inactivate lipoxygenase and lipase and preserve phytase activity in barley (cv. Blenheim) during soaking. *Cereal Chemistry*, St. Paul, v.74, n.6, p.727-732, 1997.

SANTOS, F.F. dos. A Cultura da Mandioquinha-salsa no Brasil. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 1997, v.19, n.190, p.5-7.

SILVANOVICH, M.P; HILL, R.D. α-Amylases from triticale 6A190: purification and characterization. *Cereal Chemistry*, St. Paul, v.54, n.6, p.1270-1281, 1977.

STREET, H.V. Glycoside hydrolyses – amylases: measurement of starch-iodine complex. In: BERGMEYER, H. **Methods of Enzyme Analyses**, v.2, second edition, Academic Press, New York, 1974.

SUBBARAMAIAH, K., SHARMA, R. Characterization of β-amylase from *Sinapis alba* Cityledons, *Phytochemistry,* Oxford, v.29, n.5, p.1417-1419, 1990.

SUCKLING, C.J. **Enzyme Chemistry: Impact and Applications**. Second Edition, Ed. Chapman and Hall, 1990, 383p.

SWAIN, R.R., DEKKER, E.E. Purification and properties of an α-amylase from the cotyledons of germinating peas. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v.122, p.75-86, 1966.

SWIFT, H.J., BRADY, L., DEREWENDA, Z.S. Structure and molecular model refinement of *Aspergillus orizae* (TAKA) α-amylase: an application of the simulated-anneling method. Disponível em: http://www.rcsb.gov Acesso em 11 set. 2001.

TAKASE, H., OGATA, F., ITO, A. Purification and characterization of β-amylases from tubers of taro *Colocasia antiquorum. Agriculture and Biological Chemistry*, v.54, n.10, p.2741-2742, 1990.

THE BRITISH NUTRITION FOUDATION. Chemistry of Complex Carbohydrates and Their Organization in Foods. In: **Complex Carbohydrates in Foods.** The report of the British Nutrition Foundation's Task Force, p.3-8, Published by Chapman and Hall for the British Nutrition Foundation, St. Ives, 1990.

THOMA, J.A., SPRADLIN, J.E, DYGERT, S. Plant and animal amylases. In: BOYER, P.D. **The Enzymes**. 3 rd, Ed. Academic Press, NY, 1959, vol.5, p.115-182.

TKACHUK, R., KRUGER, J.E. Wheat α-amylases II: physical characterization. *Cereal Chemistry,* St. Paul, v.51, p.508-529, 1972.

VISURI, K., NUMMI, M. Purification and characterization of crystalline β-amylase from barley. *European Journal of Biochemistry,* Berlin, v.28, p.555-565, 1972.

WHITAKER J.R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. Second edition, Ed. Marcel Dekker, New York, 1994, 636p.

WITT, W., SAUTER, J.J. Purification and characterization of α-amylase from poplar leaves. *Phytochemistry,* Oxford, v.41, n.2, p.365-372, 1996.

WITT, W., SAUTER, J.J. Purification and properties of starch granule-degrading α-amylase from potato tubers. *Journal of Experimental Botany,* Oxford, v.47 (304), 1789-1795, 1996.

WONG, D.W.S. **Mechanism and Theory in Food Chemistry**, Ed. Van Nostrand Reinhold, New York, 1989, 428p.

WONG, D.W.S. Química de Los Alimentos: Mecanismos y Teoria. Editorial Acribia S.A., Espanha, 1989, 476p.

YAMAMOTO, T. **Enzyme Chemistry and Molecular Biology of Amylases and Related Enzymes**. Edited by The Amylase Research Society of Japan, CRC Press, Tokyo, 1994, 206p.

YAMASAKI, S., YOKOYAMA, H., MYRANO, K., NONOURA, Y., HIGASHIHARA, M., TAHATA, S., YONEDA, K., UMEZAWA, C. Purification and characterization of β-amylase from ginseng. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Tokyo, v.37, n.4, p.973-978, 1989.

ZHANG, T., OATES, C.G. Relationship between α-amylase degradation and physical-chemical properties of sweet potato starches. *Food Chemistry,* Barking, v.65, p.157-163, 1999.