

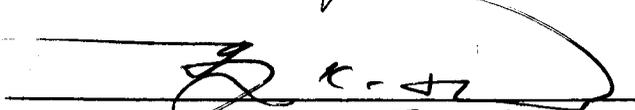
PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
VIABILIDADE DE APLICAÇÃO DA DEXTRANASE
DE *PENICILLIUM* SP.

02/87

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parcer

Este exemplar corresponde a relação
final da tese defendida por Ingrid
Schmidt-Hebbel Martens e aprovada
pela Comissão Julgadora em 12.01.87.
Campinas, 12 de Janeiro de 1987.


Presidente da Banca

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
VIABILIDADE DE APLICAÇÃO DA DEXTRANASE
DE *PENICILLIUM* SP.

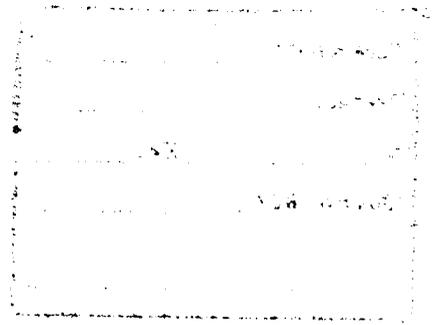
INGRID SCHMIDT-HEBBEL MARTENS
Farmacêutica - Bioquímica

PROF. DR. YONG KUN PARK
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Univer-
sidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de "MESTRE"
em Ciência de Alimentos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
Campinas - SP

1986



Ao Peter,
aos meus pais e irmãos,
que, com amor, carinho e
compreensão enriquecem a mi
nha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park, pela orientação e dedicação no decorrer do trabalho.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos, pelas facilidades concedidas para a realização deste trabalho.

A Eliane, pelo auxílio na parte experimental do trabalho, bem como, pela amizade e constante apoio.

Ao Luiz, pela dedicação na correção do original.

Ao Wilson, pelos excelentes desenhos desta tese.

A Cristina, pelo dedicado trabalho de datilografia.

Aos muitos amigos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, que, de uma ou outra forma, contribuíram para a realização da presente tese.

Aos tantos outros amigos, pelo incentivo e apoio durante o decorrer do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica, pelo apoio no decorrer do trabalho.

Ao CNPq, à FAPESP e à CAPES, pela concessão das respectivas bolsas.

A ABIA, pela colaboração na impressão desta tese.

INDICE

RESUMO	ix
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Seleção de fungos produtores de dextranase	39
3.1.2. Isolamento dos fungos	39
3.1.3. Seleção preliminar de fungos produtores de dex tranase	40
3.1.4. Seleção de fungos melhores produtores de dex tranase	41
3.1.5. Indução da produção de dextranase em meio lí quido	41
3.2. Determinação da atividade de dextranase.....	42
3.3. Estudo da produção de dextranase	42
3.3.1. Efeito da fonte de carbono na produção de dex tranase	42
3.3.2. Efeito da fonte de nitrogênio na produção da enzima	43
3.3.3. Efeito da concentração de dextrana na produção de dextranase	43

3.3.4.	Influência da temperatura de incubação na produção de dextranase	44
3.3.5.	Estudo da cinética de produção de dextranase em fermentação submersa	45
3.3.6.	Produção de dextranase em fermentação submersa.	46
3.4.	Determinação da concentração de açúcares totais	46
3.5.	Purificação da dextranase bruta	46
3.5.1.	Cromatografia em coluna de DEAE-celulose	46
3.5.2.	Cromatografia em coluna de CM-celulose	47
3.6.	Determinação da concentração de proteína	49
3.7.	Caracterização da dextranase	49
3.7.1.	Efeito da temperatura na atividade da dextranase	49
3.7.2.	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima	49
3.7.3.	Efeito do pH na atividade da dextranase	50
3.7.4.	Efeito do pH na estabilidade enzimática	50
3.7.5.	Ação de substâncias inibidoras sobre a atividade da dextranase	50
3.7.6.	Influência da concentração de substrato na atividade enzimática	51
3.8.	Cromatografia descendente em papel dos produtos da hidrólise enzimática da dextrana	51
3.8.1.	Preparação dos padrões	51

3.8.2. Cromatografia descendente em papel	52
3.9. Viabilidade de aplicação da dextranase na remoção da dextrana do caldo de cana e de açúcar cristal.....	52
3.9.1. Hidrólise enzimática da dextrana em caldo de cana	53
3.9.2. Hidrólise enzimática da dextrana em açúcar cristal.....	53
3.10. Determinação de dextrana	54
4. RESULTADOS	55
4.1. Seleção de fungos	55
4.1.1. Seleção preliminar de fungos produtores de dextranase	55
4.1.2. Seleção de fungos melhores produtores de dextranase	55
4.1.3. Produção de dextranase em fermentação submersa.	56
4.2. Estudo da produção de dextranase em fermentação submersa	56
4.2.1. Efeito da fonte de carbono na produção de dextranase	56
4.2.2. Efeito da fonte de nitrogênio na produção de dextranase	57
4.2.3. Efeito da concentração de dextrana na produção de dextranase	57

4.2.4. Influência da temperatura de incubação na produção de dextranase 57

4.2.5. Estudo da cinética da produção de dextranase em fermentação submersa 58

4.2.6. Produção de dextranase em fermentação submersa. 58

4.3. Purificação da dextranase bruta 59

4.4. Caracterização da dextranase 59

4.4.1. Efeito da temperatura na atividade da dextranase 60

4.4.2. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima 60

4.4.3. Efeito do pH na atividade da dextranase 60

4.4.4. Efeito do pH na estabilidade enzimática 61

4.4.5. Ação de substâncias inibidoras sobre a atividade da dextranase 61

4.4.6. Influência da concentração de substrato na atividade enzimática 61

4.5. Cromatografia descendente em papel dos produtos da hidrólise enzimática da dextrana 62

4.6. Viabilidade de aplicação da dextranase na remoção da dextrana do caldo de cana e de açúcar cristal 62

4.6.1. Hidrólise enzimática da dextrana em caldo de cana 62

4.6.2. Hidrólise enzimática da dextrana em açúcar cristal. 63

5. DISCUSSÃO	64
5.1. Seleção de fungos produtores de dextranase	64
5.2. Estudo da produção de dextranase em fermentação submersa	65
5.3. Purificação da dextranase	68
5.4. Caracterização da dextranase	70
5.5. Cromatografia dos produtos da hidrólise enzimática da dextrana	73
5.6. Viabilidade de aplicação da dextranase na remoção da dextrana do caldo de cana e de açúcar cristal.....	74
6. CONCLUSÕES	76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de dextranase em meio semi-sólido sem e com dextrana	78
Tabela 2 - Produção de dextranase em meio semi-sólido e em meio líquido	79
Tabela 3 - Efeito da fonte de carbono na produção de dextranase	80
Tabela 4 - Efeito da fonte de nitrogênio na produção de dextranase	81
Tabela 5 - Efeito da concentração de dextrana na produção de dextranase	82

Tabela 6 - Influência da temperatura de incubação na produção de dextranase	83
Tabela 7 - Purificação da dextranase de <i>Penicillium</i> sp ...	84
Tabela 8 - Ação de substâncias inibidoras sobre a atividade da dextranase	85
Tabela 9 - Hidrólise enzimática da dextrana em caldo de cana	86
Tabela 10 - Hidrólise enzimática da dextrana em açúcar cristal.....	87

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Microfotografia de <i>Penicillium</i> sp	88
Figura 2 - Cinética da produção de dextranase	89
Figura 3 - Cromatografia em coluna de DEAE-celulose	90
Figura 4 - Cromatografia em coluna de CM-celulose	91
Figura 5 - Efeito da temperatura na atividade de dextranase	92
Figura 6 - Efeito da temperatura na estabilidade da enzima	93
Figura 7 - Efeito do pH na atividade de dextranase	94

Figura 8 - Efeito do pH na estabilidade da enzima	95
Figura 9 - Efeito da concentração de dextrana na atividade de dextranase	96
Figura 10 - Cromatografia descendente em papel dos produtos da hidrólise enzimática da dextrana.....	97
Figura 11 - Hidrólise enzimática da dextrana em caldo de cana	98
Figura 12 - Efeito da utilização de açúcar contaminado com dextrana na produção de balas	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
8. ANEXOS	110

*If you don't expect, you'll
never recognize the unexpected.*

(HERACLITO)

RESUMO

Oitocentas e sessenta e três linhagens de fungos foram isoladas do solo de plantações de cana de açúcar, assim como de varas de cana deterioradas, e testadas quanto à atividade de dextranase. Nesta seleção, foi encontrada uma linhagem de *Penicillium* sp que produz alta atividade de dextranase quando cultivada em meio líquido contendo dextrana como única fonte de carbono.

Estudaram-se as condições ótimas de produção de dextranase, quanto à fonte de carbono, de nitrogênio, concentração de dextrana no meio e temperatura de incubação. A dextranase foi produzida em fermentação submersa em meio contendo dextrana, farinha de soja desengordurada, extrato de levedura, KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em pH 6,0 a 30°C.

A enzima bruta foi purificada através de cromatografia em coluna de DEAE-celulose e de CM-celulose. A caracterização da enzima mostrou que a temperatura ótima da dextranase é de 50°C, e o pH ótimo de 4,2. A enzima se mantém estável a 40°C durante 7 horas. O pH de estabilidade se encontra na faixa de pH 4,2 a 5,0. A dextranase de *Penicillium* sp é fortemente inibida por íons Ag^+ , Mn^{2+} , Fe^{2+} e Hg^{2+} . Na hidrólise da dextrana a enzima libera glicose, isomaltose e isomaltotriose como produtos principais.

Na aplicação da dextranase de *Penicillium* sp na hidrólise da dextrana em caldo de cana e em açúcar cristal, a mesma apresentou resultados satisfatórios.

SUMMARY

Eight hundred and sixty three strains of fungi were isolated from cane sugar fields and deteriorated cane sugar and examined for production of dextranase. It was found a strain of *Penicillium* sp which has produced highest activity of dextranase when the strain was cultivated in liquid medium which contained dextran as the sole carbon source.

The optimal condition for dextranase production by the fungus was studied and found that dextranase was produced in submerged culture in medium containing dextran, 5g; defatted soy flour, 10g; yeast extract, 5g; KH_2PO_4 , 5g and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5g in 1 liter, pH 6,0 at 30°C.

The crude enzyme was purified by DEAE-cellulose and CM-cellulose column chromatography. The enzyme was most active at pH 4,2, and the temperature optimum was near 50°C. The dextranase was stable over a pH range from 4,2 - 5,0 at 40°C for 7 hours. The enzyme was strongly inhibited by Ag^+ , Mn^{2+} , Fe^{2+} and Hg^{2+} ions. The main hydrolysis products of dextran were glucose, isomaltose and isomaltotriose.

The application of *Penicillium* sp dextranase in removing dextran from raw cane sugar juice and raw sugar showed satisfactory results.

1. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos conhecidos como dextranas são polímeros homogêneos formados por unidades de D-glicopiranosose ligadas entre si, predominantemente, através de ligações glicosídicas α -1,6. Dextranas são sintetizadas a partir de sacarose por bactérias da família *Lactobacillaceae*, principalmente espécies dos gêneros *Leuconostoc* sp, *Streptococcus* sp e *Lactobacillus* sp. Entre as espécies do gênero *Leuconostoc* sp, destacam-se as espécies *Leuconostoc mesenteroides* e *L. dextranicum*, sendo que a produção industrial de dextrana é feita a partir da fermentação de sacarose por *L. mesenteroides*. A enzima que catalisa a síntese da dextrana a partir de sacarose é a dextransacarase.

A estrutura e as propriedades físico-químicas das dextranas variam muito entre as várias espécies produtoras, e dependem das condições de cultivo do microrganismo, tais como, concentração de sacarose, pH do meio, aeração e temperatura de incubação.

A proporção de ligações α -1,6 das dextranas varia de 52 a 97%. As ramificações são feitas através de ligações glicosídicas α -1,2, α -1,3 e α -1,4.

A maioria das dextranas apresenta peso molecular elevado, da ordem de 10^5 a 10^7 , ou mais. Em consequência do elevado peso molecular, as mesmas são insolúveis em álcool etílico a 40 a 50%, porém, a maioria é solúvel em água. No entanto, a solubilidade das

dextranas em água decresce à medida que aumenta a proporção de ligações glicosídicas diferentes de α -1,6. Dextranas são compostos altamente dextrorrotatórios.

Em função das suas características físico-químicas, as dextranas apresentam diversas aplicações.

Soluções estéreis de dextrana, de peso molecular médio de 75.000, são utilizadas como expansores do plasma sanguíneo e inclusive como substitutos do sangue.

Uma aplicação de grande importância da dextrana é a sua utilização como suporte de resinas para cromatografia de afinidade e de exclusão molecular.

A utilização de dextrana como espessante para alimentos torna-se possível graças à viscosidade apresentada por soluções de dextrana e ao fato das mesmas não apresentarem sabor, cor e aroma, além de serem inócuas para a saúde.

Por outro lado a presença de dextrana pode assumir consequências bastante adversas.

Há alguns anos vem sendo estudado o papel da dextrana na etiologia da cárie dental, embora o mecanismo de ação ainda apresenta alguns aspectos que não foram totalmente esclarecidos.

Outro aspecto adverso da dextrana é a presença da mesma no caldo de cana durante o processamento. Entre os fatores que contribuem para a infecção da cana por bactérias da família *Lactobacillaceae* podem ser citados a prática da queimada, as geadas, o uso de colhedoras mecânicas e a estocagem de cana cortada.

No caldo de cana contaminado por dextrana ocorre abaixamento do pH devido à presença concomitante de ácido lático e acético, sendo que este fato exige quantidades exageradas de cal durante a neutralização.

A presença da dextrana propriamente dita no caldo, leva ao aumento na viscosidade do caldo e do melaço, diminuição da velocidade de decantação, dificuldade de filtração, formação de crostas e deficiência na transferência de calor nos aquecedores, diminuição da velocidade de cristalização e alongamento do eixo "c" dos cristais de açúcar. O açúcar resultante é de baixa qualidade, difícil de manipular, secar e empacotar.

Existem diversos métodos físicos e químicos para a remoção da dextrana no caldo de cana, tais como ultrafiltração, diálise, osmose reversa, hidrólise ácida, exposição a ultrassom e luz ultravioleta. No entanto, estes métodos são inadequados para o tratamento de grandes volumes de caldo de cana.

Um dos métodos mais promissores para a eliminação da

dextrana é o tratamento enzimático do caldo de cana contaminado. Enzimas possuem a vantagem de serem altamente específicas, de apresentarem atividade em condições brandas de pH e temperatura, baixa toxicidade e requererem baixas dosagens. As enzimas de origem microbiana apresentam além das vantagens citadas, a vantagem do baixo custo de produção.

A enzima dextranase (α -1,6-D-glicano 6-glicanohidrolase, EC 3.2.1.11) é uma enzima capaz de hidrolisar ligações glicosídicas α -1,6 da dextrana.

A ocorrência de dextranase tem sido descrita em diversos tecidos de mamíferos e inúmeros microrganismos. Entre os tecidos de mamíferos incluem-se a mucosa intestinal, o fígado, o baço e o rim.

Os microrganismos produtores de dextranase incluem inúmeras espécies de fungos, principalmente dos gêneros *Penicillium* sp, *Spicaria* sp, *Chaetomium* sp e *Fusarium* sp. As bactérias mais frequentemente citadas como produtoras de dextranase pertencem aos gêneros *Lactobacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Cellvibrio* sp, *Streptococcus* sp e *Brevibacterium* sp. Muitos dos microrganismos produzem dextranase apenas quando cultivados em meio contendo dextrana como única fonte de carbono, ou seja, trata-se de uma enzima indutível. Além da própria dextrana, os oligossacarídeos da série isomaltose de elevado peso molecular, a dextrana oxidada, a dextrana insolúvel ou ésteres derivados da isomaltose, servem como indutores da

síntese de dextranase.

As dextranases podem ser subdivididas em endo e exoenzimas de acordo com o mecanismo de ação das mesmas. As endodextranases cindem as ligações glicosídicas α -1,6 da molécula de dextrana ao acaso, enquanto que as exodextranases liberam unidades de glicose a partir da extremidade não-redutora da molécula do polímero.

Tomando como referência a localização das dextranases, as mesmas podem ser classificadas em extra e intracelulares. Os fungos produtores de dextranase descritos na literatura, produzem enzima extracelular, enquanto que entre as bactérias produtoras de dextranase, encontram-se enzimas de ambos os tipos.

Considerando-se os efeitos adversos que a presença da dextrana provoca no processamento do caldo de cana e dada a elevada produção de açúcar a partir de cana no Brasil, o presente trabalho visou o isolamento de uma espécie de fungo produtora de dextranase extracelular. Uma vez isolado o fungo *Penicillium* sp em meio líquido, procedeu-se à caracterização e ao estudo da viabilidade de aplicação industrial da mesma.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1948, Ingelman (21) cultivara a bactéria *Cellvibrio fulva* em meio líquido contendo dextrana, NaNO_3 , K_2HPO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ durante vários meses. Após diálise, centrifugação e filtração do caldo de cultura, o autor obtivera o extrato enzimático e utilizara o mesmo para o estudo da hidrólise enzimática da dextrana de peso molecular 2 000 000. Ingelman verificara que a viscosidade da solução de dextrana diminuía ao mesmo tempo em que a concentração de açúcares redutores aumentara. Trabalhando com diferentes concentrações enzimáticas, o autor verificara que a diminuição da viscosidade da solução de dextrana fora proporcional à concentração de enzima. Ingelman observara também que o pH ótimo da enzima se situara em pH 5,2 a 5,3.

Em 1949, Hultin e Nordström (20), analisando 30 diferentes fungos, verificaram que as linhagens *Penicillium lilacinum* Thom, *Penicillium funiculosum* Thom e *Verticillium coccorum* (Petch) Westerdiijk apresentaram atividade de dextranase, quando cultivadas em meio líquido que contivera dextrana de baixo peso molecular como única fonte de carbono. Outrossim, verificaram que culturas submersas destes fungos resultaram em maior atividade enzimática do que culturas em meio sólido. Os autores observaram que o pH ótimo de produção de dextranase fora 4,0. A atividade da enzima havia sido medida através da diminuição da viscosidade, assim como da liberação de açúcares redutores.

No mesmo ano, Bailey e Clarke (1) procuraram verificar a existência de um microrganismo produtor de dextranase do rúmem de gado. Neste estudo isolaram duas linhagens de *Lactobacillus bifidus*. O mesmo bacilo fora isolado das fezes de uma criança lactente. As três linhagens secretaram dextranase extracelular. Incubando esta enzima com dextrana essencialmente linear, produzida por *Streptococcus bovis*, obtiveram isomaltotriose, isomaltotetraose, isomaltopentaose, isomaltohexaose e traços de isomaltoheptaose como produtos da hidrólise. A hidrólise não levara à formação de isomaltose ou glicose. Completando o estudo da dextranase bacteriana, Bailey e Clarke notaram que a mesma não apresentara a capacidade de hidrolisar isomaltose, isomaltotriose, isomaltotetraose e isomaltopentaose, enquanto que isomaltohexaose fora fracamente hidrolisada e isomaltoheptaose e isomaltooctaose foram rapidamente hidrolisadas. O pH ótimo para esta enzima fora de 5,4 a 6,5 e a temperatura ótima situara-se na faixa de 40 a 50°C.

Mais tarde, Tsuchiya et. al. (54), em 1962, encontraram 20 linhagens de *Penicillium lilacinum*, *P. funiculosum*, *P. verrucosum* e *Spicaria violacea* que produziram dextranase extracelular em fermentação submersa. Os autores notaram que um concentrado de amilase de *Aspergillus niger* NRRL 330 também apresentara a capacidade de degradar a dextrana. O pH ótimo para todos os fungos situara-se na faixa de pH 4,0 a 5,5. A dextranase que fora produzida por *P. funiculosum* hidrolisara rapidamente a dextrana homóloga. Em relação a dextranas heterólogas testadas pelos pesquisadores, a mes

ma mostrara atividade em grau variável.

No mesmo ano, Whiteside-Carlson e Carlson (58) inocularam soluções de dextrana e sais minerais com amostras de solo, assim como expuseram estas soluções ao meio ambiente. Obtiveram o fungo *Aspergillus* sp que mostrara ser útil na degradação de várias dextranas. Notaram que filtrados de culturas deste fungo apresentaram alta atividade na degradação do mencionado polissacarídeo. Durante o intervalo de tempo necessário para que o filtrado degradasse o polissacarídeo a fragmentos de peso molecular em torno de 75 000, ocorrera a formação de pequena quantidade de açúcares redutores. Fazendo uma analogia com as α -amilases, os autores sugeriram o termo endo-dextranase, uma vez que a mesma enzima preferencialmente ligações glicosídicas distantes dos grupos terminais.

Posteriormente, em 1960, Bailey et. al. (2) estudaram a ação da dextranase bacteriana sobre diversas dextranas ramificadas em relação aos produtos da hidrólise. Verificaram que os hidrolisados de todos os substratos analisados (dextranas de diversas estruturas químicas) apresentaram isomaltotriose, isomaltotetraose e isomaltopentaose. Constataram também que diferentes proporções de ligações α -1,6; α -1,4 e α -1,3 presentes nas dextranas por eles utilizados na hidrólise enzimática, levaram aos diversos produtos citados em quantidades variáveis.

Prosseguindo os estudos sobre dextranases bacterianas , Bailey et. al. (3), em 1961, estudaram detalhadamente a ação da dextranase de *Lactobacillus bifidus* sobre a dextrana ramificada elaborada pelo *Leuconostoc mesenteroides* (Birmingham). Este estudo mostrara que a enzima hidrolisara o substrato, dando origem a uma complexa mistura de oligossacarídeos. Além de isomaltotriose , isomaltotetraose, isomaltopentaose e isomaltohexaose, os autores isolaram um material de grau de polimerização superior a 6, um tetrassacarídeo e um pentassacarídeo. O tetrassacarídeo mostrara ser uma mistura de 3³-glicosil - isomaltotriose e 3²-glicosil - isomaltotriose. O pentassacarídeo contivera uma unidade de glicose unida a outra glicose da isomaltotetraose, sem ser a glicose terminal, através de ligação α -1,3, e provavelmente tratara-se de isômeros. Por outro lado, os autores verificaram que esta dextranase hidrolisara 6-0- α -isomaltohexaosil- e 6-0- α -isomaltoheptaosil-sorbitol em 2 e 3 lugares alternativos, respectivamente.

Bourne et. al. (4) comprovaram, em 1962, que ocorre a indução da produção de dextranase extracelular por linhagens dos fungos *Penicillium lilacinum* e *Penicillium funiculosum* quando estas foram incubadas em meio contendo dextrana não-ramificada de *Streptococcus bovis*. As propriedades gerais não pareceram diferir dos preparados elaborados em meios contendo dextrana ramificada de *Leuconostoc mesenteroides*. Os produtos obtidos após a hidrólise da dextrana de *Streptococcus bovis* por dextranase foram glicose, isomaltose e isomaltotriose, sendo que a isomaltose

fora o produto principal. Este fato sugerira aos autores que a isomaltotetraose fora a menor isomaltodextrina totalmente hidrolisável, uma vez que verificaram que a dextranase hidrolisara com facilidade dextranas praticamente não-ramificadas e isomaltodextrinas modificadas ou não, desde que estas não contivessem menos de três ligações glicosídicas. A hidrólise ocorrera principalmente nas ligações glicosídicas não terminais. Demonstraram que o número de grupos redutores, liberados pela dextranase a partir de diversas dextranas, diminuía sensivelmente com o grau de ramificação do substrato.

Dando continuidade ao trabalho realizado em 1962, no ano seguinte, Bourne et. al. (5) verificaram que as dextranases produzidas por *Penicillium lilacinum* NRRL 896 e *Penicillium funiculosum* NRRL 1132, hidrolisaram a dextrana produzida por *Leuconostoc mesenteroides* (Birmingham), dando misturas complexas de oligossacarídeos. Ambas as enzimas produziram glicose, isomaltose e isomaltotriose, além de penta, hexa, hepta e octassacarídeos ramificados. A dextranase de *Penicillium funiculosum* produzira também um tetrassacarídeo ramificado que analisado em detalhe mostrara ser 3^3 - α -glicosilisomaltotriose. Os pentassacarídeos, iguais para ambas as dextranases, foram identificados como sendo 3^3 -glicosilisomaltotetraose pura ou em mistura em 3^3 -glicosiliosomaltotetraose. Da mesma forma, os autores verificaram que os hexassacarídeos foram idênticos e mostraram ser 3^3

-glicosilisomaltopentaose pura ou em mistura com isômeros, nos quais a ramificação ocorrera num ponto mais afastado da extremidade não-redutora. O heptassacarídeo e o octassacarídeo produzidos pela enzima de *Penicillium lilacinum* indicaram a presença de 3^4 -glicosilisomaltohexaose e 3^4 -glicosilisomaltoheptaose, respectivamente. Ambos os sacarídeos apresentaram-se em mistura com isômeros, nos quais a ramificação estivera localizada em posição mais afastada da extremidade não-redutora da isomaltohexaose e isomaltoheptaose, respectivamente. Os autores verificaram também, que o octassacarídeo contivera um sacarídeo, no qual duas moléculas de glicose estiveram ligadas através de ligações α -1,3 à unidade de isomaltohexaose.

Mais tarde, em 1966, Janson e Porath (22) isolaram e caracterizaram a dextranase pura, sintetizada por microrganismo do gênero *Cytophaga*. Neste estudo, verificaram que o peso molecular da enzima se situara em torno de 60 000; o ponto isoelétrico, estimado em função da composição em aminoácidos, em torno de pH 4,0. O pH ótimo situara-se em torno de pH 5,0 a 6,5 e a temperatura ótima fora de 50°C. Estudando a especificidade da enzima, verificaram que os produtos de degradação da dextrana de *Leuconostoc mesenteroides* B-512, foram oligossacarídeos de comprimentos variados. O produto final da degradação parecia ser a isomaltose, além de traços de glicose. A capacidade desta dextranase de solubilizar totalmente alguns géis de dextrana, como por exemplo Sephadex G-100, G-150 e G-200, indicara ser um endo-enzima. Os au

tores não encontraram nenhum inibidor para a enzima.

Zevenhuizen (60) em 1968, isolara do solo diversas espécies do gênero *Bacillus* sp, as quais, quando induzidas, produziram dextranase ligada à parede celular. A enzima mostrara atividade do tipo exo-hidrolase. O autor verificara que as propriedades das dextranases de ambas as espécies, *B. subtilis* e *B. megatherium*, foram similares. As células intactas, lavadas, apresentaram atividade de dextranase, enquanto que os filtrados não apresentaram nenhuma. Este fato fizera-o concluir que a degradação de dextrana ocorrera no interior da célula, provavelmente sem ação anterior de uma enzima (dextranase) extracelular. Por outro lado, o autor observara que a dextranase de *Bacillus* sp agira cindindo ligações glicosídicas α -1,6 terminais da dextrana, liberando glicose como produto da hidrólise. Notara porém, que a dextranase de *Bacillus* sp não conseguira cindir ligações glicosídicas α -1,4, nem α -1,6 de polissacarídeos do grupo glicogênio-amido (glicogênio, amilopectina e maltose não foram hidrolisados).

No mesmo ano, Sutherland (50) estudara a influência da presença de dextrana sobre o formato dos cristais de açúcar. Ele adicionara dextrana na proporção de 0,25, 0,5 e 1,0% ao melado e notara que a 0,5% da dextrana provocara alongamento moderado dos cristais, enquanto que a 1,0% o alongamento fora extremo. Sutherland observara também que os cristais de açúcar provenientes do melado de elevado índice de refração apresentaram alongamento mar

cante. Submetera este melado à diálise, e verificara que o mesmo fornecera cristais de açúcar de conformação normal. Sutherland então testara diversas substâncias, tais como, inulina, amido, dextrina, levana, alginatos, gomas diversas, carboximetilcelulose, "Ficol" e sulfato de dextrana e não encontrara nenhuma evidência de alongamento dos cristais de açúcar.

Dando continuidade ao estudo realizado em 1968 por Sutherland, um ano depois, Sutherland e Paton (51) estudaram a influência do peso molecular, temperatura, concentração e estrutura molecular da dextrana sobre o alongamento do eixo "c" dos cristais de açúcar. Neste estudo, os autores notaram que adicionando-se dextrana a soluções de açúcar puro a mesma provocara o alongamento do eixo "c" dos cristais. O grau de alongamento intensificara-se com o aumento da temperatura, do peso molecular e da concentração de dextrana. Verificaram também, que em relação à concentração de dextrana fizeram-se necessárias concentrações muito elevadas para atingir o alongamento dos cristais. No entanto, Sutherland e Paton perceberam que em caldo de cana o efeito da dextrana fora muito pronunciado e mesmo 0,5% de dextrana resultara em alongamento extremo dos cristais. Diante destes resultados, os autores concluíram pela ocorrência de interação entre a dextrana e outro componente qualquer do caldo de cana, provocando a amplificação do efeito deletério da dextrana. A estrutura da dextrana também mostrara ser de importância, sendo que a dextrana mais efetiva no alongamento dos cristais fora a dextrana com elevada proporção de ligações α -1,6.

Em 1970, Chalet et. al. (6) purificaram a dextranase extracelular produzida por *Penicillium funiculosum* em fermentação submersa. Obtiveram uma enzima que mostrara ser homogênea através de eletroforese e eletrofocalização. Os métodos de purificação, utilizados pelos pesquisadores, incluíram precipitação por acetona, fracionamento por sulfato de amônio, filtração em gel, fracionamento seguido de precipitação por íon férrico e cromatografia em DEAE-celulose. Os autores também obtiveram a enzima purificada por eletroforese. A cromatografia de exclusão molecular indicara um peso molecular de 41 000 para a enzima e a eletrofocalização estabeleceu o ponto isoelétrico em pH 4,6. Nos estudos de cinética enzimática, Chalet et. al. notaram que na presença de excesso de substrato (dextrana 100), 1 mg de dextranase liberara 27 000 unidades de isomaltose em 2 horas de reação. Os autores atingiram fator de purificação de 1000 vezes e rendimento de 2,6% entre o caldo de cultura e o produto final.

Iniciando um amplo trabalho sobre dextranases fúngicas, Fukumoto et. al (13), em 1971, demonstraram ser o *Penicillium luteum* ATCC 9644 produtor de dextranase extracelular quando incubado em meio de cultura contendo dextrana como única fonte de carbono. Estudando o efeito da fonte de carbono sobre a produção

da enzima, verificaram que a dextrana e oligossacarídeos que apresentaram ligações glicosídicas α -1,6 foram efetivos na produção de dextranase, sendo que a indutibilidade destes compostos fora aproximadamente proporcional ao comprimento da cadeia. Outrossim, notaram que a produção de dextranase fora maior em concentrações crescentes de dextrana. Observaram também, que NaNO_3 , K_2HPO_4 e extrato de levedura, a 0,2%, respectivamente, e pH 6 foram as condições mais favoráveis para a produção de dextranase em aerobiose. Verificaram que o pH ótimo da enzima situara-se na faixa de pH 4 a 6 e a estabilidade da dextranase ocorrera na faixa de pH 3,5 a 7,0. A temperatura ótima fora de 50°C e a estabilidade térmica se verificara em temperaturas abaixo de 50°C. Os autores notaram que entre os inúmeros sais que testaram, apenas o HgCl_2 mostrara inativar a enzima. Estudando a especificidade da dextranase, Fukumoto et. al. observaram que a mesma hidrolisara a dextrana, Sephadex de vários tipos, isomaltose, isomaltotriose, isomaltotetraose, isomaltopentaose e isomaltohexaose em graus variáveis. A enzima apresentara atividade em relação a substratos como pululano, panose, isomaltosilmaltose, amido solúvel, amilopectina, milho ceroso e dextrina β -limite. A dextranase purificada hidrolisara a dextrana dando como produtos da hidrólise a glicose e a isomaltose, juntamente com pequenas quantidades de isomaltotriose, demonstrando ser uma endoenzima.

No mesmo ano, estudando aproximadamente 400 linhagens de fungos, Tsuru et. al. (55) isolaram *Aspergillus carneus* que demonstrara ser o melhor produtor de dextranase, mesmo em relação ao *Penicillium luteum* ATCC 9644. Verificaram que a enzima dextranase fora indutível, sendo que a presença de outros carboidratos, além da dextrana, inibira ou retardara a produção de dextranase. Analisando a influência da concentração de dextrana na produção de dextranase, verificaram que utilizando meios contendo 1,5% de dextrana (PM 2000000), a produção de enzima fora máxima. Nesta concentração o tempo necessário para a produção da enzima fora mais longo do que quando utilizaram concentrações menores de substrato. Em função destes achados, passaram a adotar meios contendo 1% de dextrana. Utilizando diversos tipos de dextrana (de *Leuconostoc mesenteroides* IAM 1046 e outra de linhagem não identificada, isolada de malte comercial) como fonte de carbono, compararam a indutibilidade das mesmas com a dextrana comercial (T - 2000), na produção de enzima. Verificaram, nesta comparação, que a dextrana IAM fora aproximadamente três vezes mais efetiva do que a dextrana comercial. Estudando o efeito da fonte de nitrogênio sobre a formação de enzima, notaram que a polipeptona a 1% dera os melhores resultados. Os autores estudaram ainda o efeito do pH inicial do meio e da temperatura na produção de dextranase, e verificaram que a produção da enzima fora máxima quando o pH inicial do meio se situara na faixa de 8,0 a 8,5. Quanto à temperatura de incubação, observaram que nos primeiros 6 dias a produção de dextranase atin

gira o máximo quando o fungo fora cultivado a 28°C. A 25°C a produção de dextranase fora baixa nos primeiros 6 dias e, após este período inicial, aumentara e atingira o mesmo valor que a 28°C.

Dragan-Bularda e Kiss (11), em 1972, demonstraram a presença de dextranase no solo e estudaram a influência que o substrato, assim como os produtos finais da hidrólise, exerceram na formação de dextranase por microrganismos do solo. Neste estudo, os autores, notaram atividade de dextranase mesmo quando não havia microrganismos proliferando no solo. Ou seja, a enzima tinha sido formada por microrganismos presentes no solo e resistira à degradação e à inativação térmica, às quais foram submetidas as amostras de solo. A incubação de amostras de solo com dextrana levou ao aumento na produção de dextranase pelos microrganismos presentes no mesmo; incubando estas amostras com glicose não se verificara a produção desta enzima. Em virtude destes resultados, os autores concluíram que a produção de dextranase no solo fora um processo indutível.

Richards e Streamer (40), no mesmo ano, conseguiram isolar do solo uma bactéria, *Pseudomonas* UQM 733, que produzira, em meio contendo dextrana como única fonte de carbono, duas dextranases extracelulares. A bactéria mostrara também certa atividade de dextranase intracelular. Utilizando a técnica de precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguida de cromatografia em gel para purificação das enzimas extracelulares, obtiveram uma fração, denominada D_1 , que mostrara uma única banda de proteína na eletroforese, e outra denomi-

nada D_2 , que mostrara duas bandas protéicas na eletroforese. As propriedades físico-químicas destas duas enzimas mostraram-se divergentes. D_1 possuía temperatura ótima de 55°C , enquanto que para a fração D_2 a mesma se situara na faixa de 40 a 45°C ; D_1 mostrara-se estável até temperaturas de 51°C e D_2 apenas até 43°C . O pH ótimo para D_1 estivera na faixa de pH $4,5$ a $5,5$, enquanto que para D_2 esta faixa se mostrara bem mais ampla, de pH $4,5$ a $7,5$. Os autores associaram este fato à presença de duas proteínas diferentes (provavelmente isoenzimas) em D_2 . Os produtos da hidrólise da dextrana também diferiram para ambas as dextranases, embora ambas mostraram ser endoenzimas. Após 15 horas de hidrólise, D_1 fornecera como produtos principais isomaltose, isomaltotriose, isomaltotetraose e isomaltopentaose; D_2 fornecera como produtos principais isomaltopentaose e uma mistura de açúcares da série isomaltose possuindo 6 a 10 unidades de glicose.

Dando continuidade ao trabalho que Tsuru et. al. tinham realizado em 1974, um ano depois, Hiraoka et. al. (18) procederam à purificação e estudo de algumas propriedades da enzima isolada de *Aspergillus carneus*. Para a purificação da enzima, valeu-se de fracionamento por sulfato de amônio, cromografia em DEAE-celulose e filtração em Bio-Gel P-150. Após eletrofocalização, os autores obtiveram duas frações: dextranase I (pI 4,12) e dextranase II (pI 4,35). Ambas as frações mostraram atividade máxima em pH $5,0$ a $5,5$ e estabilidade na faixa de pH $4,5$ a $9,0$ a 30°C por 24 horas. A temperatura ótima para ambas fora de aproxi

madamente 60°C e as enzimas se mostraram estáveis em temperatura inferior a 50°C. Verificaram que as enzimas foram inativadas por íons de metais pesados, como Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} e Fe^{3+} .

Prosseguindo o estudo que Hiraoka et. al. tinham realizado em 1972, nesse mesmo ano, Tsuru et. al. (56), investigaram a especificidade da dextranase de *Aspergillus carneus* quanto ao substrato, utilizando isomaltodextrinas, dextrana e seus derivados como tal. Verificaram que a enzima hidrolisara rapidamente a dextrana (T-2000), que consistira em mais de 95% de ligações glicosídicas α -1,6. A enzima fornecera como produtos da hidrólise isomaltotriose, isomaltose e pequena quantidade de glicose, assim como traços de oligossacarídeos maiores, sendo que o grau de hidrólise fora de 40%. A dextrana IAM fora hidrolisada mais lentamente e em menor grau. Entre as isomaltodextrinas testadas pelos autores, os compostos G_4 a G_8 sofreram hidrólise, dando isomaltose e isomaltotriose, na mesma velocidade que a dextrana T-2000. A enzima hidrolisara a isomaltotriose muito lentamente e não apresentara ação sobre a isomaltose. Compararam os produtos da digestão de isomaltodextrinas e seus derivados reduzidos e sugeriram que a enzima inicialmente removera unidades de isomaltotriosil e, em grau um pouco inferior, unidades isomaltosil a partir da extremidade não-redutora das isomaltodextrinas.

Ainda no ano de 1972, Cheetham e Richards (7), dando continuidade ao estudo de dextranases, iniciado por Richards e Streamer no mesmo ano, purificaram e estudaram as propriedades da

dextranase intracelular de *Pseudomonas* UQM 733. Observaram que o pH ótimo de dextranase intracelular fora 5,5; a temperatura ótima fora aproximadamente 50°C, e a enzima mantivera a estabilidade em temperaturas inferiores a 40°C. Verificaram que o "ataque" inicial da dextranase sobre a dextrana fora do tipo "endo", enquanto que o "ataque" dos oligossacarídeos (isomaltose, isomaltotriose, isomaltotetraose, isomaltopentaose e isomaltohexaose) fora do tipo "exo". Na época, os autores sugeriram que esta endodextranase apresentara modo de ação semelhante à α -amilase, que hidrolisara amilose ao acaso, enquanto que os oligossacarídeos foram hidrolisados de forma "ordenada". Descartaram a possibilidade da enzima ser uma mistura de exo e endodextranase, uma vez que a mesma apresentara uma banda única na eletroforese, além de picos isolados nas curvas de atividade versus pH e temperatura, respectivamente. Concluíram os pesquisadores, que a enzima fora pura e diferente das outras duas dextranases extracelulares anteriormente estudadas e designadas por D₁ e D₂. Denominaram a dextranase intracelular de D₃. Lançaram a hipótese de que esta enzima intracelular, in vivo, tivera a função de hidrolisar oligossacarídeos, provenientes da ação das enzimas D₁ e D₂ sobre a dextrana, a glicose.

Um ano depois, Kosaric et. al. (26), em 1973, estudaram 28 linhagens de *Penicillium* e verificaram que a linhagem *Penicillium funiculosum* SH-5 produzira a maior quantidade da enzima dextranase. Notaram que a produção máxima de dextranase ocor

ra quando da diminuição da massa celular. Neste estudo, os autores não conseguiram verificar se a dextranase fora efetivamente uma enzima extracelular ou se a mesma apenas fora secretada pela célula como consequência da autólise desta. O pH ótimo da enzima situara-se na faixa de pH 5,0 a 5,5; a atividade máxima ocorrera a 55°C.

Nesse mesmo ano, Sugiura et. al. (46) purificaram dextranase a partir da enzima bruta comercial (fração etanólica do filtrado de cultura de *Penicillium funiculosum*), através de filtração em Bio-Gel P-60 e cromatografia em CM-e em DEAE-celulose. A preparação enzimática obtida fora fracionada pelos autores através de eletrofocalização, em duas frações, dextranase I (pI 3,98) e dextranase II (pI 4,19). As dextranases I e II apresentaram-se homogêneas na eletroforese. Na filtração em gel, os pesquisadores verificaram que o peso molecular de ambas as frações fora de 44000. Sugiura et. al. verificaram que as enzimas foram mais ativas em pH 6,0 e mantiveram-se estáveis em pH 5,0 a 7,5 a 37°C durante 60 minutos. Na presença de Co^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+} ocorrera ativação de ambas as frações e na presença de Ag^+ , Hg^{2+} , N-bromosuccinimida e iodo ocorrera a inativação das enzimas. Estudando a cinética da fração II, os autores verificaram que a mesma hidrolisara preferencialmente dextranas com ligações glicosídicas α -1,6, isto é, dextranas não ramificadas.

Ainda no ano de 1973, dando continuidade ao estudo sobre dextranases fúngicas, Hiraoka et. al. (19) procederam ao estudo de algumas propriedades físico-químicas e especificidade quanto ao substrato de dextranases altamente purificadas provenientes de *Aspergillus carneus* e *Penicillium luteum*. Utilizando a técnica de ultracentrifugação, Hiraoka et. al. encontraram os valores de 71000 e 46000 para o peso molecular da dextranase de *A. carneus* e *P. luteum*, respectivamente. A composição em aminoácidos, como puderam verificar os pesquisadores, de ambas as enzimas fora similar, exceto o conteúdo de histidina, arginina, treonina e serina. A comparação dos produtos da digestão de isomaltodextrinas e seus derivados reduzidos indicara que a dextranase de *A. carneus* liberara unidades de isomaltotriose e menor quantidade de isomaltose a partir da extremidade não-redutora do substrato. Hiraoka et. al. concluíram que a dextranase de *P. luteum* cindira os substratos removendo inicialmente unidades isomaltosil e em quantidade menor, isomaltotriosil da extremidade não-redutora do substrato.

No mesmo ano, Yamaguchi e Gocho (59) examinaram 500 linhagens de microrganismos produtores de dextranase quanto ao pH de atividade e à estabilidade enzimática. Neste estudo encontraram uma bactéria gram-positiva do gênero *Brevibacterium* (*Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum*), que produzira dextranase alcalina. A síntese máxima de dextranase ocorrera em meio líquido contendo 1% de dextrana, 2% de etanol, 1% de polipeptona e 0,05% de ex

trato de levedura e traços de sais inorgânicos, em aerobiose. Verificaram os autores que a dextranase apresentara pH ótimo em 8,0 a 37°C e temperatura ótima de 53°C em pH 7,5. A enzima manteve a sua estabilidade na faixa de pH 5,0 a 10,5 por 24 horas em 37°C, acentuadamente em pH alcalino. A enzima também se mostrou estável a 60°C por 10 minutos. Yamaguchi e Gocho observaram que $HgCl_2$, $CuCl_2$ e $ZnCl_2$ apresentaram efeito inibitório sobre a dextranase de *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum*.

Na mesma época, Joshi e Tamhane (23) pesquisaram a ocorrência de microrganismos produtores de dextranase no solo e no ar. Notaram que um fungo, até então desconhecido como produtor de enzima, isolado do ar e identificado como *Aspergillus luchuensis* Inui, apresentara excelente atividade de dextranase. Verificaram também que a atividade da exo-dextranase atingira seu máximo após 96 horas de incubação, enquanto que a atividade da endo-dextranase o fizera após 72 horas de fermentação. Joshi e Tamhane salientaram que a produção de enzima fora indutível e que a dextrana, e até certo ponto o amido, como única fonte de carbono, conseguiram induzir a produção da enzima pelo microrganismo que eles utilizaram.

Em 1974, Sugiura et. al. (47), dando continuidade ao estudo sobre dextranase realizado em 1973, purificaram a enzima de *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* através de fracionamento com sulfato de amônio, filtração em Bio-Gel P-30 e cromato

grafia em DEAE-celulose. Na eletroforese de disco, os autores obtiveram uma única banda protéica para a enzima. A enzima mostrou-se mais ativa na faixa de pH de 7,0 a 7,5 em 30 minutos de reação. Verificaram, Sugiura et. al., que a enzima mantivera a estabilidade na faixa de pH 5,0 a 11,0 a 36°C durante 12 horas. Estudando o efeito de sais metálicos e reagentes, os pesquisadores notaram que a enzima fora ativada na presença de iodo, HgCl_2 , N-bromosuccinimida e CuSO_4 . Analisando a reação de hidrólise, Sugiura et. al. verificaram que, na hidrólise da dextrana e de isomaltodextrinas reduzidas, a isomaltotriose fora a única substância redutora formada. Notaram também que a viscosidade específica da mistura diminuía lentamente. Estes resultados sugeriram aos autores que a dextranase de *Brevibacterium fuscum* var. dextranlyticum removera unidades isomaltotriosil a partir da extremidade não-redutora das isomaltodextrinas, apresentando atividade apenas de exo-enzima.

No mesmo ano, Richards e Streamer (41) investigaram o mecanismo de ação da dextranase D_1 de *Pseudomonas* UQM 733 sobre oligossacarídeos da série isomaltose e dextrana. Neste estudo, eles verificaram que a fração D_1 não apresentara capacidade de hidrolisar oligossacarídeos com menos de 5 unidades de glicose, mesmo após mais de 60 horas de hidrólise. A velocidade inicial de hidrólise aumentara com o acréscimo de unidades de glicose até isomaltooctose. Com oligossacarídeos maiores os autores verificaram decréscimo lento do grau de hidrólise.

Incubando isomaltotriose e isomaltotetraose com a fração D_1 durante 4 dias, Richards e Streamer notaram a presença de traços de glicose e isomaltose e glicose, isomaltose e isomaltotriose, respectivamente. Este fato sugeriu a eles que a enzima não hidrolisara oligossacarídeos menores que a isomaltopentaose na presença de substratos mais facilmente hidrolisáveis. Estes resultados estiveram de acordo com as observações dos mesmos autores feitas em 1972. Dos oligossacarídeos degradáveis apenas a isomaltopentaose mostrou uma forma predominante de degradação liberando isomaltose e isomaltotriose. A degradação de oligossacarídeos maiores liberou diversos produtos indicando que os mesmos possuíam mais de uma ligação glicosídica suscetível à dextranase D_1 .

Petrova e Molodova, ainda em 1974, (38) estudaram o efeito de diversas fontes de carbono, nitrogênio e fósforo na biossíntese de dextranase extracelular de *Penicillium funiculosum* 15. Os autores observaram que dextrana de *Leuconostoc mesenteroides* a 1,0% levou à maior atividade de dextranase e substituindo a dextrana por amido obtiveram baixa atividade da enzima. Para a fonte de nitrogênio notaram que NaNO_3 a 0,1% levou à maior síntese de dextranase, e como fonte de fósforo o K_2HPO_4 a 0,08% mostrou-se mais efetivo. Aproveitando este mesmo estudo, os autores analisaram o efeito de MgSO_4 na biossíntese de dextranase e verificaram que o mesmo, na concentração de 0,60 g/l, mostrava-se favorável. Ao meio basal, composto de 1% de dextrana; 0,1%

NaNO_3 ; 0,08% K_2HPO_4 e 0,06% MgSO_4 , Petrova e Molodova acrescentaram diversos produtos, tais como, farinha de soja, caldo de Hottinger, hidrolisado de caseína, extrato de milho, e extrato de broto de cevada, verificando que todos eles provocaram diminuição da atividade de dextranase de *Penicillium funiculosum*.

Posteriormente, Sugiura e Ito (49), em 1975, investigaram algumas propriedades físico-químicas e composição em aminoácidos das dextranases de *Brevivacterium fuscum* var. *dextranolyticum* e *Penicillium funiculosum* IAM 7013. As constantes de sedimentação encontradas foram 4,35 S e 4,37 S e os pontos isoelétricos (pI) 4,17 e 4,19, respectivamente. A filtração em Bio-Gel P-100 indicara peso molecular de $5,5 \times 10^4$ para *B. fuscum* e $4,4 \times 10^4$ para *P. funiculosum*. Na análise de aminoácidos, os autores verificaram que a dextranase de *B. fuscum* fora composta por 429 resíduos de aminoácidos e a enzima de *P. funiculosum* apresentara mais de 349 resíduos de 18 aminoácidos. A composição de ambas as enzimas mostrara diferir apenas nos dois resíduos de cistina contidos unicamente na enzima de *P. funiculosum*. Por outro lado, Sugiura e Ito, constataram que ambas eram glicoproteínas.

Simonson e Liberta (44), em 1975, pesquisando 179 fungos dos gêneros *Ascomycetes* sp, *Basidiomycetes* sp, *Deuteromycetes* sp e *Zygomycetes* sp quanto à produção de dextranase, verificaram que diversas linhagens de *Fusarium* sp e

Penicillium roquefortii apresentaram atividade da enzima. Estas linhagens não tinham sido descritas até então como produtoras da referida enzima. Os autores selecionaram *Fusarium moniliforme* para estudos posteriores, observando que em meio líquido, o pH inicial 8 fora o mais adequado para a produção de dextranase. Neste mesmo pH as colônias mostraram diâmetro maior. Os pesquisadores notaram ainda, que um período de incubação de 14 dias fora o mais favorável para a produção da enzima. Estudando o sistema de dextranase, observaram que o mesmo fora do tipo indutível, uma vez que na presença de sacarose, maltose ou glicose não ocorreu a produção da dextranase. Na presença de mistura de glicose e dextrana ocorreu a produção da mesma em quantidade menor do que na presença apenas de dextrana.

Nesse mesmo ano, Vinogradova et. al. (57) estudaram 50 linhagens de fungos e 240 linhagens de *Actinomycetes* sp. Aproximadamente 1/3 dos fungos e 1/8 dos *Actinomycetes* sp apresentaram atividade de dextranase. Entre os fungos os maiores produtores foram *Gymnoascus uncinatus*, *Curvularia lunata*, *Penicillium lunata*, *P. janthinellum* e *P. luteum*. Os autores verificaram também que a atividade das linhagens de *Actinomycetes* sp fora algumas vezes superior à encontrada nos fungos. Em contraste com os fungos, a dextranase dos *Actinomycetes* sp apresentara atividade máxima em meio neutro ou levemente alcalino.

Simonson et. al. (45), ainda em 1975, purificaram a

endo-dextranase extracelular de *Fusarium moniliforme*. O produto principal da hidrólise enzimática da dextrana mostrou ser a iso maltose. O grupo de pesquisadores verificara que o peso molecular da enzima fora 39000. Neste estudo, estabeleceram o pH óti mo da enzima em 5,5 e a temperatura ótima em torno de 55°C. A dextranase não mostrara inibição pelo EDTA ou acetato de iodo e o K_M para dextrana de peso molecular médio 10000 fora estimado por Simonson et. al. em $1,1 \times 10^{-4}$ M. Na eletroforese verifica ram-se algumas diferenças em relação à dextranase comercial de *Penicillium* sp.

Em 1976, Hayward e Sly (17) estudaram 78 bactérias gram-positivas diferentes quanto à produção de dextranase. Utilizando meio de "agar-blue-dextran", isolaram, a partir de amostras de solo, 2 bactérias, que sintetizaram dextranase extracelular. Através de testes bioquímicos e de estudos morfológicos, os pesquisadores constaram que as bactérias em questão foram a *Oerskovia xanthineolytica* UQM 1150 e 1151.

Posteriormente, em 1977, Pulkownkh e Walker (39), isolaram uma endo-dextranase extracelular de *Streptococcus mutans* Kl-R. Verificando a especificidade da enzima purificada, notaram que a mesma inicialmente hidrolisara a dextrana a sacarídeos da série isomaltose, sendo que o menor deles fora a IM_5 . Incubando a mistura por tempo prolongado, os autores verificaram que a quantidade de IM_5 mantivera-se inalterada, enquanto que os açúcares maiores do que IM_5 foram hidrolisados a IM_4 , IM_5 e pequenas quantidades de isomaltose e

glicose. Adicionando excesso de enzima e incubando por tempo prolongado, notaram que a hidrólise de IM_4 e IM_5 fornecera, como produutos, glicose, IM_2 e IM_3 . A taxa de hidrólise dos sacarídeos da série isomaltose reduzira-se drasticamente com o decréscimo do comprimento da cadeia de IM_{12} a IM_5 . Pulkownkh e Walker notaram também que a hidrólise de dextranas, contendo 96% ou mais de ligações glicosídicas α -1,6 fora completa, enquanto que a hidrólise de dextrana de *L. mesenteroides* NRRL-B-1355, que contivera 88% de ligações glicosídicas α -1,6, atingira apenas 84%.

No mesmo ano, Maksimov et. al. (32) purificaram e caracterizaram a dextranase produzida pelo fungo *Penicillium funiculosum* 15. Na purificação da enzima valeram-se da precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em DEAE-celulose. Durante este procedimento, o grupo de pesquisadores verificara que na 1^a cromatografia em DEAE-celulose obtiveram atividade específica elevada embora não tivessem sucesso na remoção dos carboidratos presentes na preparação enzimática. Nos estágios subsequentes de purificação, isto é, cromatografia em Sephadex G-15 e 2^a cromatografia em DEAE-celulose conseguiram eliminar pequena quantidade de carboidratos perdendo concomitantemente atividade da enzima. Maksimov et. al. notaram também que a dextranase fora instável na forma purificada o que se manifestara claramente durante a liofilização da mesma. A liofilização de eluatos dessalificados da cromatografia em DEAE-celulose levava a perdas de atividade da ordem de 30 a 90%.

Em 1978, Danilova et. al. (10) isolaram, purificaram e caracterizaram a dextranase de *Fusarium solani* (Mort) App et Wr 281. Compararam ainda esta enzima com a dextranase obtida a partir de *Penicillium funiculosum*. Os pesquisadores verificaram que o peso molecular da dextranase de *F. solani* fora de 39600 e da dextranase de *P. funiculosum* de 34800; o ponto isoelétrico da primeira fora 4,23 e da última 4.25, Quanto ao pH ótimo de atividade, Danilova et. al. observaram que este fora de pH 5,0 para *P. funiculosum* e de pH 5,0 a 5,5 para *F. solani*.

Dando continuidade ao trabalho sobre dextranase de *Pseudomonas* UQM 733, Richards e Streamer (42) estudaram, no ano de 1978, o modo de ação da fração D₂, uma endo-dextranase extracelular. Purificando esta fração através de cromatografia de exclusão molecular verificaram que o produto mostrara duas bandas proteicas na eletroforese em gel. Apenas a banda maior demonstrara atividade de dextranase. Os autores notaram que a taxa de degradação e a percentagem de incremento do poder redutor aumentara com o aumento do grau de polimerização dos isomaltossacarídeos de IM₇ a IM₁₂. Por outro lado, observaram que a fração D₂ hidrolisara preferencialmente ligações glicosídicas distantes de ambas as extremidades da cadeia do substrato. Este fato ficara bem evidente na hidrólise de IM₁₀, IM₁₁ e IM₁₂ onde não ocorrera formação de produtos de grau de polimerização inferior a três. A endo-dextranase não mostrara taxa de hidrólise máxima para oligossacarídeos de grau de polimerização 7 a 12. A IM₇ fora o menor isomaltossa

carídeo que a fração D_2 hidrolisara em velocidade significativa. A partir destes resultados, Richards e Streamer não conseguiram postular um modelo exato para o sítio ativo de D_2 , uma vez que com IM_{12} não se atingira velocidade máxima de hidrólise. No entanto, estes achados sugeriram aos autores que o sítio ativo envolvera 10 ou mais sub-sítios capazes de se ligar às unidades de glicose do substrato.

Ainda em 1978, Covacevich e Richards (8) retomaram o estudo feito em 1972 por Cheetham e Richards e, utilizando a técnica de eletrofocalização, investigaram novamente a dextranase e as α -D-glicosidades intracelulares de *Pseudomonas* UQM 733. Verificaram a presença de, no mínimo, três dextranases. O produto final da hidrólise de dextrana fora a glicose, o que demonstrara aos autores a presença de enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,6 e α -1,3 do substrato. Covacevich e Richards purificaram uma fração intracelular de dextranase, que eles denominam D_4 , e notaram que a mesma possuía características semelhantes à endo-dextranase extracelular D_1 , analisada em trabalho anterior de Cheetham e Richards.

Um ano depois, em 1979, Greulich e Ludwig (14) estudaram a cinética da hidrólise enzimática da dextrana através de dextranase, quanto à influência do pH sobre a mesma. Neste estudo verificaram que o pH ótimo da enzima fora 6,6.

Covacevich e Richards (9), no mesmo ano, estudaram o mecanismo de ação da dextranase intracelular (fração D₄) de *Pseudomonas* UQM 733 que tinha sido purificada por eles no ano anterior, valendo-se de diversos isomalto-oligossacarídeos como substrato. A velocidade inicial de hidrólise aumentara conforme o aumento no grau de polimerização, de IM₇ e IM₉, e se mostrara muito baixa em relação a oligossacarídeos menores. A hidrólise de IM₆ fornecera quantidades equimolares de IM₄ e IM₂, o que indicara uma cisão assimétrica do substrato. Este comportamento fora notado também por Richards e Streamer, para a dextranase extracelular (D₁) da mesma bactéria.

Mais tarde, Minakova e Preobrazhenskaya (34), em 1980, estudaram as condições de cultura mais favoráveis para a produção de dextranase pelo fungo *Penicillium purpurogenum* (Ftoll). Neste estudo, notaram que meio contendo 2% de dextrana, NaNO₃ como fonte de nitrogênio, além de KH₂PO₄ era o mais adequado para a produção da enzima. Procedendo ao isolamento da dextranase em estado homogêneo, utilizando eletroforese, constataram que a mesma possuía ponto isoelétrico em pH 4,3 e peso molecular de 365000. O pH ótimo da enzima fora de 5,5 e o pH de estabilidade verificara-se na faixa de 6,5 a 7,0. Num estudo comparativo, fazendo uso de dextranase de *P. purpurogenum* (Ftoll) e de *P. funiculosum*, os autores observaram que a primeira hidrolisara dextranas lineares a uma veloci

dade três vezes superiores à última. Ao mesmo tempo, notaram que na hidrólise de dextranas ramificadas, a enzima de *P. purpurogenum* forneceu 1,5 vezes mais produtos lineares (glicose e isomaltose) e maior quantidade de tetrassacarídeos ramificados do que a hidrólise do mesmo substrato pela dextranase de *P. funiculosum*.

Maksimov et. al. (33), no mesmo ano estudaram a atividade de sacarolítica e liquefaciente de dextranase homogênea de *Penicillium funiculosum*. Notaram que ocorrera perda rápida de atividade liquefaciente durante o armazenamento de soluções aquosas da enzima. Esta atividade, no entanto, fora recuperada após filtração em gel da solução enzimática. Os pesquisadores observaram que a atividade de liquefaciente de soluções de dextranase recém preparadas, aumentara aproximadamente duas vezes por filtração em gel e diminuía a 1/3 da atividade inicial, após armazenamento a 4°C durante 20 horas. Maksimov e sua equipe observaram que durante as operações descritas, a atividade sacarolítica das preparações enzimáticas experimentara perdas de 6 a 15% em relação à atividade inicial.

Ainda no mesmo ano, Molodova et. al. (35), realizaram um estudo comparativo entre diversos métodos de purificação da dextranase de *Penicillium funiculosum*. Os métodos por eles utilizados foram: fracionamento com álcool etílico, dessalificação (salting-out) com sulfato de amônio, adsorção da enzima em bentonita e cromatografia em DEAE-celulose. Usando o método de adsorção em bentonita, os autores obtiveram alta atividade específica

(500 U/mg proteína), enquanto que a purificação por cromatografia em DEAE-celulose resultara num preparado enzimático homogêneo na eletroforese em gel de poliacrilamida, com atividade específica de até 1000 U/mg proteína.

Um ano depois, em 1981, Hattori e Ishibashi (15), analisando 556 linhagens de fungos e 115 linhagens de *Streptomyces* sp. em relação à produção de dextranase, encontraram 30 linhagens de diversos gêneros que produziram a enzima. Entre as linhagens estudadas, os pesquisadores verificaram que o fungo *Chaetomium gracile* fora aquele que apresentara maior produção de dextranase, tanto em meio líquido, como em meio semi-sólido. Hattori e Ishibashi verificaram as características físico-químicas da enzima, tais como pH ótimo, pH de estabilidade temperatura ótima, além de estudar a hidrólise da dextrana através da enzima.

Hattori et. al. (16), em 1981, dando seqüência ao estudo iniciado por Hattori e Ishibashi no mesmo ano, procederam à purificação e caracterização da dextranase de *Chaetomium gracile*. Durante o procedimento de purificação da enzima, notaram a presença de várias frações que apresentaram atividade de dextranase, sendo que duas destas frações foram mais ativas. Do ponto de vista enzimático ambas as frações mostraram propriedades semelhantes: pH ótimo em torno de 5,5; pH de estabilidade na faixa de pH 5,5 a 11,0; temperatura ótima de 65°C e estabilidade térmica abaixo de 55°C. Os autores estimaram o peso molecular em 77 000 para a fração I e 71000 para a fração II; o ponto isoelétrico fora 6,2 e 5,7, respectivamente.

Hattori et. al. concluíram que as frações se comportaram como endo-dextranases, embora o grau de hidrólise da dextrana atingira 55%, expresso em glicose.

Lobanok, Zinchenko e Shishlo (29), ainda em 1981, isolaram duas frações com atividade dextranase a partir de culturas do fungo *Penicillium piscarium* BIM G-102 em meio líquido. Estas frações apresentaram valores diferentes de R_f quando submetidas à eletroforese (fração 1: $R_f = 0,42$ e fração 2: $R_f = 0,55$), embora ambas apresentaram peso molecular aproximado de 82 000. Estudando a hidrólise da dextrana por ambas as frações, os autores notaram que elas diferiram levemente no modo de ação, tanto qualitativa como quantitativamente. Lobanok e sua equipe observaram também que o efeito dos íons por eles estudados, fora diferente para a fração 1 e 2.

Mais tarde, Lobanok, et. al. (30), em 1982, realizaram um estudo para estabelecer as condições ótimas de produção de dextranase pelo fungo *Aspergillus insuetus* G-116 em meio líquido e sólido. Os parâmetros por eles analisados foram temperatura, aeração, acidez do meio, inóculo, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, fatores estimuladores do crescimento do fungo e da produção de dextranase. Os autores verificaram que a temperatura ôtima para o crescimento do fungo fora 24-25°C, enquanto que a 29°C o acúmulo de dextranase fora máximo. Quanto à aeração, Lobanok et. al., observaram que a taxa ótima de oxigênio para a síntese de dextranase fora 2,3 mg O_2 /min. O inóculo mais apropriado para o meio líquido fora esporos numa contagem de 5×10^6 a 1×10^7 /50 ml de meio. De acordo com as observações feitas pelos

pesquisadores o pH 4 a 5 mostrara-se mais eficiente no acúmulo da enzima. A única fonte de carbono capaz de induzir a produção de dextranase fora a dextrana, enquanto que NaNO_3 e KNO_3 mostraram-se eficientes como fontes de nitrogênio. Os autores verificaram que o farelo de trigo influenciara positivamente o crescimento do *Aspergillus insuetus* G-116 e a produção de dextranase pelo mesmo.

Nesse mesmo ano, Saska e Polack (43) procederam à cristalização da sacarose na presença de dextrana e de dextrana parcialmente hidrolisada. Eles evidenciaram que o efeito da presença de oligossacarídeos, provenientes da hidrólise da dextrana, sobre o alongamento dos cristais de sacarose diminuía de acordo com a relação alongamento/peso molecular da dextrana. Desta forma, ficava invalidada a hipótese do alongamento dos cristais aumentar com a hidrólise da dextrana, desde que algum dos oligossacarídeos fosse ativo na modificação dos cristais.

Parrish (37), em 1982, verificara a influência de três tipos de dextrana (dextrana de peso molecular 500 mil e 2000 mil e proveniente de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512) assim como de isomaltose na viscosidade de soluções de açúcar, medindo a viscosidade de soluções de sacarose de 46 a 60° Brix em temperaturas que variaram de 35 a 75°C na presença de 6500 ppm de dextrana ou de isomaltose. Neste estudo, Parrish verificara que a concentração de dextrana que ele utilizara, aumentara a viscosidade da solução de sacarose. Da mesma maneira, a presença de dextrana provocara alongamento do eixo "c" dos cristais de sacarose. Notara também, que a concentração de 6500 ppm de isomaltose não causara alongamento dos cristais de sacarose.

Kobayashi et. al. (25), em 1983, purificaram a dextranase II de *Flavobacterium* sp M-73. Esta fração tinha sido detectada anteriormente pela mesma equipe de pesquisadores. Durante a purificação, os pesquisadores utilizaram cromatografia em coluna de Amberlite CG-50 e em amino-octil-Sepharose, seguida de cromatografia de afinidade em isomaltotriose-Sepharose e eletroforese. A enzima purificada mostrara ser monomérica, de peso molecular 114 mil. A fração II fora mais ativa em pH 7,0 e 35°C, sendo estável a 4°C por 24 horas na faixa de pH 6,5 a 12,0. Kobayashi et. al. observaram que a fração II apresentara especificidade por ligações α -1,6 consecutivas e o produto principal na hidrólise da dextrana fora a isomaltotriose. Após 8 horas de hidrólise, também fora possível detectar isomaltose, isomaltotetraose e um açúcar não identificado.

Estudando a fração II da dextranase de *Flavobacterium* sp M-73, anteriormente estudada por Kobayashi et. al., Takagi et.al.(52), em 1984, verificaram que a mesma hidrolisara dextranas lineares, tais como dextrana T-10, T-110 ou B-512F em proporção variável de 25 a 32%, expressa como conversão aparente a D-glicose. Dextranas ramificadas como as provenientes das linhagens B-1298, B-1299, B-1307 ou B-1416 mostraram não ser bons substratos para a enzima. Os estudos realizados em dextranas lineares evidenciaram que na hidrólise de substratos de elevado peso molecular a dextranase de *Flavobacterium* sp M-73 comportara-se como endoenzima, fornecendo como produto

principal da hidrólise a isomaltose. Quando Takagi et. al. utilizaram isomalto-oligossacarídeos como substrato da dextranase II, a mesma não se mostrara eficiente. Nos estudos de cinética enzimática os autores verificaram que a afinidade da enzima aumentara com o incremento no tamanho molecular do substrato. O uso simultâneo de dextranase I (capaz de hidrolisar ligações α -1,2) e dextranase II aumentara sensivelmente o grau de hidrólise de dextranas ramificadas das linhagens B-1298 e B-1299.

Em 1985, Lee e Fox (27) purificaram e caracterizaram a dextranase de *Paecilomyces lilacinus*, a partir de extrato cru liofilizado. A purificação fora atingida por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. Durante a cromatografia, Lee e Fox verificaram a presença de duas isoenzimas. As características físico-químicas de ambas as dextranases foram similares. A atividade hidrolítica máxima se verificara em pH 4,5 e 55°C. Os autores observaram também que ambas as isoenzimas foram inativadas a 70°C. A energia de ativação para a inativação térmica fora de 402 e 330 kJ/mol para a dextranase I e II, respectivamente. As isoenzimas não foram inibidas por EDTA (ácido etilenodiaminatraacético) nem por NEM (N-etilmaleimida) na faixa de concentração de 10^{-6} a 10^{-2} M.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção de fungos produtores de dextranase

Com o objetivo de selecionar fungos produtores de dextranase, foram isoladas do solo e de cana de açúcar deteriorada, e testadas inúmeras culturas de fungos conforme descrição que se segue.

3.1.1. Coleta de amostras

As amostras de terra e de cana deteriorada foram coletadas em plantações de cana de açúcar e usinas de açúcar e de álcool do Estado de São Paulo.

Foram coletadas amostras de aproximadamente 50g de terra isenta de resíduos vegetais e animais, de profundidade variando de 5 a 20 cm e acondicionadas separadamente em sacos plásticos (11).

Para a coleta de cana deteriorada, foram selecionadas varas que tinham sido estocadas por um período de aproximadamente 8 dias. As extremidades destas varas foram cortadas e os pedaços acondicionados separadamente em sacos plásticos.

3.1.2. Isolamento dos fungos

Cerca de 1g de terra de cada amostra foi adicionada a tubo de ensaio contendo 10ml de água destilada esterilizada, agitada vigorosamente e deixada em repouso. Do sobrenadante preparou-se

uma diluição de 1:10 em água destilada esterilizada. Desta suspensão de microrganismos espalhou-se uma alçada em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose, incubando-se as mesmas à temperatura ambiente por 3 a 5 dias para o adequado crescimento dos fungos. Os fungos isolados a partir deste material foram mantidos em tubos de Agar Sabouraud Dextrose inclinado.

Para o isolamento de fungos das extremidades das varas de cana, tocou-se a superfície das mesmas com uma alça, espalhando-se o material diretamente em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose. A seguir, as placas sofreram o mesmo tratamento descrito acima.

3.1.3 Seleção preliminar de fungos produtores de dextranase

Os fungos isolados de acordo com o item 3.1.2. foram inoculados em frascos erlenmeyer de 500 ml contendo 20g de meio de cultura semi-sólido, composto de farelo de trigo e água destilada na proporção de 1:1 (P/V), esterilizados. Os erlenmeyer foram incubados a 30°C durante 5 a 7 dias, até crescimento adequado dos fungos. Após a incubação, foram adicionados 100 ml de água destilada a cada erlenmeyer. Triturou-se e agitou-se o conteúdo dos mesmos para extração da enzima. Os frascos foram deixados em repouso durante uma hora, após o qual o conteúdo dos mesmos foi submetido à filtração em papel de filtro. A atividade de dextranase do filtrado foi determinada conforme o item 3.2.

3.1.4. Seleção de fungos melhores produtores de dextranase

Os fungos que apresentaram atividade de dextranase de acordo com a seleção descrita no item 3.1.3., foram inoculados em tubos de ensaio contendo 2g de meio de cultura semi-sólido, composto de farelo de trigo e água destilada na proporção de 1:1 (P/V), esterilizado, e em tubos de ensaio contendo 2g de meio de cultura semi-sólido enriquecido com dextrana, composto de farelo de trigo e solução de dextrana (PM 60 a 90 mil) a 1%, na proporção de 1:1 (P/V), esterilizado. Os tubos foram incubados a 30°C durante 5 dias. A seguir, foram adicionados 20 ml de água destilada a cada tubo, recebendo o conteúdo dos mesmos o tratamento descrito sob o item 3.1.3.

3.1.5. Indução da produção de dextranase em meio líquido

Os fungos melhores produtores de dextranase em meio semi-sólido contendo dextrana, foram inoculados em frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 25 ml de meio líquido, esterilizado. A composição do meio líquido era a seguinte: 0,5% extrato de levedura; 1,0% peptona; 0,5% KH_2PO_4 e 0,25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Como fonte de carbono utilizou-se 0,5% dextrana (PM 60 a 90 mil) ou 0,5% amido solúvel; o pH inicial de ambos os meios foi de pH 6,0. Após 4 dias de incubação à temperatura ambiente de 25°C e agitação constante de 200 rpm, o conteúdo dos frascos erlenmeyer foi filtrado. A atividade de dextranase do filtrado foi determinada de acordo com o item 3.2.

3.2. Determinação da atividade de dextranase

A atividade de dextranase foi medida utilizando-se como substrato a dextrana (PM 60 a 90 mil) a 0,5% em tampão acetato 0,1M, pH 5,0. A 4 ml do substrato, juntou-se 1 ml de extrato enzimático, convenientemente diluído, incubando-se o sistema a 40°C durante 20 minutos. Após inativação térmica em banho de água em ebulição por 15 minutos, o teor de açúcares redutores foi determinado pelo método de Somogyi-Nelson (36), utilizando-se como padrão a D-glicose anidra. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de glicose por minuto, nas condições do ensaio.

3.3. Estudo da produção de dextranase em fermentação submersa

Com o objetivo de otimizar a produção de dextranase em fermentação submersa, estudaram-se alguns parâmetros que afetam a mesma, conforme descrição que se segue.

3.3.1. Efeito da fonte de carbono na produção de dextranase

Para avaliar o efeito da fonte de carbono na produção de dextranase, inoculou-se o fungo melhor produtor da enzima, selecionado de acordo com os itens 3.1.3., 3.1.4. e 3.1.5., em frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 25 ml de meio de cultura líquido, esterilizado, com a seguinte composição: 0,5% extrato de levedura; 1,0% peptona; 0,5% KH_2PO_4 e 0,25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Como fonte de carbono foram testadas as substâncias dextrana, amido solúvel,

dextrina, sacarose, maltose, lactose e rafinose a 2%, respectivamente. O pH de todos os meios de cultura utilizados foi ajustado em 6,0. Após 4 dias de incubação à temperatura ambiente de 25°C e agitação constante de 200 rpm, o conteúdo dos frascos erlenmeyer foi filtrado. A atividade de dextranase foi determinada de acordo com o item 3.2.

3.3.2. Efeito da fonte de nitrogênio na produção da enzima

Para estudar o efeito da fonte de nitrogênio na produção de dextranase, inoculou-se o fungo melhor produtor da enzima em frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 25 ml de meio de cultura líquido, esterilizado. A composição do meio era a seguinte: 1,0% dextrana, 0,5% extrato de levedura; 0,5% KH_2PO_4 e 0,25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. As fontes de nitrogênio testadas foram as seguintes: peptona, caseína, farinha de soja desengordurada, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a 1,0%, respectivamente. O pH de todos os meios de cultura testados foi acertado em pH 6,0. Os frascos erlenmeyer foram incubados à temperatura ambiente de 25°C e agitação constante de 200 rpm durante 4 dias. Após a incubação, o conteúdo dos frascos foi filtrado. Neste último determinou-se a atividade de dextranase de acordo com o item 3.2.

3.3.3. Efeito da concentração de dextrana na produção de dextranase

Com o objetivo de estudar o efeito da concentração de dextrana presente no meio de cultura, na indução da produção de

dextranase, inoculou-se o fungo melhor produtor da enzima em frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 25 ml de meio líquido, esterilizado. A composição do meio utilizado foi a seguinte: 0,5% extrato de levedura; 1,0% farinha de soja desengordurada; 0,5% KH_2PO_4 e 0,25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Este meio foi acrescido de dextrana (PM 60 a 90 mil) nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5%, respectivamente. O pH de todos os meios de cultura utilizados foi de pH 6,0. Os frascos erlenmeyer foram incubados à temperatura ambiente de 25°C e agitação constante de 200 rpm durante 4 dias. Após a incubação, o procedimento seguido foi o mesmo descrito no item 3.3.1.

3.3.4. Influência da temperatura de incubação na produção de dextranase

Com o intuito de estudar a influência da temperatura de incubação na produção de dextranase, inoculou-se o fungo selecionado em frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 25 ml de meio de cultura líquido, esterilizado. A composição do meio foi a seguinte: 0,5% dextrana; 0,5% extrato de levedura; 1,0% farinha de soja desengordurada; 0,5% KH_2PO_4 e 0,25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. O pH do meio de cultura utilizado foi de pH 6,0. Os frascos erlenmeyer foram incubados à temperatura de 25, 30 e 35°C e agitação constante de 200 rpm. Após 4 dias de incubação, o conteúdo dos frascos foi filtrado, e a atividade de dextranase foi determinada no filtrado conforme o item 3.2.

3.3.5. Estudo da cinética de produção de dextranase em fermentação submersa

Com a finalidade de estudar a cinética de produção de dextranase em fermentação submersa, preparou-se uma suspensão de esporos incubando-se a linhagem selecionada durante 5 dias em tubos de Agar Sabouraud Dextrose inclinado à temperatura ambiente. Após a incubação adicionaram-se 15 ml de água destilada esterilizada ao tubo e raspou-se a superfície da colônia com alça de platina estéril. Todo o procedimento foi feito em condições de assepsia.

Da suspensão de esporos inoculou-se 1 ml em cada um dos frascos erlenmeyer de 250 ml. Cada frasco continha 25 ml de meio de cultura líquido, esterilizado, com a seguinte composição: 0,5% dextrana; 1,0% peptona; 0,5% extrato de levedura; 0,5% KH_2PO_4 e 0,25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em pH 6,0. Os frascos erlenmeyer foram incubados a 30°C e agitação constante de 200 rpm. Diariamente foram retirados dois frascos e no conteúdo dos mesmos determinou-se inicialmente o pH. Em seguida o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 10 000 rpm durante 15 minutos. No sobrenadante determinou-se a atividade de dextranase (de acordo com o item 3.2.) e o teor de açúcares totais (de acordo com o item 3.5.). O precipitado foi lavado diversas vezes com água destilada e transferido para placa de Petri previamente tarada. A massa celular foi secada em estufa a 100°C até peso constante.

3.3.6. Produção de dextranase em fermentação submersa

Para a produção de dextranase em fermentação submersa incularam-se 2 ml da suspensão de esporos, obtida de acordo com o item 3.3.5., em frascos erlenmeyer de 500 ml contendo 50 ml de meio de cultura líquido, esterilizado. A composição do meio utilizado era a mesma do item 3.3.4. Os frascos foram incubados nas mesmas condições do item 3.3.5. Decorridos 5 dias de incubação, o conteúdo dos frascos foi centrifugado e em seguida filtrado. No filtrado determinou-se a atividade de dextranase, o teor de proteína e de açúcares totais. O filtrado foi liofilizado para conservação e posterior purificação.

3.4. Determinação da concentração de açúcares totais

O teor de açúcares totais foi determinado pelo método de Dubois et. al. (12), utilizando-se como padrão a D-glicose anidra.

3.5. Purificação da dextranase bruta

Para a purificação da dextranase bruta, em pó, obtida de acordo com o item 3.3.6., utilizou-se cromatografia em DEAE-celulose e em CM-celulose.

3.5.1. Cromatografia em coluna de DEAE-celulose

Para realizar a cromatografia em DEAE-celulose (dietilaminoetil-celulose), 30g da mesma foram previamente tratadas com soluu

ção de ácido clorídrico e hidróxido de sódio conforme especificação do fabricante e em seguida equilibrada em tampão citrato - fosfato 0,05M pH 4,2.

2,8g de dextranase bruta, em pó, contendo 92,36 mg de proteína e 4950,03 U de atividade, foram dissolvidas em 40 ml de água destilada e dialisadas em membrana de celulose contra água destilada durante 24 horas e por mais 24 horas contra tampão citrato-fosfato 0,05M pH 4,2. A diálise foi realizada a 4°C. A solução enzimática obtida foi aplicada em coluna de DEAE-celulose, previamente tratada, de 2,6 cm de diâmetro e 60 cm de comprimento.

A enzima foi eluída através de gradiente de concentração de NaCl variando-se de 0,1 a 1,0M. Durante a cromatografia manteve-se fluxo constante de 12 ml/hora mediante bomba peristáltica, coletando-se frações de 6 ml cada. O curso de eluição de proteínas através da coluna foi acompanhado pela medida da absorbância a 280nm em espectrofotômetro.

A atividade de dextranase das frações foi determinada de acordo com item 3.2. As frações que mostraram atividade foram reunidas e a concentração de proteína e de açúcares totais foram determinadas de acordo, respectivamente, com os itens 3.7. e 3.5. A solução enzimática obtida foi liofilizada.

3.5.2. Cromatografia em coluna de CM-celulose

Para realizar a cromatografia em CM-celulose (carboximetil

-celulose) 10g da mesma foram previamente tratadas com solução de ácido clorídrico seguida de solução de hidróxido de sódio de acordo com as especificações do fabricante. Finalmente, a resina foi equilibrada em tampão citrato-fosfato 0,05M pH 4,2.

0,6472g de enzima liofilizada, obtida de acordo com o item 3.6.1., contendo 675,2U de atividade e 1,11mg de proteína foram dissolvidas em 12 ml de água destilada e dialisada em membrana de celulose contra água destilada durante 24 horas e por mais 24 horas contra tampão citrato-fosfato 0,05M pH 4,2. A solução obtida foi aplicada em coluna de CM-celulose, previamente tratada, de 2,0cm de diâmetro e 30cm de comprimento.

As proteínas foram eluídas da coluna através de gradiente de concentração de NaCl, variando-se de 0,1 a 1,0 M. O fluxo de eluição foi mantido constante em 12 ml/hora através de bomba peristáltica, coletando-se frações de 6 ml cada. A eluição das proteínas da coluna foi acompanhada pela medida da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro.

A atividade de dextranase foi determinada de acordo com o item 3.2. As frações que apresentaram atividade foram reunidas e dialisadas em membrana de celulose contra água desionizada durante 24 horas a 4°C. A solução obtida foi liofilizada para conservação.

3.6. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Lowry (31), utilizando-se como padrão a albumina de soro bovino.

3.7. Caracterização da dextranase

Para a caracterização da dextranase utilizou-se a enzima purificada, de acordo com o item 3.5.

3.7.1. Efeito da temperatura na atividade da dextranase

Para estudar o efeito da temperatura na atividade da dextranase prepararam-se sistemas contendo 19 ml de solução de dextrana a 0,5% em tampão acetato 0,1M, pH 5,0 e 1 ml de solução enzimática contendo 0,34U de atividade. Os sistemas foram incubados a 35, 40, 50 ou 60°C, respectivamente, durante 20 minutos. A atividade de dextranase foi determinada de acordo com o item 3.2.

3.7.2. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima

Para o estudo do efeito da temperatura na estabilidade da enzima, incubaram-se 10 ml da solução enzimática contendo 0,34 U/ml a 4, 40, 50 ou 60°C por diversas horas. Durante o transcorrer da incubação retiraram-se alíquotas de 1 ml, determinando-se a atividade residual das mesmas como descrito no item 3.2.

3.7.3. Efeito do pH na atividade da dextranase

O efeito do pH na atividade enzimática foi ensaiado preparando-se sistemas contendo 19 ml de dextrana a 0,5% em tampão citrato-fosfato 0,1M e 1 ml de solução enzimática contendo 0,34U de atividade. O tampão foi utilizado dentro da faixa de capacidade de tamponante de pH 2,6 a 7,0. Os sistemas foram incubados a 50°C durante 20 minutos. Decorrida a incubação, a atividade da enzima foi medida de acordo com o procedimento descrito em 3.2.

3.7.4. Efeito do pH na estabilidade da enzima

O efeito do pH na estabilidade da enzima foi verificado juntando-se 2 ml de solução enzimática contendo 0,68U de atividade e 2 ml de tampão citrato-fosfato 0,1M. A faixa de pH estudado foi de 2,6 a 7,0. Os sistemas foram incubados a 20°C durante 24 horas. Decorrida a incubação, determinou-se a atividade residual da enzima utilizando-se 1 ml da solução enzimática de acordo com o item 3.2.

3.7.5. Ação de substâncias inibidoras sobre a atividade da dextranase

O estudo da ação de substâncias inibidoras na atividade da dextranase, foi feito preparando-se sistemas contendo 2 ml de solução de dextrana a 1% em tampão acetato 0,2M pH 4,2, 2 ml do inibidor na concentração final de 1 ou 10 mM e 1 ml de solução enzimática apresentando 0,08 U de atividade. Após 20 minutos de incubação a 40°C as amostras foram tratadas pelo método de Hattori et. al. (16) modificado. A reação enzimática foi interrompida pe

la adição de 1 ml de H_2SO_4 2,0N e neutralizada pela adição de NaOH 1,0N. Finalmente, completou-se o volume para 10 ml e determinou-se a atividade de dextranase pelo método descrito em 3.2.

3.7.6. Influência da concentração de substrato na atividade enzimática

Para o estudo da influência da concentração de substrato na atividade de dextranase, incubou-se 1 ml de solução enzimática contendo 0,15 μ g de proteína e 0,48U de atividade com 4 ml de solução de dextrana (PM 60 a 90 mil) de concentração variável de 0,1 a 1,0% em tampão acetato 0,1M, pH 4,2. Os sistemas foram incubados durante 20 minutos a 50°C e a atividade enzimática foi determinada como descrito no item 3.2.

Os parâmetros cinéticos da hidrólise da dextrana, a constante de Michaelis-Menten (K_M) e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), foram calculados pelo método gráfico de Lineweaver e Burk. (28).

3.8. Cromatografia descendente em papel dos produtos da hidrólise enzimática da dextrana

3.8.1. Preparação dos padrões

Para a preparação dos padrões de glicose e de dextrana dissolveu-se quantidade suficiente de cada, previamente secados, em água destilada de forma a obter soluções de concentração 100 μ g/ml.

Com o objetivo de obter padrões da série isomaltose, ou seja, além de isomaltose, isomaltotriose, isomaltotetraose, isomaltopentaose, isomaltohexaose, isomaltoheptaose e isomaltooctose, procedeu-se à hidrólise ácida de acordo com o método de Turvey e Whelan descrito por Fukumoto et. al. (13). Após neutralização com $\text{Ba}(\text{OH})_2$ e filtração, a solução foi liofilizada obtendo-se o padrão, em pó.

3.8.2. Cromatografia descendente em papel

O estudo dos produtos da hidrólise enzimática da dextrana foi feito incubando-se 9,5 ml de solução de dextrana a 1% em tampão acetato 0,1M pH 4,2 e 0,5 ml de solução enzimática obtida de acordo com o item 3.6 contendo 6,8U de atividade. O sistema foi incubado a 50°C, retirando-se alíquotas de 1 ml decorridas 0; 2; 4; 6 e 24 horas de incubação. As amostras foram inativadas mantendo-se as mesmas em banho a 100°C durante 15 minutos.

Os padrões e as amostras foram aplicados em papel para cromatografia Whatman nº 1. O sistema de solventes utilizado foi butanol: piridina: água na proporção 4:6:3 (V:V). O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de 20 horas.

O cromatograma foi revelado seguindo o método de Trevelyan et. al. (53).

3.9. Estudo da viabilidade de aplicação da dextranase na remoção da dextrana do caldo de cana e de açúcar cristal

Para estudar a possibilidade de se aplicar a dextranase

de *Penicillium* sp na hidrólise da dextrana, presente em caldo de cana e em açúcar cristal , procedeu-se da seguinte forma.

3.9.1. Hidrólise enzimática da dextrana em caldo de cana

1000 ml de caldo de cana recém extraído foram colocados em recipiente de vidro hermeticamente fechado. Em seguida, o mesmo foi deixado em repouso durante 48 horas à temperatura ambiente de 25°C para fermentação dextrânica natural.

500 ml deste caldo foram transferidos para erlenmeyer de 1000 ml e pré-incubados a 40°C durante 1 hora. A solução de dextranase foi preparada pela dissolução de 0,7037g de extrato enzimático bruto, obtido de acordo com o item 3.1.5., em 10 ml de água destilada. A solução enzimática apresentou 124,4U de atividade/ml. 5 ml desta solução foram acrescentados ao caldo de cana, retirando-se alíquotas de 50 ml decorridas 0; 0,5; 1; 2 e 4 horas de incubação a 40°C. As amostras eram imediatamente inativadas em banho a 100°C durante 15 minutos. O teor de dextrana residual nas amostras foi determinado de acordo com o item 3.10.

3.9.2. Hidrólise enzimática da dextrana em açúcar cristal

Para estudar a hidrólise enzimática da dextrana em açúcar cristal preparou-se uma solução aquosa a 50%. A 25 ml desta solução, pré-incubada a 40°C durante 20 minutos, acrescentou-se 1 ml de solução enzimática obtida de acordo com o item 3.6. A solução enzimática apresentou 0,95U de atividade/ml. O sistema substrato-

enzima foi incubado a 40°C, retirando-se alíquotas de 4 ml decorridas 0; 0,5; 1; 2 e 4 horas de incubação. As amostras retiradas foram imediatamente inativadas em banho a 100°C durante 15 minutos. O teor de dextrana residual foi determinado de acordo com o item 3.10.

3.10. Determinação do teor de dextrana

O teor de dextrana presente no caldo de cana e no açúcar refinado foi determinado pelo método de Keniry et. al. (24), utilizando-se a dextrana (marca Intermat) de peso molecular 60 a 90 mil como padrão.

4. RESULTADOS

4.1. Seleção de fungos

A seleção de fungos foi feita de acordo com o item 3.1. Os resultados encontrados constam nos itens a seguir.

4.1.1. Seleção preliminar de fungos produtores de dextranase

A seleção preliminar de fungos produtores de dextranase foi feita de acordo com o procedimento descrito sob o item 3.1.3. Foram isoladas ao todo 863 linhagens, das quais foram preliminarmente selecionados 14 fungos que apresentaram atividade de dextranase. A Tabela 1 indica a atividade de dextranase dos mesmos. Todas as linhagens selecionadas produziram dextranase extracelular.

4.1.2. Seleção de fungos melhores produtores de dextranase

Após submeter os fungos preliminarmente selecionados de acordo com o item 3.1.3. à produção induzida de dextranase em meio semi-sólido contendo dextrana, foram escolhidos 7 deles em função da alta atividade de dextranase que apresentaram. As linhagens pré-selecionadas pertenciam aos gêneros *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp e *Fusarium* sp. A Tabela 2 mostra a atividade de dextranase destes fungos, quando cultivados em meio semi-sólido sem e com dextrana.

4.1.3. Indução da produção de dextranase em fermentação submersa

A fermentação submersa na presença e na ausência de dextrana, possibilitou a escolha da linhagem 265 como melhor produtora da enzima. A Tabela 2 indica a atividade de dextranase nas condições descritas em 3.1.5. A Figura 1 mostra a microfotografia da linhagem escolhida. O fungo foi identificado como *Penicillium* sp em função das características morfológicas da colônia e da análise microscópica.

4.2. Estudo da produção de dextranase em fermentação submersa

O estudo da produção da enzima em fermentação submersa foi feito de acordo com o item 3.3. Os parâmetros estudados foram fonte de carbono, de nitrogênio, concentração de dextrana e temperatura de incubação.

4.2.1. Efeito da fonte de carbono na produção de dextranase

Como mostra a Tabela 3, a produção de dextranase em fermentação submersa, feita de acordo com o item 3.1.5., foi nitidamente influenciada pela fonte de carbono utilizada. O *Penicillium* sp apresentou maior atividade de dextranase em meio contendo dextrana como única fonte de carbono. Em meio contendo amido, maltose ou rafinose como fonte de carbono, o fungo apresentou baixa atividade da enzima. Em meio contendo dextrina, sacarose, lactose ou rafinose não se verificou atividade de dextranase. A ativi

dade de dextranase apresentada pelo fungo foi de 41,21 U/ml ; $6,38 \times 10^{-2}$ U/ml; $2,55 \times 10^{-2}$ U/ml e $8,33 \times 10^{-3}$ U/ml para dextrana , amido, maltose e rafinose, respectivamente.

4.2.2. Efeito da fonte de nitrogênio na produção de dextranase

A Tabela 4 indica os resultados obtidos para o estudo do efeito da fonte de nitrogênio na produção de dextranase, de acordo com o item 3.3.2. Estes resultados indicam que, entre as fontes de nitrogênio testadas, a que mais favoreceu a produção de dextranase foi a farinha de soja desengordurada. Utilizando-se esta fonte de nitrogênio, obteve-se atividade de 37,7 U/ml.

4.2.3. Efeito da concentração de dextrana na produção de dextranase

Os dados obtidos de acordo com o item 3.3.3. constam da Tabela 5. De acordo com estes resultados, a atividade de dextranase apresentada pelo fungo *Penicillium* sp foi de 88,96 U/ml na concentração de dextrana de 0,5%. à medida que aumentou a concentração de dextrana no meio, diminuiu a atividade de dextranase do fungo.

4.2.4. Influência da temperatura de incubação na produção de dextranase

Na Tabela 6 estão representados os resultados obtidos de acordo com o item 3.3.4. De acordo com estes resultados, a temperatura que levou à maior produção de enzima pelo fungo *Penicillium* sp foi de 30°C.

4.2.5. Estudo da cinética de produção de dextranase em fermentação submersa

A Figura 2 mostra os resultados obtidos para o estudo da cinética de produção de dextranase em fermentação submersa feita como descrito no item 3.3.5. A massa celular aumentou do 1º ao 3º dia de fermentação, mantendo-se estável até o 5º dia. A massa celular atingiu 14,8 mg/ml no seu valor máximo. O pH inicial de 6,0 sofreu alterações no decorrer da fermentação como mostra a referida figura, atingindo no final da mesma valor de 7,2. A atividade de dextranase tornou-se perceptível decorridas mais de 24 horas do início da fermentação. A mesma aumentou de forma constante durante o decorrer do estudo, atingindo 40,6 unidades/ml no final do mesmo. O teor de açúcares totais diminuiu rapidamente durante os dois primeiros dias de fermentação. Após este período continuou a diminuir, no entanto mais lentamente. O teor inicial de açúcares totais era de 102 mg/ml e no final era em torno de 12 mg/ml.

4.2.6. Produção de dextranase em fermentação submersa

Na produção de dextranase em fermentação submersa, feita de acordo com o item 3.3.6., obtiveram-se 960 ml de extrato bruto. Na Tabela 7 constam os resultados alcançados para o extrato bruto. O mesmo apresentou atividade específica de 59,89 unidades de dextranase/mg de proteína.

4.3. Purificação da dextranase bruta

O extrato bruto, que inicialmente apresentou atividade específica de 59,89 unidades de dextranase/mg de proteína, foi purificado através de cromatografia em coluna de DEAE-celulose e em coluna de CM-celulose conforme descrição dos itens 3.6.1. e 3.6.2., respectivamente. A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para as diversas etapas de purificação da dextranase.

O eluato obtido após fracionamento em coluna de DEAE-celulose mostrou um único pico de atividade. Como assinala a Figura 3, o pico de atividade de dextranase foi eluído da coluna na concentração de NaCl de 0,4M. As frações que apresentaram atividade, isto é, as frações 142 a 168 foram reunidas. A solução obtida apresentou atividade específica de 411,73 unidades de dextranase/mg de proteína, representando grau de pureza 6,87 vezes superior ao extrato bruto.

O fracionamento em coluna de CM-celulose, como mostra a Figura 4, apresentou um único pico de atividade, eluído da coluna sem gradiente de NaCl. As frações de 13 a 17 foram reunidas, apresentando atividade específica de 3213,51 unidades de enzima/mg de proteína.

4.4. Caracterização da dextranase

A enzima purificada foi caracterizada de acordo com o item 3.8. Os resultados da caracterização constam a seguir.

4.4.1. Efeito da temperatura na atividade da dextranase

A Figura 5 ilustra os resultados obtidos para a verificação do efeito da temperatura na atividade da dextranase, feito de acordo com o item 3.8.1. A temperatura ótima da enzima é de 50°C.

4.4.2. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima

A Figura 6 mostra a estabilidade da dextranase quando submetida à incubação a 4, 40, 50 ou 60°C durante várias horas, conforme descrição feita em 3.7.2.

A 4°C não ocorreu perda de atividade da dextranase nas primeiras 7 horas de incubação, verificando-se após 24 horas perda de 18% de atividade. Quando incubada a 40°C, a enzima manteve a atividade inicial durante 7 horas. Decorridas 24 horas de incubação nesta temperatura, a enzima perdeu 42% da sua atividade. A 50°C ocorreu a manutenção da atividade enzimática durante 1 hora, sendo que, decorridas 24 horas de incubação, a enzima manteve apenas 3% de atividade. A 60°C a dextranase de *Penicillium* sp foi rapidamente inativada, e não apresentou atividade após 24 horas de incubação.

4.4.3. Efeito do pH na atividade da dextranase

A Figura 7 mostra a atividade de dextranase na faixa de pH utilizada, conforme o item 3.8.3. A enzima mostrou maior atividade em pH 4,2.

4.4.4. Efeito do pH na estabilidade da enzima

O estudo referente à influência do pH na estabilidade da enzima foi realizado de acordo com o item 3.7.4. A Figura 8 indica que a enzima mostrou maior estabilidade na faixa de pH 4,2 a 5,0.

4.4.5. Ação de substâncias inibidoras sobre a atividade da dextranase

A Tabela 8 indica os resultados obtidos para o estudo do efeito de diversos sais e inibidores na atividade de dextranase feito como consta no item 3.7.5. Observa-se que todos os sais utilizados inibiram a enzima em ambas as concentrações ensaiadas. Os íons Ag^+ , Hg^{2+} , Mn^{2+} e Fe^{2+} evidenciaram acentuado efeito inibidor.

4.4.6. Efeito da concentração de substrato na atividade enzimática

O item 3.7.6. relata como foi feita a determinação do efeito da concentração de substrato na atividade de dextranase. A Figura 9 demonstra que os parâmetros cinéticos, K_M e $V_{m\text{áx}}$, foram 2,77 mg/ml e 2,88 m moles glicose/minuto/mg proteína, respectivamente. Adotando 75 mil como peso molecular médio da dextrana (PM 60 a 90 mil), o valor de K_M passa a ser $3,69 \times 10^{-2}$ mM.

4.5. Cromatografia descendente em papel dos produtos da hidrólise enzimática da dextrana

A Figura 10 ilustra o cromatograma obtido de acordo com o procedimento descrito em 3.9.

Comparando-se os valores de R_f encontrados para os padrões com as amostras aplicadas no cromatograma, observa-se no início da hidrólise uma mancha difusa na origem que corresponde à dextrana. Após 2 horas de reação aparecem manchas características de isomaltose, isomaltotriose. Na origem, apareceu uma mancha difusa, provavelmente dextrana e oligossacarídeos maiores que a isomaltopentaose. No transcorrer da hidrólise enzimática da dextrana, aumentou a concentração de glicose, isomaltose e isomaltotriose liberada por ação da enzima.

4.6. Viabilidade de aplicação da dextranase na remoção de dextrana do caldo de cana e de açúcar cristal

4.6.1. Hidrólise enzimática da dextrana em caldo de cana

A possibilidade de remoção enzimática da dextrana em caldo de cana foi estudada de acordo com o item 3.9.1. A Tabela 9 indica os resultados obtidos neste estudo. O teor inicial da dextrana no caldo de cana era de 11,8 mg/ml. Decorridas 0,5 horas de hidrólise, o teor de dextrana no caldo de cana caiu para 0,77 mg/ml, representando uma redução de 93,47% de dextrana. O teor de dextrana continuou a cair no transcorrer da hidrólise. Comple

tadas 4 horas de reação enzimática, permaneciam no caldo de cana apenas 3,73% do teor inicial de dextrana.

4.6.2. Hidrólise enzimática da dextrana em açúcar cristal

A remoção enzimática da dextrana em açúcar cristal foi estudada de acordo com o item 3.9.2. A Tabela 10 fornece os resultados obtidos. O teor inicial de dextrana no açúcar cristal era de 1,18 mg/g. Nas condições do estudo, a enzima não mostrou atividade na primeira meia hora de reação. Após 1 hora de reação, o teor de dextrana sofreu uma redução de 8,5%. Após 2 horas de hidrólise, o teor de dextrana no açúcar era de 0,93 mg/g, representando 78,7% do teor inicial. Decorridas 4 horas de hidrólise o teor residual de dextrana era de 0,81 mg/g ou 68,8%.

5. DISCUSSÃO

5.1. Seleção de fungos produtores de dextranase

A seleção de fungos produtores de dextranase evidenciou que existem no solo de plantações de cana e em varas de cana deteriorada, inúmeros fungos que produzem dextranase extracelular. As linhagens que produziram dextranase em maior quantidade, quando cultivadas em meio líquido contendo dextrana como única fonte de carbono, pertenciam aos gêneros *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp e *Fusarium* sp. Com o intuito de obterem microrganismos produtores de dextranase, Fukumoto et. al. (13) testaram inúmeras espécies de fungos e bactérias, e verificaram que os fungos *Penicillium luteum* ATCC 9644, obtido a partir de culturas-estoque, e *Aspergillus carneus*, isolado do solo, foram os melhores produtores da enzima. Hattori e Ishibashi (15) verificaram a atividade de dextranase extracelular de 556 espécies de fungos e 115 espécies de *Streptomyces* sp em meio líquido, e notaram que espécies do gênero *Chaetomium* sp apresentaram maior atividade. Fazendo um levantamento da produção de dextranase por 400 linhagens de fungos, isolados a partir do solo, Tsuru et. al. (55), observaram que *Aspergillus carneus* produzira a maior concentração da enzima. Cabe salientar que, embora os fungos isolados como melhores produtores de dextranase no decorrer do presente trabalho, já constassem de outros trabalhos publicados, não existe nenhum registro de isolamento dos mesmos a partir de solo de plantações de cana ou de varas de cana deterioradas. Quanto ao tipo de fer

mentação, isto é, fermentação semi-sólida ou submersa, o presente trabalho mostrou nitidamente que o meio líquido é mais propício para a produção de dextranase. Por outro lado, comparando-se a atividade de dextranase que as sete diferentes linhagens apresentaram em meio líquido contendo amido ou dextrana como única fonte de carbono, nota-se que no primeiro a atividade foi sensivelmente inferior àquela encontrada no segundo meio. Estes resultados, que podem ser verificados na Tabela 2, demonstram que a enzima dextranase é do tipo indutível.

5.2. Estudo da produção de dextranase em fermentação submersa

O estudo referente à produção de dextranase por *Penicillium* sp em fermentação submersa mostrou que a mesma sofre influência da totalidade dos fatores analisados. A fonte de carbono oferecida ao fungo é de grande importância, visto que na presença de dextrana a produção de enzima foi da ordem de 646 vezes maior do que na presença de amido. Substituindo-se a dextrana por qualquer uma das outras fontes de carbono testadas, a diferença na biosíntese de dextranase pelo fungo *Penicillium* sp tornou-se ainda mais acentuada do que no caso de amido, como ilustra a Tabela 3. O comportamento do fungo *Penicillium* sp frente às diferentes fontes de carbono, mostra, mais uma vez, que a enzima dextranase é uma enzima indutível. Estudando a importância da fonte de carbono na produção de dextranase em meio líquido pelo fungo *Penicillium luteum*, Fukumoto et. al. (13) notaram que dextrana e oligossacarídeos formados por ligações glicosídicas α -1,6 foram eficientes na produ

ção de dextranase, e que a indutibilidade dos mesmos fora aproximadamente proporcional ao comprimento da cadeia dos mesmos. Os outros compostos por eles testados, isto é, glicose, sacarose, maltose, lactose, amido de milho ceroso e amido solúvel não levaram à produção de dextranase. Resultados similares foram encontrados por Lobanok et. al. (30) e Tsuru et. al. (55) em relação aos fungos *Aspergillus insuetus* G-116 e *Aspergillus carneus*, respectivamente. A Tabela 4 possibilitou a análise do efeito da fonte de nitrogênio na produção de dextranase extracelular por *Penicillium* sp. A fonte de nitrogênio que se mostrou mais favorável foi a farinha de soja desengordurada, enquanto que $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ evidenciou ser o composto menos favorável para a produção da enzima. Não foi possível encontrar um trabalho na literatura com o qual poderiam ser confrontados estes resultados. Estudando-se a influência do fator concentração de dextrana no meio de cultura, a produção de dextranase pelo fungo *Penicillium* sp diminuiu à medida que aumentou a concentração de dextrana. A interpretação destes resultados, que figuram na Tabela 5, sugeriu que o fungo mostrou acentuada sensibilidade à concentração de dextrana no meio de cultura, sendo que concentrações de dextrana superiores a 0,5% inibiram a produção da mesma. Analisando este aspecto da produção de dextranase por *Penicillium luteum*, Fukumoto et. al. (13), verificaram que a atividade de dextranase aumentara com o aumento na concentração de dextrana dissolvida no meio. Na concentração de 2,0% ocorreria a produção máxima da enzima. No entanto, nesta concentração, Fukumoto et. al. verificaram ser mais longo o período de tempo necessário para a produção de enzima, além de resultar em caldos de cultura extremamente viscosos. A temperatura de incubação

foi um dos fatores estudados, cujos resultados constam da Tabela 6. Foram estudadas 3 temperaturas diferentes, sendo que a 30°C a produção de dextranase por *Penicillium* sp foi em torno de 2,5 e 7,5 vezes superior à mesma a 25 e 35°C, respectivamente. Trabalhando com *Aspergillus insuetus* G-116, Lobanok et. al. (30) notaram que a 28/29°C a produção de dextranase pelo fungo fora em torno de 1,6 vezes maior do que a 24/25°C.

Os resultados deste estudo permitiram concluir que as condições de cultura mais favoráveis para a produção de dextranase pelo fungo *Penicillium* sp foram meio de cultura líquido contendo 0,5% dextrana, 1,0% farinha de soja desengordurada, 0,5% KH_2PO_4 e 0,25% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH inicial 6,0, à temperatura de 30°C e agitação constante de 200 rpm.

Para o estudo da cinética de produção de dextranase substituiu-se a farinha de soja desengordurada por peptona, na mesma concentração. A substituição da fonte de nitrogênio permitiu a determinação da massa celular sem interferência da farinha de soja na mesma.

A cinética da produção de dextranase pelo fungo *Penicillium* sp consta da Figura 2, e foi interrompida após o 5º dia de fermentação já que o meio tornou-se bastante viscoso quando se utilizou a farinha de soja desengordurada como fonte de nitrogênio. A viscosidade do meio dificultou a recuperação da enzima.

Os dados encontrados permitem fazer algumas correlações

com o trabalho de Kosaric et. al. (26) em relação ao fungo *Penicillium funiculosum*. Este autor utilizara meio líquido com pH inicial 6,0 no seu estudo. O pH mantivera-se praticamente inalterado nas primeiras 24 horas de fermentação, decorridas as quais aumentara lentamente até atingir o valor 7,0 no 7º dia de fermentação. A massa celular atingira o seu valor máximo durante o 2º dia de fermentação e caíra até aproximadamente metade do seu valor máximo no final da mesma. A atividade de dextranase aumentara lentamente do 1º ao fim do 4º dia de fermentação, permanecendo praticamente inalterada até o final da mesma.

5.3. Purificação da dextranase

A Tabela 7 e as Figuras 3 e 4 apresentam os resultados da purificação da dextranase de *Penicillium* sp através de cromatografia em coluna de DEAE-celulose e de CM-celulose. No item 3.6., verifica-se que a enzima bruta foi diretamente aplicada em coluna de cromatografia, sem ser previamente precipitada através de sulfato de amônio, álcool etílico ou acetona, procedimento este comumente utilizado na etapa inicial da purificação enzimática. Durante os estudos preliminares com vistas à purificação da enzima, precipitaram-se as proteínas presentes no extrato bruto com sulfato de amônio a 80%, álcool etílico a 70% e acetona a 50%. O extrato bruto utilizado foi obtido pela fermentação a 30°C como descrito no item 3.3.4. Os resultados alcançados nos permitiram optar pela precipitação com sulfato de amônio, como melhor alternativa para a primeira etapa da purificação

ção da enzima, visto que a atividade de dextranase recuperada após ressuspender e dessalinizar o precipitado era da ordem de 82%. Os precipitados obtidos pela adição de álcool etílico a 70% e acetona a 50% apresentaram apenas 23 e 17% da atividade inicial, respectivamente. Estes dados não estão de acordo com aqueles obtidos por Molodova et. al. (35) que obtiveram recuperação de 88 a 92% para sulfato de amônio e 80 a 85% quando utilizaram álcool etílico. No entanto, quando se procedeu à precipitação da enzima no extrato bruto obtido em escala maior, isto é, de acordo com o item 3.3.6., verificou-se que a enzima permaneceu em suspensão junto com o sal. Maksimov et. al. (32), trabalhando com *Penicillium funiculosum*, observaram que, em consequência ao consumo incompleto de dextrana pelo fungo, a enzima presente no meio não pudera ser separada da dextrana uma vez que, nestas condições, não precipitara em solução saturada de sulfato de amônio, assim como não fora absorvida em DEAE-celulose.

O crescimento normal do fungo e portanto, o consumo da totalidade da dextrana possibilitara a purificação por métodos convencionais. Considerando que, quando da produção de dextrana se em larga escala, foram adotadas as condições estipuladas mais favoráveis em escala menor, podem ter eventualmente ocorrido modificações ao nível do metabolismo do fungo *Penicillium* sp de forma a não esgotar a fonte de carbono. No entanto, precisa ser levado em consideração que a enzima de *Penicillium* sp foi adsorvida em DEAE-celulose, o que não acontecera com a enzima estuda

da por Maksimov et. al. (32). Provavelmente, a liofilização do material tenha contribuído para a adsorção do extrato bruto na DEAE-celulose.

As etapas de cromatografia em coluna de DEAE-celulose e em CM-celulose, seguidas de diálise, contribuíram para a desalinização, a remoção de compostos de baixo peso molecular e de pigmentos do extrato bruto. Estes procedimentos também favoreceram a concentração do teor de proteínas. No final da purificação obteve-se extrato enzimático límpido de grau de pureza 53,65 vezes superior ao extrato bruto.

A técnica de fracionamento da dextranase em coluna de troca iônica, mostrou que em pH 4,2 a enzima foi adsorvida por DEAE-celulose, sendo eluída em um único pico de atividade na concentração de 0,4M de NaCl. Este fato evidenciou tratar-se de enzima com predominância de cargas negativas. Estes resultados estão de acordo com experimentos anteriormente realizados por Maksimov et. al. (32) para a enzima de *Penicillium funiculosum*. Na cromatografia em coluna de CM-celulose mostrou um único pico de atividade, eluído logo no início da separação, o que esteve de acordo com a predominância de cargas negativas que a enzima possuía em pH 4,2.

5.4. Caracterização da dextranase

A dextranase de *Penicillium* sp apresentou atividade máxima a 50°C, sendo que a 40°C a enzima exibiu 74% e a 60°C exibiu 78% da atividade máxima.

O pH ótimo da enzima situou-se em pH 4,2. Em valores de pH inferiores ou superiores ao valor ótimo, a enzima perdeu atividade rapidamente.

A atividade catalítica da dextranase de *Penicillium* sp mostrou estabilidade na faixa compreendida entre pH 4,2 e 5,0 a 20°C.

A enzima apresentou termoestabilidade em pH 4,2 a 4°C e a 40°C durante 7 horas. Decorridas 24 horas a 4°C, a enzima manteve 82% e a 40°C manteve 59% da atividade. A 50°C a enzima perdeu atividade a partir da 2ª hora de incubação e, transcorridas 24 horas, a mesma apresentou apenas 3,5% da atividade inicial. A 60°C a perda de atividade deu-se mais rapidamente do que a 50°C, restando ao término de 24 horas, 1% da atividade inicial da enzima.

Em relação à influência de substâncias inibidoras sobre a atividade de dextranase de *Penicillium* sp, verificou-se que a mesma é inibida por diversos íons, em ambas as concentrações testadas. Na concentração de 10^{-3} M, os íons Ag^+ , Mn^{2+} e Hg^{2+} exibiram acentuada inibição da enzima. Na concentração de 10^{-2} M os íons Ag^+ , Mn^{2+} , Hg^{2+} e Fe^{2+} afetaram de forma mais acentuada a atividade da enzima. Por outro lado, o EDTA provocou discreta perda de atividade da dextranase.

Comparando-se os resultados deste trabalho com aqueles obtidos por Fukumoto et. al. (13), Minakova e Preobrazhenskaya

(34), e Sugiyama et. al. (46) trabalhando com dextranase de *Penicillium luteum*, *P. purpurogenum* (Ftoll) e *P. funiculosum*, respectivamente, nota-se que a dextranase de *Penicillium* sp apresentou algumas diferenças em relação às propriedades físico-químicas. A diferença mais significativa ocorreu em relação ao pH ótimo da enzima. O pH ótimo para *Penicillium luteum*, *P. purpurogenum* (Ftoll) e *P. funiculosum* situaram-se em pH 5,0; 5,5 e 6,0, respectivamente. Embora o fungo estudado no presente trabalho pertença ao mesmo gênero, isto é, *Penicillium* sp, a dextranase do mesmo apresentou pH ótimo consideravelmente mais ácido. Cabe enfatizar que a linhagem descrita neste trabalho, não fora anteriormente relatada como produtora de dextranase extracelular. O pH ótimo ácido da enzima aumenta significativamente a aplicabilidade da enzima na eliminação de dextrana em caldo de cana contaminado, conforme discussão no item 5.6. A faixa de estabilidade ao pH situaram-se em 3,5 a 7,0; 4,5 a 7,5 e 6,5 a 7,0, respectivamente.

Quanto à temperatura ótima de atividade catalítica, a mesma verificaram-se em 50°C para *Penicillium luteum* (13) e em 55°C para *P. funiculosum* (26). A termoestabilidade das enzimas variaram bastante. No entanto, a maioria das espécies de *Penicillium* sp foram estáveis na faixa de 0 a 50°C (13, 26, 36, 46).

Analisando-se a influência que substâncias inibido

ras exercem sobre a atividade da dextranase de *Penicillium* sp, verifica-se que este comportamento fora notado por diversos pesquisadores que trabalharam com espécies do mencionado gênero.

Fukumoto et. al. (13), analisando a ação de substâncias inibidoras sobre a atividade de dextranase de *Penicillium luteum*, verificaram que a mesma fora inativada apenas por HgCl_2 . No entanto, Sugiura et. al. (46), trabalhando com dextranase de *P. funiculosum*, notaram que a enzima fora inibida por íons Ag^+ e Hg^{2+} , enquanto que os íons Co^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+} provocaram a ativação da enzima. Estes pesquisadores observaram também que a dextranase fora parcialmente inativada por EDTA. Como mostra a Tabela 8, os íons Co^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+} provocaram inibição parcial da enzima de *Penicillium* sp, o mesmo acontecendo em relação ao EDTA. Kosaric et. al. (26) observaram que, na concentração de 10mM, os íons Ag^+ , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} inibiram a enzima de *P. funiculosum* enquanto que EDTA não afetara a atividade da mesma. Estudando a ação de substâncias inibidoras na atividade das dextranases 1 e 2 de *P. piscarium* BIM G-102, Lobanok et. al. (29) observaram que os íons Ag^+ , Sn^{2+} e Fe^{3+} inibiram de forma acentuada ambas as isoenzimas, enquanto que não ocorrera ativação das mesmas na presença de íons Mn^{2+} , Cu^{2+} ou Co^{2+} .

5.5. Cromatografia dos produtos da hidrólise enzimática da dextrana

A hidrólise enzimática da dextrana de peso molecular

60 a 90 mil, feita de acordo com o item 3.8, e cujos resultados constam do item 4.5., forneceu como produtos principais a glicose, a isomaltose e a isomaltotriose.

Estes resultados são reforçados por aqueles obtidos por Fukumoto et. al. (13), que trabalharam em condições semelhantes com *Penicillium luteum*, e obtiveram os produtos citados após 24 horas de hidrólise. Sugiura e Ito (48) verificaram que os produtos da hidrólise de dextrana foram a isomaltose, a isomaltotriose, a isomaltotetraose, a isomaltopentaose e a isomaltohexaose. Trabalhando com o fungo *Penicillium piscarium* BIM G-102, Lobanok et. al. (30) notaram que os produtos principais da hidrólise da dextrana, feita através do sobrenadante do caldo de cultura do fungo, foram a glicose e a isomaltose.

5.6. Viabilidade de aplicação da dextranase na remoção de dextrana do caldo de cana e do açúcar cristal

Com base nos estudos feitos em relação à hidrólise enzimática da dextrana em caldo de cana e em açúcar cristal, verifica-se a grande aplicabilidade da dextranase para este fim. A Tabela 9 e a Figura 11 mostram os excelentes resultados obtidos para o caldo de cana, mesmo utilizando-se pequena concentração da enzima. Cabe salientar que o pH ótimo da enzima de *Penicillium* sp, ou seja, pH 4,2, mais ácido do que os valores relatados na literatura, favorece a hidrólise enzimática da

dextrana em caldo de cana. O caldo de cana contaminado por dextrana, apresenta pH na faixa de 3,5 a 4,5, devido à presença concomitante dos ácidos lático e acético, decorrentes do metabolismo das bactérias infectantes da cana. Outro fator importante é a termoestabilidade da enzima, cuja atividade se mantém inalterada, mesmo após incubação a 40°C durante 7 horas.

Em relação à hidrólise enzimática da dextrana no açúcar cristal, verificou-se que a ação da enzima se deu mais lentamente do que no caso do caldo de cana. No entanto, a hidrólise da dextrana presente em caldo de cana e em açúcar cristal através da dextranase de *Penicillium* sp mostrou-se satisfatória em ambos os casos.

Do ponto de vista da produção de açúcar, deve-se salientar que o uso de dextranase para remoção da dextrana, deverá ser feita preferencialmente no caldo de cana, antes do processamento do mesmo. Desta forma seria possível evitar todos os inconvenientes que a presença da dextrana provoca durante o processamento do caldo de cana, entre eles, dificuldade de filtração, decantação e transferência de calor deficientes e alongamento do eixo "c" dos cristais de açúcar. Isto evitaria também a modificação do formato de balas e laboradas com açúcar cristal contaminado com dextrana, como mostra a Figura 12.

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste trabalho, pode-se con
cluir que:

- 6.1. Dos fungos isolados, *Penicillium* sp apresenta maior ati
vidade de dextranase extracelular.
- 6.2. O fungo *Penicillium* sp produz dextranase em fermentação submersa, produzindo baixíssima concentração da enzima em fermentação semi-sólida.
- 6.3. A dextranase do fungo *Penicillium* sp é uma enzima indutí
vel, utilizando preferencialmente dextrana como indutor.
- 6.4. A dextranase apresenta carga negativa em pH 4,2, uma vez que foi adsorvida em DEAE-celulose e não em CM-celulose.
- 6.5. A temperatura ótima para a dextranase é de 50°C.
- 6.6. A enzima é estável a 40°C durante 7 horas.
- 6.7. A atividade hidrolítica máxima da enzima de *Penicillium* sp ocorre em pH 4,2. Este fato permite concluir que esta linhagem não fora anteriormente descrita.
- 6.8. A enzima se mantém estável na faixa de pH 4,2 a 5,0.
- 6.9. A dextranase de *Penicillium* sp é fortemente inibida pe
los íons Ag^+ , Mn^{2+} , Hg^{2+} e Fe^{2+} , enquanto que na presen
ça de EDTA a mesma é parcialmente inibida.

6.10. Os produtos principais da hidrólise da dextrana através da dextranase de *Penicillium* sp são glicose, isomaltose e isomaltotriose.

6.11. Com base nas características da dextranase excretada por *Penicillium* sp, a mesma apresenta grande viabilidade de aplicação no processamento do caldo de cana contaminado por dextrana.

TABELA 1

Produção de dextranase em meio semi-sólido sem e com dextrana.

Nº da linhagem	atividade de dextranase (U/ml)	
	sem dextrana	com dextrana
12	$1,31 \times 10^{-2}$	$3,05 \times 10^{-2}$
147	$1,50 \times 10^{-2}$	$1,83 \times 10^{-2}$
265	$2,39 \times 10^{-3}$	$3,16 \times 10^{-2}$
288	$9,44 \times 10^{-4}$	$4,99 \times 10^{-3}$
368	$2,28 \times 10^{-3}$	$2,24 \times 10^{-2}$
464	$7,22 \times 10^{-4}$	$5,18 \times 10^{-2}$
520	$3,33 \times 10^{-4}$	$1,47 \times 10^{-2}$
569	$3,05 \times 10^{-3}$	$4,86 \times 10^{-2}$
576	$1,39 \times 10^{-3}$	$5,67 \times 10^{-2}$
666	$3,39 \times 10^{-3}$	$5,58 \times 10^{-2}$
673	$1,66 \times 10^{-4}$	$4,37 \times 10^{-2}$
703	$4,34 \times 10^{-3}$	$6,47 \times 10^{-2}$
719	$3,05 \times 10^{-3}$	$5,16 \times 10^{-2}$
774	$2,61 \times 10^{-3}$	$3,73 \times 10^{-2}$

TABELA 2

Produção de dextranase em meio semi-sólido e em meio líquido.

Nº da linhagem	atividade de dextranase (U/ml)					
	meio semi-sólido		meio líquido			
	sem dextrana	com dextrana	sem dextrana	com dextrana	com dextrana	com dextrana
12	$1,31 \times 10^{-2}$	$3,05 \times 10^{-2}$	0,00		$1,45 \times 10^{-1}$	
265	$2,39 \times 10^{-3}$	$3,16 \times 10^{-2}$	$4,33 \times 10^{-1}$		22,44	
368	$2,28 \times 10^{-3}$	$2,24 \times 10^{-2}$	0,00		$3,31 \times 10^{-1}$	
576	$1,39 \times 10^{-3}$	$5,67 \times 10^{-2}$	$2,58 \times 10^{-2}$		6,87	
666	$3,39 \times 10^{-3}$	$5,58 \times 10^{-2}$	$2,58 \times 10^{-2}$		5,42	
703	$4,38 \times 10^{-3}$	$6,47 \times 10^{-2}$	$1,07 \times 10^{-1}$		3,32	
774	$2,61 \times 10^{-3}$	$3,73 \times 10^{-2}$	$4,19 \times 10^{-2}$		5,17	

TABELA 3

Efeito da fonte de carbono na produção de dextranase por
Penicillium sp.

fonte de carbono	atividade de dextranase (U/ml)
dextrana	41,21
amido	$6,38 \times 10^{-2}$
maltose	$2,55 \times 10^{-2}$
rafinose	$8,33 \times 10^{-3}$
dextrina	0,00
glicose	0,00
lactose	0,00
sacarose	0,00

TABELA 4

Efeito da fonte de nitrogênio na produção de dextranase por *Penicillium* sp.

fonte de nitrogênio	atividade de dextranase (U/ml)
soja desengordurada	37,17
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	26,68
peptona	22,32
caseína	5,69
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,32

TABELA 5

Efeito da concentração de dextrana na produção de dextranase por *Penicillium* sp.

concentração de dextrana (%)	atividade de dextranase (U/ml)
0,5	88,96
1,0	46,17
1,5	43,67
2,0	36,30
2,5	8,96

TABELA 6

Influência da temperatura de incubação na produção de dextranase por *Penicillium* sp.

temperatura (°C)	atividade de dextranase (U/ml)
25	68,45
30	173,72
35	23,25

TABELA 7

Purificação da dextranase de *Penicillium* sp.

	volume (ml)	atividade (U/ml)	ativ. total (U)	proteína (mg/ml)	ativ. espec. (U/mg)	purifica- ção (vezes)	açúcares (mg/ml)
extrato bruto	960,0	107,52	103219,2	1,795	59,89	1,00	2,90
DEAE-celulose	125,0	26,68	3335,0	0,0648	411,73	6,87	0,35
CM-celulose	28,0	47,56	1331,7	0,0148	3213,51	53,65	0,22

TABELA 8

Efeito de substâncias inibidoras sobre a atividade de dextranase.

sal	concentração (M)	atividade residual (%)
H ₂ O	-	100
AgNO ₃	10 ⁻³	56,9
	10 ⁻²	0,0
CaCl ₂	10 ⁻³	97,4
	10 ⁻²	69,8
CoCl ₂	10 ⁻³	94,8
	10 ⁻²	69,8
CuSO ₄	10 ⁻³	87,1
	10 ⁻²	65,5
EDTA	10 ⁻³	89,9
	10 ⁻²	81,0
FeSO ₄	10 ⁻³	82,8
	10 ⁻²	52,6
HgCl ₂	10 ⁻³	61,2
	10 ⁻²	53,5
MgSO ₄	10 ⁻³	82,8
	10 ⁻²	78,4
MnCl ₂	10 ⁻³	55,2
	10 ⁻²	24,1
ZnCl ₂	10 ⁻³	86,2
	10 ⁻²	61,2

TABELA 9

Hidrólise enzimática da dextrana em caldo de cana contendo
1,24 U de dextranase/ml.

tempo de hidrólise (h)	dextrana residual (mg/ml)	dextrana residual
0	11,8	100
0,5	0,77	6,53
1	0,58	4,92
2	0,43	3,64
4	0,44	3,73

TABELA 10

Hidrólise enzimática da dextrana em açúcar cristal a 50%
contendo 0,04 U de dextranase/ml.

tempo de hidrólise (horas)	teor de dextrana (mg/g)	teor de dex- trana (%)
0	1,18	100,0
0,5	1,18	100,0
1	1,08	91,5
2	0,93	78,7
4	0,81	68,8

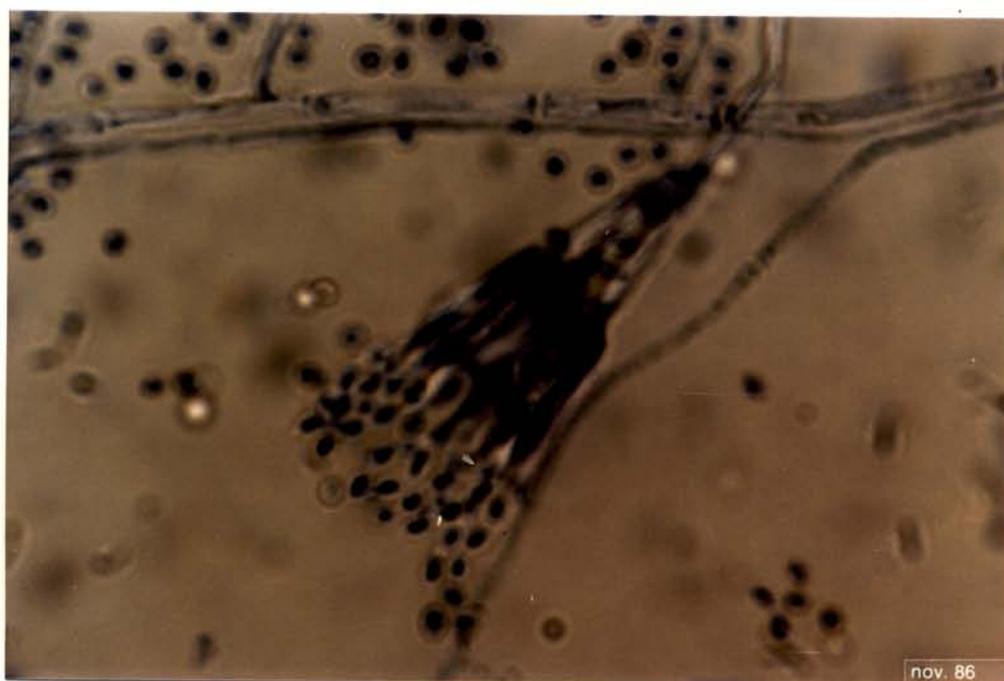


Figura 1 - Microfotografia do fungo *Penicillium* sp.

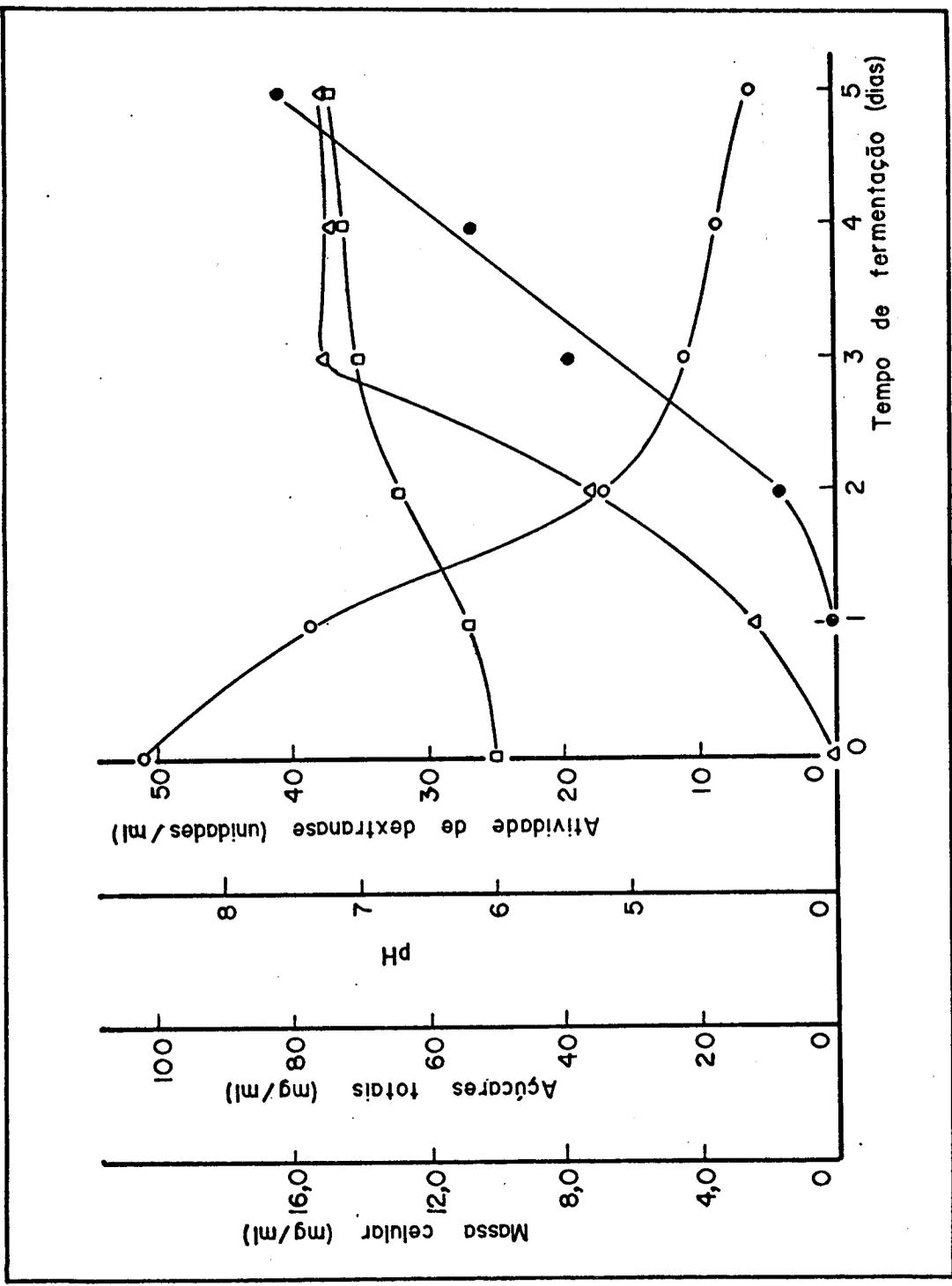


Figura 2 - Cinética da produção de dextranase por *Penicillium* sp.
(—●—) Atividade de dextranase; (—□—) pH; (—○—) Açúcares totais;
(—△—) Massa celular.

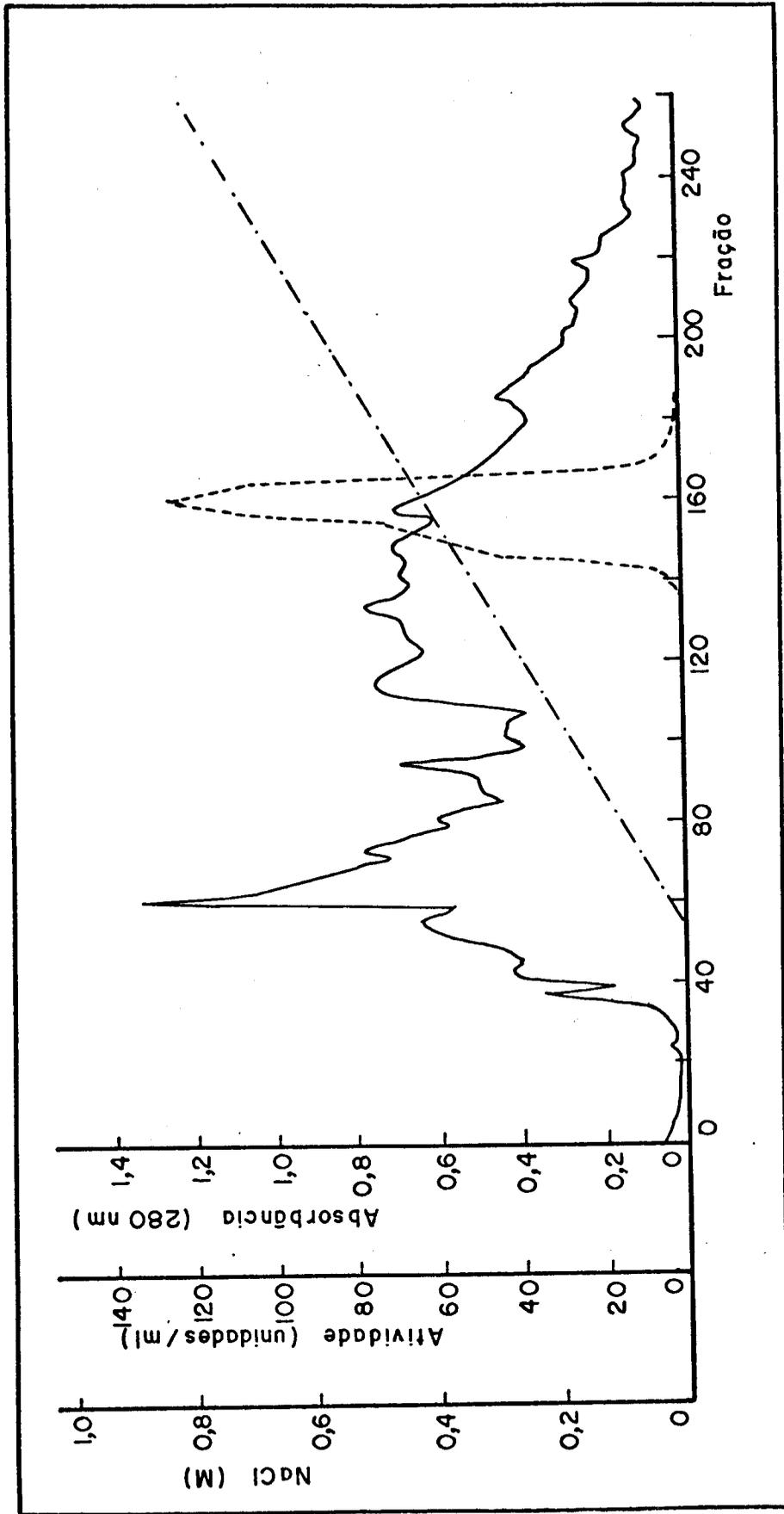


Figura 3 - Cromatografia em coluna de DEAE-celulose.

(—) Absorbância; (---) Atividade; (-.-) NaCl

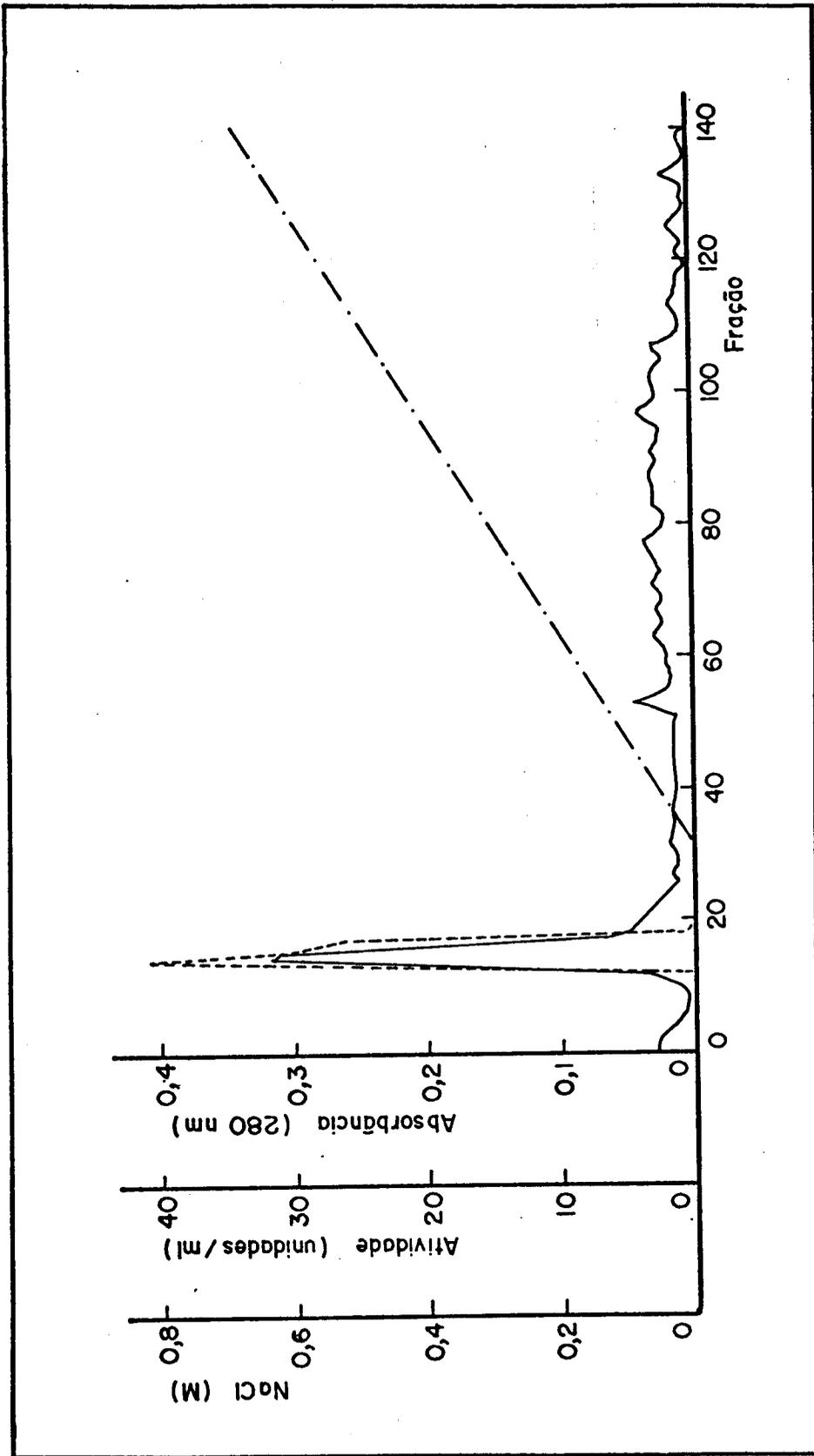


Figura 4 - Cromatografia em coluna de CM-celulose.

(—) Absorbância; (---) Atividade; (-.-) NaCl

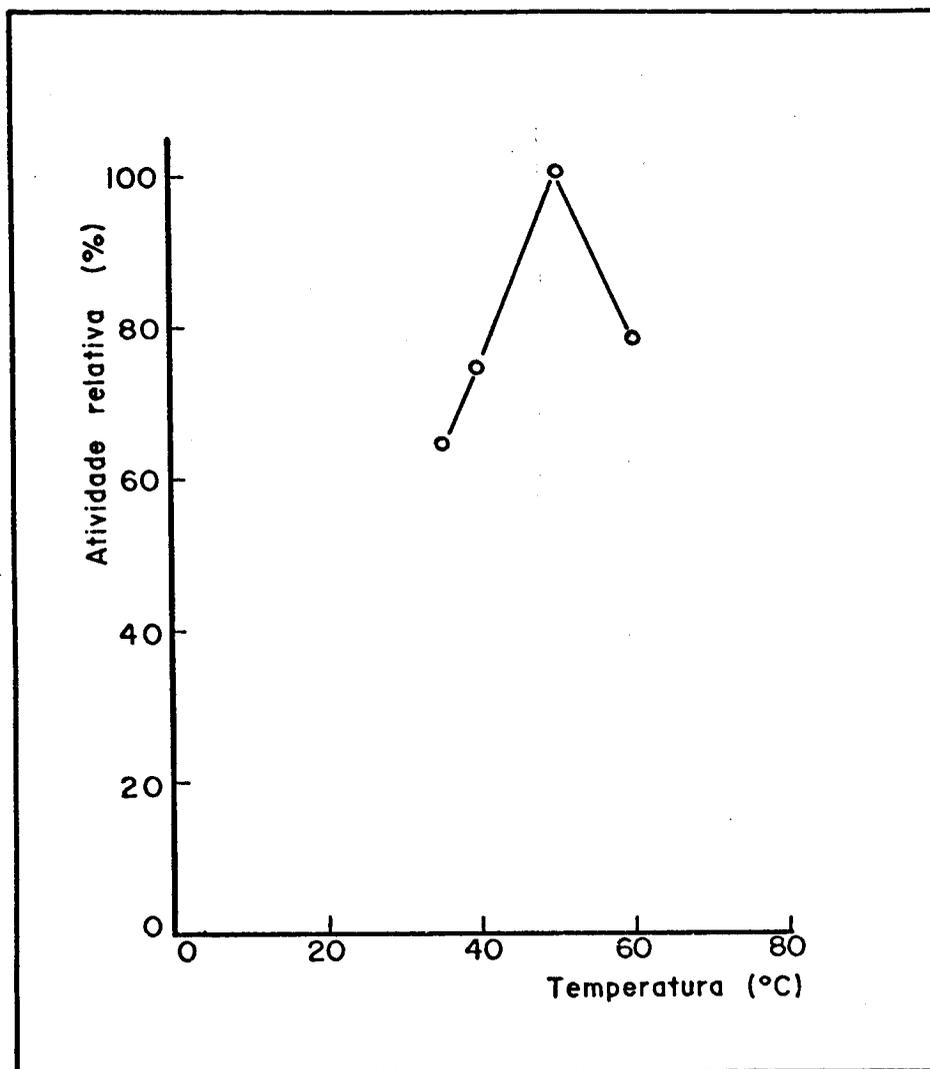


Figura 5 - Efeito da temperatura na atividade da dextranase.

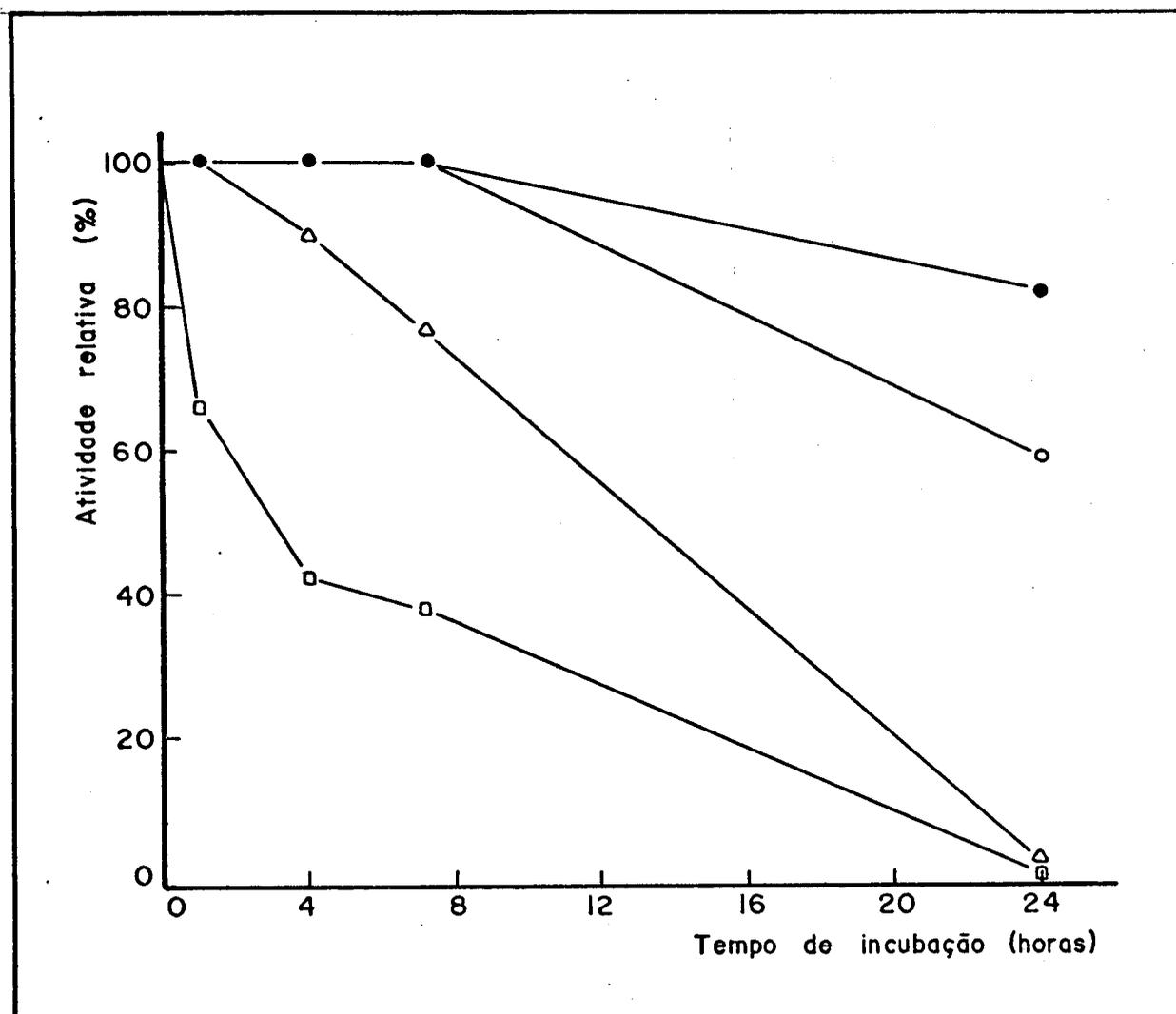


Figura 6 - Efeito da temperatura na estabilidade da enzima.

(—●—) 4°C; (—○—) 40°C; (—△—) 50°C; (—□—) 60°C

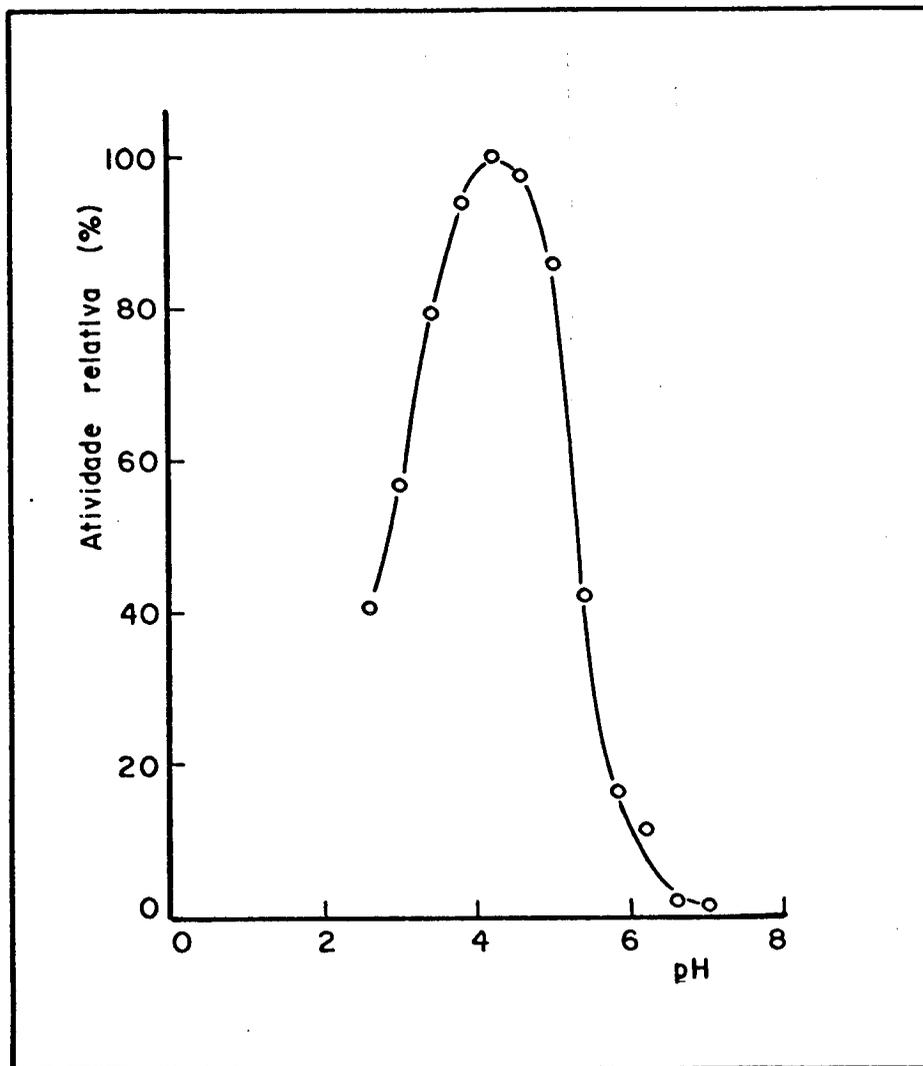


Figura 7 - Efeito do pH na atividade da dextranase.

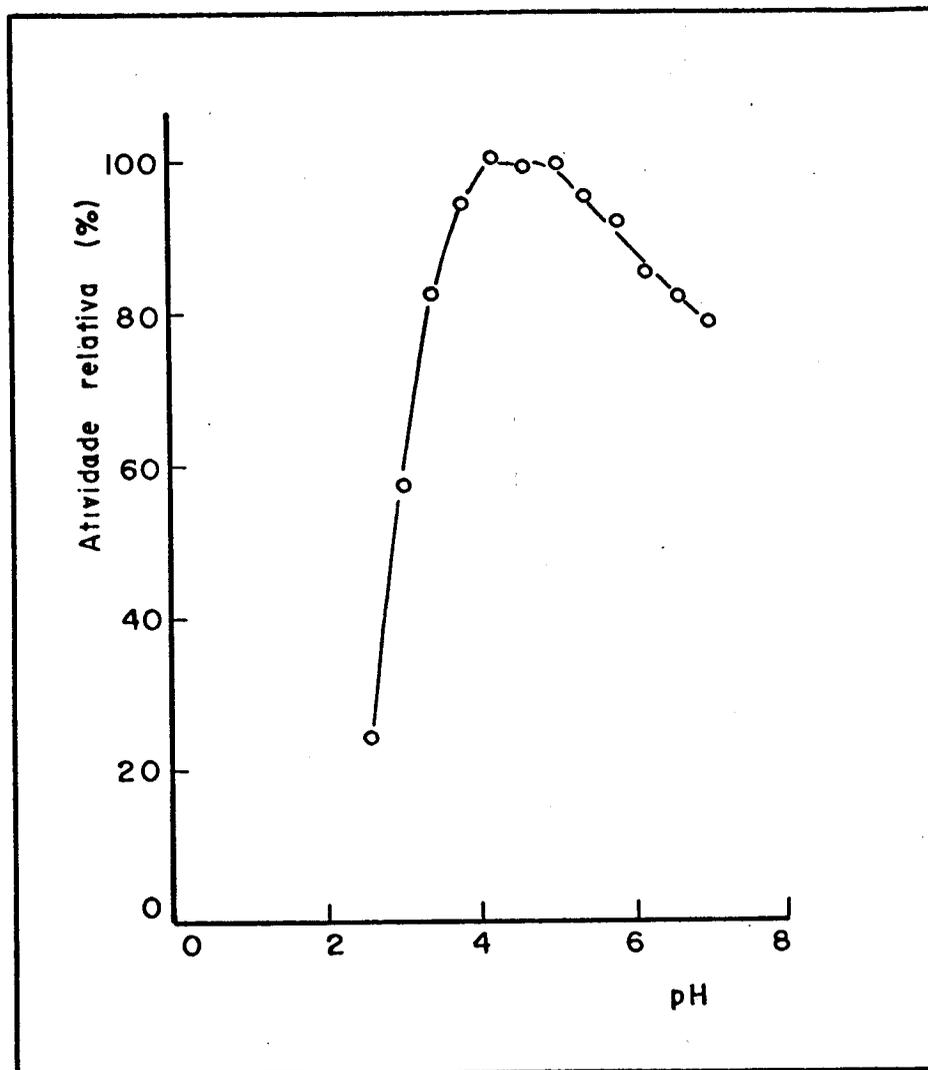


Figura 8 - Efeito do pH na estabilidade da enzima .

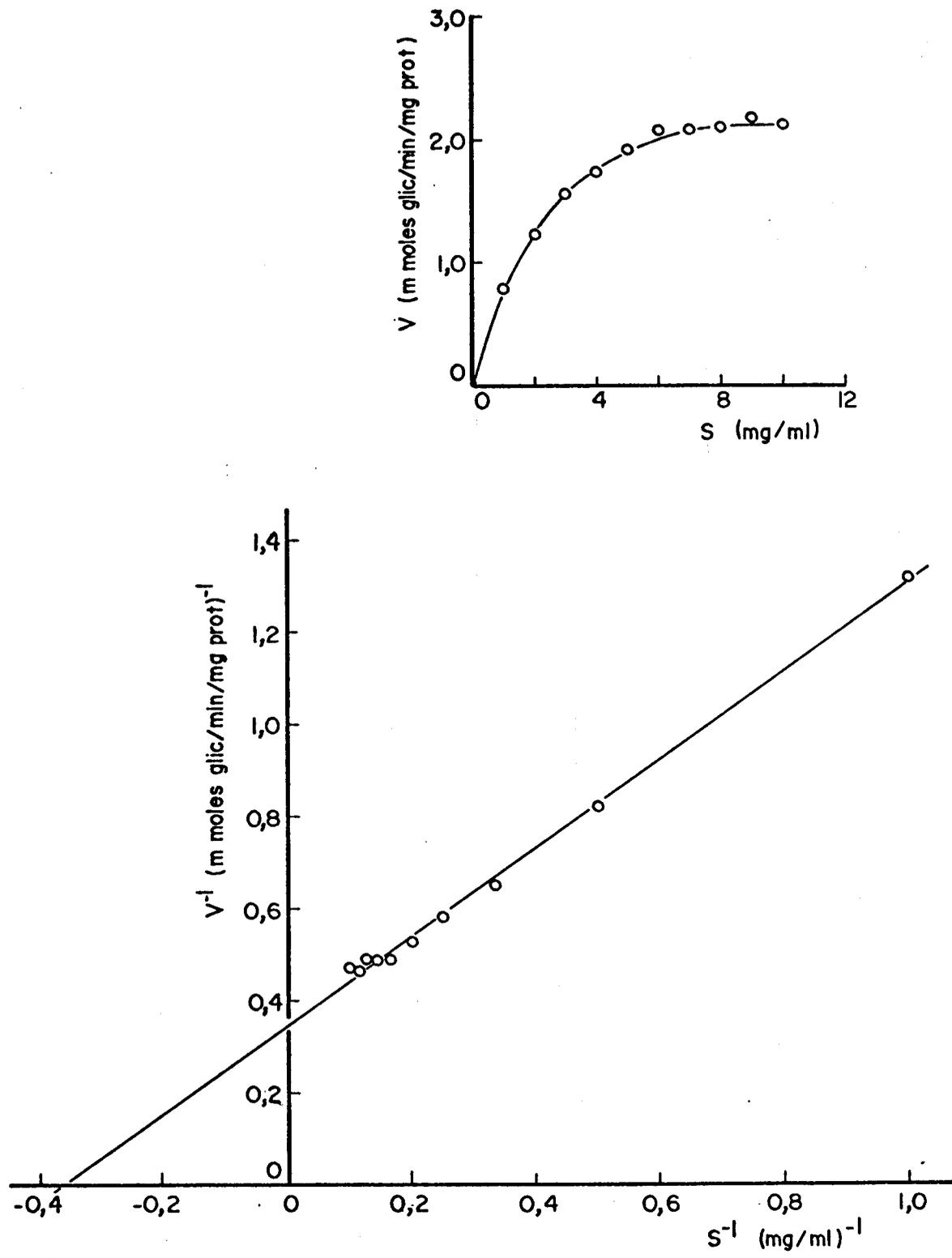


Figura 9 - Influência da concentração de substrato na atividade enzimática.

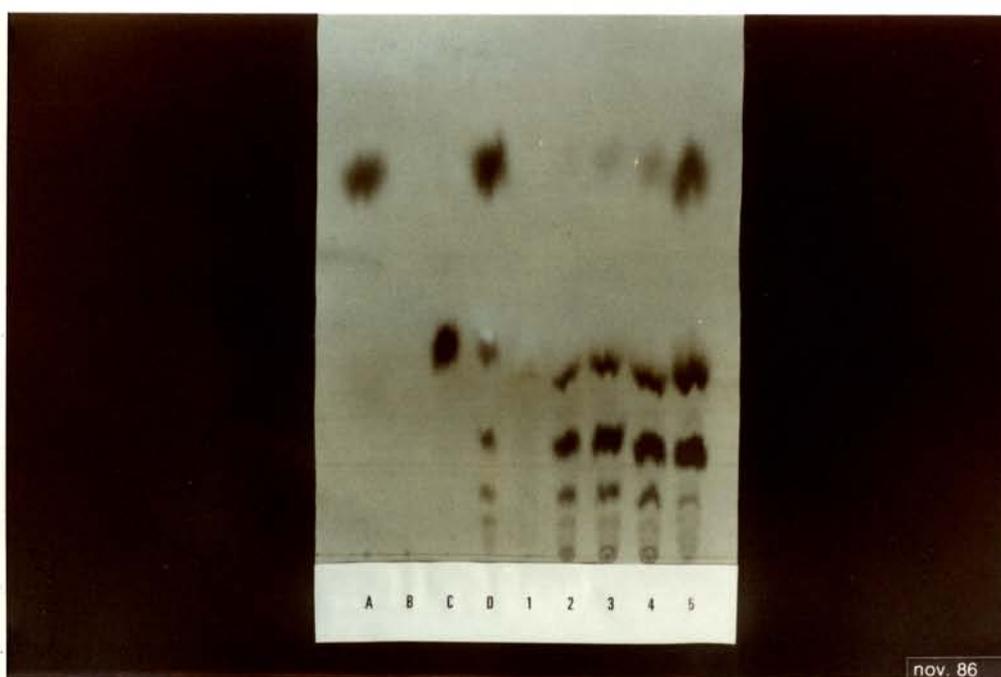


Figura 10 - Cromatografia descendente em papel dos produtos da hidrólise enzimática da dextrana. Padrões: A: glicose; B: dextrana; C: isomaltose; D: hidrólise ácida da dextrana. Amostras: 1: 0 horas ; 2: 2 horas; 3: 4 horas; 4: 6 horas; 5: 24 horas.

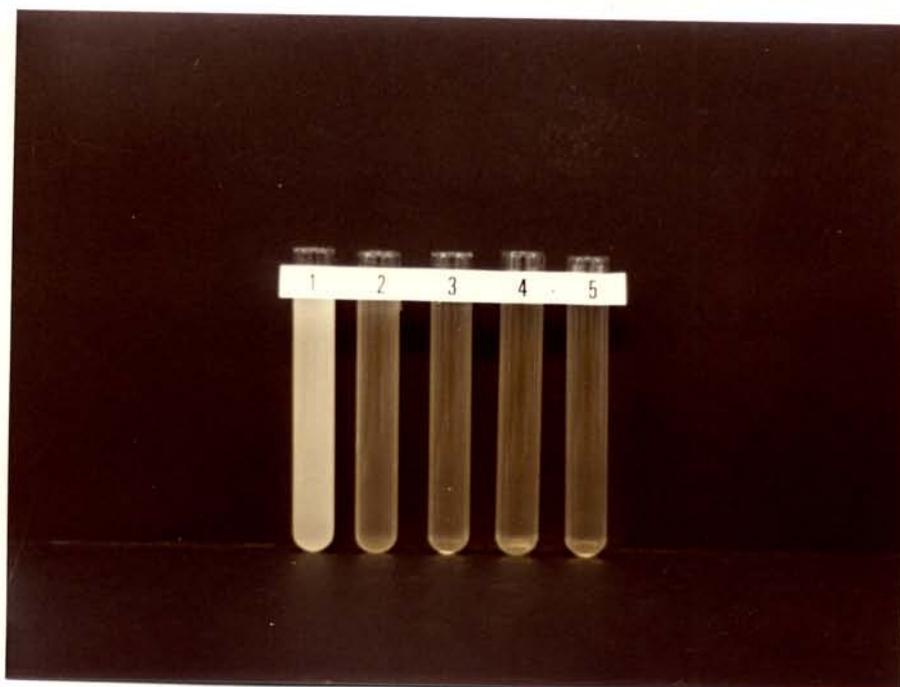


Figura 11 - Hidrólise enzimática da dextrana em caldo de cana. Amostras: 1: 0 horas ; 2: 0,5 horas; 3: 1 hora; 4: 2 horas ; 5: 4 horas.



Figura 12 - Efeito da utilização de açúcar contaminado com dextrana na produção de balas. Amostras: 1: açúcar não contaminado; 2: açúcar contaminado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) BAILEY, W. & CLARKE, R.T.J. A bacterial dextranase. Biochem. J., 72: 49, 1959.
- (2) _____; HUTSON, D.H. & WEIGEL, H. Action of a bacterial dextranase on branched dextrans. Nature, 186: 553, 1960.
- (3) _____; _____ & _____. Studies on dextrans and dextranases. Part I. The action of a *Lactobacillus bifidus* dextranase on a branched dextran. Biochem. J., 80: 514, 1961.
- (4) BOURNE, E.J.; _____ & _____. Studies on dextrans and dextranases. Part II. The action of mould dextranases on modified isomaltodextrins and the effect of anomalous linkages on dextran hydrolysis. Biochem. J., 85: 158, 1962.
- (5) _____; _____ & _____. Studies on dextrans and dextranases. Part III. Structures of oligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* (Birmingham) dextran. Biochem. J., 86: 555, 1963.
- (6) CHAIET, L.; KEMPF, A.J.; HARMAN, R.; KACZKA, E.; WESTON, R.; NOLLSTADT, K. & WOLF, F.J. Isolation of a pure dextranase from *Penicillium funiculosum*. Appl. Microbiol., 20(3): 421, 1970.

- (7) CHEETHAM, N.W.H. & RICHARDS, G.N. Studies on dextranases. Part II. An intracellular bacterial dextranase. Carbohydr. Res., 25: 333, 1972.
- (8) COVACEVICH, M.T. & RICHARDS, G.N. Studies on dextranases. Part VII. Purification of intracellular dextranases and D-glucosidases from *Pseudomonas* UQM 733. Carbohydr. Res., 64: 169, 1978.
- (9) _____ & _____. Studies on dextranases. Part VIII. Modes of action of intracellular dextranase and three oligoglucanases from *Pseudomonas* UQM 733. Carbohydr. Res., 70: 283, 1979.
- (10) DANILOVA, T.I.; MAKSIMOV, V.I.; MOLODOVA, G.A. & SAZONOVA, N.N. Dextranase of *Fusarium solani*. Appl. Bioch. Microbiol., 14(5): 538, 1978.
- (11) DRAGAN-BULARDA, M. & KISS, S. Dextranase activity in soil. Soil Biol. Biochem., 4: 413, 1972.
- (12) DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28(3): 350, 1956.

- (13) FUKUMOTO, J.; TSUJI, H. & TSURU, D. Studies on mold dextranases. Part I. *Penicillium luteum* dextranase: Its production and some enzymatic properties. J. Biochem., 69:1113, 1971.
- (14) GREULICH, K.O. & LUDWIG, H. pH dependence of dextranase - catalysed hydrolysis of dextran. J. Chem. Res.(S).
- (15) HATTORI, A. & ISHIBASHI, K. Screening of dextranase producing microorganisms. Agric. Biol. Chem., 45(10): 2347, 1981.
- (16) _____; _____ & MINATO, S. The purification and characterization of the dextranase of *Chaetomium gracile*. Agric. Biol. Chem., 45(11): 2409, 1981.
- (17) HAYWARD, A.C. & SLY, L.I. Dextranase activity in *Oerskovia xanthineolytica*. J. Appl. Bact., 40:355, 1976.
- (18) HIRAOKA, N.; FUKUMOTO, J. & TSURU, D. Studies on mold dextranases. Part III. Purification and some enzymatic properties of *Aspergillus carneus* dextranase. J. Biochem., 71(1): 57, 1972.

- (19) _____; TSUJI, H.; FUKUMOTO, J.; YAMAMOTO, T. & TSURU, D. Studies on mold dextranases, Part V. Some physicochemical properties and substrate specificity of dextranases from *Aspergillus carneus* and *Penicillium luteum*. Int. J. Pept. Prot. Res., 5(3): 161, 1973.
- (20) HULTIN, E. & NORDSTRÖM, L. Investigations on dextranase .
1. On the occurrence and the assay of dextranase. Acta Chem. Scand., 3: 1405, 1949.
- (21) INGELMAN, B. Enzymatic breakdown of dextran. Acta Chem. Scan., 2:803, 1948.
- (22) JANSON, J.C. & PORATH, J. A bacterial dextranase. Methods Enzymol., 8: 615, 1966.
- (23) JOSHI, V.K. & TAMHANE, D.V. Location of dextranase activity in an *Aspergillus luchuensis* spp. isolate. Curr.Sci., 42(20): 720, 1973.
- (24) KENIRY, J.S.; LEE, J.B. & MAHONEY, V.C. Improvements in the dextran assay of cane sugar materials. Int. Sugar J., 71: 230, 1969.

- (25) KOBAYASHI, M.; TAKAGI, S.; SHIOTA, M.; MITSUIHI, Y. MATSU
DA, K. An isomaltotriose - producing dextranase from
Flavobacterium sp M-73: Purification and properties. A-
gric. Biol. Chem., 47(11): 2585, 1983.
- (26) KOSARIC, N.; YU, K.; ZAJIC, J.E. & ROZANIS, J. Dextranase
production from *Penicillium funiculosum*. Biotechn. Bio-
eng., 15: 729, 1973.
- (27) LEE, J.M. & FOX, P.F. Purification and characterization
of *Paecilomyces lilacinus* dextranase. Enzyme Microb.
Technol., 7(11): 573, 1985.
- (28) LINEWEAVER, H.; & BURK, D. The determination of enzyme
dissociation constants. J. Am. Chem. Soc., 56: 658 ,
1934.
- (29) LOBANOK, A.G.; ZINCHENKO, O.N. & SHISHLO, V.I. Some pro
perties of dextranases from the fungus *Penicillium*
piscaium BIM G-102. Appl. Bioch. Microbiol., 17(2) :
153. 1981.
- (30) _____; _____ & _____. Influence of culture condi
tions and composition of the nutrient medium on dextra
nase synthesis by the fungus *Aspergillus insuetus* G-116.
Appl. Bioch. Microbiol., 18(5): 536, 1982.
- (31) LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.F. & RANDALL, R.F. - Protein
measurement with the folin phenol reagent. J. Biol.
Chem., 193: 265, 1951.

- (32) MAKSIMOV, V.I.; MOLODOVA, G.A.; DANILOVA, T.I. & BURTSEVA, N.N. Purification of dextranase from *Penicillium funiculosum*. Appl. Bioch. Microbiol., 13(3): 353, 1977.
- (33) _____; DANILOVA, T.I. & MOLODOVA, G.A. Liquefying and saccharolytic activity of preparations of dextranase from *Penicillium funiculosum*. Appl. Bioch. Microbiol., 16(5): 509, 1980.
- (34) MINAKOVA, A.L. & PREOBRAZHENSKAYA, M.E. Isolation and properties of a dextranase from *Penicillium purpurogenum* (Ftoll). Appl. Bioch. Microbiol., 16(5): 502, 1980.
- (35) MOLODOVA, G.A.; DANILOVA, T.I.; MAKSIMOV, V.I. & KOZHEVNIKOVA, N.P. Methods of purifying dextranase from *Penicillium funiculosum*. Appl. Bioch. Microbiol., 16(6): 654, 1980.
- (36) NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153: 375, 1944.
- (37) PARRISH, F.W. Dextrans, dextran hydrolysis products and viscosity in sugar solutions. Proc. 1982 Conf. Sugar Proc Res., 157, 1984.

- (38) PETROVA, L.I. & MOLODOVA, G.A. Synthetic medium for biosynthesis of dextranase by *Penicillium funiculosum*. Appl. Bioch. Microbiol., 10(6): 718, 1974.
- (39) PULKOWNKH, A. & WALKER, G.L. Purification and substrate specificity of an endo-dextranase of *Streptococcus mutans* KI-R. Carbohydr. Res., 54: 237, 1977.
- (40) RICHARDS, G.N. & STREAMER, M. Studies on dextranases. Part I. Isolation of extracellular bacterial dextranases. Carbohydr. Res., 25: 323, 1972.
- (41) _____ & _____. Studies on dextranases. Part IV. Mode of action of dextranase D₁ on oligosaccharides. Carbohydr. Res., 32(2): 251, 1974.
- (42) _____ & _____. Studies on dextranases. Part VI. Mode of action of dextranase D₂ from *Pseudomonas* UQM 733 on oligosaccharides. Carbohydr. Res., 62(1): 191, 1978.
- (43) SASKA, M. & POLACK, J.A. Effects of dextran hydrolysate on sucrose crystal elongation. Z. Zuckerind., 107(10): 941, 1982.
- (44) SIMONSON, L.G. & LIBERTA, A.E. New sources of fungal dextranase. Mycologia, 67(4): 845, 1975.

- (45) _____; _____ & RICHARDSON, A. Characterization of an extracellular dextranase from *Fusarium moniliforme*. Appl. Microbiol., 30(5): 855, 1975.
- (46) SUGIURA, M.; ITO, A.; OGISO, T.; KATO, K. & ASANO, H. Studies on dextranase. Part I. Purification of dextranase from *Penicillium funiculosum* and its enzymatic properties. Biochim. Biophys. Acta, 309(2): 357, 1973.
- (47) _____; _____ & YAMAGUCHI, T. Studies on dextranase. Part II. New exo-dextranase from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum*. Biochim. Biophys. Acta, 350: 61, 1974.
- (48) _____ & _____. Studies on dextranase. Part III. Action patterns of dextranase from *Penicillium funiculosum* on substrate and inhibition on hydrolysis reaction by substrate analogues. Chem. Pharm. Bull., 22(7): 1593, 1974.
- (49) _____ & _____. Studies on dextranase. Part VI. Some physicochemical properties and amino acid compositions of dextranases from *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* and *Penicillium funiculosum* IAM 7013. Chem. Pharm. Bull., 23(6): 1304, 1975.

- (50) SUTHERLAND, D.N. Dextran and crystal elongation. Int. Sugar J., 70(6): 355, 1968.
- (51) _____ & PATON, N. Dextran and crystal elongation: Further experiments. Int. Sugar J., 71(845): 131, 1969.
- (52) TAKAGI, S.; SHIOTA, M.; MITSUIHI, Y.; KOBAYASHI, M. & MATSUDA, K. An isomaltotriose - producing dextranase from *Flavobacterium* sp M-73: Action pattern of the enzyme. Carbohydr. Res., 129: 167, 1984.
- (53) TREVELYAN, W.E.; PROCTOR, D.P. & HARRISON, J.G. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166: 444, 1950.
- (54) TSUCHIYA, H.M.; JEANES, A.; BRICKER, H.M. & WILHAM, C.A. Dextran degrading enzymes from molds. J. Bact., 64: 513, 1952.
- (55) TSURU, D.; HIRAOKA, N.; HIROSE, T. & FUKUMOTO, J. Studies on mold dextranases. Part II. Dextranase production by a strain of *Aspergillus carneus*. Agric. Biol. Chem., 35(11): 1727, 1971.

- (56) _____; _____ & FUKUMOTO, J. Studies on mold dextranases. Part IV. Substrate specificity of *Aspergillus carneus* dextranase. J. Biochem., 71: 653, 1972.
- (57) VINOGRADOVA, K.A.; CHERKESOVA, G.V.; PETROVA, L.I.; MAMULINA, N.S. & MOLODOVA, G.A. Formation of dextranases by mycelial fungi and actinomycetes. Appl. Bioch. Microbiol., 11 (5): 644, 1973.
- (58) WHITESIDE-CARLSON, V. & CARLSON, W.W. Enzymatic hydrolysis of dextran. Science, 115: 43, 1952.
- (59) YAMAGUCHI, T. & GOCHO, S. Production and properties of alkaline dextranase from a newly isolated *Brevibacterium*. Agric. Biol. Chem., 37(11): 2527, 1973.
- (60) ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. Cell-bound exodextranase of *Bacillus* species. Carbohydr. Res., 6: 310, 1968.

ANEXO I

MATERIAL E MÉTODOS

A - Reagentes

Os reagentes utilizados foram obtidos das firmas Carlo Erba, Merck, Riedel e Sigma.

A dextrana (PM 60 a 90 mil) foi obtida da firma Intermat Ind. e Com. Ltda.

Glicose e maltose foram obtidos da Merck, dextrina da Carlo Erba, sacarose da Mallinckrodt, lactose da Fischer e rafinose da BDH.

O Agar Sabouraud Dextrose, o extrato de levedura e a peptona foram obtidos da Difco, enquanto que o amido solúvel foi obtido da Reagen e a caseína da Riedel.

O farelo de trigo foi obtido do Ital.

B - Equipamentos

autoclave Soc. Fabbe Ltda. - Mod. 103

balança semi-analítica Sauter-Typ SD/200T/0,1

balança analítica Sauter - Mod. 404/10

banho maria FANEM Ltda - Mod. 102/1

bomba peristáltica Milan - Mod. 204

centrífuga Beckman - Mod. J-213

coletor de frações Buchler Fractomete Alpha 200 - Mod.34600

espectrofotômetro Perkin-Elmer Coleman 124-D (leitura em 280nm)

espectrofotômetro Baush & Lomb Spectronic 20 (leitura em 420nm e 540nm)

espectrofotômetro Coleman 295 (leitura em 660nm)

estufa bacteriológica FANEM Ltda - Mod. 002/3

liofilizador Virtis 10-146 MRB

microscópio Zeiss biocular

microscópio Nikon 82028

pH metro Horiba H-5

shaker Fermentation Design Inc. - Mod. 0531

shaker Psycrotherm New Brunswic Scientific. Co., Inc.