

"CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA UTILIZAÇÃO
DA ENZIMA DEXTRANA-SACARASE NA
MODIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS"

03/89

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

"CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DA ENZIMA DEXTRANA-
-SACARASE NA MODIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS"

Parcer

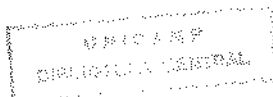
*Este exemplar corresponde a redação final
da Tese defendida por Maria Isabel Rodrigues e
aprovada pela Comissão Julgadora em 03.02.89
Campinas, 03 de fevereiro de 1989*


Maria Isabel Rodrigues

Presidente da Banca

ORIENTADOR: Prof.Dr. Francisco Maugeri Filho

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do grau de mestre
em Engenharia de Alimentos



AGRADECIMENTOS

- Ao Prof.Dr. Francisco Maugeri Filho pela sua dedicação como orientador e pesquisador e apoio constante em todos os momentos.
- Ao Prof.Dr. Gerard Goma, diretor do INSA-Toulouse, pela oportunidade que me proporcionou, na realização de um estágio, contribuindo na minha formação profissional.
- Ao Prof. René Marc Willemott por sua amizade e colaboração
- Às minhas queridas amigas Fátima A.A. Costa e Gláucia M.F. Aragão pela sólida amizade e incentivo durante todos esses anos que trabalhamos e estudamos juntas.
- Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos que me apoiaram e incentivaram contribuindo para a realização deste trabalho.
- À Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos (ABIA) pelo custeio da confecção desta tese.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, que com muita humildade e simplicidade souberam ser tão sábios na difícil tarefa de educar e transmitir toda confiança que os filhos sempre desejam.

À minha querida irmã Renata, pelo sorriso incomparável, irradiando energia e força por onde passe.

Ao meu grande companheiro Francisco, que além de me proporcionar tanta felicidade numa relação a dois, soube acumular tão bem distintos papéis na minha vida.

À memória do meu amigo Clovis Garcia. Pouca gente teve oportunidade de conhecer alguém mais humano e cristão, que se dizia ateu.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABELAS	vi
RESUMO	viii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1- Aspectos Gerais	6
2.2- Aplicações	9
2.3- Processo de obtenção da dextrana	12
2.4- dextrana-sacarase	15
2.4.1- Produção	15
2.4.2- Propriedades	18
2.4.3- Definições de atividade de dextrana-sacarase ..	20
2.5- Mecanismo de ação da dextrana-sacarase	20
2.6- Mecanismo de ação da dextrana-sacarase na presença de receptores	24
2.7- Glicosilação de polissacarídeos usando a enzima dextrana-sacarase no meio reacional	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1- Equipamentos utilizados	32
3.2- Substratos e reagentes	33
3.3- Métodos analíticos	34
3.3.1- Determinação de açúcares totais - Método de Antrona	34
3.3.2- Determinação de proteína - Método de Lowry ...	34
3.3.3- Determinação de atividade de dextranase	34
3.3.4- Determinação da atividade de dextrana-sacarase	35
3.3.5- Determinação da glicosilação nos polissacarií-	

deos pelo método de cintilação radioativa	39
3.3.6- Enzima utilizada	40
3.3.7- Polissacarídeos utilizados	42
3.3.8- Preparação da coluna	44
3.3.9- Metodologia de separação e detecção dos produtos obtidos na reação enzimática	45
3.4- Metodologia usada nos ensaios de glicosilação de maltodextrina e pululana	46
3.4.1- Determinação do tempo de retenção na coluna das moléculas de alto e baixo peso molecular	46
3.4.2- Preparo das amostras para leitura de radioatividade	47
3.4.3- Ensaios com a maltodextrina	47
3.4.4- Ensaios com a pululana	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1- Determinação do tempo de reação necessário para a produção de dextrana	54
4.2- Determinação do tempo de retenção na coluna das moléculas de alto e baixo peso molecular	56
4.3- Resultados obtidos nos ensaios com a maltodextrina ..	57
4.4- Resultados obtidos nos ensaios com a pululana	72
4.4.1- Utilizando o microconcentrador AMICON	72
4.4.2- Utilizando o método de diálise	74
5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do mecanismo de ação da dextrana-sacarase proposto por ROBYT	23
Figura 2 - Esquema do mecanismo de deformação de ramificações proposto por ROBYT	24
Figura 3 - Esquema do mecanismo para a reação dos receptores na síntese de dextrana	26
Figura 4 - Distribuição da D-[¹⁴ C] glicose da sacarose nos produtos de reação com os "acceptors"	27
Figura 5 - Variação de V_{max} e K_m em função da concentração da maltose como receptor	30
Figura 6 - Estrutura da maltodextrina	43
Figura 7 - Estrutura da pululana	44
Figura 8 - Equipamentos usados nos experimentos	46
Figura 9a - Fluxograma das etapas realizadas a preparação de amostras para leitura no contador de radioatividade a partir de reações em (1) e com (2) maltodextrina, sem a concentração das frações 7,8,9 e 10	49
Figura 9b - Preparo das amostras para leitura no contador de radioatividade a partir de reações sem (1) e com (2) maltodextrina, concentrando as frações 7 + 8 no Rotavapor	50
Figura 9c - Preparo das amostras para leitura no	

contador de radioatividade, a partir
da reação com maltodextrina (2),
concentrando as frações 7 + 8 no
microconcentrador AMICON 50

Figura 10a - Fluxograma das etapas realizadas na
preparação de amostras para leitura
no contador de radioatividade a partir da
reação com pululana, concentrando as
frações 7,8 e 9 no microconcentrador AMICON 52

Figura 10b - Fluxograma das etapas realizadas na
preparação de amostras para leitura de
radioatividade a partir da reação com
pululana usando o método de diálise para
eliminar as moléculas de baixo PM 53

Figura 11 - Evolução da reação de síntese da dextrana
sem receptor com maltodextrina e com pululana ... 54

Figura 12 - Determinação do tempo de retenção de:
(a) sacarose + frutose + glicose; (b) malto-
-dextrina + frutose; (c) pululana + frutose;
(d) dextrana + sacarose + frutose 56

Figura 13 - Resultado da reação de sacarose (C14) +
dextrana-sacarase. (a) cromatograma;
(b) radioatividade correspondente ao cromatograma 61

Figura 14 - Resultado da reação de sacarose (C14) +
dextrana-sacarase + maltodextrina:
(a) cromatograma; (b) radioatividade
correspondente ao cromatograma 61

Figura 15 - (a) cromatograma das frações (7 + 8 +
9 + 10) correspondente a figura 13 (sem malto-
-dextrina); (b) radioatividade correspondente

ao cromatograma	63
Figura 16 - (a) cromatograma das frações (7 + 8 + 9 + 10) correspondentes a figura 13 (sem malto- dextrina) reagida com α -amilase; (b) radio- -atividade correspondente ao cromatograma	63
Figura 17 - (a) cromatograma das frações (7 + 8 + 9 + 10) correspondentes a figura 14 (com maltodextrina); (b) radioatividade correspondente ao cromatograma	65
Figura 18 - (a) cromatograma das frações (7 + 9 + 9 + 10) correspondentes a figura 14 (com maltodextrina) reagida com α -amilase; (b) radio- -atividade correspondente ao cromatograma	65
Figura 19 - (a) cromatograma das frações (7 + 8) concentradas no Rotavapor correspondente a figura 13 (sem maltodextrina); (b) radioa- -tividade correspondente ao cromatograma	67
Figura 20 - (a) cromatograma das frações (7 + 8) concentradas no Rotavapor correspondente a figura 14 (com maltodextrina); (b) radioatividade correspondente ao cromatograma	67
Figura 21 - (a) cromatograma das frações (7 + 8) concentradas no AMICON correspondentes a figura 14 (com maltodextrina); (b) radioa- -tividade correspondente ao cromatograma	69
Figura 22 - (a) cromatograma das frações (7 + 8) concentradas no AMICON correspondente a figura 14 (com maltodextrina) reagida com α -amilase; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma	69

- Figura 23 - (a) cromatograma das frações (7 + 8) concentradas no AMICON correspondente a figura 14 (com maltodextrina) reagidas com dextranase; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma 71
- Figura 24 - Resultado da reação de sacarose + dextrana-sacarase + pululana (a) cromatograma; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma 76
- Figura 25 - (a) cromatograma das frações (7 + 8 + 9) concentradas no AMICON correspondente a figura 24 (com pululana); (b) radioatividade correspondente ao cromatograma 77
- Figura 26 - (a) cromatograma das frações (7 + 8 + 9) concentradas no AMICON correspondentes a figura 24 (com pululana) reagida com pululanase; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma 77
- Figura 27 - (a) cromatograma das frações (7 + 8 + 9) concentradas no AMICON correspondente a figura 24 (com pululana) reagidas com dextranase; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma 79
- Figura 28 - (a) cromatograma das frações (7 + 8 + 9) correspondentes as frações com PM < 10.000 obtidas no filtrado (AMICON) correspondente a figura 24 (com pululana); (b) radioatividade correspondente ao cromatograma 80
- Figura 29 - (a) cromatograma das frações (7 + 8 + 9) correspondentes às frações com PM < 10.000 obtidas no filtrado (AMICON) correspondente a figura 24 (com pululana) reagida com pululanase; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma 80
- Figura 30 - (a) cromatograma das frações (7 + 8 + 9)

correspondentes as frações com PM < 10.000 obtidas
no filtrado (AMICON) correspondente a figura 24
reagida com dextranase; (b) radioatividade
correspondente ao cromatograma 82

Figura 31 - Resultado da reação (sacarose + dextrana-sacarase +
pululana) dialisada (a) cromatograma;
(b) radioatividade correspondente ao cromatograma 83

Figura 32 - Resultado de reação (sacarose + dextrana-sacarase
+ pululana) dialisada, reagida com pululanase
(a) cromatograma; (b) radioatividade
correspondente ao cromatograma 83

Figura 33 - Resultado da reação (sacarose + dextrana-sacarase
+ pululana) dialisada, reagida com dextranase
(a) cromatograma; (b) radioatividade
correspondente ao cromatograma 85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de ligações alfa entre os resíduos glicosídeos das dextranas de diferentes linhagens e microrganismos	8
Tabela 2 - Porcentual do total de D-glicose da sacarose, incorporados nos produtos de reação dextrana-sacarase com receptores	28
Tabela 3 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 13b	62
Tabela 4 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 14b	62
Tabela 5 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 15b	64
Tabela 6 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 16b	64
Tabela 7 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 17b	66
Tabela 8 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 18b	66
Tabela 9 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 19b	68
Tabela 10 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 20b	68
Tabela 11 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 21b	70
Tabela 12 - Radioatividade das frações correspondentes	

a figura 22b	70
Tabela 13 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 23b	71
Tabela 14 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 24b	76
Tabela 15 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 25b	78
Tabela 16 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 26b	78
Tabela 17 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 27b	79
Tabela 18 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 28b	81
Tabela 19 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 29b	81
Tabela 20 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 30b	82
Tabela 21 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 31b	84
Tabela 22 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 32b	84
Tabela 23 - Radioatividade das frações correspondentes a figura 33b	85

Resumo

Neste trabalho realizou-se o estudo de glicosilação de maltodextrina e pululana, utilizando a enzima dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* de NRLL B 512 F. Empregou-se, no acompanhamento das reações bioquímicas, a metodologia de radioatividade através de sacarose marcada com carbono 14, assim como cromatografia de permeação em gel.

No estudo realizado com maltodextrina verificou-se que a enzima dextrana-sacarase é incapaz de transferir a glicose contida na molécula de sacarose para o polissacarídeo. No caso de pululana, apesar de também não ter sido observado a glicosilação nas moléculas de peso molecular elevado (ao redor de 300.000 daltons), houve indícios de que a glicosilação ocorreu em moléculas de pululana de peso molecular abaixo de 10.000 daltons. Observou-se igualmente neste caso, a formação de dextrana de peso molecular abaixo de 10.000 daltons.

Summary

In this work a study of the addition of glucose molecules in both polyssaccharides, maltodextrin and pullulan was performed. The enzyme dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 F was utilized. The biochemical reactions were analysed by means of radioactivity techniques, using sucrose labeled with C^{14} as well as gel permeation chromatography.

It was observed that the enzyme dextranucrase was unable to transfer units of glucose from sucrose molecules to the polyssaccharides both maltodextrin and pullulan. On the other hand, it was observed that smaller molecules of pullulan with less than 10.000 daltons, were possibly glucosilated. It was also noticed that dextran with less than 10.000 daltons was produced.

1 - INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são macromoléculas de origem natural, conhecidos como gomas. Definida de maneira prática e funcional, uma goma é um polímero que pode dissolver-se ou dispersar-se em água para formar soluções, suspensões viscosas ou géis. Seus usos têm sido bastante variados desde a antiguidade devido principalmente a sua capacidade de alterar as propriedades da água alterando sua viscosidade.

Sem dúvida alguma, os polissacarídeos mais estudados nos últimos anos têm sido de origem microbiana, chamados de biopolímeros. Isto ocorre principalmente porque os polissacarídeos de origem microbiana possuem propriedades que em alguns casos, superam em características funcionais as gomas de origem vegetal, de algas e sintéticas.

Algumas vantagens na produção de biopolímeros podem ser citadas, como:

- sua produção não depende de condições climáticas.
- podem produzir-se em zonas onde as condições não permitem o desenvolvimento de gomas naturais.
- uso de matérias-primas regionais.
- a escala de produção depende somente do mercado
- consegue-se maior uniformidade em suas propriedades, pureza e características de qualidade, já que em geral sua biossíntese é muito específica podendo-se controlar parâmetros como: pH, temperatura, tempo de fermentação,

composição do meio e inóculo, agitação e aeração.

- permite alterar potencialmente as características dos microorganismos produtores com a finalidade de melhorar a produção e obter propriedades especiais, o que é praticamente impossível com as demais gomas naturais.
- facilidade de obtenção de polissacarídeos com pesos e estruturas moleculares diferentes, alterando-se as condições de fermentação.

Entre as desvantagens tem-se o alto custo das plantas de processo, devido ao investimento inicial na aquisição e instalação dos equipamentos.

Em 1984 a venda de biopolímeros no mundo foi estimada em 100 a 200 milhões de dólares e em 1987 ao redor de 300 milhões de dólares.

Os biopolímeros devem ter propriedades tais que os tornem competitivos e atraentes em relação aos polissacarídeos de vegetais e algas. Essas propriedades incluem: alta viscosidade ou poder gelificante, compatibilidade com uma ampla variedade de sais, faixa de pH e temperatura, alta solubilidade em água e sinergismo com outros polissacarídeos. A possibilidade de se obter um custo mais atrativo através de uma produção e recuperação eficientes é o objetivo dos estudos de otimização do processo na obtenção do biopolímero. A maioria deles tem em comum as seguintes propriedades ou condições de produção: são compostos não tóxicos produzidos extracelularmente em fermentação aeróbica em batelada por microorganismos não patogênicos, com uma eficiência em torno

de 50%.

Os biopolímeros de interesse comercial podem ser classificados em:

1 - Polissacarídeos neutros

1.1 - Biopolímeros de origem bacteriana

- dextrana

- "curdlan"

1.2 - Biopolímeros de origem fúngica

- pululana

- "scleroglucan"

2 - Polissacarídeos Aniônicos

- Xantana

- Alginato (bacteriano)

- Biopolímero de *Arthrobacter* sp

- " de *Beijerinckia indica*

- " de *Erwinia tahitica*

- " de *Pseudomonas* sp

Apesar da grande quantidade de polissacarídeos microbianos pesquisados, somente dois deles, xantana e dextrana, são produzidos industrialmente. Isto se deve ao fato de que o polissacarídeo deve ter vantagens técnicas e econômicas para que possa substituir a custos similares algumas das gomas já existentes.

No momento a xantana é ainda o único biopolímero comercializado que divide uma significativa fatia do mercado, dominado

atualmente pelos derivados de gomas de plantas e algas. A produção de xantana foi de 5000 toneladas em 1975 e de 200000 toneladas em 1984. Por outro lado, a produção de dextrana, outro biopolímero de grande aplicação, está estimada em 2000 toneladas anuais. Os principais produtores deste biopolímero são: Alemanha Ocidental, Estados Unidos, Inglaterra, Holanda, Japão, URSS e Suíça.

A dextrana é outro biopolímero de grande interesse comercial devido a sua grande aplicabilidade tanto na indústria farmacêutica, química, petroquímica ou de alimentos. Inicialmente, ela despertou grande interesse devido aos problemas que causava na indústria açucareira entupindo peneiras, trocadores de calor e provocando "espumas" de alta viscosidade (grandes bolhas) durante o processo e produção de etanol. Vulgarmente nas usinas de açúcar e álcool, sua contaminação é chamada de formação de "canji-ca".

As aplicações da dextrana estão diretamente relacionadas com seu peso molecular. Com peso molecular superior a 25 milhões de daltons pode ser empregada na extração de petróleo como lama de impermeabilização e lubrificação, ou ainda na recuperação secundária de petróleo de alta viscosidade. A dextrana de peso molecular médio é usada na indústria de alimentos como estabilizante, gelificante e agente de textura. Na indústria química tem seu uso na purificação de produtos biológicos, usada como gel em cromatografia de permeação e, na indústria farmacêutica, como substância de encapsulação e vetor de medicamentos. A dextrana de baixo peso molecular é usada na indústria farmacêutica há

mais de trinta anos. Conforme o seu peso molecular ela pode ser usada como substituta do plasma sanguíneo (70.000) ou com a finalidade de aumentar a fluidez do sangue (40.000).

A síntese da dextrana se faz graças à ação de uma enzima extracelular -dextrana-sacarase - ou α -(1-6)-D-glucan-D-frutose-2-D-glucosil transferase. O mecanismo de ação da enzima tem sido muito discutido nos últimos 30 anos. Meios reacionais, compreendendo sacarose como substrato, alguns receptores tais como maltose, isomaltose, nigerose e outros e a enzima dextrana-sacarase foram estudados para melhor compreender o mecanismo da reação. Observou-se que a presença de certos receptores aumenta a velocidade de reação e provoca a formação de grande quantidade de oligossacarídeos.

O poder receptor de inúmeros monossacarídeos e dissacarídeos tem merecido bastante atenção, porém a glicosilação de receptores de peso moleculares mais elevados, tem sido raramente estudada.

Nas reações de glicosilação de oligossacarídeos, não só a modificação do mesmo tem interesse comercial, como também a produção de dextrana e frutose que são obtidas paralelamente durante a reação. Existe ainda, o interesse científico de verificar se a enzima pode realmente promover tal reação, possibilitando modificar polissacarídeos bioquimicamente. Desta forma, este método se apresentaria como uma alternativa aos métodos químicos de modificação usualmente empregados.

O objetivo deste trabalho é portanto de estudar a ação da enzima dextrana-sacarase na presença de sacarose e polissaca-

rídeos, no presente caso pululana e maltodextrina, com vistas a promover a transferência da molécula de glicose contida na sacarose para a molécula do polissacarídeo.

A metodologia utilizada para acompanhar os ensaios foi a de cromatografia de permeação em gel (GPC) e sacarose radioativa uniformemente marcada com C14 para facilitar a detecção da glicosilação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Aspectos Gerais:

O termo dextrana foi utilizado pela primeira vez em 1874 quando SCHEIBLER notou uma turvação nos xaropes de beterraba e cana de açúcar. Anteriormente PASTEUR em 1861 demonstrou que estas substâncias viscosas eram causadas pela ação de microorganismos e em 1878 VAN TIEGHEM chamou a bactéria causadora deste fenômeno de *Leuconostoc mesenteroides*.

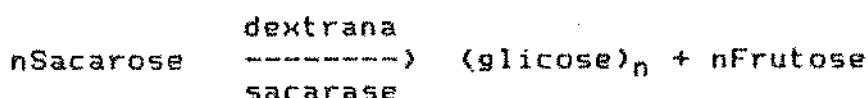
O microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* é gram positivo, anaeróbio facultativo, sem mobilidade e não forma esporos, classificado como:

- grupo: Streptococceae
- família: Lactobacillaceae
- gênero: *Leuconostoc*
- espécie: *mesenteroides*

Outros microorganismos também podem produzir "dextrana", porém não se tem suas características e propriedades específicas bem definidas. Frequentemente usam o termo "dextrana" quando não se tem uma definição clara de suas propriedades químicas e de sua origem bacteriana (1). Porém a maioria dos trabalhos publicados recentemente conduzem seus experimentos com linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* e em particular a NRRL B 512F.

A dextrana é um homopolissacarídeo (2), classificado no grupo dos biopolímeros por ter uma origem microbiana, formado por grande quantidade de resíduos α -D-glucopiranosil, através de ligações α -(1-6), α -(1-2), α -(1-3) e α (1-4). A maioria das dextranas conhecidas tem uma cadeia principal linear, formada por ligações α -(1-6) apresentando diversidades quanto à proporção das outras ligações e graus de ramificações.

A síntese de dextrana se dá pela ação de uma enzima extracelular - dextrana-sacarase - ou α -(1-6)-D-glucan-D-frutose-2-D-glucosiltransferase (EC.2.4.1.5) como mostra a seguinte reação:



A enzima dextrana-sacarase foi denominada por Hestrin e Arineri-Shapiro em 1944 segundo NEELY (24). Ela é classificada como sendo um membro das transglicosidases, indicando que a enzima catalisa exclusivamente a síntese de cadeias de unidades α -D-glicopiranosil com ligações α -(1-6).

As características da dextrana quanto ao tipo de ligação existente e o grau de ramificação, dependem muito do microorganismo produtor.

Inúmeras bactérias produzem dextrana extracelular. Estas bactérias são agrupadas na família Lactobacillaceae e mais especificamente nos gêneros Lactobacillus, Streptococcus e Leuconostoc. A tabela 1 extraída de um artigo de SIDEBOTHAM (39) apresenta alguns destes microorganismos produtores, e a variação da porcentagem das ligações das respectivas dextranas.

Tabela 1: Porcentagem de ligações alfa entre os resíduos glicosídeos das dextranas de diferentes linhagens e microorganismos.

Microorganismo	DEXTRANA			
	% de ligações entre os resíduos D-glicopiranosil			
	1 - 6	1 - 4	1 - 3	1 - 2
<i>L. mesenteroides</i>				
NRRL B - 512	95	-	5	-
B-523S	93	3	4	-
B-742S	64	8	28	-
B-742L	95	4	-	-
B-1064	95	2	3	-
B-1299S	56	-	7	36
B-1299L	49	-	19	32
B-1355S	53	-	47	-
B-1375 ^a	84,5	1	14,5	-
B-1415	87	12,5	0,5	-
B-1416	83	7	10	-
IFO 12370	94	-	6	-
SF4	95	-	5	-
44	71	-	29	-
<i>S. mutans</i>				
OMZ 176	16	-	84	-
Ingbritt A	37	-	62,5	-
<i>S. sanguis</i>				
804	52	-	48	-
Complexo Tibi ^b	90	1,5	8,5	-

^a Também chamado como *L. dextranicum*

^b *Lactobacillus brevis* / *Saccharomyces cerevisiae*

A utilização de vários substratos tem sido objeto de estudos na tentativa de melhor compreender o mecanismo de ação da dextrana-sacarase. GRIER e MAYER, JUNG e MAYER (6,12) utilizando a enzima dextrana-sacarase de *Streptococcus sanguis* realizaram vários estudos de cinética enzimática na presença de sacarose e fluoroacúcares como substratos. Os resultados obtidos mostraram que a similaridade das constantes cinéticas sugere que α -1-fluoroglicose é um substrato alternativo razoável para a sacarose.

Entretanto, até o momento, toda a dextrana comercial é sintetizada por via enzimática, na presença ou ausência de células, usando a sacarose como substrato (38). Uma característica bastante útil no processo de produção é que tanto a dextrana como a dextrana-sacarase são exocelulares, facilitando os processos de extração (37). Já que o mecanismo envolve apenas uma enzima, sem intermediários, a síntese "in vitro" é conduzida com relativa facilidade, bastando isolar a enzima e colocá-la em contato com a sacarose em condições controladas de temperatura e pH.

2.2- Aplicações:

A dextrana surgiu primeiramente como um grande problema nas indústrias de açúcar, devido às transformações que ocorriam nos caldos açucarados acarretando um aumento da viscosidade, formação de películas e aparecimento de sabor amargo. Até hoje, estudos são realizados visando a produção de enzimas que degradem a dextrana, ou seja as dextranases (18,19).

Por outro lado, a dextrana é atualmente um dos polissacarídeos mais estudados devido a sua grande aplicabilidade tanto na indústria farmacêutica, química, petroquímica ou de alimentos. Várias patentes para a produção de dextrana já foram registradas (24).

A dextrana possui algumas características específicas garantindo seu espaço nas aplicações industriais, onde não se encontram substitutos adequados (44).

A classificação da utilização da dextrana torna-se mais fácil quando é feita pelo seu peso molecular:

a - Peso molecular superior a 25 milhões de daltons:

- Extração de petróleo de alta viscosidade: é utilizada para compor a lama de perfuração e também na recuperação secundária do petróleo. Em Cuba, na década de 60, praticamente toda a dextrana produzida era destinada à extração de petróleo (17).

b - Peso molecular médio:

- Indústria de Alimentos:
 - agente gelificante em geléias e gomas de mascar.
 - inibidor da formação de cristais e mantenedor do volume em sorvetes.
 - inibidor da cristalização, homogeneizador e espessante em doces e xaropes.
 - agente estabilizante em composição de coberturas.
 - agente espessante em pudins.

- Indústria Química:

- obtenção de redes moleculares - gel de dextrana com ligações cruzadas: usados para enchimento de colunas em cromatografia de exclusão molecular (38). Produtos mais conhecidos: SEPHADEX e DEAE-DEXTRANA.
- produção de soda: precipitação de impurezas através de complexos.
- produção de alumínio: agente de sedimentação.

c - Baixo Peso Molecular:

Na indústria farmacêutica a dextrana de baixo peso molecular tem seu maior uso, tendo sido introduzida há mais de 30 anos. Conforme o seu peso molecular ela pode ser usada como expansor do plasma sanguíneo (70.000) ou com a finalidade de aumentar a fluidez do sangue (40.000) (38). Ela é completamente metabolizada no organismo e não apresenta efeitos tóxicos ou alérgicos. Estes efeitos aparecem, com a dextrana de alto peso molecular, ou com alto grau de ramificação.

Em solução salina isotônica a 6% p/v a dextrana de baixo peso molecular apresenta propriedades coloidais, osmóticas e reológicas, semelhantes às proteínas do plasma sanguíneo. As vantagens de sua utilização estão relacionadas pela sua capacidade quanto a:

- estabilidade à esterilização.
- independência do tipo sanguíneo do paciente.
- livre de doenças transmissíveis.
- baixa incidência de reações adversas.

Outros derivados da dextrana úteis na medicina são:

- Dextrana-Sulfato: apresenta propriedades anti-coagulantes (23).
- Dextrana-Ferro: o complexo formado da dextrana com íon Fe^{++} é estável e tem sido utilizado com sucesso no tratamento de anemias em animais e seres humanos (1). Esta complexação dificilmente é conseguida com outros carboidratos.

2.3- Processo de obtenção da dextrana:

Existem atualmente dois processos industriais de produção de dextrana sendo que as etapas principais são:

- Fermentação
 - crescimento celular
 - produção da enzima
 - produção da dextrana
- Hidrólise: enzimática, ácida ou ultrassom
- Fracionamento
- Secagem

a - Processo Convencional de Produção de Dextrana:

É o método mais tradicional, e consiste em produzir dextrana em presença de células de *Leuconostoc mesenteroides* em meio de cultura contendo sacarose enriquecido com outros nutrientes. Exige pouco controle além da temperatura. Este processo tem um baixo rendimento além de ser altamente dispendioso pela necessi-

dade de purificação e fracionamento. Porém, a maior parte da produção industrial é feita por esse processo.

JEANES (9) descreve as condições de cultura para a produção de três diferentes dextranas: duas hidrossolúveis (NRRL B-512 e B-1146) e uma insolúvel em água (B-523). Para o *L. mesenteroides* B-512 as condições de cultura foram realizadas como segue:

- Meio de cultura: 100g sacarose; 2,5 g de extrato de levedura; 0,2g de sulfato de magnésio heptahidratado e 5,0g de fosfato de potássio monobásico em 1 litro de água destilada (pH inicial ajustado a 7,0).
- Temperatura: 25°C durante toda a fermentação
- pH: cai de 7,0 para 4,8 quando a fermentação é interrompida, coincidindo com o pico máximo de viscosidade.
- Aeração: não se mostrou favorável.
- Tempo: varia de 18 a 30 horas.
- Recuperação da dextrana: Para se extrair dextrana o meio fermentado é diluído em água, centrifugado para separação das células e em seguida a dextrana é precipitada pela adição de etanol (até 45% v/v). Recuperado por centrifugação, o produto é dissolvido em água e novamente precipitado com álcool. O produto final é chamado de dextrana nativa. Nestas condições é um polímero de alto peso molecular, podendo alcançar até cem milhões de daltons. O rendimento, em relação à sacarose inicial chega próximo a 25%. Para fins clínicos, a dextrana nativa passa por processos de hidrólise e fracionamento para se chegar no final com um produto de peso

molecular baixo e uniforme.

b - Produção de Dextrana Via Enzimática

O método consiste em separar a enzima contida no meio de cultura e fazê-la agir "in vitro" como forma de obter o produto. Este processo tem a vantagem de proporcionar um controle mais rigoroso durante a fase de fermentação e síntese de dextrana resultando num meio mais aperfeiçoado, rentável e racional de obtenção do polissacarídeo. Dentre outras vantagens, a simplificação do processo de purificação, e maior rendimento foram apontadas por JEANES (10,11).

O rendimento teórico da síntese é de 100% em relação à glicose. Porém em condições industriais o rendimento é menor, diminuindo com o aumento da concentração inicial de sacarose, obtendo-se produtos secundários. Mesmo na ausência de células, a dextrana produzida é de alto peso molecular exigindo as etapas de hidrólise e fracionamento para os usos farmacêuticos (1). A produção de dextrana por esta via, permite ainda obter simultaneamente a frutose, açúcar de grande valor comercial.

c - Produção por enzima imobilizada:

Um terceiro método, ainda em fase de desenvolvimento, consiste na produção de dextrana por enzima imobilizada.

É muito interessante controlar a síntese de dextrana em termos do seu peso molecular já que as suas diversas utilizações

estão diretamente relacionadas aos diferentes pesos moleculares. Isso exige um controle de uma série de fatores como: concentração do substrato, tempo de reação, força iônica, tipo de receptores, concentração dos receptores, atividade enzimática, temperatura e pH.

O segundo processo descrito embora exija uma tecnologia mais sofisticada e investimento inicial maior, é aquele que torna possível o controle dos diversos parâmetros citados.

2.4- Dextrana-Sacarase:

2.4.1- Produção:

A dextrana-sacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* B-512F é uma enzima indutiva, e o único indutor conhecido é a sacarose (25), utilizada também como fonte de carbono. Outros açúcares como glicose, frutose, manose, lactose, etc, promovem um crescimento vegetativo normal, no entanto não há produção de enzima (16).

Diversos fatores influenciam na produção de dextrana-sacarase. A concentração de sacarose variando de 0,5 a 5% aumenta a atividade enzimática máxima de 6 a 120 UDS/ml, no entanto, acima de 2% devido à produção de dextrana há um aumento excessivo na viscosidade, dificultando a separação das células (41). Os pesquisadores consideram que a concentração ótima de sacarose é de 2%.

Água de maceração de milho ou extrato de levedura (2%) são nutrientes essenciais que servem como fonte de nitrogênio, vitaminas e demais fatores de crescimento. A substituição parcial da fonte de nitrogênio por fosfato de amônia resultou numa queda acentuada da atividade enzimática, pelo aumento da concentração dos íons amônio (41).

O meio de cultura deve ser suplementado com solução de sais contendo: sulfato de magnésio heptahidratado, cloreto de sódio, sulfato de manganês e sulfato ferroso (1).

QUEIROZ (29) estudou a adição de melão e água de maceração de milho como fontes de carbono e nitrogênio respectivamente. Os resultados mostraram que o melão é uma boa alternativa na substituição de sacarose suprimindo ainda a necessidade de adição de sais. Porém a substituição do extrato de levedura por água de maceração de milho não proporcionou nenhum incremento significativo na produção de dextrana-sacarase.

LOPES (16) verificou que a adição de cálcio (cloreto de cálcio) a 0,05% promove uma melhor estabilidade da enzima purificada (16). RDBYT e WALSETH (34) estudaram o efeito do cálcio mostrando que acima de 0,1% o crescimento pode ser afetado e a atividade enzimática diminuída.

Quanto ao pH, a produção de dextrana-sacarase é bastante sensível a este parâmetro. O valor ótimo está em torno de 6,7 sendo controlado pela adição de hidróxido de sódio durante a fermentação. Alguns pesquisadores estudando o efeito do pH, verificaram que a adição de fosfato (1-2%) ao meio de cultura, atuando como um tamponante, evita quedas bruscas de pH, mesmo quando o

controle é automático (16).

A faixa de temperatura é de 23-27°C, sendo que na maioria dos trabalhos publicados a temperatura foi controlada em 25°C.

A agitação deve ser suficiente para manter a homogeneidade, evitando a sedimentação (100-200 rpm).

O *Leuconostoc mesenteroides* é uma bactéria aeróbica facultativa, desenvolvendo-se bem em anaerobiose. A injeção de oxigênio puro, ou de dióxido de carbono inibe o crescimento. Quando uma pequena quantidade de ar é injetada (0,1 VVM) a produção de dextrana aumenta e sem aeração a produção de enzima é diminuída (1).

No processo de produção de dextrana-sacarase por fermentação descontínua nessas condições, obtinha-se uma atividade enzimática média entre 50 a 70 UDS/ml no meio de cultura, com 24 horas de fermentação não ultrapassando 120 UDS/ml. Em 1979, LOPES (16) utilizando-se de um sistema semidescontínuo com adição contínua de sacarose (20 g/l) atingiu 180 UDS/ml no meio de cultura após 10 horas de fermentação. Esta inovação representou um aumento na produtividade bem superior as atingidas por outros pesquisadores.

Os primeiros estudos realizados sobre a produção de dextrana-sacarase por fermentação contínua foram bastante desanimadores. LAWFORD e colaboradores (15) em 1979, não conseguiram nenhuma atividade enzimática no efluente trabalhando-se com taxas de diluição abaixo de 0,2/h. A concentração máxima atingida foi de 9,0 UDS/ml com 0,53/h de taxa de diluição.

Em 1984, PAUL e colaboradores (26) usando a mesma linhagem, *Leuconostoc mesenteroides* B512F, obtiveram uma concentração máxima de 70 UDS/ml à uma taxa de diluição de 0,4/h, resultando numa produtividade ainda maior (três vezes aproximadamente) à obtida em fermentação semi-contínua (adição contínua de sacarose) por LOPES (16).

2.4.2- Propriedades:

A composição química e o peso molecular da dextrana-sacarase é ainda, motivo de muitas discussões e dúvidas.

Em 1975, estudando os efeitos de íons metálicos, ITAYA e YAMAMOTO (8) sugeriram ser a dextrana-sacarase uma metaloenzima. Acreditavam, que os íons metálicos agiam como cofatores e possuíam um efeito estabilizante. Trabalhos mais recentes (22,27) mostram que a enzima não necessita desses íons para sintetizar a dextrana. Porém eles podem possuir um efeito estabilizante e ativador.

Estudando a inibição da dextrana-sacarase pelos íons de metais pesados, MILLER e ROBYT (20) demonstraram que o zinco possui um forte efeito inibidor mesmo em baixas concentrações (10 mM).

ROBYT (35) submeteu a enzima purificada à hidrólise ácida demonstrando que a fração de carboidratos era constituída principalmente de manose. A adição de concavalina A inativa totalmente a enzima, levando o autor a concluir que a enzima era uma glicoproteína, pois a concavalina tem a capacidade de se complexar com

glicoproteínas que possuem resíduos de D-manose.

O peso molecular da dextrana-sacarase é bastante difícil de ser determinado, já que uma parte de dextrana permanece ligada à enzima.

EBERT e SCHENKS (5) avaliaram um peso molecular de 280.000 daltons para a dextrana. KOBAYASHI e MATSUDA (14) usando dextranases como forma de eliminar a dextrana ligada à enzima obtiveram um peso molecular equivalente a 65.000 daltons. Utilizando-se de uma metodologia mais sofisticada de purificação, MILLER e colaboradores (21) conseguiram obter uma enzima com teores de carboidrato abaixo de 1% e peso molecular ao redor de 180.000. Devido aos baixos teores de carboidratos obtidos neste processo, os autores colocaram em questão o fato da enzima ser uma glicoproteína.

Os parâmetros de temperatura e pH visando a otimização da ação da enzima foram bastante estudados. Verificou-se que a atividade máxima ocorre por volta de 30°C (7), com um pH ótimo em torno de 5,2.

Quanto à manutenção da enzima, a melhor forma de estocagem é liofilizada, a temperatura abaixo de 5°C, mantendo-se sua atividade por vários anos.

2.4.3- Definições de atividade de dextrana-sacarase:

A unidade de dextrana-sacarase (UDS) foi definida como a quantidade de enzima que converte 1mg de sacarose em dextrana, em uma hora, liberando 0,52mg de frutose, a pH 5,2 com tampão aceta-

to e temperatura de 30°C (7).

LAWFORD, KLINGERMEN e WILLIAMS (15) expressam a atividade enzimática em microgramas de açúcar redutor produzidos por minuto por mililitro, a pH 5,5 e temperatura de 30°C. ROBYT e WALSETH (33) definiram a unidade dextrana-sacarase, como a quantidade de enzima que incorpora 1 micromole de D-glucose na cadeia do polisacarídeo em 1 minuto a pH 5,0 e temperatura de 25°C.

A diversidade nas condições do teste para medir a atividade enzimática da dextrana-sacarase dificulta muito a comparação dos resultados obtidos por diferentes autores, já que não se pode estabelecer uma equivalência entre as mesmas.

KABOLI e REILLY (13) definem uma unidade (U), como sendo a quantidade de enzima que libera 1 micromole de açúcar redutor em 1 minuto, a pH 5,2 e temperatura de 30°C. Assim, 1U = 20,27 UDS.

Na maioria dos trabalhos publicados a unidade enzimática é expressa em UDS. No entanto, mais recentemente a definição dada por KABOLI e REILLY vem sendo utilizada.

2.5- Mecanismo de Ação da Dextrana-sacarase:

O mecanismo de ação da dextrana-sacarase tem sido muito discutido nos últimos 30 anos. ALSOP (1) relata que em 1941 quando dextrana-sacarase foi descoberta, Cori e Cori trabalhavam com a síntese do glicogênio e Haynes estudava a síntese de amido. Eles acreditavam que a formação da cadeia molecular se dava pela adição de glicose a partir da α -glicose-1-fosfato na extremidade

não redutora da cadeia em crescimento. Mais tarde ficou demonstrado que açúcares fosforilados não estavam envolvidos na síntese.

Na discussão do mecanismo de reação muitas dúvidas necessitavam ser esclarecidas. Dentre elas:

- 1- A reação se dá em cadeia simples ou múltipla?
- 2- O início de polimerização necessita de um indutor?
- 3- A cadeia cresce pela extremidade redutora ou não redutora da molécula?
- 4- Como para o ciclo de crescimento, qual é o mecanismo, qual é o receptor de moléculas?
- 5- Como são formadas as ramificações? Mais que uma enzima é envolvida?

Em 1960, NEELY (24) propôs um mecanismo que explica a formação da cadeia principal, mas não as ramificações. A enzima teria dois sítios ativos: doador (d) e receptor (M). O crescimento do polissacarídeo se daria a partir da extremidade não redutora, envolvendo as seguintes etapas:

- 1- ligação simultânea de duas moléculas de sacarose aos dois sítios ativos d e M. A molécula ligada ao sítio d seria doadora de resíduos D-glucopiranosil e a outra molécula receptora iniciaria a cadeia.
- 2- transferência do grupo D-glucopiranosil da sacarose, ligada a outro d, para a sacarose ligada ao sítio M;

liberando uma molécula de frutose.

3- Sucessivas transferências de grupos D-glucopiranosil da sacarose para o final não redutor da cadeia em crescimento, ligado ao sítio M, formando ligações α -(1-6).

4- dissociação ou inativação do complexo dextranosil, terminando a síntese da molécula de dextrana.

EBERT e SCHENKS(5) em 1968, admitiram a hipótese dos dois sítios ativos da enzima, porém sugeriram um mecanismo no qual o crescimento da cadeia se efetuava pela extremidade redutora da glicose. Em seus estudos, concluíram que não é necessário "ativadores" para iniciar o crescimento do polímero.

ROBYT e colaboradores (30,31,32 e 34) utilizando-se de metodologia de carbono marcado, publicaram uma série de trabalhos demonstrando o mecanismo de ação catalítica da dextrana-sacarase.

A glicose é acrescentada entre a enzima e a dextrana por um ataque nucleofílico do oxigênio ligado ao carbono 6 da glicose sobre o carbono 1 da dextrana, para formar uma ligação glicosídica α -(1-6). Um grupo nucleofílico do sítio ativo da enzima é então liberado e permite a hidrólise da sacarose e a formação de um complexo glicosil-enzima. O oxigênio ligado ao carbono 6 da glicose repete o mecanismo atacando o carbono 1 da dextrana.

Este mecanismo ocorre devido aos dois grupos catalíticos equivalentes da enzima (X_1 e X_2). No início da reação, os dois grupos atacam a sacarose obtendo-se os complexos glicosídicos.

Imediatamente após, o oxigênio ligado ao carbono 6 de um desses 2 grupos efetua um ataque nucleofílico sobre o carbono 1 do outro grupo.

O mecanismo se repete, os 2 grupos catalíticos formam complexos covalentes, alternativamente com glicose e dextrana. A figura 1 apresenta o esquema proposto por ROBYT (30).

Quando o receptor natural (glicose ou frutose) estiver numa concentração suficiente para concorrer ao nível do sítio ativo com a sacarose, a dextrana é liberada cessando o alongamento da cadeia. Neste mecanismo, um grupo hidroxila do receptor efetua um ataque nucleofílico sobre o carbono 1 da cadeia da dextrana.

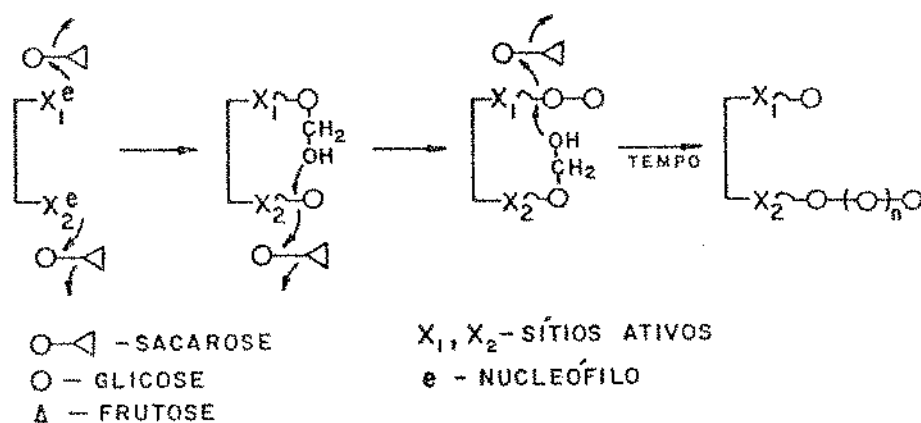


Figura 1: Esquema do mecanismo da ação da dextrana-sacarase proposto por ROBYT (30).

A biossíntese das ligações α -(1-3) (ramificações) foram também estudadas por ROBYT (30). Ele demonstrou que este tipo de ligação se dá quando um grupo hidroxila do carbono C3 da dextrana

livre em solução produz um ataque nucleofílico sobre o carbono C1 na extremidade redutora do complexo dextranosil-enzima, liberando a dextrana do complexo (Figura 2).

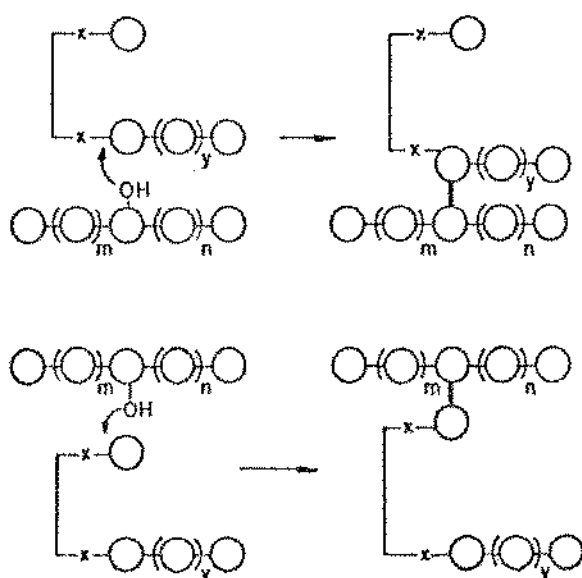


Figura 2: Esquema do mecanismo de formação de ramificações proposto por ROBYT (30).

2.6- Mecanismo de Ação da Dextrana-sacarase na Presença de receptores.

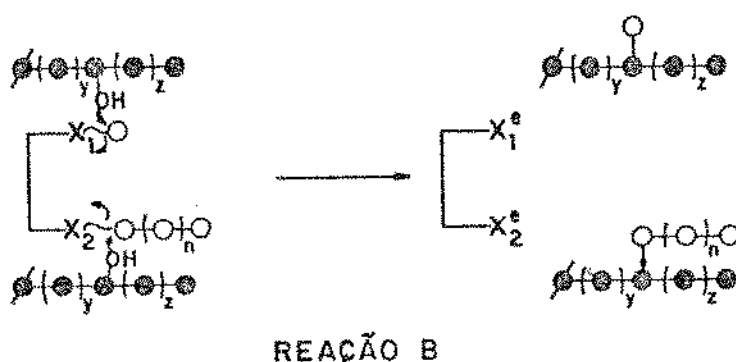
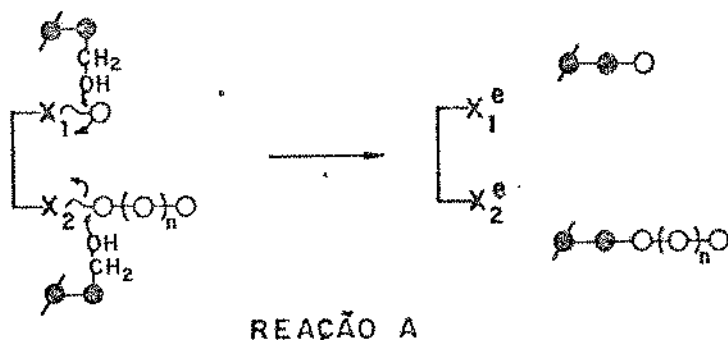
Alguns autores (42,43) estudaram o efeito da adição de carboidratos de baixo peso molecular no meio reacional sacarose-dextrana-sacarase, com a intenção de melhor compreender o mecanismo da reação. No entanto, observaram que a adição destes no meio reacional provocava a produção de dextranas de baixo peso molecular. Assim, estes carboidratos foram denominados de recep-

tores.

EBERT e SCHENKS(5) utilizando receptores marcados radioativamente (C^{14}) estudaram a cinética da reação e os pesos moleculares dos produtos obtidos. Os autores classificaram os receptores em fortes, intermediários e fracos, de acordo com sua capacidade de ativar a enzima. Eles acreditam que a terminação da cadeia se dá pela quebra da ligação entre a enzima e a cadeia em crescimento devido à ação do receptor, que desfaz o complexo enzima-cadeia, impedindo que este se refaça. A formação de dextrana de baixo peso molecular na presença do receptor é explicada pela sua competição com o substrato. Neste mesmo trabalho propuseram um mecanismo para explicar a formação das ramificações. Estas eram obtidas pela ação de moléculas de dextrana como receptor.

ROBYT (35) dando sequência a seus estudos sobre o mecanismo de ação da dextrana-sacarase, investigou o comportamento da enzima na presença de receptores. O mecanismo proposto considera que as hidroxilas dos receptores fazem um ataque nucleófilo e liberam os grupos glicosil e dextranosil da enzima, desfazendo o complexo, formando ligações glicosídicas, dando como produtos, respectivamente, oligossacarídeos e dextrana (Figura 3 - reação A). Ao reagir em presença de sacarose, os grupos glicosil e dextranosil, são continuamente regenerados no sítio ativo e deslocados pelo receptor. Assim, os rendimentos dos produtos da reação com o receptor são maiores do que quando a reação ocorre na ausência de sacarose. Quando a concentração do primeiro oligossacarídeo se torna suficientemente alta, ele age como receptor dan-

do origem a outro oligossacarídeo de maior cadeia, observando-se, nesses casos, uma série de oligossacarídeos homólogos (Figura 3-reação B).



- = Glicose
● = Glicose (aceptor)
⊙ = Glicose com carbono redutor
- ↓ = Ligação α-1,3 (ramificação)
— = Ligação α-1,6
 X_1^e, X_2^e = Sítios ativos

● = Glucose (acceptor)

● = Glicose com carbono redutor

= Ligação α -1,3 (ramificação)

Grupos = Ligação α -1,6

$$X_1^e, X_2^e = \text{Sítios ativos}$$

Figura 3: Esquema do mecanismo para a reação dos receptores na síntese de dextrana. (Os símbolos cheios representam unidades C14) (35).

Em 1983 ROBYT e EKLUND (36) estudaram o efeito de vários receptores usando sacarose C14 nas mesmas condições de temperatura, pH, substratos e concentrações de receptores e dextrana-sacarase altamente purificada. Eles determinaram o número de produ-

tos formados para cada receptor, sua quantidade, e a quantidade de dextrana formada. A eficiência relativa dos diferentes receptores foi determinada pela comparação da porcentagem de D-glicose incorporada nos vários oligossacarídeos formados. A incorporação ou glicosilação quantitativa, pela dextrana-sacarase de B-5i2-F, de D-glicose a partir da sacarose nos oligossacarídeos obtidos, está resumida na figura 4 e tabela 2 para 17 receptores estudados.

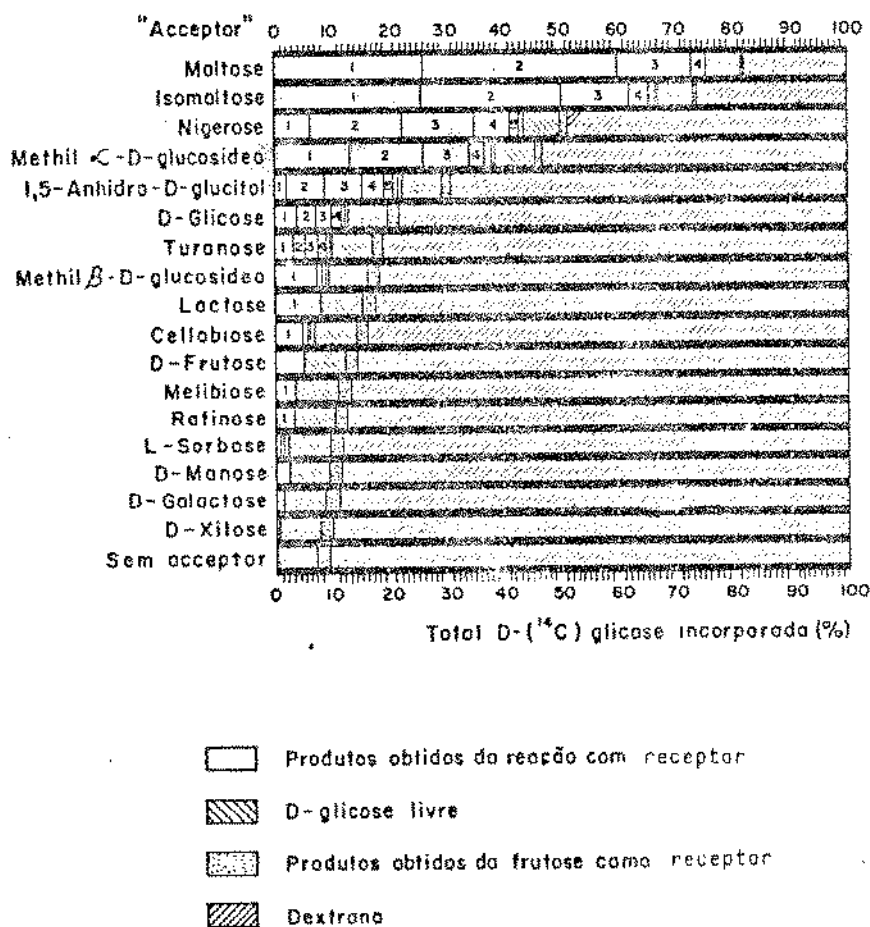


Figura 4: Distribuição da D-[^{14}C] glicose da sacarose nos produtos de reação com os receptores. (Os produtos são mostrados segundo o aumento do grau de polimerização (d.p.)) (36).

Tabela 2: Porcentual do total de D-glicose da sacarose, incorporados nos produtos de reação dextrana-sacarase com receptores.

Receptor	% glicose nos produtos de reação com receptor	% glicose na dextrana	% D-glicose livre	% leucrose e isomaltulose	Eficiência relativa do receptor
Maltose	75,5	18,0	5,9	0,6	100,0
Isomaltose	67,0	26,2	6,0	0,8	88,7
Sacarose	43,9	48,7	6,3	1,1	58,1
1- α -D-glicosídeo	38,9	53,1	6,7	1,3	51,5
5-anidro-D-glucitol	22,6	69,0	6,9	1,5	29,9
D-glicose	12,9	77,9	7,1	2,1	17,1
Glucanose	10,1	80,7	7,3	1,9	13,4
1- α -D-glicosídeo	9,3	81,5	7,0	2,2	12,3
Galactose	8,1	82,1	7,5	2,3	10,7
Lactobiose	6,8	83,6	7,5	2,1	9,0
Frutose	4,8	85,6	7,4	2,2	6,4
Pinone	3,3	86,8	7,5	2,4	4,4
Libiose	3,2	87,4	7,2	2,2	4,2
Sorbose	2,4	88,2	7,2	2,2	3,2
Manose	2,2	88,3	7,2	2,0	2,9
Galactose	1,3	88,9	7,3	2,5	1,7
Xilose	0,4	89,9	7,5	2,2	0,5
Receptor	-	90,6	7,3	2,1	-

em relação ao valor máximo obtido pela maltose.

Neste estudo, a razão molar de receptor/sacarose foi 1:1 para todos os receptores. A maltose foi o receptor mais eficiente, sendo que 75,5% dos grupos D-glicosil da sacarose foram adicionados à maltose para formação de oligossacarídeos e graus de polimerização (d.p.) de 3 a 8.

Na síntese de dextrana obtida pela reação de dextrana-sacarase de B-512F com sacarose, a leucrose (O- α -D-glicopiranosil-(1-5)-D-frutopiranoose) e isomaltulose (O- α -D-glicopiranosil-(1-6)-D-frutofuranose) são sempre observados como produtos em menor quantidade. Eles são obtidos da reação da D-frutose liberada com grupo D-glicosil.

PAUL e colaboradores (28) verificaram o efeito da maltose na cinética da reação. Em presença de maltose, a velocidade máxima (V_{max}) da reação foi 3 vezes maior e a constante aparente de Michaelis (K_m) aumentou de 12 mM a 163 mM quando a concentração do receptor passou de 0 a 568 mM (figura 5). Este aumento da velocidade pode ser explicado pela alteração da etapa limitante.

De fato, durante a síntese de dextrana, a etapa limitante é a transferência da cadeia em crescimento de um sítio a outro da enzima. Para a reação com receptor, esta etapa tem menor importância, sendo que o rompimento da ligação α -1-2 passa a ser a etapa limitante.

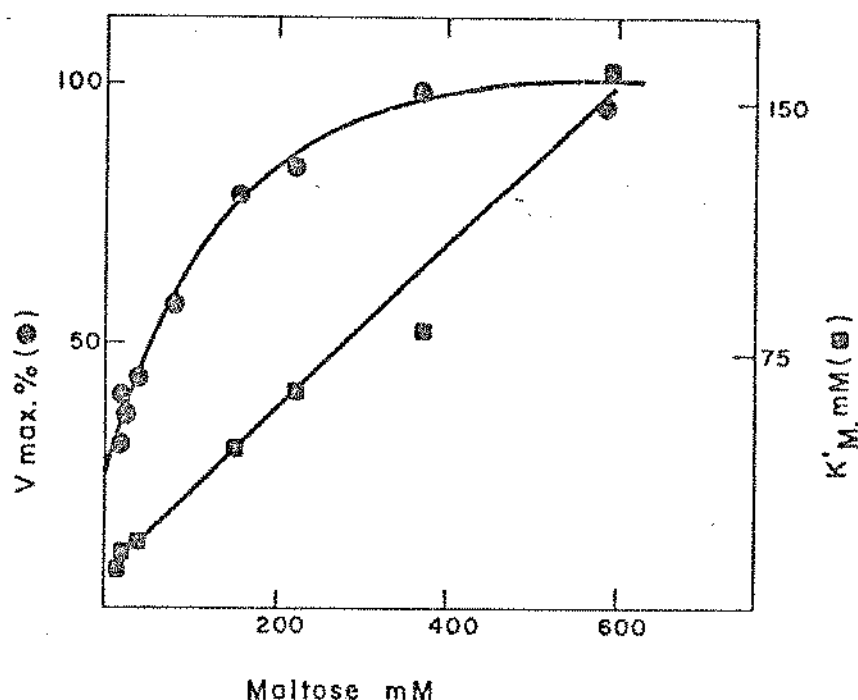


Figura 5. Variação de V_{max} e K_m em função da concentração da maltose como receptor.

2.7- Glicosilação de Polissacarídeos usando a enzima dextrana-sacarase no meio reacional.

O interesse de modificar as propriedades físico-químicas de polissacarídeos via enzimática é cada vez maior, pois são mais facilmente conduzidas e menos drásticas que a metodologias químicas utilizadas. A enzima dextrana-sacarase mostrou possuir um potencial de glicosilação em uma grande variedade de receptores. Assim, alguns pesquisadores têm usado esta enzima em ensaios de glicosilação de proteínas e de outros oligossacarídeos que não foram estudados no trabalho de ROBYT (36).

BESSIERE (4) investigou o potencial de glicosilação da dextrana-sacarase em receptores protéicos (β -galactosidase). Nes-

te caso a glicosilação tinha como objetivo melhorar a estabilização e conservação da proteína, aumentar a solubilidade e estabilidade térmica. Foi usada a metodologia de cintilação líquida para detectar a incorporação de glicose radioativa na β -galactosidade. A separação da dextrana-sacarase e β -galactosidade foi feita por resina de troca iônica. A interpretação dos resultados ficou muito difícil pois as duas enzimas possuem pontos isoelétricos muito próximos. O autor considera que outras enzimas como ribonuclease bovina, mais fácil de separar da dextrana-sacarase, devem ser testadas no estudo da glicosilação.

Outro trabalho de glicosilação utilizando a enzima dextrana-sacarase para modificações em polissacarídeos, foi realizado por TAILLANDER (40) no INSA-Toulouse. Neste caso, a pesquisadora também teve problemas de metodologia para a detecção da adição de glicose. Em seu trabalho, foi usado cromatografia de permeação em gel (GPC), determinando-se o tempo de reação e massa molar dos oligossacarídeos. O princípio do método baseava-se na hipótese de que a massa molar do oligossacarídeo aumentaria, diminuindo seu tempo de retenção na coluna. Porém a metodologia não mostrou-se adequada e os resultados não foram conclusivos.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1- Equipamentos utilizados:

- Bomba peristáltica (baixa vazão)
Miniplus 2 - Gilson
- Coluna Pharmacia - Fine Chemicals
diâm.=1,6cm; alt.=40cm e volume=80ml
- Coletor de fração
FRAC-100, Pharmacia-Fine Chemicals
- Refratômetro diferencial
Waters Associated-R403
- Registrador
KIPP & ZONEN BD40
- Liquid Scintillation System
BECKMAN - LS1801/3801/5801
- Spectrophotometer 4050 - UV/Visível
LKB - Biochrom
Ultrospec II
- Gilford Instrument - 2600
Model - 1084X100
Serial 7499
- 7225B PLOTTER
HEWLETT - PACKARD CO
- Centrífuga refrigerada alta rotação
BECKMAN
- Ultrafiltro AMICON 8400

3.2- Substratos e Reagentes:

- Pululana PI-20 (PM=200000)
lot nº PI 307072
Hayashibara Biochemical Laboratories, INC
- Maltodextrina (PM=30000)
Sociedade Roquette - France
- Opti-fluor TM
(High flash-point liquid Scintillation cocktail for
aqueous and nonaqueous samples)
UNITED TECHNOLOGIES PACKARD
- α -amilase SIGMA (1,4- α -D glucanohydrolase) EC 3.2.11
(A. oryzae) No.A-0273
- Solução de sacarose radioativa (C14) uniformemente mar-
cada à 200 g/l
índice de radioatividade: 60 uCi/ml
AMERSHAM France
- dextranase AMANO B6081B/D 3000 U/ml
- pululanase SIGMA P2138
suspensão em (NH₄)₂SO₄ 3,2 M pH 6,0
- dextrana-sacarase produzida, purificada e liofilizada
por AURIOL (3).

3.3- Métodos Analíticos:

3.3.1- Determinação de Açúcares Totais - Método de Antrona:

Reagente: 0,2 g de antrona em 100 ml de ác. sulfúrico conc.

Curva Padrão com maltose de 0,012 a 0,12 g/l

Procedimento: 1 ml de amostra + 2 ml do reagente --> 10 min. em banho-maria a temperatura de ebulição --> resfriar e ler a 625 nm.

3.3.2- Determinação de Proteína - Método de Lowry:

Reagentes: Sol. A: 2 g de carbonato de sódio anidro + 0,02 g de tartarato duplo de sódio e potássio + 100 ml de NaOH 0,1 N

Sol. B: 0,5 g de sulfato de cobre + 2 gotas de ácido sulfúrico em 100 ml de água dest.

Sol. A + B: 50 ml de Sol. A + 1 ml de sol. B

Procedimento: 1 ml de amostra + 3 ml de sol. A + B

agitar e esperar 110 min.

adicionar 0,3 ml de Folin

agitar e esperar 30 min

ler a 750 nm

Curva Padrão com albumina de 20 a 200 ug/ml

3.3.3- Determinação de Atividade de Dextranase:

Curva Padrão com maltose 0,6 a 3 g/l usando o método de DNS (3,5 dinitrosalicílico)

Procedimento: 500 ul de sol. de maltose + 500 ul DNS

-> 5 min. em banho-maria a temperatura de ebulição

-> resfriar e ler a 540 nm.

Medida da Atividade de Dextranase: 450 ul de dextra

na 40000 a 10 g/l em tampão acetato 20 mM pH 5,2 +

50 ul de enzima a ser analisada) -> deixar a 37°C

durante 10 min. -> parar a reação com 500 ul de DNS

e colocar em banho-maria a temperatura de ebulição

durante 5 min. -> Ler a 540 nm

3.3.4- Determinação da Atividade de Dextrana-Sacarase:

A atividade da enzima dextrana-sacarase é determinada pela medida da frutose liberada no meio reacional. Para isso foi utilizado o método de kit enzimático da Boehringer que tem os seguintes princípios:

A glicose e frutose são fosforiladas a glicose-6-fosfato (G-6-P) e frutose-6-fosfato (F-6-P) na presença da enzima hexokinase (HK) e adenosina-5-trifosfato (ATP) (1), (2).

HK



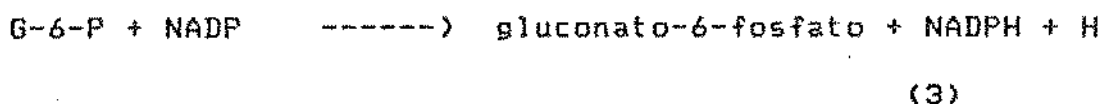
HK



Na presença da enzima glicose-6--fosfato desidrogenase (G-6-P-DH), G-6-P é oxidada pela nicotinamida-adenina-dinu-

cleotideo-fosfato (NADP) para gluconato-6-fosfato com a formação de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) (3).

G6P-DH



A quantidade de NADPH formada nesta reação é estequiometricamente igual a quantidade de glicose. NADPH é determinado pela medida de sua absorbância a 340 nm. Na conclusão da reação (3), F-6-P é convertido a G-6-P pela fosfo-glicose-isomerase (PGI) (4).

PGI



G-6-P reage com NADP formando gluconato-6-fosfato e NADPH, que é outra vez determinado. A quantidade de NADPH obtido nesta reação é estequiometricamente igual a quantidade de frutose.

Preparação do Kit Boehringer:

Sol. 1: NADPH: 69,14 mg

ATP: 173,00 mg

Tampão pH 7,6: 27 ml

Sol. 2: Hexokinase(127809): 143 μ l

G6DPH(165875): 91 μ l

Água destilada: 466 μ l

Sol. 3: PGisomerase(128139): 143 μ l

Água destilada: 557 μ l

Tampão pH 7,6: Triethanolamine: 26 g

NaOH 2 N: 25,2 ml

MgCl₂.6H₂O: 0,44 g

EDTA: 37 mg

água qsp: 250 ml

Procedimento:

Reação: 0,1 ml de dextrana-sacarase + 0,5 ml de sacarose 100 g/l (em tampão acetato 20mM pH 5,2) a 30°C.

Retirou-se alíquotas de 0,05 ml nos tempos de 0, 4, 8 e 12 min. e adicionou-se 0,5 ml da sol.1 + 1 ml de água destilada. Leu-se a absorbância a 340 nm (E₀), adicionou-se 10 μ l da sol.2 e leu-se a 340 nm (E₁) e então adicionou-se 10 μ l da sol.3 e leu-se a 340 nm (E₂).

A concentração de frutose é calculada:

$$c = \frac{V \cdot Mw}{E.d.v.1000} \cdot \Delta A_{frutose}$$

onde: $\Delta A_{frutose} = E_2 - E_1$

$$V = 1 \text{ ml de água} + 0,5 \text{ ml sol.1} + 0,05 \text{ ml amostra} + \\ 0,01 \text{ ml sol.2} + 0,01 \text{ ml sol.3} = 1,57 \text{ ml}$$

$$Mw = 180,16 \text{ g (peso molecular da frutose)}$$

$$E = 6,3 \text{ (coeficiente de absorção do NADPH a 340 nm)}$$

$$d = 1 \text{ cm (comprimento ótico da cubeta)}$$

$$v = 0,05 \text{ ml (volume de amostra)}$$

$$\text{então: } c \text{ (g/l)} = \frac{5,657}{6,3} \cdot \Delta A_{\text{frutose}}$$

Assim o cálculo de atividade da dextrana-sacarase em 0,6 ml de reação é:

$$\text{Atividade (U/ml)} = \frac{5,657}{6,3} \cdot \frac{\Delta A_{\text{frutose}}}{\Delta t} \cdot \frac{1}{180,16} \cdot \frac{0,6 \cdot 10^6}{0,1 \cdot 1000}$$

$$\text{Atividade (U/ml)} = 29,9 \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

Obs: - $\Delta A / \Delta t$ = coeficiente angular do gráfico de $(E_2 - E_1) \times t$

- 1 UDS = 1 mg sacarose consumida que libera 0,526 mg frutose/h ou 0,0487 $\mu\text{mol/min}$

- 1 U = 1 $\mu\text{mol/min}$ de açúcar redutor liberado

- 1 U = 20,52 UDS

3.3.5- Determinação da glicosilação nos polissacarídeos pelo método de cintilação radioativa:

O procedimento para utilização desta metodologia é bastante simples, exigindo apenas cuidados quanto à contaminação pessoal e do ambiente.

As análises de determinação de radioatividade eram feitas imediatamente após a coleta das frações obtidas na coluna de cromatografia, e consistia em misturar 1 ml da fração (amostra) + 5 ml da mistura opti-fluor em um tubo apropriado. Agitava-se bem e colocava-se no aparelho para medição de radioatividade. Os tubos eram descartados na lixeira radioativa.

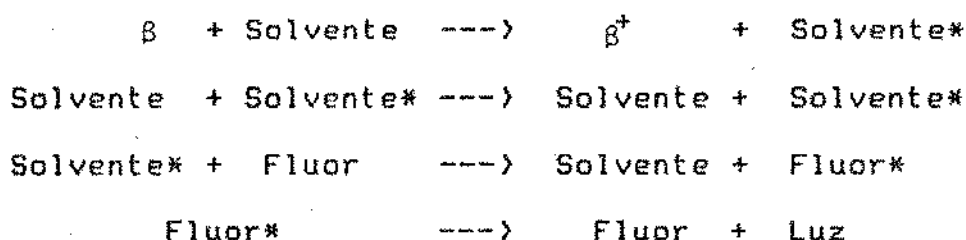
A cintilação líquida envolve a detecção e contagem do decaimento da radioatividade. A amostra radioativa para ser analisada é colocada em contato com a "mistura de cintilação", a qual contém um solvente, um emulsificador e fluor. Esta mistura converte a energia da partícula emitida durante o processo de decaimento de radioatividade em luz, a qual é detectada pelo aparelho. A luz é o resultado das seguintes interações:

- parte da energia da partícula carregada emitida (emissão β para o caso de C^{14}) pelo processo de decaimento da radioatividade é absorvida pela molécula do solvente tornando-as excitadas.

- a energia de excitação é transferida para outras moléculas do solvente e posteriormente transferida para a molécula

la de fluor tornando-a excitada.

- as moléculas de fluor excitadas retornam ao estado inicial pela emissão de luz. A luz é então dirigida à célula fotoelétrica a qual é convertida em pulso (ou "count") elétrico mensurável.



O aparelho é programado de tal forma que os resultados obtidos são expressos na forma de CPM ("count per minute") para cada amostra e CPMC que é o valor acumulado do CPM. O programa usado é chamado USER 1 e fornece uma tabela com os valores de CPM e CPMC e mais uma figura que grafica os valores de radioatividade em porcentagem versus as amostras (frações) facilitando a visualização do resultado obtido.

3.3.6- Enzima utilizada:

a - Obtenção da enzima:

As condições de cultura como determinação de meio, pH e temperaturas ótimos para a produção de dextrana-sacarase foi estudada por Auriol (3). Neste trabalho partiu-se da enzima purificada na forma liofilizada, obtida por Auriol.

b - Preparação da enzima:

Para deixá-la em solução, a enzima liofilizada foi tratada da seguinte maneira:

3 g da enzima dextrana-sacarase liofilizada + 100 ml de tampão acetato 20 mM pH 5,2 com azida de sódio 0,02% + 60 U dextranase (20 U dextranase/g de enzima) ---> agitação em becker a temperatura de 40°C durante 24 horas. Colocou-se a solução enzimática em saco de diálise (Dialysier Schlauch - Servapor # 44146, diâ. 29 mm) e deixou-se num becker contendo 5 l de tampão acetato 20 mM (+ 0,02% de azida de sódio) em agitação durante 24h a 40°C. Com os 108 ml de sol. enzimática obtidos após a diálise foi feita uma ultrafiltração para retirar a enzima dextranase utilizando o aparelho AMICON 8400 (capacidade 350 ml) com uma membrana DIAFLO ULTRA FILTERS YM 100.

Em alíquotas da solução enzimática final fez-se a determinação das seguintes características:

- atividade de dextranase: não detectado
- determinação de açúcar total: $1,3 \cdot 10^{-2}$ g/g enzima liofilizada
- determinação de proteína: 61,7 mg/g enzima liofilizada
- atividade de dextrana-sacarase: 100U/g enzima liofilizada ou 1,62 U/mg proteína

c - Determinação do tempo de reação necessário para produção de dextrana:

Para a determinação do tempo necessário de reação, levou-se em consideração o tempo necessário para inversão de 80% da sacarose, determinando a liberação de frutose. Assim sendo, colocou-se a enzima para reagir na ausência e presença de maltodextrina e pululana a fim de verificar se os polissacarídeos influenciavam na atividade da enzima. Em um tubo de ensaio, adicionou-se 0,1 ml de enzima preparada como descrito em 3.3.6b, 0,3 ml de solução de sacarose 100 g/l e 0,6 ml de tampão acetato 20 mM. Colocou-se em um banho-maria a 30°C e retirou-se alíquotas em intervalos de tempo para quantificar a frutose liberada usando o Kit Boehringer. Paralelamente foram feitas mais 2 reações como acima descrito, usando-se pululana e maltodextrina dissolvidas em tampão acetato 20 mM.

3.3.7- Polissacarídeos Utilizados:

A maltodextrina e pululana foram os polissacarídeos (receptores) escolhidos para o estudo da glicosilação. Esta escolha foi feita baseada nos trabalhos realizados por ROBYT (36) quanto ao comportamento da dextrana-sacarase na presença de receptores.

A maltose ainda é o melhor receptor conhecido apresentando ligações α -(1-4). Sendo assim, a maltodextrina que tem ligações α -(1-4) e ramificações α -(1-6) poderia ser reconhecida pela dextrana-sacarase (Figura 6).

A maltodextrina foi fornecida pela sociedade Roquette. Ela é o resultado da hidrólise parcial do amido, solúvel em água com uma massa molar média de aproximadamente 30.000.

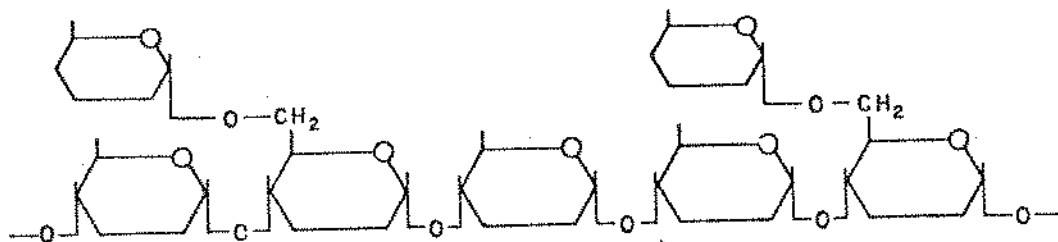


Figura 6: Estrutura de Maltodextrina.

Outro polissacarídeo usado nos experimentos foi a pululana que é constituído de unidades de maltotriose (α -(1-4)) unidas por ligações α -(1-6) (Figura 7). A pululana foi fornecida pela Hayashibara Company (Okayama, Japão). São polissacarídeos solúveis em água produzidos por fermentação do amido usando o microrganismo *Aureobasidium pullulans*. A pululana utilizada nos experimentos foi a PF-20 com massa molar de 200.000.

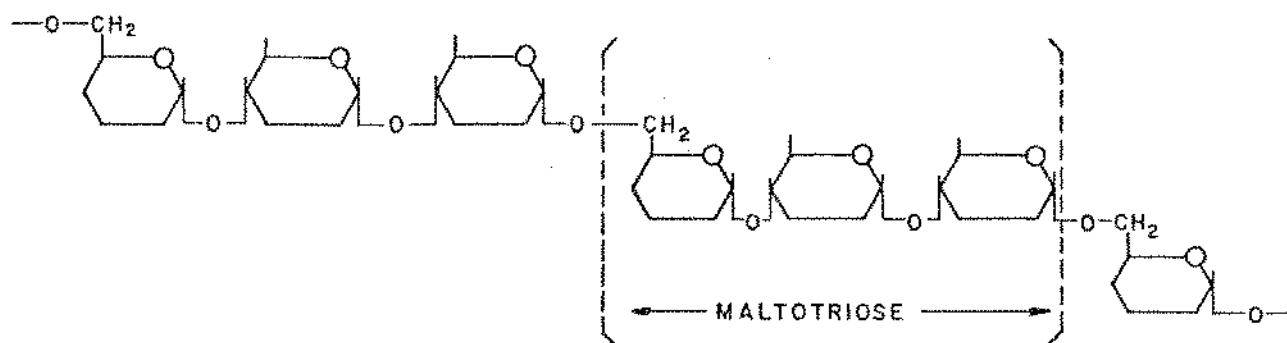


Figura 7: Estrutura da pululana.

3.3.8- Preparação da coluna:

A coluna utilizada nos experimentos foi da Pharmacia-Fine Chemicals e o gel escolhido para o empacotamento da coluna foi Bio-Gel P-2 (200-400 Mesh), de poliacrilamida, com uma faixa de fracionamento de 100-1800 daltons, ou seja, pretendeu-se separar pequenas moléculas (frutose, glicose e sacarose) das grandes moléculas com peso molecular acima de 1800 daltons (dextransa, maltodextrina, pululana e a própria enzima dextransa-sacarase).

O procedimento para a hidratação do gel foi o seguinte:

- 24 g de gel seco em 240 ml de tampão acetato 20 mM pH 5,2 com a finalidade de se obter aproximadamente 80ml do gel hidratado já que a relação volume hidratado/g de gel seco = 3,5 segundo catálogo da Bio-Gel.
- deixa-se decantar por 4 horas
- dispensa-se metade do volume do sobrenadante
- coloca-se o gel hidratado na coluna
- deixa-se decantar

- fecha-se a coluna e passa-se tampão acetato até estabilização da mesma

Obs: Sempre que foi necessário parar a utilização da coluna por um determinado período passou-se na coluna o tampão + 0,02% de azida de sódio que age como bactericida prevenindo assim o gel de contaminação.

3.3.9- Metodologia de separação e detecção dos produtos obtidos na reação enzimática:

Injetava-se uma alíquota de 0,5 ml de amostra reagida na coluna, com o auxílio de uma bomba peristáltica, na vazão constante de 20 ml/h, utilizando-se como líquido inerte tampão acetato 20 mM pH 5,2. A amostra, com um tempo de retenção em torno de 4 horas, ao sair da coluna passava por um refratômetro cuja leitura era registrada numa velocidade de 0,5 mm/min. Na saída do refratômetro as frações eram coletadas por um coletor de amostras automático por um período de 200 minutos que correspondia ao tempo de residência da amostra na coluna. Cada amostra correspondia a 10 minutos de operação, tendo-se 20 frações ao todo, que eram preparadas para análise de radioatividade, sendo submetidas ao aparelho de cintilação radioativa.

A figura 8 apresenta o conjunto de equipamentos utilizados (coluna de cromatografia, refratômetro, coletor de frações e o registrador).



Figura 8: Equipamentos usados nos experimentos: 1- bomba peristáltica, 2- coluna cromatográfica, 3- refratômetro, 4- coletor de frações, 5- registrador.

3.4- Metodologia usada nos ensaios de glicosilação de malto-dextrina e pululana:

3.4.1- Determinação do tempo de retenção na coluna das moléculas de alto e baixo peso molecular:

Primeiramente foram feitos vários ensaios para determinar as condições de operação e fixar alguns parâmetros como: velocidade da carta no registrador e atenuação da sensibilidade no refratômetro. Fixamos então a velocidade da carta em 0,5 mm/min e atenuação na faixa de 8 a 64, dependendo da concentração do pro-

duto.

Assim, com estes parâmetros fixados foram feitos experimentos com a finalidade de determinar o tempo de retenção de moléculas de alto peso molecular (dextrana, maltodextrina, pululana e a própria enzima dextrana-sacarase) e das moléculas de baixo peso molecular (glicose, frutose e sacarose).

3.4.2- Preparo das amostras para leitura de radioatividade:

O método adotado consistiu em fazer passar a amostra pela coluna, coletar as frações correspondentes às moléculas de alto peso molecular e fazê-las reagir com amilase (no caso da maltodextrina) e pululanase (para a reação com pululana) uma vez que essas enzimas não hidrolisam a dextrana. Passava-se novamente na coluna e media-se a radioatividade nas frações correspondentes às pequenas moléculas.

3.4.3 - Ensaio com a maltodextrina:

Reagiu-se a maltodextrina, sacarose radioativa e a enzima dextrana-sacarase a 30°C durante 3,5 h. Passou-se a solução reagida na coluna e coletou-se as frações 7,8,9 e 10 onde existia maior concentração de moléculas de alto peso molecular e ausência de pequenas moléculas. Evitou-se desta forma a presença de glicose, frutose ou sacarose que poderiam mascarar o resultado, interferindo na radioatividade após a hidrólise da maltodextrina. Reagiu-se o material coletado com α -amilase, hidrolisando a malto-

dextrina. A solução resultante foi depositada na coluna, coletou-se as frações e então determinou-se a radioatividade das mesmas. Um pico de radioatividade no tempo de retenção de pequenas moléculas implicaria em glicosilação na maltodextrina.

Para todas as reações, foi feito paralelamente uma reação padrão sem maltodextrina, usando-se em seu lugar tampão acetato 20 mM.

Na coluna foi injetado 0,5 ml de amostra e coletado em torno de 60 ml que correspondendo a 20 frações num período de aproximadamente 3 horas. Tinha-se conseqüentemente uma diluição da radioatividade nas frações 7,8,9 e 10. A mistura das frações 7 e 8 foram concentradas no Rotavapor e no microconcentrador AMICON para melhor resolução dos picos de radioatividade.

A seguir estão representadas as etapas dos experimentos com a maltodextrina através das figuras 9a, 9b e 9c.

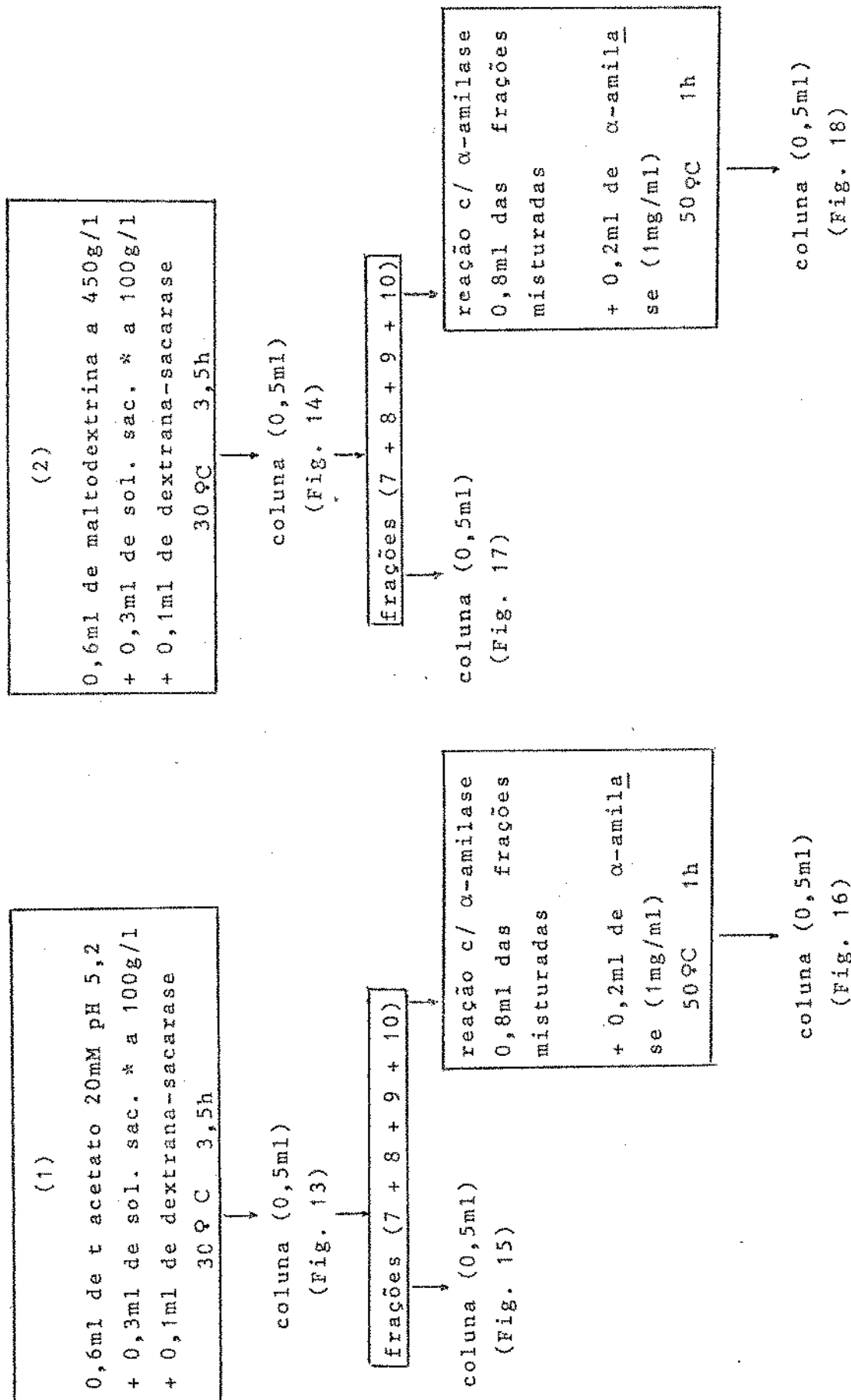


Figura 9a: Fluxograma das etapas realizadas na preparação de amostras para leitura no contador de radioatividade a partir de reações sem (1) e com (2) maltodextrina, sem a concentração das frações 7, 8, 9 e 10.

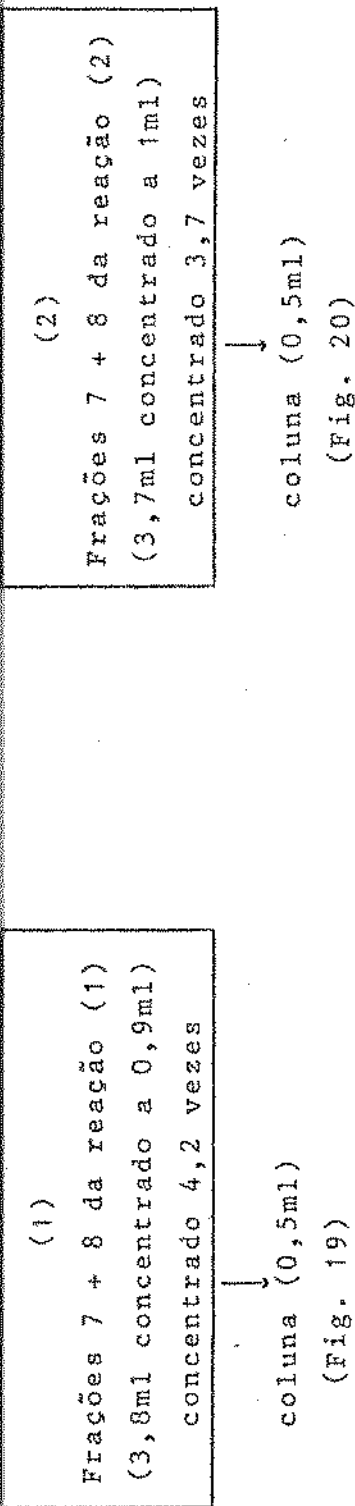


Figura 9b: Preparo das amostras para leitura no contador de radioatividade a partir de reações sem (1) e com (2) maltodextrina, concentrando as frações 7 + 8 no ROTOVAPOR

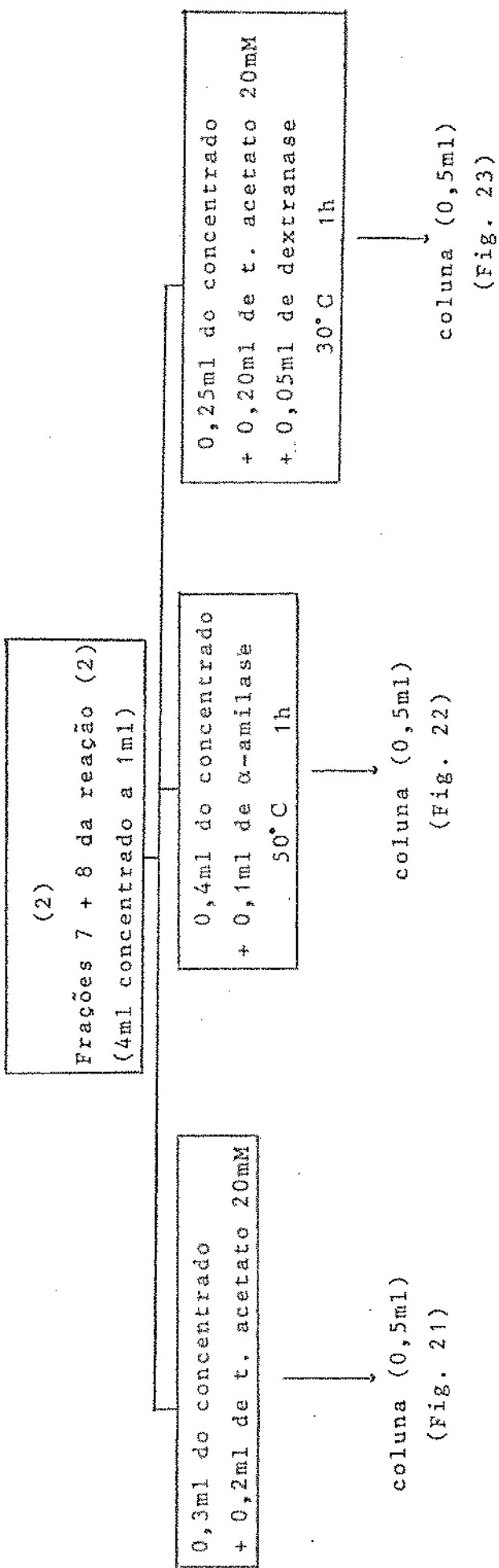


Figura 9c: Preparo das amostras para leitura no contador de radioatividade, a partir da reação com maltodextrina (2), concentrando as frações 7 + 8 no microconcentrador AMICON.

3.8.4 - Ensaios com a pululana:

Como foi verificado que a concentração das frações no microconcentrador AMICON fornecia melhores resultados do que no rotavapor, adotamos esta metodologia nos ensaios com a pululana. Para se certificar dos resultados obtidos, utilizou-se também, o método de diálise com a finalidade de eliminar as moléculas de baixo peso molecular e comparar os resultados obtidos por 2 métodos distintos. Para facilitar a compreensão, nas figuras 10a e 10b estão resumidas as várias etapas realizadas nos experimentos.

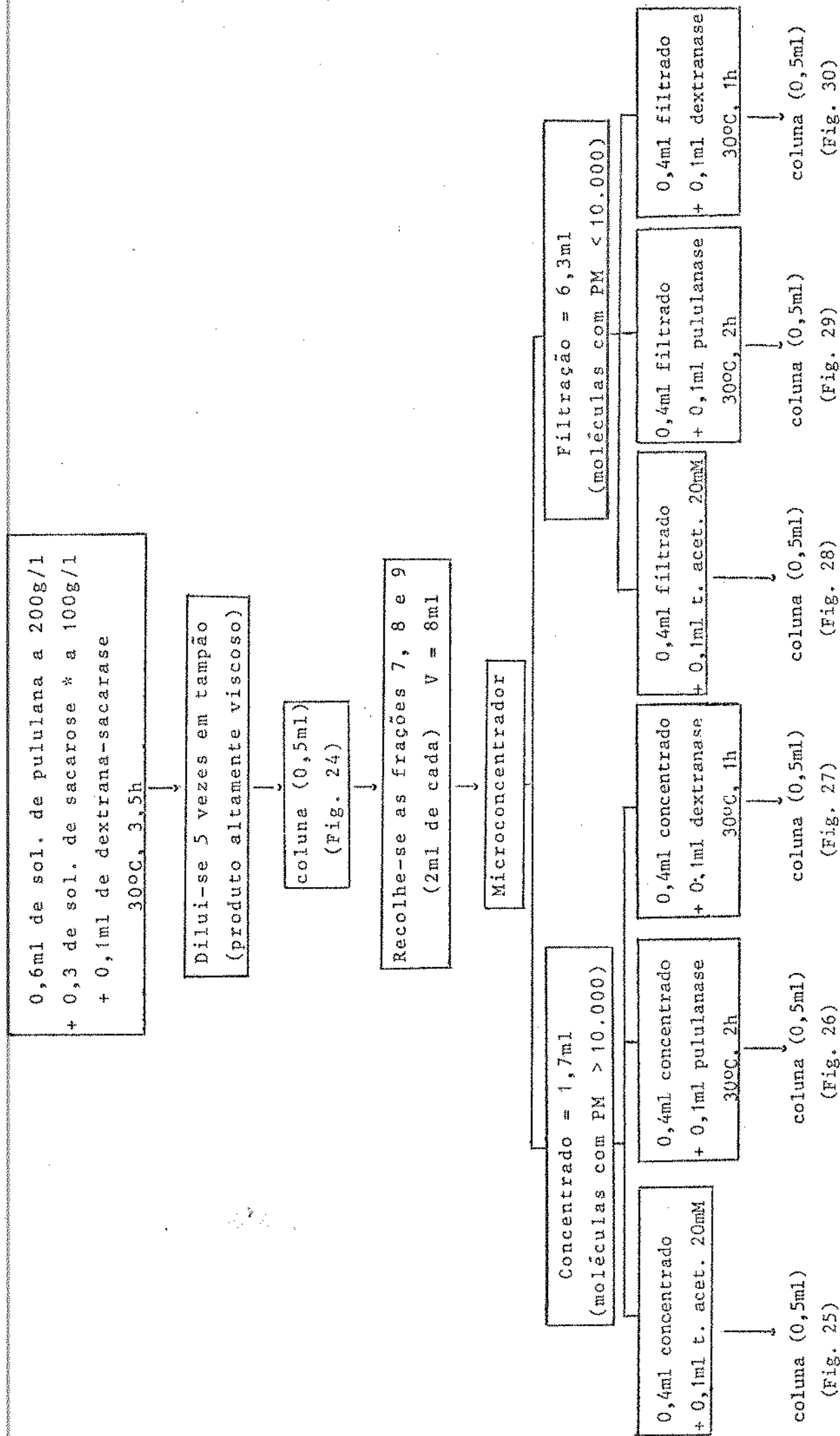


Figura 10a: Fluxograma das etapas realizadas na preparação de amostras para leitura no contador de radioatividade a partir da reação com pululana, concentrando as frações 7, 8 e 9 no microconcentrador AMICON.

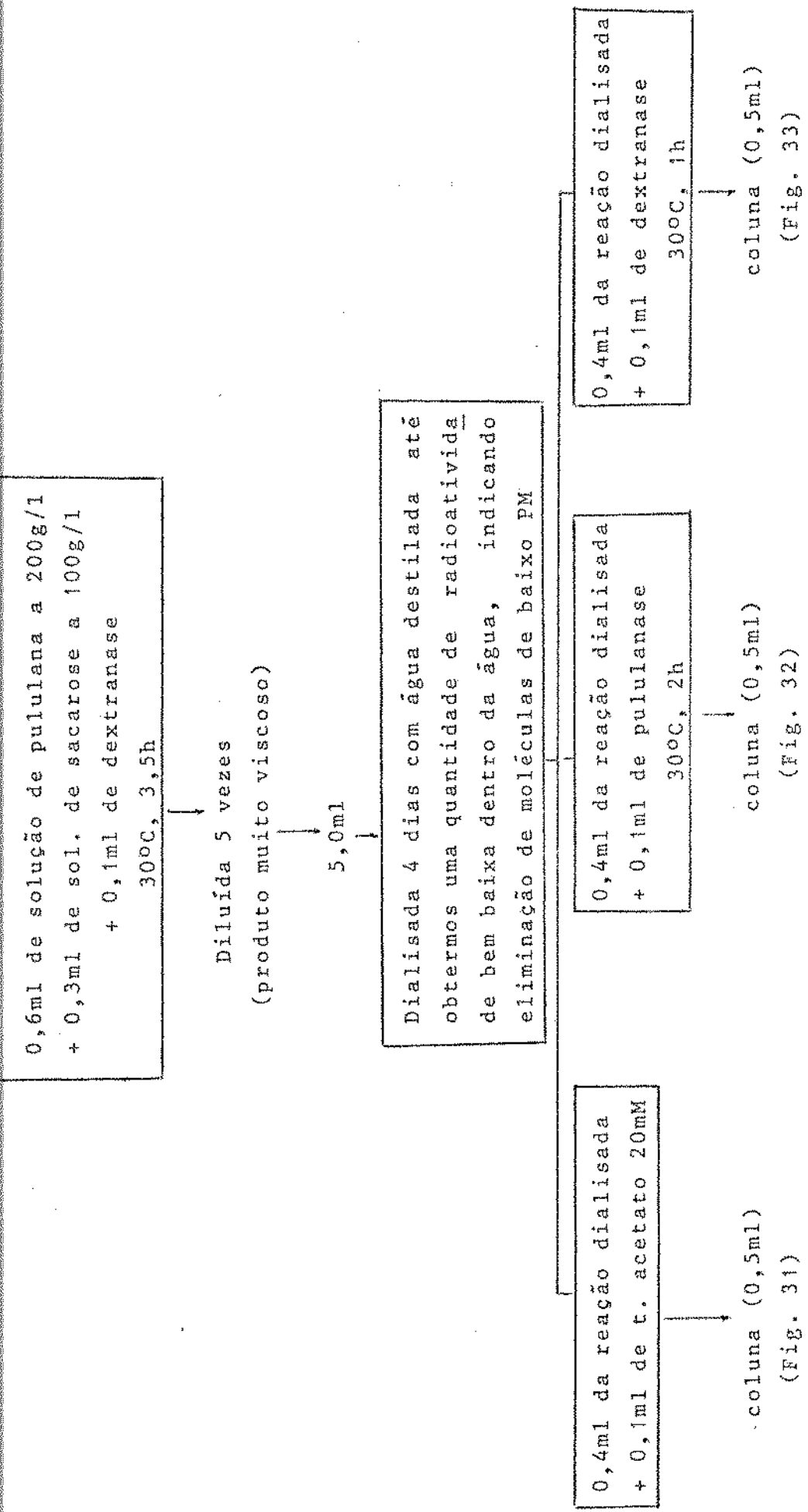


Figura 10b: Fluxograma das etapas realizadas na preparação de amostras para leitura de radioatividade de a partir da reação com pululana usando o método de diálise para eliminar as moléculas de baixo peso molecular.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1- Determinação do tempo de reação necessário para a produção de dextrana:

Verificou-se que o tempo necessário para a síntese de dextrana, com e sem os polissacarídeos, não sofreu alteração. Um tempo igual a 3,5 h é suficiente para a taxa de síntese desejada. A figura 11 mostra que a velocidade de reação é praticamente a mesma para as 3 reações. A velocidade máxima obtida foi igual a 2,88 Ui ou 59 UDS.

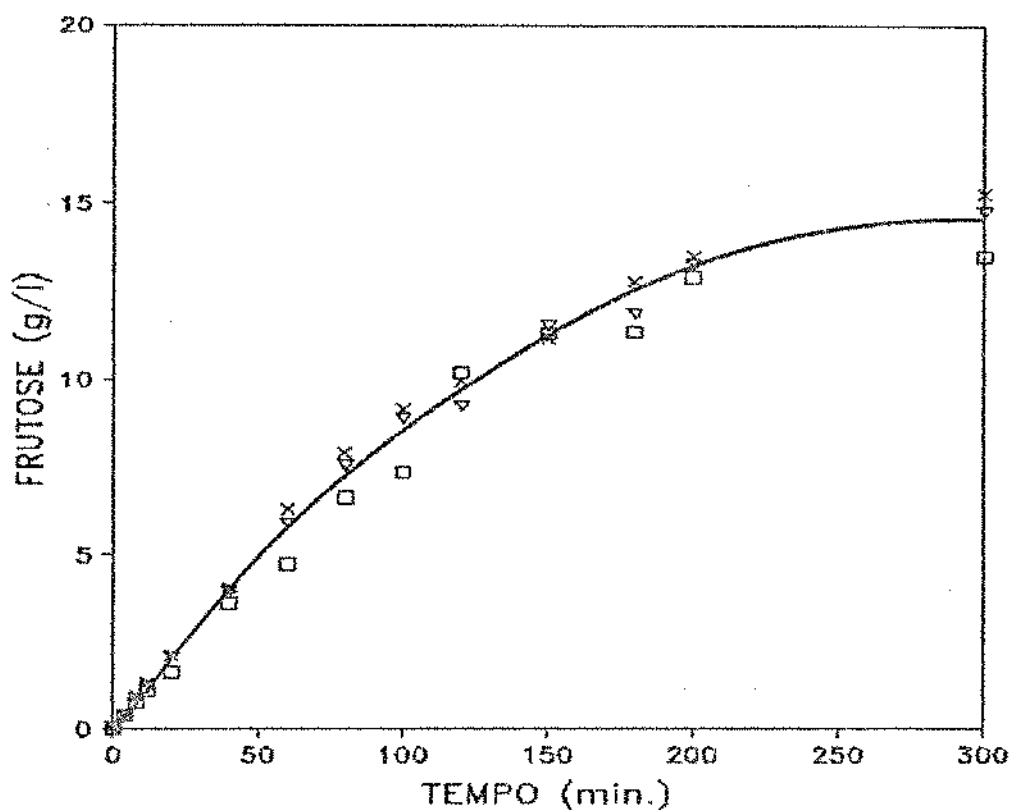


Figura 11: Evolução da reação de síntese da dextrana (□) sem "acceptor", (x) com maltodextrina e (▽) com pululana.

4.2- Determinação do tempo de retenção na coluna das moléculas de alto e baixo peso molecular:

Passou-se pela coluna, amostra contendo solução de sacarose, frutose e glicose nas concentrações de 5 g/l diluídas em tampão acetato 20mM pH 5,2. O tempo de retenção foi igual a 2,3 h para estas moléculas com peso molecular abaixo de 1800 daltons (Figura 12a).

Para moléculas de alto peso molecular obteve-se um tempo de retenção equivalente a 1,1 h como pode ser observado nas figuras 12b (maltodextrina + frutose), 12c (pululana + frutose) e 12d (dextrana + sacarose + frutose). Desta forma fica evidenciado que não foi possível separar as grandes moléculas (dextrana, maltodextrina e pululana) na coluna utilizada. Assim sendo, métodos complementares foram utilizados para se detectar a glicosilação, como esquematizado nas figuras 9 e 10. O uso das enzimas amilase e pululanase foi necessário a fim de reduzir o tamanho dos respectivos substratos, que permitiu separá-los dos outros polímeros, principalmente dextrana, e das próprias enzimas.

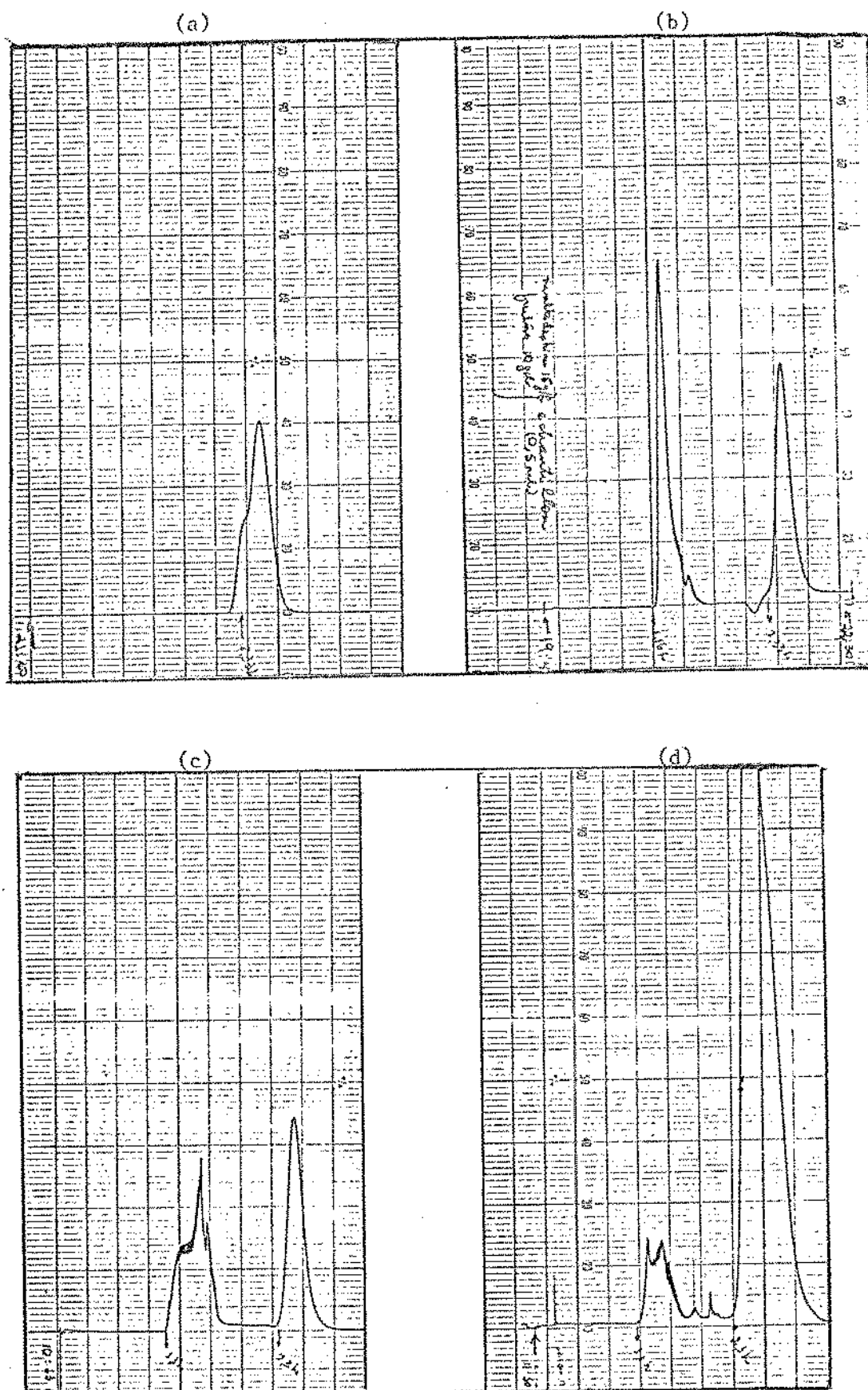


Figura 12: Determinação do tempo de retenção de: (a) sacarose + frutose + glicose; (b) maltodextrina + frutose; (c) pululana + frutose; (d) dextrana + sacarose + frutose

4.3- Resultados obtidos nos ensaios com maltodextrina:

Os resultados serão apresentados da seguinte forma: para cada cromatografia realizada apresentamos a figura correspondente ao cromatograma, a tabela de resultados da radioatividade para as 20 frações, medidas em CPM, e a figura correspondente à tabela.

As figuras 13a e 14a representam o cromatograma do resultado imediato após a reação sem e com maltodextrina respectivamente. A figura 13a representa os picos de grandes moléculas, com menor tempo de residência, e de pequenas moléculas, com maior tempo de residência, para a reação sem maltodextrina. A figura 14a representa os picos de pequenas e grandes moléculas na reação com maltodextrina. As figuras 13b e 14b representam a radioatividade das 20 amostras coletadas. Nota-se na figura 13b que a radioatividade correspondente ao pico de grandes moléculas (dextrana radioativa), perfaz um total de 40% da radioatividade total, enquanto que os restantes 60% correspondem ao pico de pequenas moléculas. Já na figura 14b nota-se que ocorre uma pequena variação nas porcentagens, ficando 34% para o pico de grandes moléculas (dextrana radioativa e eventualmente maltodextrina glicosilada) e 66% para o de pequenas moléculas. Isto pode significar que houve uma menor transformação do substrato em dextrana, na presença de maltodextrina.

As tabelas 3 e 4 representam os valores da radioatividade medida em CPM, para cada fração coletada na saída da coluna, respectivamente das reações sem e com maltodextrina. Pode-se constatar na tabela 3 que os maiores valores de radioatividade

estão nas frações 7, 8, 9 e 10, correspondendo aos picos de grandes moléculas, e 13, 14, 15 e 16, correspondentes as pequenas moléculas. O mesmo é observado na tabela 4. No entanto é relevante observar a atividade presente nas frações intermediárias, 11, 12 e 13, demonstrando a presença de moléculas de peso molecular médio sintetizadas na reação.

As figuras 15 e 16 correspondem a aplicação na coluna de 0,5 ml da mistura das frações 7, 8, 9 e 10 da reação sem maltodextrina. A figura 15 é o resultado direto da mistura e a figura 16 resultado da mistura submetida a um tratamento com α -amilase, como descrito na figura 9a. Nota-se nas figuras 15a e 16a que a altura dos picos é pequena, resultado da diluição ocorrida no processo. Porém constata-se que a α -amilase não age na dextrana formada, pois os picos de radioatividade são praticamente idênticos, como podemos observar nas figuras 15b e 16b e nas tabelas 5 e 6. Assim sendo, fez-se reagir α -amilase com uma alíquota da mistura das frações 7, 8, 9 e 10 da reação com maltodextrina e aplicou-se novamente na coluna. Tomou-se o cuidado de aplicar uma alíquota da mesma reação, sem ter sido tratada com α -amilase.

As figuras 17 e 18 correspondem ao processo descrito no parágrafo precedente. Comparando-se as figuras 17a e 18a, verifica-se que houve hidrólise da maltodextrina pela ação da α -amilase, porém os picos de radioatividade permaneceram praticamente idênticos, como demonstra as figuras 17b e 18b e nas tabelas 7 e 8.

A conclusão preliminar que se pode tirar destes resultados é que a dextrana-sacarase não promoveu a glicosilação esperada. Entretanto, dada a diluição ocorrida no processo de cromatografia

de permeação em gel, o que poderia mascarar algum resultado positivo, procedeu-se a concentração das misturas das amostras 7 e 8 (onde se encontra a maior parte da maltodextrina), em Rotavapor e através do microconcentrador AMICON, como descrito na figura 9b.

A amostra obtida após concentração no Rotavapor foi novamente passada na coluna e o resultado está exposto nas figuras 19 (sem maltodextrina) e 20 (com maltodextrina). Nota-se nestas figuras (19a. e 20a) uma interferência pelo aparecimento de um 2º pico (13-14) devido à solução tampão, igualmente concentrada, sendo que os picos de radioatividade (figs. 19b e 20b) são praticamente iguais ao das figuras 15b e 16b, embora a radioatividade seja bem mais elevada neste caso (tabelas 9 e 10).

A fim de eliminar a interferência provocada pelo tampão concentrado, passou-se a usar o microconcentrador AMICON, com membrana YM10, que retém moléculas com PM acima de 10000. Os resultados estão expostos nas figuras 21, 22 e 23, para, respectivamente, a amostra concentrada, amostra concentrada tratada com α -amilase e amostra concentrada tratada com dextranase, seguindo o esquema da figura 9c. O uso da dextranase aqui, foi introduzido a fim de se verificar se o pico de radioatividade correspondente às grandes moléculas, era realmente devido à síntese de dextrana.

Nas figuras 21a e 21b verifica-se que somente o pico relativo às grandes moléculas (dextrana + maltodextrina) possui radioatividade. Quando a amostra foi tratada com α -amilase, o resultado obtido (fig. 22) demonstra que os açúcares resultantes da ação desta enzima não possuem praticamente nenhuma radioatividade. Em compensação quando a amostra foi tratada com dextranase, verifi-

ca-se na figura 23a a existência de 2 picos, porém a radioatividade deslocou-se quase inteiramente para o pico de pequenas moléculas resultantes da hidrólise da dextrana. As tabelas 11, 12 e 13 vem corroborar essas observações. Portanto, a enzima dextrana-sacarase não efetuou a glicosilação esperada na maltodextrina.

No entanto, é possível que a presença de maltodextrina na reação da enzima dextrana-sacarase com sacarose tenha provocado a formação de moléculas de menor peso molecular. As frações 11, 12 e 13 correspondem aos pesos moleculares intermediários entre os de alto peso molecular (7,9 e 10) e de baixo peso molecular (14,15 e 16). Analisando-se as figuras 13 (sem maltodextrina) e 14 (com maltodextrina) observa-se um acréscimo de 33,5% de radioatividade nas frações 11,12 e 13 quando a maltodextrina esteve presente na reação. Este aumento de radioatividade pode ser explicado pela formação de oligossacarídeos ou dextrana de baixo peso molecular, já que todo C14 é proveniente somente da sacarose.

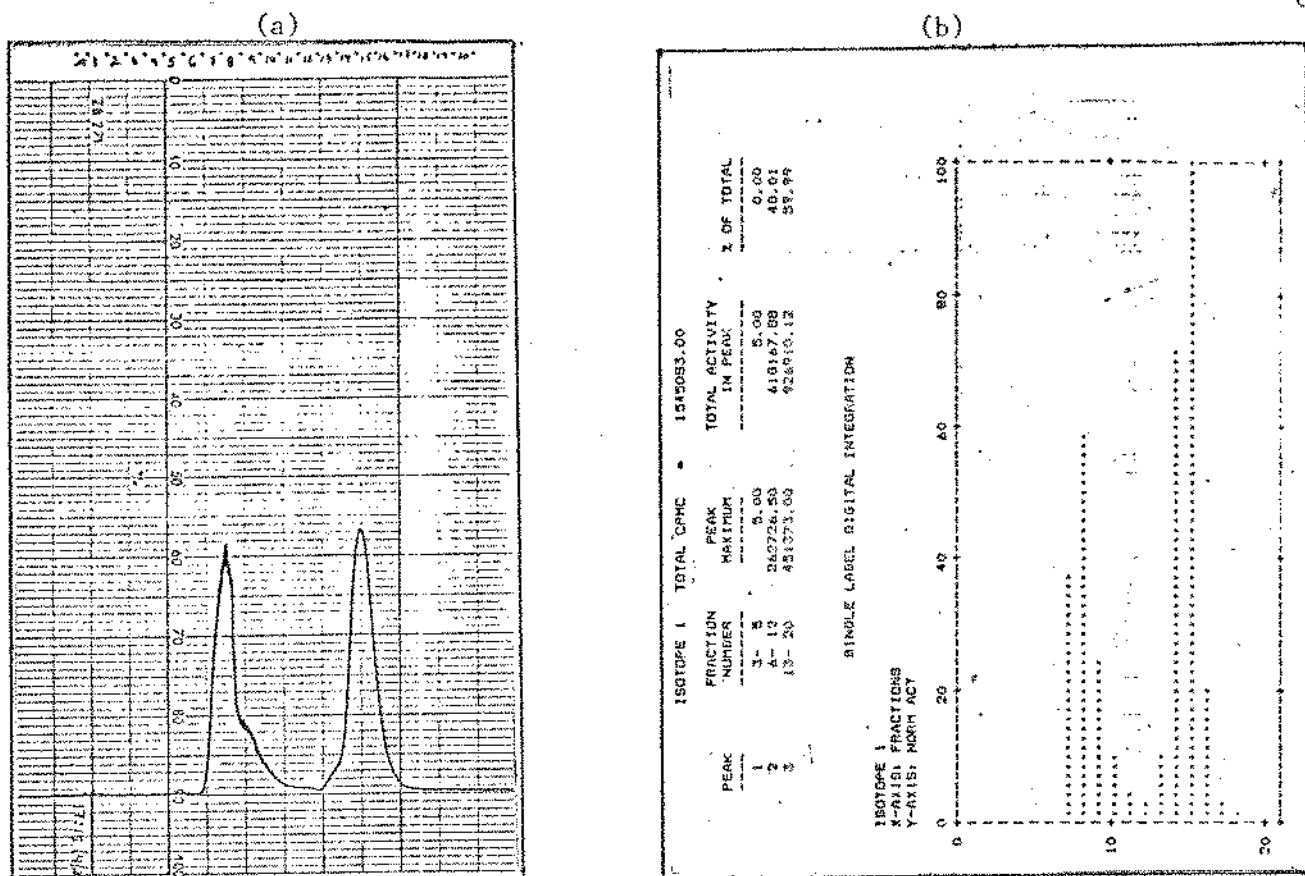


Figura 13: Resultado da reação de sacarose (C^{14}) + dextrana - sacarase. (a) cromatograma; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma.

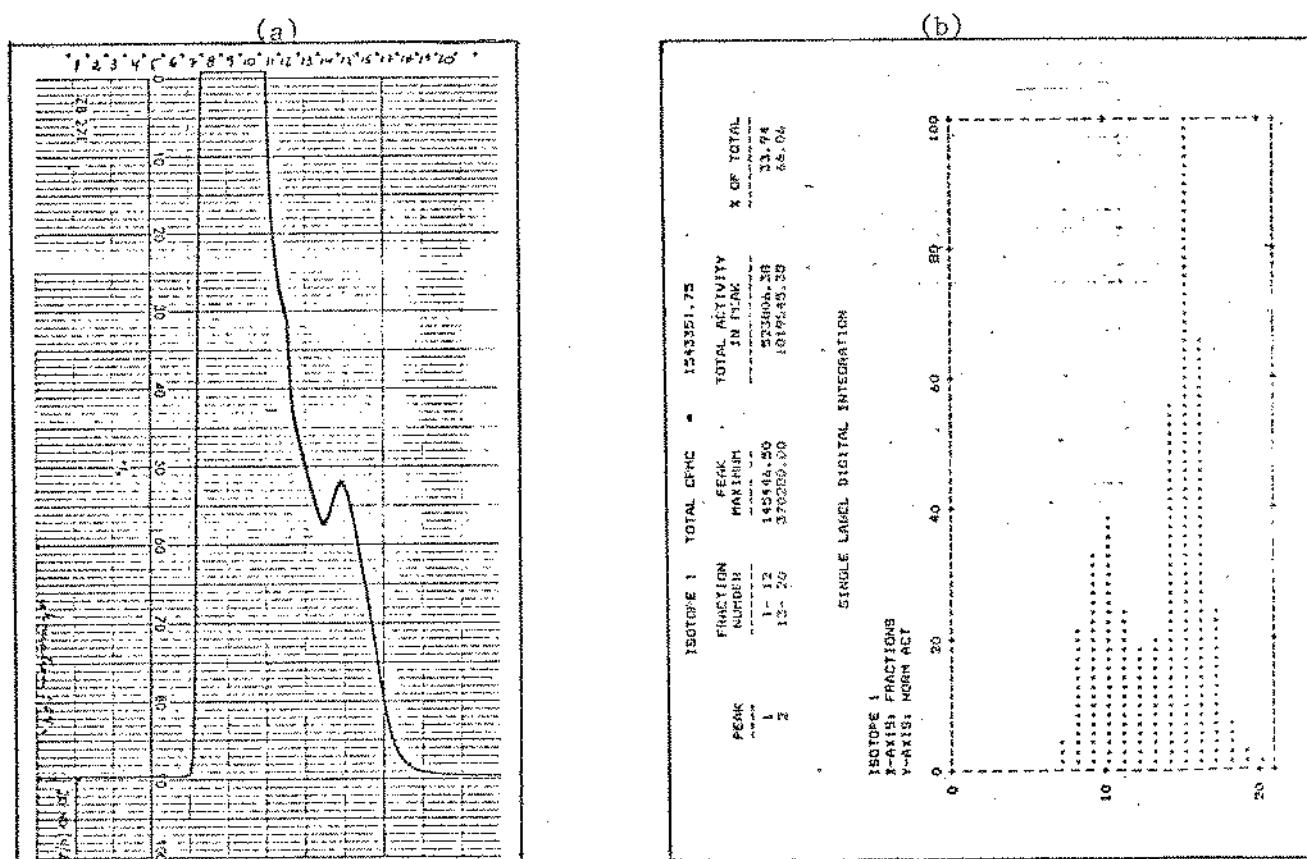


Figura 14: Resultado da reação de sacarose (C^{14}) + dextrana - sacarase + mal toidextrina: (a) cromatograma; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma.

PAGE: 1

USER: 2 10:10 PMW PRESET TIME: 1.00 MED 04 FEB 1997 21:35
SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRN R532IN
HRT: 1 R53IN DEFIN

CHANNEL 1-LL 0 UL3 470 2510M: 2.00 BKG SUB: 40.00 BKG 2810:100.00 LSR: 50

LSR-TIME: 0.10 INT:979.95

SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION

UNKNOWN ID: 1501 CPNC
UNKNOWN UNITS: 1501 CPNC
NORM FACTOR: 1501 CPNC
INTEGRAL THRESHOLD: 1501 CPNC
GRAPH X-AXIS: 1501 CPNC
Y-AXIS: 1501 CPNC
HALF LIFE(DAYS): 1501 CPNC
QUENCH RANGER LOW:131.00 HIGH:377.0
QUENCH RANGER HIGH:377.0
CONSTANT QUENCHIN LOW:131.00 HIGH:377.0
CALCULATE DPMY
QUENCH LIMITS
QUENCH CURVE COEFF
1501, CH: A1 4.401585 B1-0.0010090 C10.00000597 D1-0.0000000224

BASILINE CORRECTION

SAM	POS	CH	CPM	2510Z	TIME	EL TIME	AVG	HA	ERR
1	16	-1	1	-12.00	****	1.00	1.41	124.0	108
2	16	-2	1	-5.00	****	1.00	3.01	124.0	108
3	16	-3	1	-10.00	****	1.00	4.59	124.0	108
4	16	-4	1	-14.00	****	1.00	6.19	124.0	108
5	16	-5	1	-18.00	****	1.00	7.76	124.0	108
6	16	-6	1	-22.00	****	1.00	9.35	124.0	108
7	16	-7	1	-26.00	****	1.00	10.94	124.0	108
8	16	-8	1	-30.00	****	1.00	12.53	124.0	108
9	16	-9	1	-34.00	****	1.00	14.12	124.0	108
10	16	-10	1	-38.00	****	1.00	15.71	124.0	108
11	16	-11	1	-42.00	****	1.00	17.30	124.0	108
12	16	-12	1	-46.00	****	1.00	18.89	124.0	108
13	16	-13	1	-50.00	****	1.00	20.48	124.0	108
14	16	-14	1	-54.00	****	1.00	22.07	124.0	108
15	16	-15	1	-58.00	****	1.00	23.66	124.0	108
16	16	-16	1	-62.00	****	1.00	25.25	124.0	108
17	16	-17	1	-66.00	****	1.00	26.84	124.0	108
18	16	-18	1	-70.00	****	1.00	28.43	124.0	108
19	16	-19	1	-74.00	****	1.00	30.02	124.0	108
20	16	-20	1	-78.00	****	1.00	31.61	124.0	108

Tabela 3: Radioatividade das frações correspondentes a figura 13b.

PAGE: 1

USER: 2 10:10 PMW PRESET TIME: 1.00 MED 04 FEB 1997 21:38
SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRN R532IN
HRT: 1 R53IN DEFIN

CHANNEL 1-LL 0 UL3 470 2510M: 2.00 BKG SUB: 40.00 BKG 2810:100.00 LSR: 50

LSR-TIME: 0.10 INT:979.95

SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION

UNKNOWN ID: 1501 CPNC
UNKNOWN UNITS: 1501 CPNC
NORM FACTOR: 1501 CPNC
INTEGRAL THRESHOLD: 1501 CPNC
GRAPH X-AXIS: 1501 CPNC
Y-AXIS: 1501 CPNC
HALF LIFE(DAYS): 1501 CPNC
QUENCH RANGER LOW:131.00 HIGH:377.0
QUENCH RANGER HIGH:377.0
CONSTANT QUENCHIN LOW:131.00 HIGH:377.0
CALCULATE DPMY
QUENCH LIMITS
QUENCH CURVE COEFF
1501, CH: A1 4.401585 B1-0.0010090 C10.00000597 D1-0.0000000224

BASILINE CORRECTION

SAM	POS	CH	CPM	2510Z	TIME	EL TIME	AVG	HA	ERR
1	16	-1	1	695.00	9.49	1.00	1.42	125.0	695.00
2	16	-2	1	429.00	13.74	1.00	3.03	124.0	1124.00
3	16	-3	1	254.00	20.74	1.00	4.62	123.0	1378.00
4	16	-4	1	184.00	26.90	1.00	6.20	123.0	1584.00
5	16	-5	1	124.00	27.41	1.00	7.79	123.0	1746.00
6	16	-6	1	104.00	29.51	1.00	9.37	124.0	1912.00
7	16	-7	1	147.00	31.14	1.00	10.95	124.0	2078.00
8	16	-8	1	187.00	32.77	1.00	12.54	125.0	2244.00
9	16	-9	1	227.00	34.40	1.00	14.13	125.0	2410.00
10	16	-10	1	267.00	36.03	1.00	15.72	125.0	2576.00
11	16	-11	1	307.00	37.66	1.00	17.31	125.0	2742.00
12	16	-12	1	347.00	39.29	1.00	18.90	125.0	2908.00
13	16	-13	1	387.00	40.92	1.00	20.49	125.0	3074.00
14	16	-14	1	427.00	42.55	1.00	22.08	125.0	3240.00
15	16	-15	1	467.00	44.18	1.00	23.67	125.0	3406.00
16	16	-16	1	507.00	45.81	1.00	25.26	125.0	3572.00
17	16	-17	1	547.00	47.44	1.00	26.85	125.0	3738.00
18	16	-18	1	587.00	49.07	1.00	28.44	125.0	3904.00
19	16	-19	1	627.00	50.70	1.00	30.03	125.0	4070.00
20	16	-20	1	667.00	52.33	1.00	31.62	125.0	4236.00

Tabela 4: Radioatividade das frações correspondentes a figura 14b.

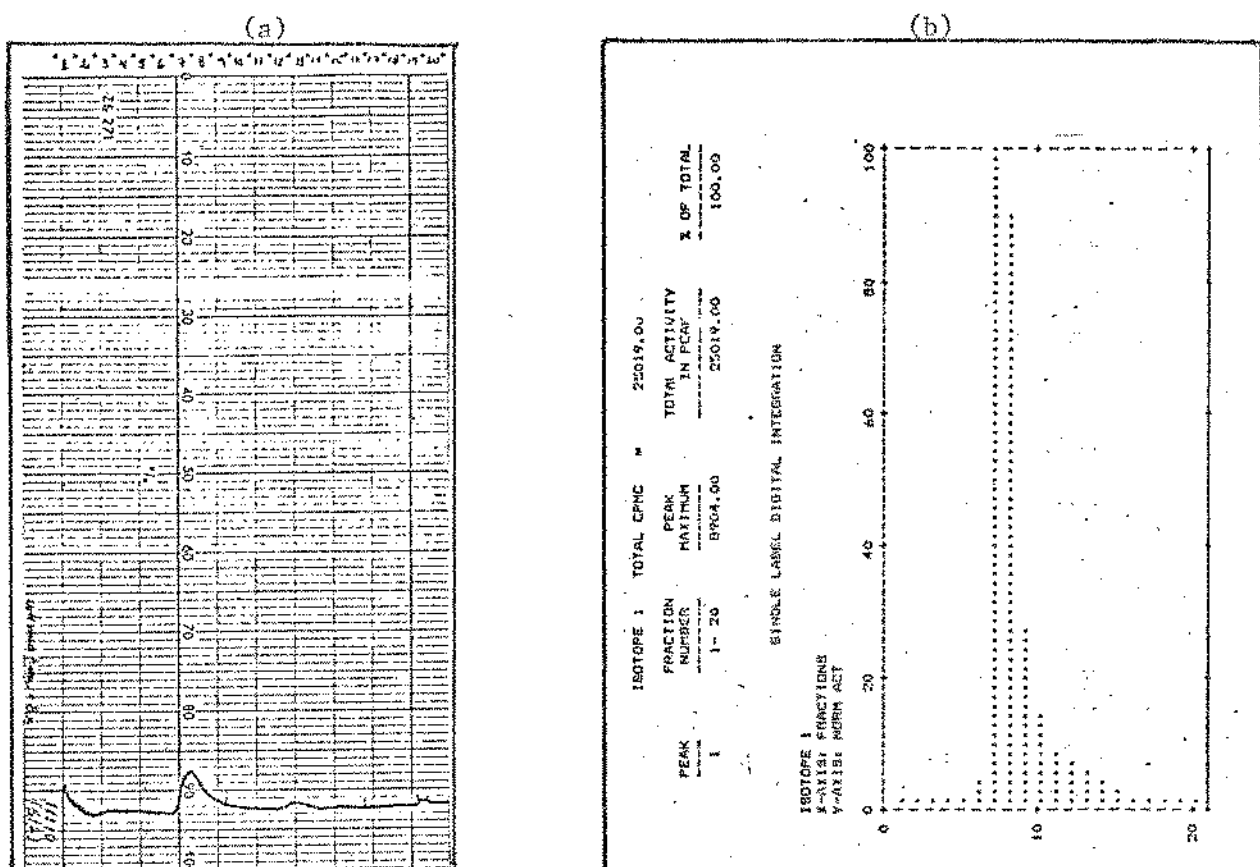


Figura 15: (a) cromatograma das frações (7+8+9+10) correspondente a fig.13 (s/ maltodextrina); (b) radioatividade correspondente ao cromatograma.

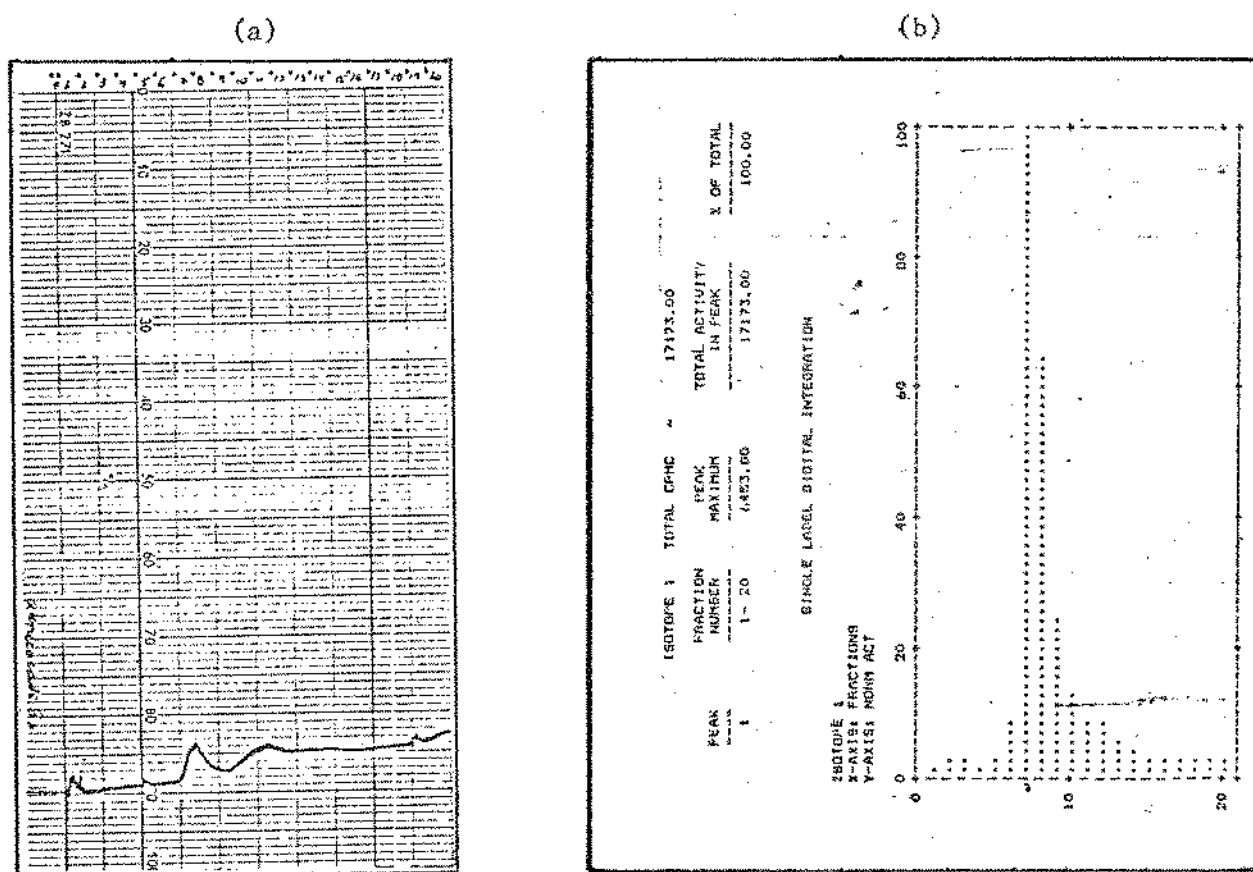


Figura 16: (a) Cromatograma das frações (7+8+9+10) Correspondente a fig.13 (s/ maltodextrina) reagida c/ α -amilase; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma.

PAGE: 1

USER: 2 10:010 RMW PRESET TIME: 1.00 THU 03 FEB 1987 13:23
 SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRN RES32IN
 (H) 1 ACIN CDFIN

LSR-TIME: 0.10 INT:999.95
 CHANNEL 1-LL: 0 UL: 670 2310M 2.00 BLS SUB: 40.00 BWS 2510:100.00 LSR: 50

SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION
 UNKNOWN ID1
 UNKNOWN UNITS
 NORM FACTOR
 INTEGRAL THRESHOLD
 GRAPH X-AXIS
 Y-AXIS
 HALF LIFE (DAYS)
 QUENCH MODIFIY
 CALCULATE BPHV
 QUENCH LIMITS
 QUENCH CURVE CDEFF
 LOW:31.00
 HIGH:377.0
 HIGH:377.0

UNKNOWN REPLICATES: 1

BASELINE CORRECTIONIN
 1501, CH1, A1, 4.401255 BI-0.001009D D10.600000597 DI-0.0000000224

SAM	POS	CH	CPH	2510Z	TIME	EL TIME	AUG HW	ERR
1	16-1	1	144.00	29.97	1.00	1.42	125.0	
2	16-2	1	137.00	25.07	1.00	2.03	125.0	164.00
3	16-3	1	143.00	21.97	1.00	27.00	INTEGRAL 1501 CPNC	301.00
4	16-4	1	156.00	21.20	1.00	147.00	INTEGRAL 1501 CPNC	344.00
5	16-5	1	122.00	23.84	1.00	124.00	INTEGRAL 1501 CPNC	400.00
6	16-6	1	348.00	16.13	1.00	9.23	125.0	722.00
7	16-7	1	6904.00	2.17	1.00	10.92	128.0	1070.00
8	16-8	1	8014.00	2.29	1.00	12.50	125.0	9974.00
9	16-9	1	2472.00	4.77	1.00	14.07	127.0	17705.00
10	16-10	1	1327.00	4.74	1.00	12.45	128.0	20486.00
11	16-11	1	824.00	6.43	1.00	17.23	124.0	21727.00
12	16-12	1	677.00	9.87	1.00	18.31	124.0	22511.00
13	16-13	1	486.00	12.32	1.00	20.39	121.0	23253.00
14	16-14	1	250.00	17.23	1.00	21.92	124.0	23774.00
15	16-15	1	247.00	21.22	1.00	23.37	124.0	24094.00
16	16-16	1	157.00	21.81	1.00	25.14	125.0	24341.00
17	16-17	1	124.00	25.76	1.00	26.77	125.0	24494.00
18	16-18	1	140.00	24.40	1.00	28.37	124.0	24628.00
19	1-1	1	112.00	41.92	1.00	30.02	125.0	24760.00
20	1-2	1	129.00	24.82	1.00	31.40	125.0	24820.00
			1501 CPNC	139.00	INTEGRAL 1501 CPNC			35619.00

Tabela 5: Radioatividade das frações correspondentes a figura 15b.

USER: 2 10:010 RMW PRESET TIME: 1.00 THU 03 FEB 1987 21:12
 SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRN RES32IN
 (H) 1 ACIN CDFIN

LSR-TIME: 0.10 INT:999.95
 CHANNEL 1-LL: 0 UL: 670 2310M 2.00 BLS SUB: 40.00 BWS 2510:100.00 LSR: 50

SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION
 UNKNOWN ID1
 UNKNOWN UNITS
 NORM FACTOR
 INTEGRAL THRESHOLD
 GRAPH X-AXIS
 Y-AXIS
 HALF LIFE (DAYS)
 QUENCH MODIFIY
 CALCULATE BPHV
 QUENCH LIMITS
 QUENCH CURVE CDEFF
 LOW:31.00
 HIGH:377.0
 HIGH:377.0

UNKNOWN REPLICATES: 1

BASELINE CORRECTIONIN
 1501, CH1, A1, 4.401255 BI-0.001009D D10.600000597 DI-0.0000000224

SAM	POS	CH	CPH	2510Z	TIME	EL TIME	AUG HW	ERR
1	16-1	1	133.00	24.00	1.00	1.42	118.0	
2	16-2	1	182.00	27.03	1.00	3.02	116.0	133.00
3	16-3	1	143.00	30.12	1.00	4.39	114.0	318.00
4	16-4	1	122.00	32.86	1.00	5.17	119.0	201.00
5	16-5	1	175.00	28.34	1.00	7.75	117.0	253.00
6	16-6	1	573.00	11.11	1.00	6.23	117.0	701.00
7	16-7	1	8453.00	2.37	1.00	10.90	110.0	1731.00
8	16-8	1	4121.00	2.42	1.00	12.34	INTEGRAL 1501 CPNC	7391.00
9	16-9	1	1372.00	4.77	1.00	13.09	INTEGRAL 1501 CPNC	11127.00
10	16-10	1	831.00	6.43	1.00	15.44	INTEGRAL 1501 CPNC	13159.00
11	16-11	1	543.00	11.55	1.00	17.23	118.0	14739.00
12	16-12	1	552.00	11.41	1.00	18.78	121.0	14673.00
13	16-13	1	402.00	14.26	1.00	20.32	118.0	15071.00
14	16-14	1	245.00	20.04	1.00	21.92	116.0	15470.00
15	16-15	1	194.00	23.73	1.00	22.50	119.0	16253.00
16	16-16	1	140.00	24.42	1.00	25.07	118.0	16291.00
17	16-17	1	147.00	27.21	1.00	26.70	117.0	16421.00
18	16-18	1	195.00	25.83	1.00	28.31	117.0	16643.00
19	1-1	1	163.00	30.27	1.00	27.92	INTEGRAL 1501 CPNC	16842.00
20	1-2	1	149.00	29.72	1.00	31.22	INTEGRAL 1501 CPNC	17002.00
			1501 CPNC	169.00	INTEGRAL 1501 CPNC			17172.00

Tabela 6: Radioatividade das frações correspondentes a figura 16b.

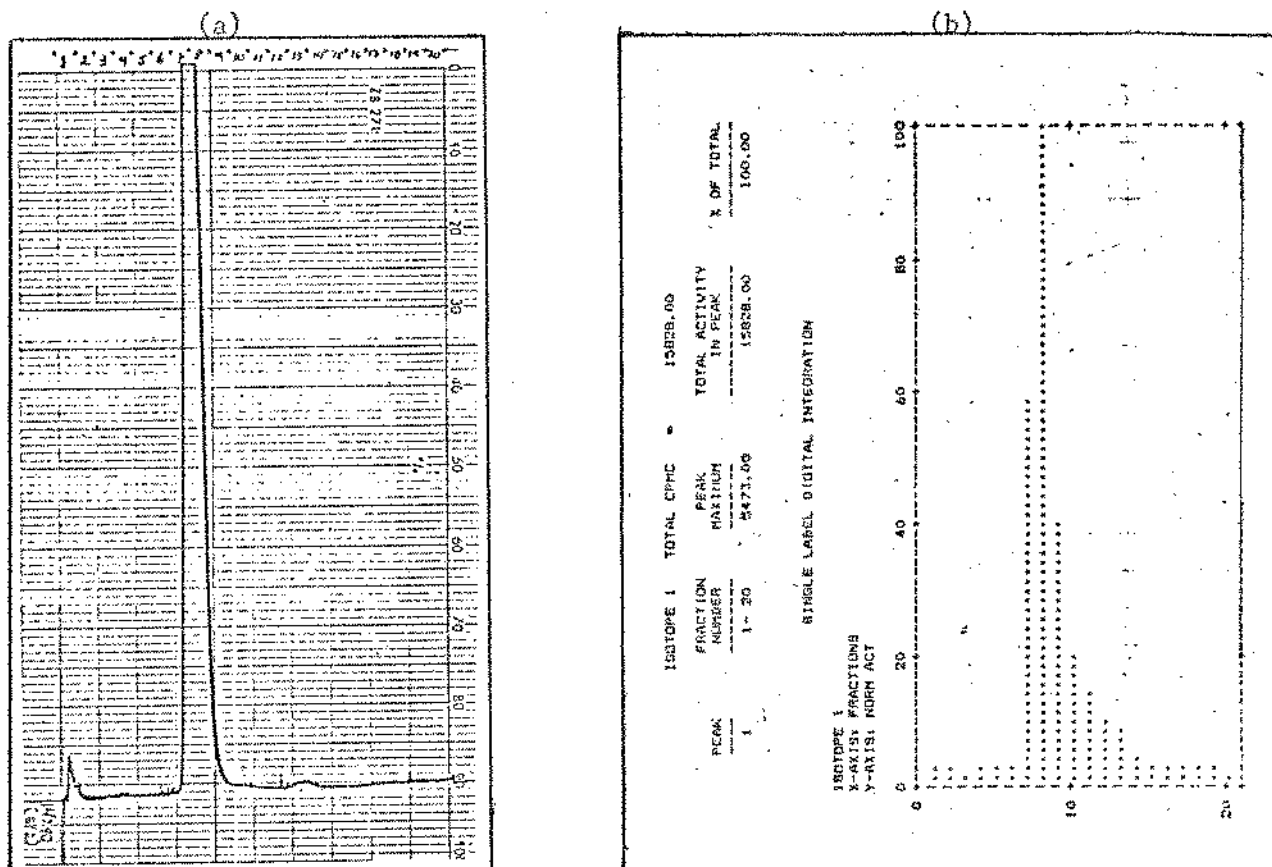


Figura 17: (a) Cromatograma das frações(7+8+9+10) correspondentes a fig.14 (com matodextrina); (b) radioatividade correspondente ao cromatograma.

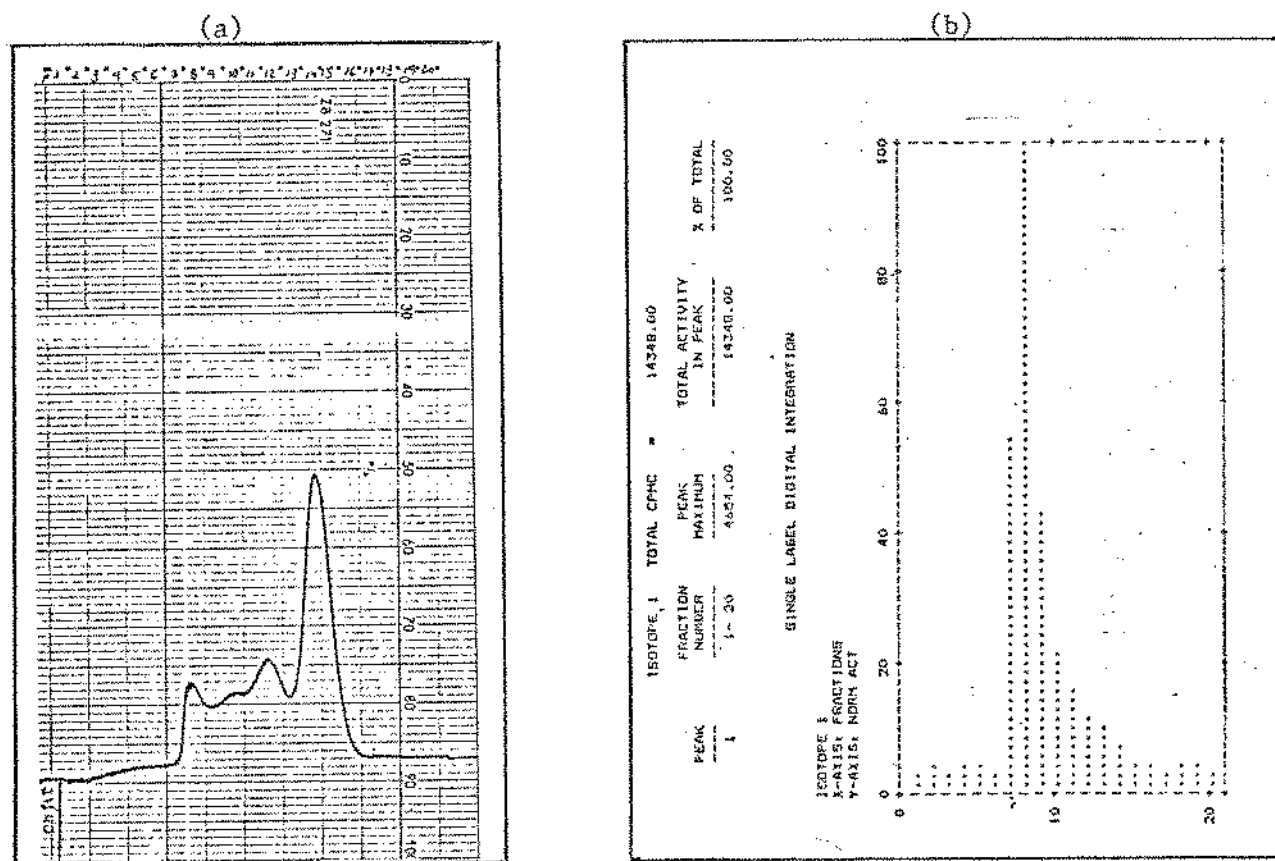


Figura 18: (a) Cromatograma das frações(7+8+9+10) correspondente a fig.14 (com maltodextrina) reagida c/ α -amilase; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma.

USER: 2 101010 RPM PRESET TIME: 1.00 700 05 FEB 1987 00:14									
SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRN RS332IN									
HRT 1 ACCIN OFFIN									
CHANNEL 1-LL: 0 UL: 470 25100 2.00 BKG SUB: 40.00 BKS 2510:100.00 LSR: 50									
LSR-TIME: 0.10 INT:999.95									
SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION									
UNKNOWN 101									
UNKNOWN REPLICATES: 1									
NORM FACTOR									
INTEGRAL THRESHOLD									
GRAPH X-AXIS									
Y-AXIS									
HALF LIFE(DAYS)									
QUENCH MODEN									
CALCULATE DEMY									
QUENCH LIMITS									
QUENCH CURVE COEFF									
LSR: CH1 A: 4.60155 B: 0.0010090 C: 0.00000597 D: 0.0000000224									
BASELINE CORRECTION									
SAN	POS	CH	CPM	2510X	TIME	EL TIME	AVG	RM	ERR
1	16	1	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
2	16	2	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
3	16	3	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
4	16	4	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
5	16	5	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
6	16	6	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
7	16	7	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
8	16	8	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
9	16	9	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
10	16	10	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
11	16	11	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
12	16	12	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
13	16	13	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
14	16	14	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
15	16	15	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
16	16	16	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
17	16	17	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
18	16	18	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
19	16	19	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00
20	16	20	128.00	37.24	1.00	1.41	124.0	128.00	128.00

Tabela 7: Radioatividade das frações correspondentes a figura 17b.

USER: 2 101010 RPM PRESET TIME: 1.00 FRI 06 FEB 1987 00:14									
SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRN RS332IN									
HRT 1 ACCIN OFFIN									
CHANNEL 1-LL: 0 UL: 470 25100 2.00 BKG SUB: 40.00 BKS 2510:100.00 LSR: 50									
LSR-TIME: 0.10 INT:999.95									
SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION									
UNKNOWN 101									
UNKNOWN REPLICATES: 1									
NORM FACTOR									
INTEGRAL THRESHOLD									
GRAPH X-AXIS									
Y-AXIS									
HALF LIFE(DAYS)									
QUENCH MODEN									
CALCULATE DEMY									
QUENCH LIMITS									
QUENCH CURVE COEFF									
LSR: CH1 A: 4.60155 B: 0.0010090 C: 0.00000597 D: 0.0000000224									
BASELINE CORRECTION									
SAN	POS	CH	CPM	2510X	TIME	EL TIME	AVG	RM	ERR
1	16	1	150.00	32.39	1.00	1.42	118.0	150.00	150.00
2	16	2	174.00	28.40	1.00	1.42	117.0	174.00	174.00
3	16	3	139.00	34.82	1.00	1.42	118.0	139.00	139.00
4	16	4	165.00	30.97	1.00	1.42	117.0	165.00	165.00
5	16	5	180.00	27.67	1.00	1.42	117.0	180.00	180.00
6	16	6	164.00	29.97	1.00	1.42	117.0	164.00	164.00
7	16	7	2232.00	4.20	1.00	1.42	110.0	2232.00	2232.00
8	16	8	4854.00	3.07	1.00	1.42	110.0	4854.00	4854.00
9	16	9	2003.00	4.94	1.00	1.42	110.0	2003.00	2003.00
10	16	10	1917.00	7.51	1.00	1.42	117.0	1917.00	1917.00
11	16	11	764.00	9.68	1.00	1.42	117.0	764.00	764.00
12	16	12	562.00	11.74	1.00	1.42	117.0	562.00	562.00
13	16	13	445.00	12.94	1.00	1.42	117.0	445.00	445.00
14	16	14	310.00	17.43	1.00	1.42	117.0	310.00	310.00
15	16	15	204.00	24.08	1.00	1.42	118.0	204.00	204.00
16	16	16	176.00	28.00	1.00	1.42	118.0	176.00	176.00
17	16	17	161.00	30.43	1.00	1.42	110.0	161.00	161.00
18	16	18	148.00	29.23	1.00	1.42	117.0	148.00	148.00
19	16	19	192.00	25.65	1.00	1.42	120.0	192.00	192.00
20	16	20	157.00	27.01	1.00	1.42	110.0	157.00	157.00

Tabela 8: Radioatividade das frações correspondentes a figura 18b.

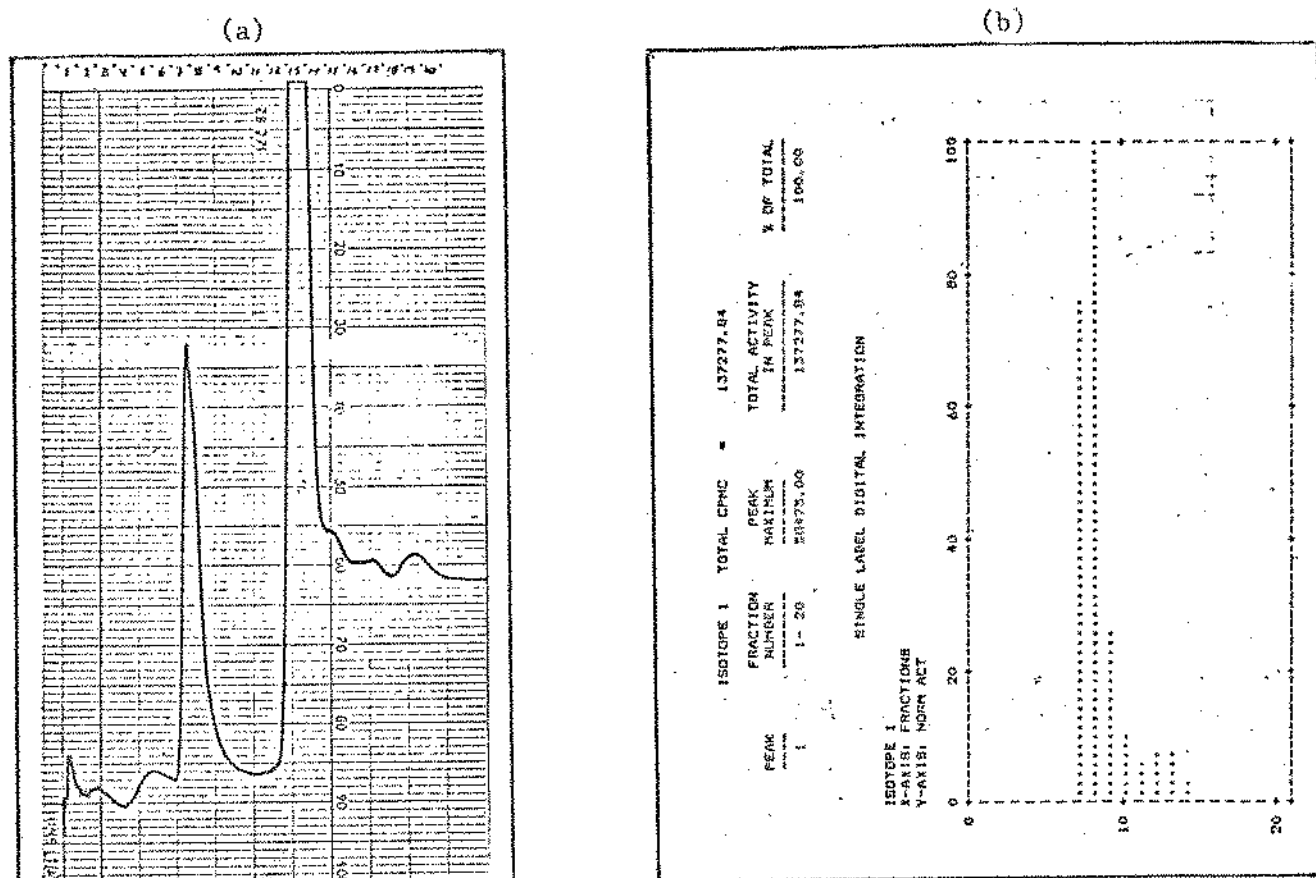


Figura 19: (a) Cromatograma das frações (7+8) concentradas no Rotavapor correspondentes a fig.13 (s/ maltodextrina); (b) radioatividade de correspondente ao cromatograma.

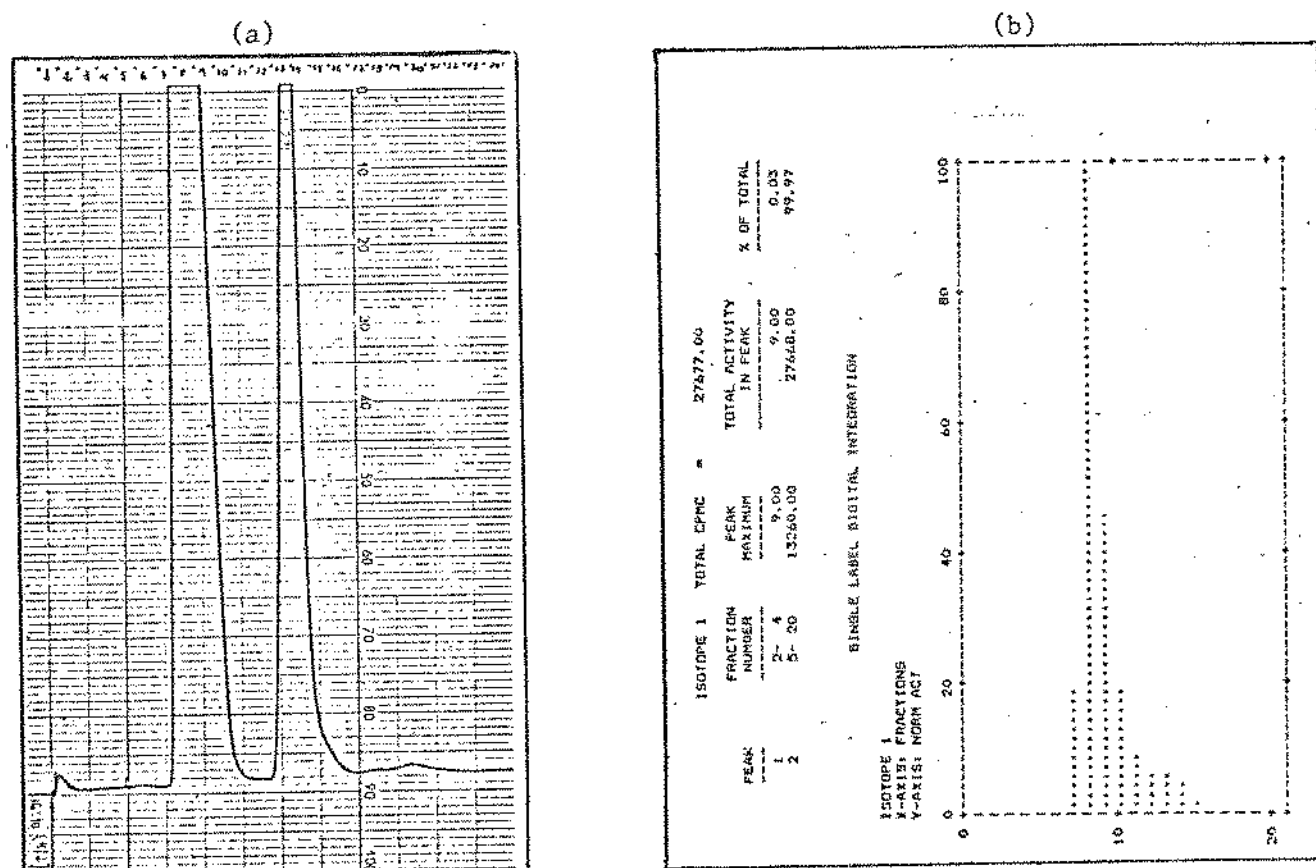


Figura 20: (a) Cromatograma das frações (7+8) concentradas no Rotavapor correspondentes a fig.14 (c/ maltodextrina); (b) radioatividade de correspondente ao cromatograma.

[illegible]

Tabela 9: Radioatividade das frações correspondentes a figura 19b.

[illegible]

Tabela 10: Radioatividade das frações correspondentes a figura 20b.

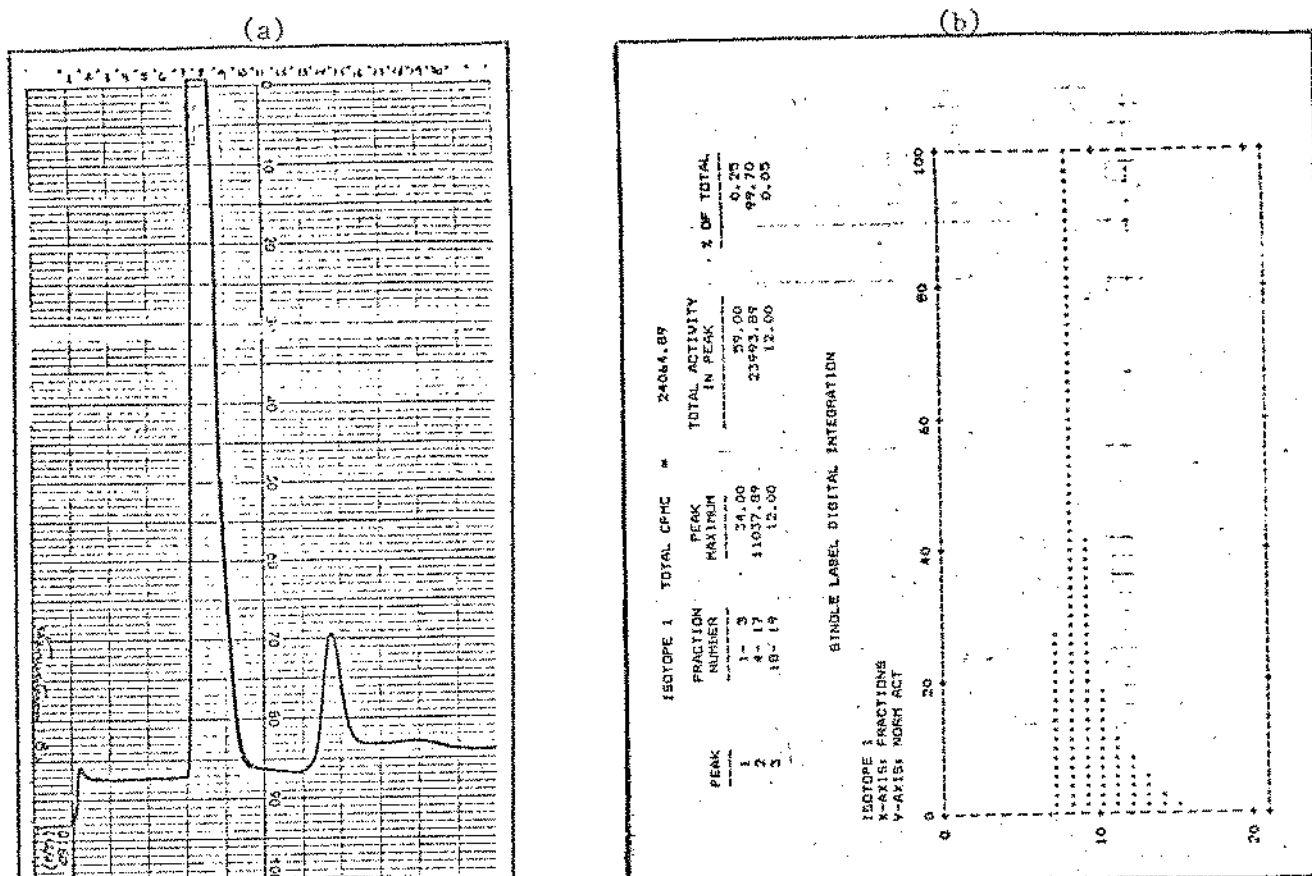


Figura 21: (a) Cromatograma das frações (7+8) concentradas no AMICON correspondente a fig.14 (c/ maltodextrina); (b) radioatividade correspondente ao cromatograma.

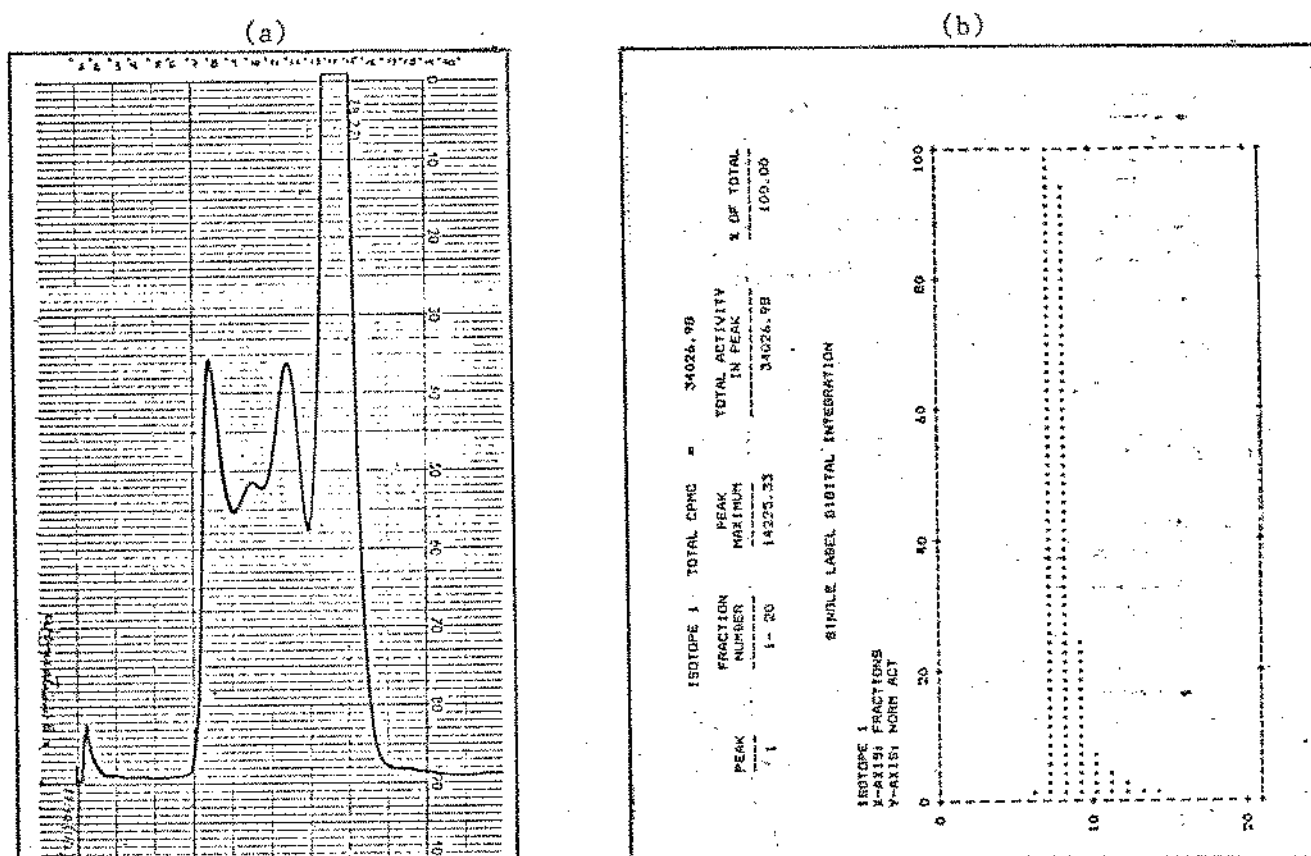


Figura 22: (a) Cromatograma das frações (7+8) concentradas no AMICON correspondente a fig.14 (c/ maltodextrina) reagida c/ α -amilase; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma.

USER: 2 ID1010 RMC PRESET TIME: 1.00 THU 12 FEB 1987 11:44									
SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRN R5232IN									
HS: 1 AGIN COFFIN LSR-TIME: 0.10 INT:999.95									
CHANNEL 1-LL: 0 UL: 670 CSIGMA: 2.00 BKG SUB: 40.00 BKG 2510:100.00 LSR: 50									
SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION									
UNKNOWN 10: 1501:CPMC									
UNKNOWN UNITS									
NORM FACTOR									
INTEGRAL THRESHOLD									
GRAPH X-AXIS									
Y-AXIS									
HALF LIFE(DAYS)									
QUENCH MODE(H)									
CALCULATE DPM(Y)									
QUENCH LIMITS									
QUENCH CURVE COEFF									
1501: CH1 AT 4.401505 81-0.0010090 C10.00000297 D1-0.0000000224									
BASELINE CORRECTION:IN									
SAM	POS	CH	CPH	2510X	TIME	EL TIME	AVG HW		ERR
1	16-1	1	34.00	128.1	1.00	1.43	112.0	34.00	34.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
2	16-2	1	25.00	172.5	1.00	3.03	114.0	59.00	59.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
3	16-3	1	-1.00	****	1.00	4.81	114.0	108	108
			1501	CPMC			-1.00		
4	16-4	1	9.00	470.9	1.00	8.18	114.0	9.00	9.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
5	16-5	1	5.00	843.8	1.00	7.77	115.0	14.00	14.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
6	16-6	1	18.00	264.9	1.00	9.35	113.0	30.00	30.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
7	16-7	1	3084.00	3.86	1.00	10.42	110.0	3084.00	3084.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
8	16-8	1	11637.89	1.99	0.95	12.45	112.0	14131.89	14131.89
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
9	16-9	1	4220.86	3.11	1.00	14.02	113.0	18661.89	18661.89
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
10	16-10	1	1989.00	4.84	1.00	16.89	114.0	20450.89	20450.89
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
11	16-11	1	1237.00	6.03	1.00	17.19	114.0	21907.89	21907.89
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
12	16-12	1	928.00	10.92	1.00	18.77	112.0	22845.89	22845.89
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
13	16-13	1	652.00	9.79	1.00	20.33	112.0	23520.89	23520.89
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
14	16-14	1	327.00	12.82	1.00	21.40	112.0	23887.89	23887.89
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
15	16-15	1	92.00	50.14	1.00	23.48	113.0	23979.89	23979.89
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
16	16-16	1	14.00	204.4	1.00	23.06	112.0	23993.89	23993.89
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
17	16-17	1	-4.00	****	1.00	24.28	112.0	108	108
			1501	CPMC			-4.00		
18	16-18	1	12.00	254.3	1.00	26.28	112.0	12.00	12.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
19	1-1	1	-3.00	****	1.00	29.91	118.0	108	108
			1501	CPMC			-3.00		
20	1-2	1	-2.00	****	1.00	31.48	119.0	108	108
			1501	CPMC			-2.00		

Tabela 11: Radioatividade das frações correspondentes a figura 21b.

USER: 2 ID1010 RMC PRESET TIME: 1.00 WED 11 FEB 1987 20:52									
SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRN R5232IN									
HS: 1 AGIN COFFIN LSR-TIME: 0.10 INT:999.95									
CHANNEL 1-LL: 0 UL: 670 CSIGMA: 2.00 BKG SUB: 40.00 BKG 2510:100.00 LSR: 50									
SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION									
UNKNOWN 10: 1501:CPMC									
UNKNOWN UNITS									
NORM FACTOR									
INTEGRAL THRESHOLD									
GRAPH X-AXIS									
Y-AXIS									
HALF LIFE(DAYS)									
QUENCH MODE(H)									
CALCULATE DPM(Y)									
QUENCH LIMITS									
QUENCH CURVE COEFF									
1501: CH1 AT 4.401505 81-0.0010090 C10.00000297 D1-0.0000000224									
BASELINE CORRECTION:IN									
SAM	POS	CH	CPH	2510X	TIME	EL TIME	AVG HW		ERR
1	16-1	1	37.00	118.1	1.00	1.41	111.0	37.00	37.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
2	16-2	1	34.00	138.1	1.00	3.01	112.0	71.00	71.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
3	16-3	1	39.00	112.2	1.00	4.28	112.0	110.00	110.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
4	16-4	1	22.00	195.4	1.00	8.17	112.0	132.00	132.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
5	16-5	1	29.00	149.4	1.00	7.75	112.0	161.00	161.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
6	16-6	1	194.00	22.46	1.00	9.33	113.0	255.00	255.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
7	16-7	1	1423.13	1.94	0.75	10.68	112.0	14580.33	14580.33
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
8	16-8	1	13240.67	2.01	0.75	11.48	112.0	26091.00	26091.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
9	16-9	1	3544.00	3.55	1.00	12.57	112.0	31635.00	31635.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
10	16-10	1	1097.00	7.12	1.00	15.15	112.0	32732.00	32732.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
11	16-11	1	553.00	11.40	1.00	16.71	113.0	33783.00	33783.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
12	16-12	1	376.00	16.92	1.00	18.28	113.0	33611.00	33611.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
13	16-13	1	196.00	37.77	1.00	19.07	113.0	33807.00	33807.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
14	16-14	1	110.00	42.84	1.00	21.44	113.0	33917.00	33917.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
15	16-15	1	50.00	89.54	1.00	23.02	112.0	33957.00	33957.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
16	16-16	1	8.00	259.2	1.00	24.60	112.0	33973.00	33973.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
17	16-17	1	22.00	195.4	1.00	26.22	113.0	33997.00	33997.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
18	16-18	1	13.00	327.4	1.00	27.03	112.0	34010.00	34010.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
19	1-1	1	14.00	304.4	1.00	29.47	112.0	34024.00	34024.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC
20	1-2	1	3.00	1493.1	1.00	31.04	113.0	34027.00	34027.00
			1501	CPMC			INTEGRAL	1501	CPMC

Tabela 12: Radioatividade das frações correspondentes a figura 22b.

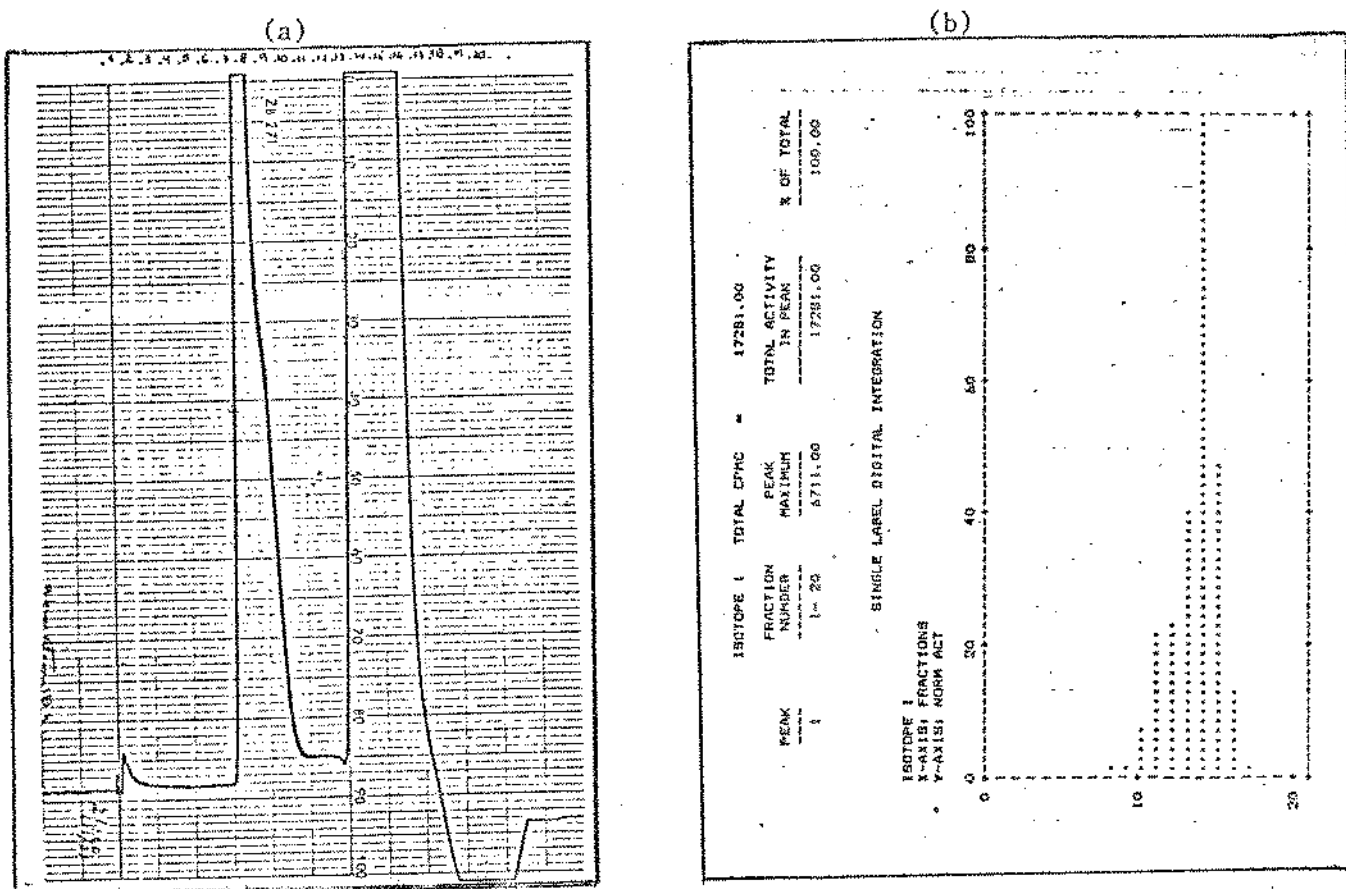


Figura 23: (a) Cromatograma das frações (7+8) concentradas no AMICON cor
respondente a fig.14 (c/ Maltodextrina) reagidas com dextrana
se; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma.

USER: 2 ID:BIG 6MW		PRESCT TIME: 1.00		THU 12 FEB 1987 00:37				
SAMPLE REPEAT: 1		CYCLE REPEAT: 1		SCR:N RS232IN				
HM: 1 ACQ:IN DEFIN		LSR-TIME: 0.10 INT:999.99						
CHANNEL 1-LL: 0		UL: 670		SIGMA: 2.00				
		BKG SUB: 40.00		BKG SIG:100.00				
		LSR: 30						
SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION								
UNKNOWN ID:		ISOL:CPMC		UNKNOWN REPLICATES: 1				
UNKNOWN FACTOR:		ISOL:D 1.000000						
INTEGRAL THRESHOLD:		ISOL:0.00000000						
GRAPH X-AXIS:		ISOL:FRACTIONS						
Y-AXIS:		ISOL:NORM ACT						
HALF LIFE (DAYS):		ISOL:IN						
QUENCH MODE:H		QUENCH RANGE LOW:31.00		HIGH:377.0				
CALCULATE DPM:Y		CONSTANT QUENCH:IN						
QUENCH LIMITS		LOW:31.00		HIGH:377.0				
QUENCH CURVE COEFF								
ISOL: CHI A: 4.601585		B: -0.0010092		C: 0.00000597				
		D: -0.0000000224						
BASELINE CORRECTION:IN								
SAM	FDS	CH	CPH	2SIGX	TIME	EL TIME	AVG HB	ERR
1	16	1	18.00	237.8	1.00	1.42	113.0	
			ISOL: CPMC			18.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
2	16	2	7.00	604.1	1.00	3.02	112.0	18.00
			ISOL: CPMC			7.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
3	16	3	14.00	304.4	1.00	4.60	113.0	25.00
			ISOL: CPMC			14.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
4	16	4	7.00	604.1	1.00	6.18	113.0	39.00
			ISOL: CPMC			7.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
5	16	5	6.00	704.0	1.00	7.72	112.0	46.00
			ISOL: CPMC			6.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
6	16	6	7.00	604.1	1.00	9.32	114.0	52.00
			ISOL: CPMC			7.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
7	16	7	22.00	195.4	1.00	10.89	112.0	59.00
			ISOL: CPMC			22.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
8	16	8	54.00	82.32	1.00	12.47	112.0	81.00
			ISOL: CPMC			54.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
9	16	9	124.00	78.30	1.00	14.05	112.0	135.00
			ISOL: CPMC			124.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
10	16	10	493.00	12.39	1.00	15.63	113.0	259.00
			ISOL: CPMC			493.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
11	16	11	1396.00	6.14	1.00	17.20	113.0	752.00
			ISOL: CPMC			1396.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
12	16	12	1492.00	5.89	1.00	18.77	112.0	2148.00
			ISOL: CPMC			1492.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
13	16	13	2717.00	4.14	1.00	20.35	112.0	3640.00
			ISOL: CPMC			2717.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
14	16	14	6711.00	2.52	1.00	21.92	112.0	6357.00
			ISOL: CPMC			6711.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
15	16	15	3182.00	3.78	1.00	23.50	112.0	13068.00
			ISOL: CPMC			3182.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
16	16	16	849.00	8.46	1.00	25.08	112.0	16250.00
			ISOL: CPMC			849.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
17	16	17	129.00	26.98	1.00	26.71	112.0	17099.00
			ISOL: CPMC			129.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
18	16	18	26.00	166.1	1.00	28.31	113.0	17228.00
			ISOL: CPMC			26.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
19	16	19	12.00	354.3	1.00	29.95	112.0	17254.00
			ISOL: CPMC			12.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC
20	16	20	15.00	284.4	1.00	31.53	112.0	17266.00
			ISOL: CPMC			15.00	INTEGRAL	ISOL: CPMC

Tabela 13: Radioatividade
das frações corresponden
te a figura 23b.

4.4- Resultados obtidos nos ensaios com a pululana:

4.4.1 - Utilizando o microconcentrador AMICON:

Na figura 24a temos o cromatograma da reação de sacarose e dextrana-sacarase na presença de pululana. Pode-se verificar através da fig. 24b e tab. 14 que 40% da radioatividade apareceu nas frações de alto peso molecular e 60% nas de baixo peso molecular. Como descrito na figura 10a, tomou-se as frações 7, 8 e 9 da reação acima e concentrou-se a mistura no microconcentrador AMICON. Em seguida, dividiu-se o concentrado em 3 porções: uma foi passada diretamente na coluna (fig. 25), outra tratada previamente com pululanase (fig. 26) e a terceira tratada previamente com dextranase (fig. 27). Analisando a fig. 25a, nota-se a presença de um 2º pico, não identificado, que não apresenta nenhuma radioatividade. A radioatividade está concentrada no pico de moléculas grandes (fig. 25b). Quando a amostra foi tratada com pululanase verifica-se na fig. 26a que houve uma diminuição significativa no pico de grandes moléculas, resultado da hidrólise da pululana. Observa-se neste cromatograma uma interferência que deve ter sido provocada pelo tampão que acompanha a enzima pululanase. O pico de radioatividade, porém, continua nas frações correspondentes às grandes moléculas (fig. 26b). Na amostra tratada com dextranase, nota-se a existência de 2 picos (fig. 27a), com um deslocamento da radioatividade para as frações de pequenas moléculas (fig. 27b). Igualmente ao caso anterior, com maltodextrina, a dextrana-sacarase não provocou glicosilação em

pululana. As tabelas 14, 15 e 16 correspondem aos resultados das figuras 25, 26 e 27.

É interessante analisar os cromatogramas representados pelas figuras 28a, 29a e 30a e seus respectivos resultados de radioatividade (figuras 28b, 29b e 30b), assim como as tabelas 17, 18 e 19, referentes as reações realizadas com as frações filtradas com o microconcentrador AMICON, onde encontramos moléculas com peso molecular inferior a 10000. É bom lembrar que este filtrado é proveniente das misturas das frações 7,8 e 9 explicando a pouca radioatividade nas frações de baixo peso molecular.

A figura 28 representa o cromatograma do filtrado obtido no AMICON da reação de sacarose, dextrana-sacarase e pululana. Nota-se que a maior concentração de radioatividade está presente nas frações intermediárias (8 a 12) de peso molecular. Estes resultados indicam que houve formação de dextranas de baixo peso molecular, ou então que houve glicosilação de pululana de peso molecular inferior a 10.000, ou ainda os dois resultados foram obtidos simultaneamente.

A figura 29 (filtrado + pululanase) mostra um acréscimo de radioatividade nas frações de baixo peso molecular (fig.29b), podendo indicar que este aumento foi proveniente de moléculas de glicose radioativas adicionadas à pululana de baixo peso molecular.

Quando o filtrado foi reagido com dextranase, toda a radioatividade foi deslocada para as frações de baixo peso molecular (fig.30b) ou seja a dextranase hidrolisou todas as moléculas radioativas de peso molecular inferior a 10.000 que estavam pre-

sentes naquela fração.

Este resultado pode indicar que a pululana tenha induzido a formação de dextrana de baixo peso molecular (oligossacarídeos). A possibilidade de que pululana de peso molecular abaixo de 10.000 tenha funcionado como receptor da reação de síntese de dextrana também existe. No entanto, qualquer conclusão mais taxativa ficaria prejudicada se se considerar a baixa radioatividade destes filtrados após inúmeras e sucessivas diluições durante o processo.

Uma hipótese também plausível para explicar porque na presença de dextranase toda radioatividade foi deslocada para as frações de baixo peso molecular, nada permanecendo nas frações de pululana eventualmente glicosilada, é a de que a dextranase possa ter reconhecido as ligações 4,6 acrescidas na cadeia da pululana, provocando hidrólise também destas ligações.

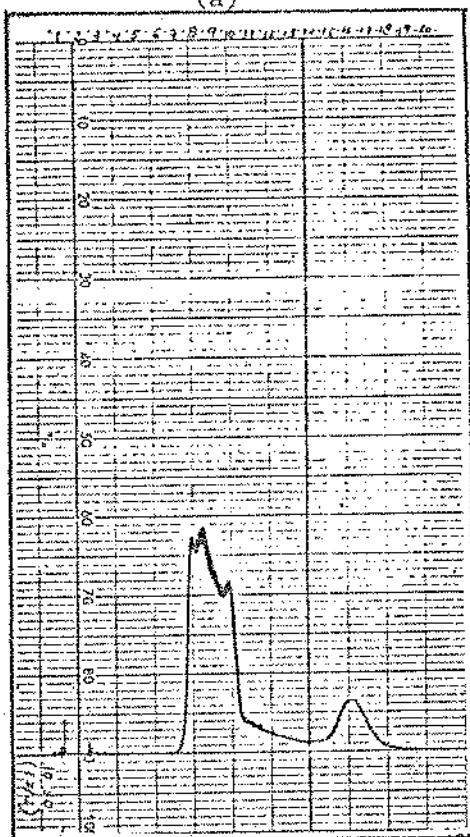
4.4.2- Utilizando o Método de Diálise:

Partindo da reação de dextrana-sacarase com sacarose radioativa em presença de pululana, seguiu-se as etapas descritas na figura 10.

O método de diálise permitiu eliminar mais eficientemente a radioatividade proveniente de moléculas de baixo peso molecular. Comparando-se as figuras 31 e 32 verifica-se que na presença da pululanase não houve qualquer aumento de radioatividade nas frações de baixo peso molecular que pudessem indicar a glicosilação da pululana. A figura 33 apresentando o resultado da reação

com dextranase mostra que toda a radioatividade foi deslocada para as frações de baixo peso molecular, confirmando que toda radioatividade da figura 31b é decorrente da produção de dextrana.

(a)



(b)

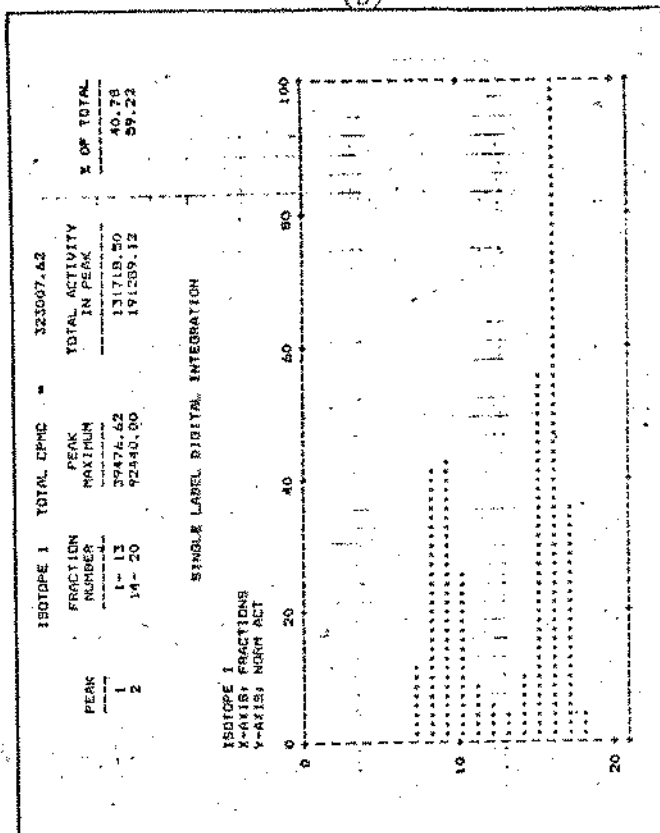


Figura 24: Resultado da reação de sacarose + dextrana-sacarase + pulula na. (a) Cromatograma; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma.

USER: 2 ID:1015 RMW PRESET TIME: 1.00 TUE 17 FEB 1987 16:27
 SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRN RS232IN
 HW: 1 ADDIN DCPIN LSR-TIME: 0.10 INT:999.95
 CHANNEL 1-LL: 0 UL: 670 ZSIGMA: 2.00 BKG SUB: 40.00 BKG ZSIG:100.00 LSK: 50

SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION UNKNOWN REPLICATES: 1

UNKNOWN ID: IS01:CPMC
 UNKNOWN UNITS IS01:Q 1.00000
 NORM FACTOR IS01:Q 0.00000000
 INTEGRAL THRESHOLD IS01:FRACTIONS
 GRAPH X-AXIS IS01:NORM ACT
 Y-AXIS IS01:N
 HALF LIFE (DAYS) IS01:N
 QUENCH MODE:IN QUENCH RANGE LOW:31.00 HIGH:377.0
 CALCULATE BFM:Y CONSTANT QUENCH:N
 QUENCH LIMITS LOW:31.00 HIGH:377.0
 QUENCH CURVE COEFF
 IS01, CH1 A: 4.601585 B: -0.0019090 C: 0.00000097 D: -0.0000000224
 BASELINE CORRECTION:N

SAM	POS	CH	CPM	2SIGZ	TIME	EL TIME	AVG HM	ERR
1	16-1	1	21.00	204.5	1.00	1.42	117.0	
			IS01 CPMC :		21.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	21.00
2	16-2	1	12.00	354.3	1.00	3.02	111.0	
			IS01 CPMC :		12.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	33.00
3	16-3	1	1.00	4200.	1.00	4.61	112.0	
			IS01 CPMC :		1.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	34.00
4	16-4	1	16.00	266.9	1.00	6.18	111.0	
			IS01 CPMC :		16.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	50.00
5	16-5	1	2.00	2102.	1.00	7.74	110.0	
			IS01 CPMC :		2.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	52.00
6	16-6	1	14.00	304.4	1.00	9.32	115.0	
			IS01 CPMC :		14.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	66.00
7	16-7	1	10316.00	0.01	1.00	10.90	111.0	
			IS01 CPMC :		10316.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	10382.00
8	16-8	1	38830.00	1.86	0.30	11.76	111.0	
			IS01 CPMC :		38830.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	49212.00
9	16-9	1	39476.46	1.84	0.30	12.67	112.0	
			IS01 CPMC :		39476.46		INTEGRAL IS01 CPMC :	88658.46
10	16-10	1	24428.89	1.92	0.45	13.65	111.0	
			IS01 CPMC :		24428.89		INTEGRAL IS01 CPMC :	112117.55
11	16-11	1	8333.00	2.25	1.00	15.23	111.0	
			IS01 CPMC :		8333.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	121450.55
12	16-12	1	5713.00	2.75	1.00	16.80	112.0	
			IS01 CPMC :		5713.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	127163.55
13	16-13	1	4553.00	3.10	1.00	18.37	111.0	
			IS01 CPMC :		4553.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	131718.56
14	16-14	1	8962.00	2.16	1.00	19.97	111.0	
			IS01 CPMC :		8962.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	140680.56
15	16-15	1	52000.00	1.94	0.20	20.72	111.0	
			IS01 CPMC :		52000.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	192680.56
16	16-16	1	92440.00	1.70	0.15	21.45	112.0	
			IS01 CPMC :		92440.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	285120.56
17	16-17	1	32737.14	1.87	0.25	22.42	110.0	
			IS01 CPMC :		32737.14		INTEGRAL IS01 CPMC :	317857.72
18	16-18	1	4318.00	3.19	1.00	24.02	111.0	
			IS01 CPMC :		4318.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	322175.72
19	1-1	1	640.00	10.27	1.00	25.66	112.0	
			IS01 CPMC :		640.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	322815.72
20	1-2	1	192.00	26.19	1.00	27.23	112.0	
			IS01 CPMC :		192.00		INTEGRAL IS01 CPMC :	323007.72

Tabela 14: Radioatividade das frações correspondentes a figura 24b.

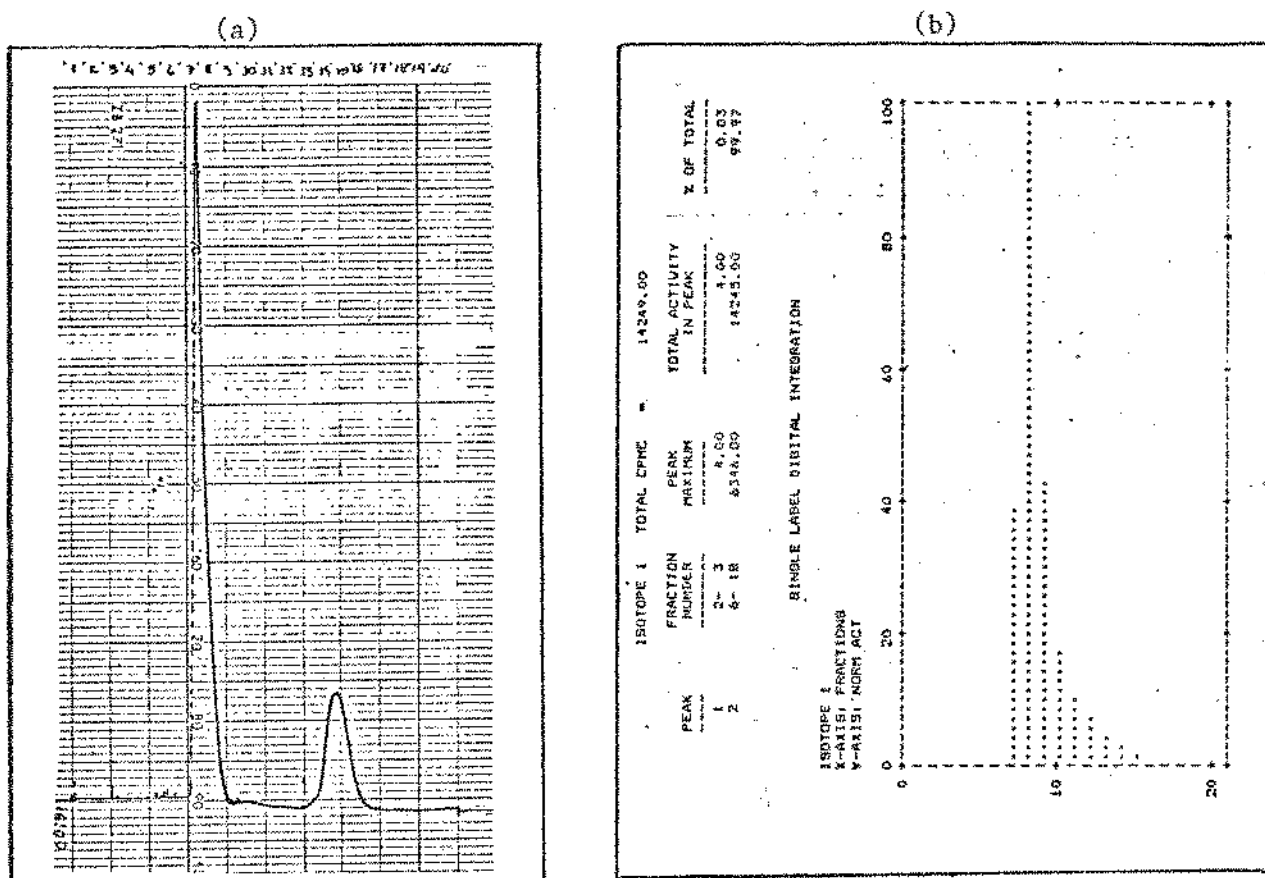


Figura 25: (a) Cromatograma das frações (7+8+9) concentradas no AMICON correspondente a figura 24 (c/ pululana); (b) radioatividade de correspondente ao cromatograma.

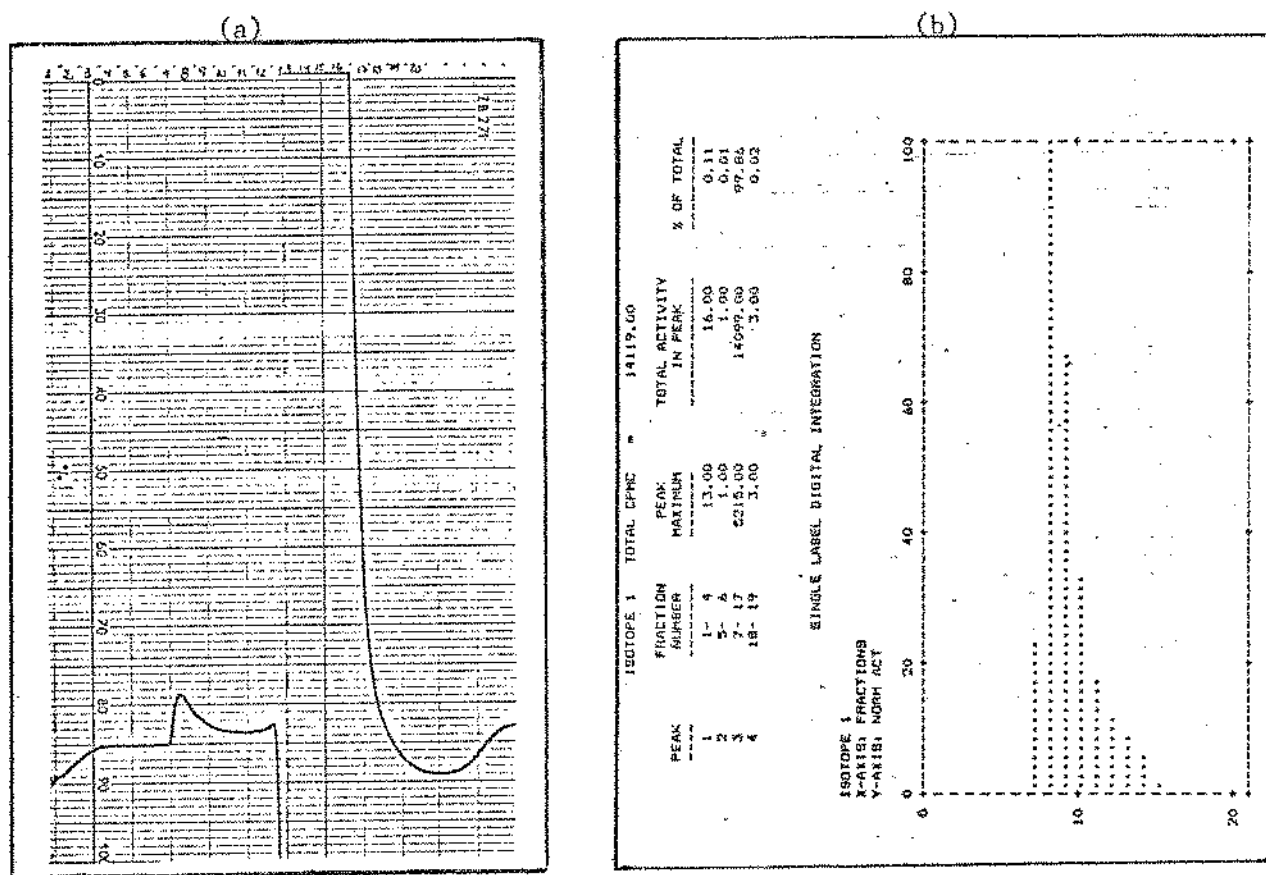


Figura 26: (a) Cromatograma das frações (7+8+9) concentradas no AMICON correspondentes a fig. 24 (c/ pululana) reagida c/ pululana se; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma.

USER: 2 1D1810 RHP	PRESET TIME: 1.00	WED 18 FEB 1987 19:43
SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRN: 002321N		
REP: 1 ACQ:IN OFFIN		
CHANNEL 1-LL: 0 181 670 251000 2.00 BKG SUB: 60.00 SKD 2510:100.00 LSR: 50	LSR-TIME: 0.10 INT:999.75	
SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION		
UNKNOWN UNITS	1501:CPMC	UNKNOWN REPLICATES: 1
NORM FACTOR	1501:0 1.00000	
INTEGRAL THRESHOLD	1501:0.00000000	
GRAPH X-AXIS	1501:FRACTIONS	
Y-AXIS	1501:INCRM ACT	
HALF LIFE(DAYS)	1501:N	
QUENCH MODE/H	QUENCH RANGE LOW:31.00	HIGH:377.0
CALCULATE DPM/Y	CONSTANT QUENCH/H	
QUENCH LIMITS	LOW:31.00	HIGH:377.0
QUENCH CURVE COEFF		
1501: CH1 A1 4.601582 B1-0.0010090 E1-0.00000097 D1-0.0000000229		
BASELINE CORRECTION		
SAM POS CH CPM 2510X TIME EL TIME AVG HR ERR		
1 16- 1 1 0.00 ***** 1.00 0.00 1.42 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
2 16- 2 1 4.00 1024. 1.00 0.00 3.03 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
3 16- 3 1 -8.00 1501:CPMC	1.00 4.00 INTEGRAL 1501:CPMC	4.00
4 16- 4 1 -3.00 1501:CPMC	1.00 -8.00 4.61 111.0	108
5 16- 5 1 -2.00 1501:CPMC	1.00 -3.00 6.18 112.0	108
6 16- 6 1 -4.00 1501:CPMC	1.00 -3.00 7.77 111.0	108
7 16- 7 1 2421.00 4.42 1.00 10.93 111.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
8 16- 8 1 6346.00 2.60 1.00 12.31 111.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
9 16- 9 1 2757.00 4.10 1.00 14.09 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
10 16-10 1 1089.00 7.18 1.00 15.67 111.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
11 16-11 1 610.00 10.62 1.00 17.25 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
12 16-12 1 460.00 12.01 1.00 18.82 111.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
13 16-13 1 246.00 18.33 1.00 20.41 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
14 16-14 1 148.00 33.18 1.00 21.97 101.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
15 16-15 1 50.00 88.34 1.00 23.57 111.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
16 16-16 1 31.00 160.6 1.00 23.15 111.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
17 16-17 1 39.00 112.2 1.00 26.77 111.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
18 16-18 1 -1.00 ***** 1.00 28.38 110.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
19 1- 1 1 -12.00 ***** 1.00 30.02 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
20 1- 2 1 -11.00 ***** 1.00 31.60 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC

Tabela 15: Radioatividade das frações correspondentes a figura 25b.

USER: 2 1D1810 RHP	PRESET TIME: 1.00	THU 19 FEB 1987 10:21
SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRN: 002321N		
REP: 1 ACQ:IN OFFIN		
CHANNEL 1-LL: 0 181 670 251000 2.00 BKG SUB: 40.00 SKD 2510:100.00 LSR: 50	LSR-TIME: 0.10 INT:999.75	
SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION		
UNKNOWN UNITS	1501:CPMC	UNKNOWN REPLICATES: 1
NORM FACTOR	1501:0 1.00000	
INTEGRAL THRESHOLD	1501:0.00000000	
GRAPH X-AXIS	1501:FRACTIONS	
Y-AXIS	1501:INCRM ACT	
HALF LIFE(DAYS)	1501:N	
QUENCH MODE/H	QUENCH RANGE LOW:31.00	HIGH:377.0
CALCULATE DPM/Y	CONSTANT QUENCH/H	
QUENCH LIMITS	LOW:31.00	HIGH:377.0
QUENCH CURVE COEFF		
1501: CH1 A1 4.601582 B1-0.0010090 E1-0.00000097 D1-0.0000000229		
BASELINE CORRECTION		
SAM POS CH CPM 2510X TIME EL TIME AVG HR ERR		
1 16- 1 1 1.00 4200. 1.00 1.42 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
2 16- 2 1 2.00 1024. 1.00 3.03 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
3 16- 3 1 13.00 327.4 1.00 2.00 INTEGRAL 1501:CPMC	1.00 4.61 111.0	3.00
4 16- 4 1 -1.00 1501:CPMC	1.00 17.00 17.25 112.0	16.00
5 16- 5 1 1.00 4200. 1.00 7.78 111.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
6 16- 6 1 -1.00 1501:CPMC	1.00 9.37 112.0	108
7 16- 7 1 1221.00 5.68 1.00 10.94 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
8 16- 8 1 2315.00 2.88 1.00 12.52 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
9 16- 9 1 3528.00 2.57 1.00 14.10 111.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
10 16-10 1 1694.00 5.45 1.00 15.68 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
11 16-11 1 912.00 8.06 1.00 17.25 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
12 16-12 1 412.00 16.56 1.00 18.82 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
13 16-13 1 478.00 12.66 1.00 20.41 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
14 16-14 1 330.00 16.82 1.00 21.97 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
15 16-15 1 80.00 37.01 1.00 23.57 113.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
16 16-16 1 24.00 179.3 1.00 25.14 111.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
17 16-17 1 -9.00 ***** 1.00 26.77 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
18 16-18 1 3.00 1923. 1.00 28.38 111.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
19 1- 1 1 -8.00 ***** 1.00 30.02 111.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC
20 1- 2 1 -3.00 ***** 1.00 31.62 112.0	1501:CPMC	1.00 INTEGRAL 1501:CPMC

Tabela 16: Radioatividade das frações correspondentes a figura 26b.

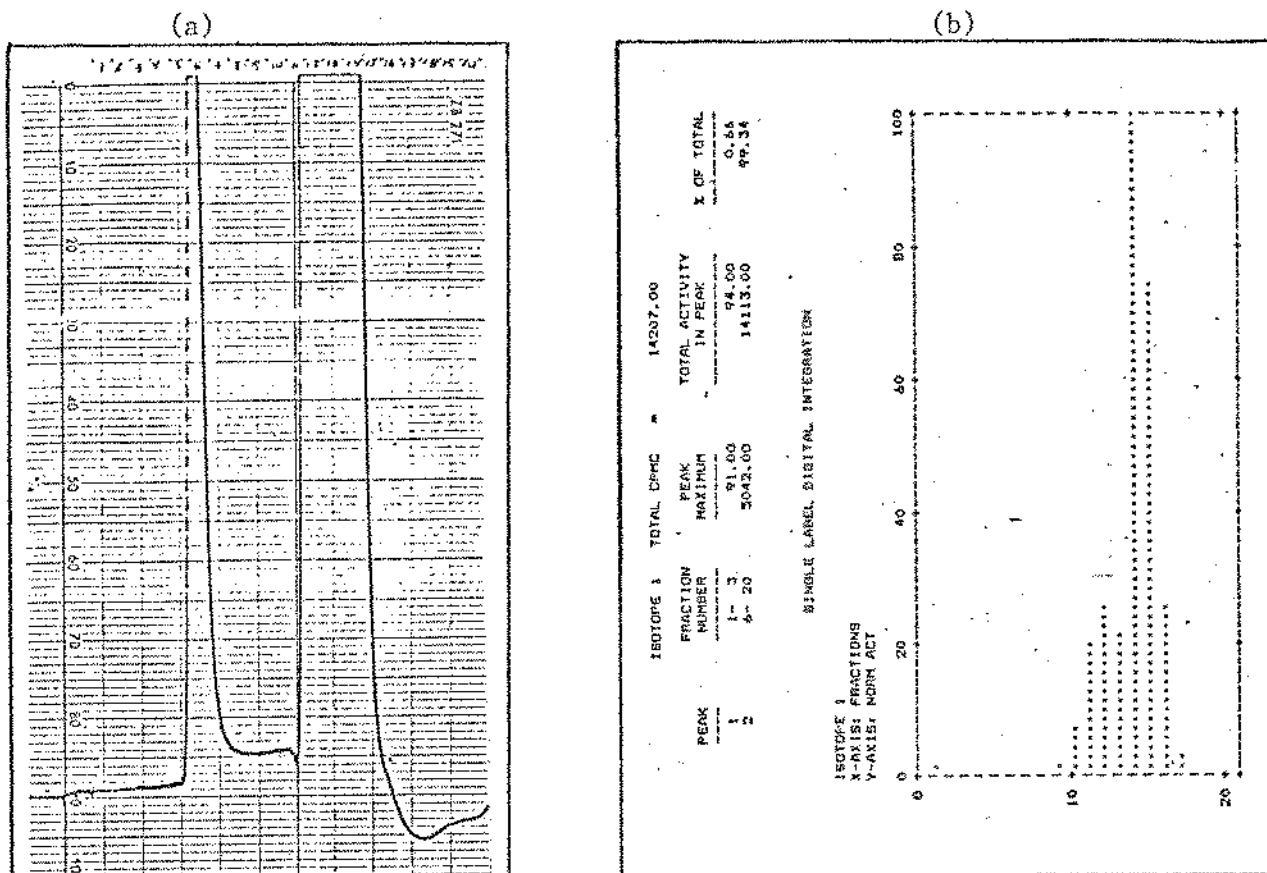


Figura 27: (a) Cromatograma das frações (7+8+9) concentradas no AMICON correspondentes a fig.24 (c/ pupulana) reagidas com dextra nase; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma.

USER: J ID:DIS RMW PRESET TIME: 1.00 FRI 20 FEB 1987 14:04
 SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRIN RS232C:N
 HW: 1 ADD:N DCF:N LSR-TIME: 0.10 INT:999.95
 CHANNEL 1-LL: 0 DL: 670 2SIGMA: 2.00 BND SUB: 40.00 BKE 2SIG:100.00 LSR: 50

SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION
 UNKNOWN ID:
 UNKNOWN UNITS IS01:CPMC
 NORM FACTOR IS01:0 1.00000
 INTEGRAL THRESHOLD IS01:0.00000000
 GRAPH X-AXIS IS01:FRACTIONS
 Y-AXIS IS01:NORM ACT
 HALF LIFE(DAYS) IS01:N
 QUENCH MODE:N QUENCH RANGE LOW:31.00 HIGH:377.0
 CALCULATE DPM:Y CONSTANT QUENCH:N
 QUENCH LIMITS LOW:31.00 HIGH:377.0
 QUENCH CURVE COEFF
 IS01: CHI A: 4.401595 B: -0.0010070 C: 0.00000597 D: -0.000000224
 BASELINE CORRECTION:N

SAM	POS	CH	CPM	2SIG	TIME	EL TIME	AVG HW	ERR
1	14-1	1	91.00	50.64	1.00	1.42	111.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	91.00
2	14-2	1	3.00	1403.1	1.00	3.01	111.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	94.00
3	14-3	1	-4.00	****	1.00	4.58	111.0	108
			IS01 CPMC :					108
4	14-4	1	-1.00	****	1.00	6.17	111.0	108
			IS01 CPMC :					108
5	14-5	1	-4.00	****	1.00	7.74	111.0	108
			IS01 CPMC :					108
6	14-6	1	-1.00	****	1.00	9.32	111.0	108
			IS01 CPMC :					108
7	14-7	1	8.00	529.2	1.00	10.89	111.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	8.00
8	14-8	1	17.00	251.5	1.00	12.48	112.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	25.00
9	14-9	1	81.00	56.36	1.00	14.05	111.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	104.00
10	14-10	1	327.00	16.94	1.00	15.63	111.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	433.00
11	14-11	1	1032.00	7.44	1.00	17.22	112.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	1465.00
12	14-12	1	1297.00	6.42	1.00	18.80	111.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	2762.00
13	14-13	1	1072.00	7.25	1.00	20.37	111.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	3835.00
14	14-14	1	5042.00	2.94	1.00	21.97	111.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	8877.00
15	14-15	1	3745.00	3.45	1.00	23.56	111.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	12622.00
16	14-16	2	1286.00	6.46	1.00	25.14	112.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	13908.00
17	14-17	1	167.00	29.51	1.00	26.77	111.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	14075.00
18	14-18	1	25.00	172.5	1.00	28.37	112.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	14100.00
19	1-1	1	8.00	529.2	1.00	30.01	113.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	14108.00
20	1-2	1	5.00	843.8	1.00	31.59	111.0	
			IS01 CPMC :				INTEGRAL IS01 CPMC :	14113.00

Tabela 17: Radioatividade das frações correspondente a figura 27b.

USER: 2 18:00 RPM	PRESET TIME: 1.00	THU 19 FEB 1987 12:28
SAMPLE RATE: 1 CYCLE REPEAT: 1 SEC:IN	RS232IN	
CH1: 1 ACIN CFFIN		
CHANNEL 1-LL: 0 LL: 470 2510MAI 0.10 INT:999.95	LSR-TIME: 0.10 BKG SUB: 40.00 BKG 2510:100.00 LSR: 50	
SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION		
UNKNOWN ID:	1501:CPMC	UNKNOWN REPLICATES: 1
NOVA FACTOR:	1501:0 1.00000	
INTEGRAL THRESHOLD:	1501:0.0000000	
GRAPH X-AXIS:	1501:FRACTIONS	
Y-AXIS:	1501:INSTR ACT	
HALF LIFE(DAYS):	1501:IN	
QUENCH MODE:IN	QUENCH RANGE LOW:31.00	HIGH:377.0
CALCULATE CPM:Y	CONSTANT QUENCH:IN	
QUENCH LIMITS:	LOW:31.00	HIGH:377.0
QUENCH CURVE COEFF		
1501: CH1 A1 4.601585 B1-0.0010099 C10.00000597 D1-0.0000000224		
BASELINE CORRECTION:IN		
SAM PDS CH CPH 2510X TIME EL TIME AVG HR		ERR
1 16- 1 1	-9.00 ***** 1.00 1.42 111.0	108
2 16- 2 1	3.00 1403. 1.00 3.02 110.0	3.00
3 16- 3 1	2.00 2102. 1.00 4.61 111.0	5.00
4 16- 4 1	-10.00 ***** 1.00 6.18 111.0	108
5 16- 5 1	-9.00 ***** 1.00 7.76 111.0	108
6 16- 6 1	18.00 327.8 1.00 9.34 108.0	18.00
7 16- 7 1	27.00 168.1 1.00 10.92 111.0	45.00
8 16- 8 1	213.00 23.49 1.00 12.49 111.0	250.00
9 16- 9 1	280.00 20.12 1.00 14.07 111.0	510.00
10 16-10 1	163.00 30.17 1.00 15.64 110.0	481.00
11 16-11 1	89.00 52.22 1.00 17.21 112.0	769.00
12 16-12 1	60.00 74.54 1.00 18.78 112.0	829.00
13 16-13 1	42.00 104.2 1.00 20.35 110.0	871.00
14 16-14 1	37.00 118.1 1.00 21.93 110.0	908.00
15 16-15 1	24.00 164.1 1.00 23.52 110.0	934.00
16 16-16 1	-6.00 ***** 1.00 25.10 110.0	108
17 16-17 1	-3.00 ***** 1.00 26.73 110.0	108
18 16-18 1	-9.00 ***** 1.00 28.35 111.0	108
19 16-19 1	-4.00 ***** 1.00 29.97 112.0	108
20 16-20 1	14.00 324.4 1.00 31.59 112.0	14.00
1501: CPMC	1.00 14.00 INTEGRAL 1501: CPMC	

Tabela 18: Radioatividade das frações correspondentes a fig. 28

USER: 2 18:00 RPM	PRESET TIME: 1.00	THU 19 FEB 1987 17:24
SAMPLE RATE: 1 CYCLE REPEAT: 1 SEC:IN	RS232IN	
CH1: 1 ACIN CFFIN		
CHANNEL 1-LL: 0 LL: 470 2510MAI 0.10 INT:999.95	LSR-TIME: 0.10 BKG SUB: 40.00 BKG 2510:100.00 LSR: 50	
SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION		
UNKNOWN ID:	1501:CPMC	UNKNOWN REPLICATES: 1
NOVA FACTOR:	1501:0 1.00000	
INTEGRAL THRESHOLD:	1501:0.0000000	
GRAPH X-AXIS:	1501:FRACTIONS	
Y-AXIS:	1501:INSTR ACT	
HALF LIFE(DAYS):	1501:IN	
QUENCH MODE:IN	QUENCH RANGE LOW:31.00	HIGH:377.0
CALCULATE CPM:Y	CONSTANT QUENCH:IN	
QUENCH LIMITS:	LOW:31.00	HIGH:377.0
QUENCH CURVE COEFF		
1501: CH1 B1 4.601585 B1-0.0010099 C10.00000597 D1-0.0000000224		
BASELINE CORRECTION:IN		
SAM PDS CH CPH 2510X TIME EL TIME AVG HR		ERR
1 16- 1 1	0.00 ***** 1.00 1.42 113.0	0.00
2 16- 2 1	-13.00 ***** 1.00 3.00 112.0	108
3 16- 3 1	-9.00 ***** 1.00 4.58 112.0	108
4 16- 4 1	-13.00 ***** 1.00 6.15 112.0	108
5 16- 5 1	-16.00 ***** 1.00 7.73 112.0	108
6 16- 6 1	-6.00 ***** 1.00 9.29 112.0	108
7 16- 7 1	5.00 847.9 1.00 10.86 113.0	5.00
8 16- 8 1	152.00 32.01 1.00 12.44 112.0	157.00
9 16- 9 1	248.00 21.15 1.00 14.13 113.0	405.00
10 16-10 1	140.00 34.40 1.00 15.70 112.0	545.00
11 16-11 1	88.00 52.22 1.00 17.28 113.0	633.00
12 16-12 1	44.00 70.18 1.00 18.86 113.0	697.00
13 16-13 1	44.00 68.18 1.00 20.44 110.0	763.00
14 16-14 1	72.00 62.85 1.00 22.02 113.0	835.00
15 16-15 1	3.00 170.0 1.00 23.60 112.0	858.00
16 16-16 1	-4.00 ***** 1.00 25.17 112.0	108
17 16-17 1	10.00 434.3 1.00 26.80 112.0	10.00
18 16-18 1	-4.00 ***** 1.00 28.41 108.0	108
19 16-19 1	-4.00 ***** 1.00 30.03 112.0	108
20 16-20 1	-9.00 ***** 1.00 31.62 113.0	108
1501: CPMC	1.00 31.62 INTEGRAL 1501: CPMC	

Tabela 19: Radioatividade das frações correspondentes a fig. 29.

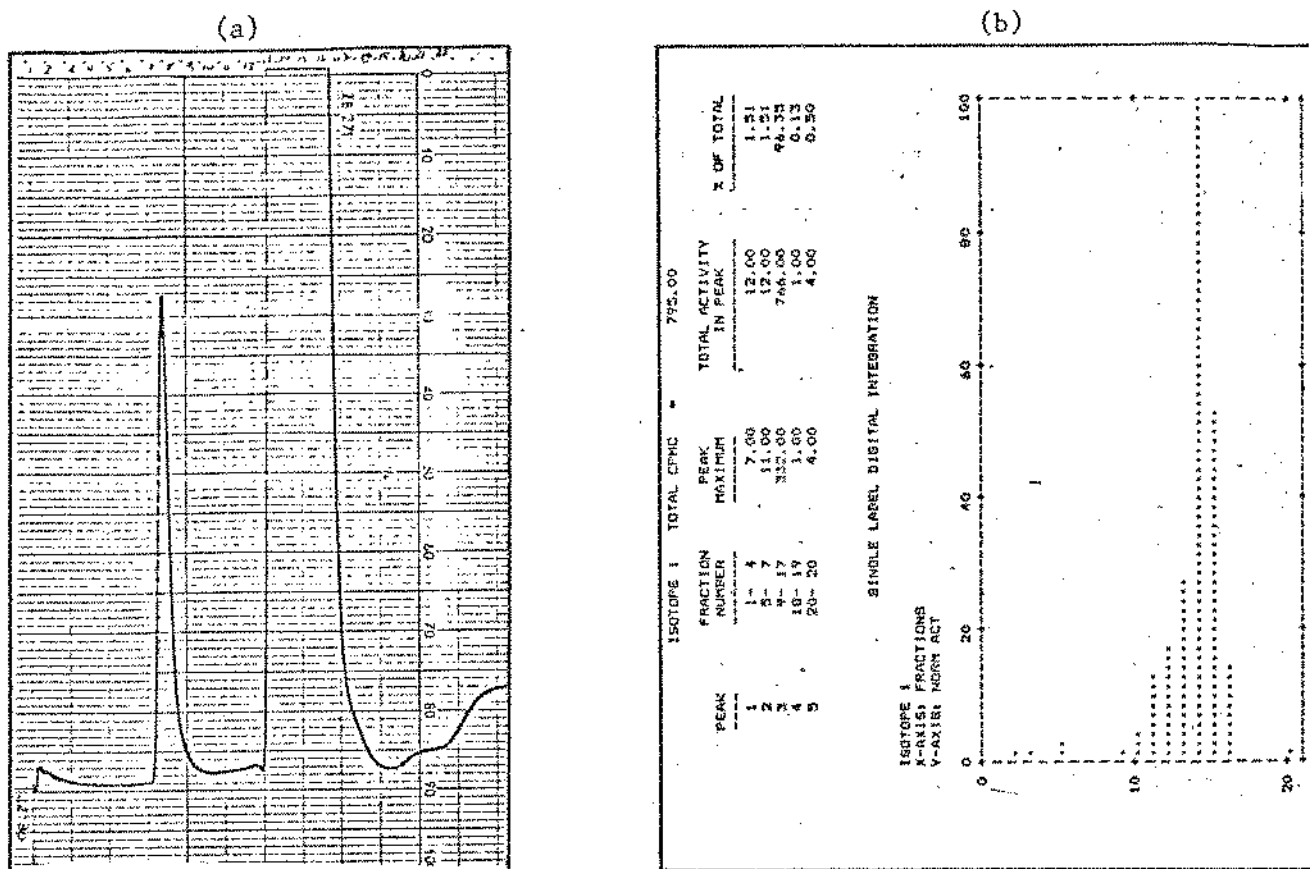


Figura 30: (a) Cromatograma das frações (7+8+9) correspondentes as frações com PM < 10000 obtidas no filtrado (AMICON) correspondente a fig. 24 reagida com dextranase; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma

USER: 2 ID: DIG PMV PRESET TIME: 1.00 FRI 20 FEB 1987 10:37
 SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SER: N RS232C: N
 HA: 1 ADD: N CCF: N LSR-TIME: 0.10 INT: 999.95

CHANNEL 1-LL: 0 UL: 670 ZSIGMA: 2.00 BKG SUB: 40.00 BKG ZSIGMA: 100.00 LSR: 50

SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION

UNKNOWN ID: UNKNOWN REPLICATES: 1
 UNKNOWN UNITS: ISOT: CPNC
 NORM FACTOR: ISOT: 0.00000
 INTEGRAL THRESHOLD: ISOT: 0.00000000
 GRAPH X-Axis: ISOT: FRACTIONS
 Y-Axis: ISOT: NORM ACT
 HALF LIFE (DAYS): ISOT: N
 QUENCH MODE: M QUENCH RANGE LOW: 31.00 HIGH: 377.0
 CALCULATE BPN: Y CONSTANT QUENCH: N
 QUENCH LIMITS LOW: 31.00 HIGH: 377.0
 QUENCH CURVE COEFF
 ISOT: CH1 A: 4.601585 B: -0.0010090 D: 0.000000597 D1: -0.0000000224
 BASELINE CORRECTION: N

SAM	POS	CH	CPH	ZSIGX	TIME	EL TIME	AVG HS	ERR
1	16-1	1	1.00 4200.1	1.00	1.42	113.0		
			ISOT: CPNC		1.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	1.00
2	16-2	1	7.00 604.1	1.00	3.02	112.0		
			ISOT: CPNC		7.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	8.00
3	16-3	1	4.00 1054.1	1.00	4.61	111.0		
			ISOT: CPNC		4.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	12.00
4	16-4	1	-11.00 *****	1.00	6.18	112.0		108
			ISOT: CPNC		-11.00			
5	16-5	1	11.00 386.1	1.00	7.76	113.0		
			ISOT: CPNC		11.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	11.90
6	16-6	1	1.00 4200.1	1.00	9.33	112.0		
			ISOT: CPNC		1.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	12.00
7	16-7	1	-2.00 *****	1.00	10.91	112.0		108
			ISOT: CPNC		-2.00			
8	16-8	1	-13.00 *****	1.00	12.49	112.0		108
			ISOT: CPNC		-13.00			
9	16-9	1	7.00 604.1	1.00	14.07	113.0		
			ISOT: CPNC		7.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	7.00
10	16-10	1	13.00 327.4	1.00	15.64	113.0		
			ISOT: CPNC		13.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	20.00
11	16-11	1	45.00 97.68	1.00	17.22	111.0		
			ISOT: CPNC		45.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	65.00
12	16-12	1	56.00 79.54	1.00	18.79	111.0		
			ISOT: CPNC		56.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	121.00
13	16-13	1	91.00 50.64	1.00	20.37	109.0		
			ISOT: CPNC		91.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	212.00
14	16-14	1	332.00 16.74	1.00	21.95	111.0		
			ISOT: CPNC		332.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	344.00
15	16-15	1	176.00 28.20	1.00	23.52	111.0		
			ISOT: CPNC		176.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	720.00
16	16-16	1	46.00 95.85	1.00	25.09	111.0		
			ISOT: CPNC		46.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	766.00
17	16-17	1	-7.00 *****	1.00	26.72	111.0		108
			ISOT: CPNC		-7.00			
18	16-18	1	1.00 4200.1	1.00	28.32	113.0		
			ISOT: CPNC		1.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	1.00
19	1-1	1	-3.00 *****	1.00	29.95	113.0		108
			ISOT: CPNC		-3.00			
20	1-2	1	4.00 1054.1	1.00	31.52	111.0		
			ISOT: CPNC		4.00	INTEGRAL	ISOT: CPNC	4.00

Tabela 20: Radioatividade de das frações correspondente a figura 30b.

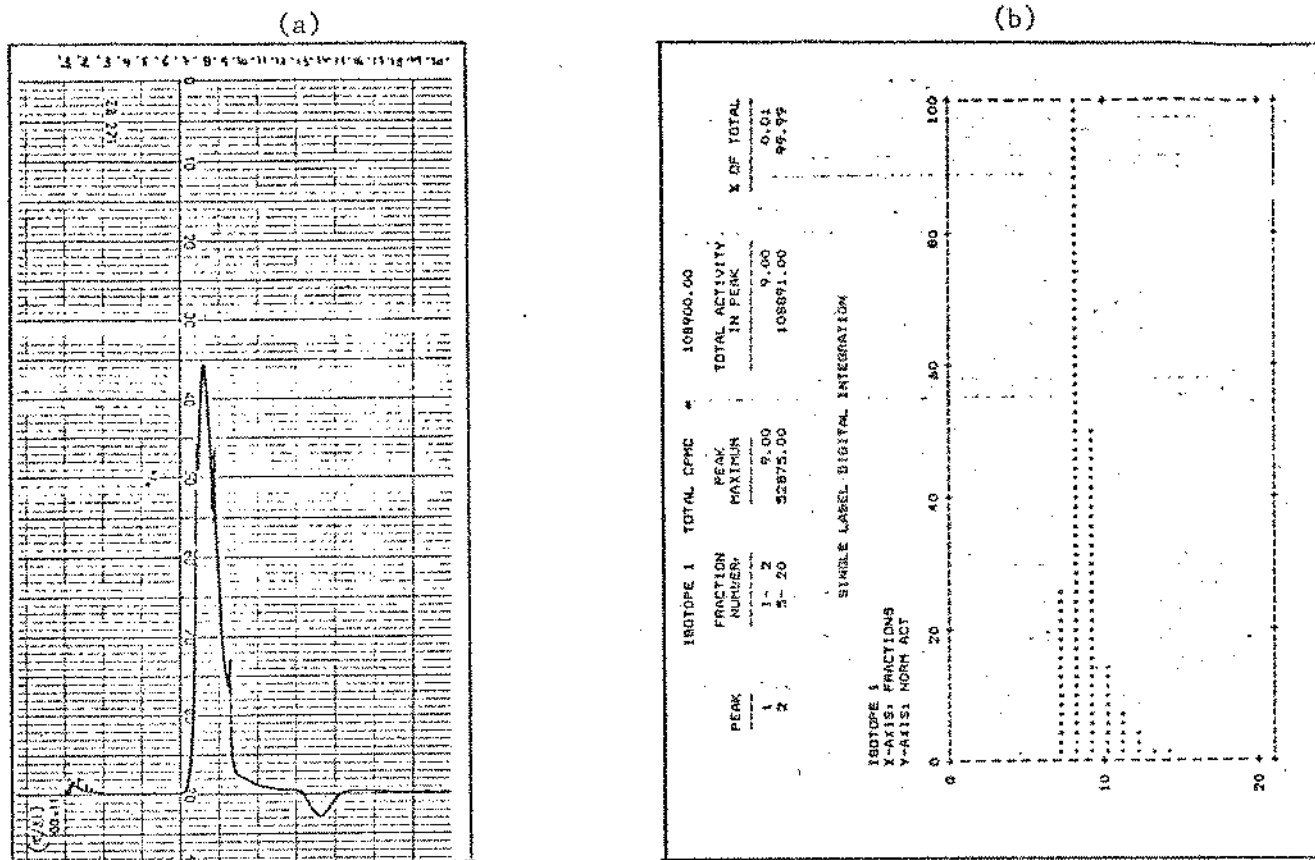


Figura 31: Resultado da reação (sacarose+dextrana-sacarase+pululana) diali sada. (a) cromatograma; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma

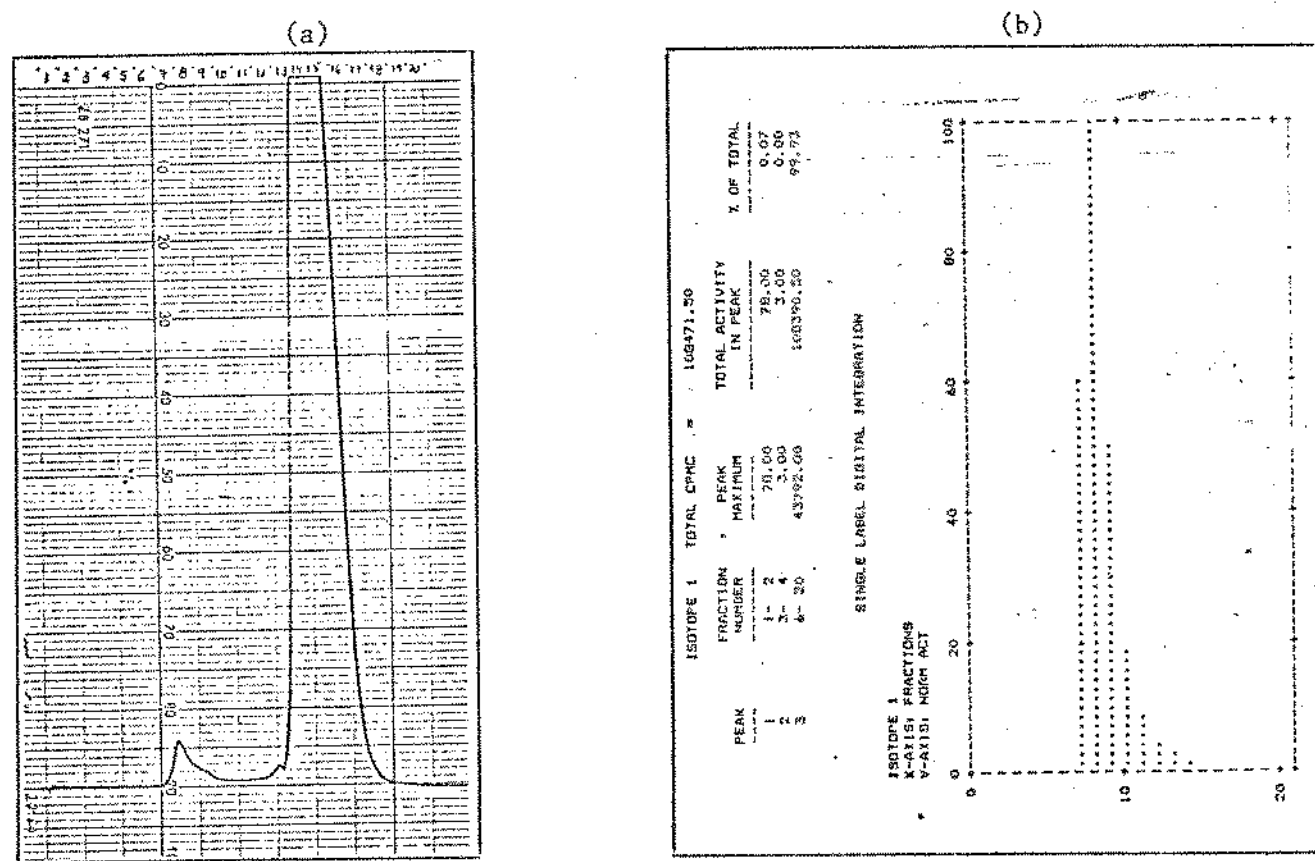


Figura 32: Resultado da reação (sacarose+dextrana-sacarase+pululana) diali sada, reagida com pululanase. (a) cromatograma; (b) radioatividade correspondente ao cromatograma.

USER: 2 10.010 RHW PRESET TIME: 1.00 WED 18 FEB 1987 18:54									
SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRN RES32IN									
HST: 1 ADDIN COFIN									
CHANNEL I-LL: 0 UL: 670 ZSIGMA: 2.00 BKG SUB: 40.00 SKB ZSIGMA: 100.00 LSR: 50.									
LSR-TIME: 0.10 INT: 999.95									
SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION									
UNKNOWN ID: 1501:CPMC									
UNKNOWN UNITS: 1501:0 1.00000									
NORM FACTOR: 1501:0.0000000									
INTEGRAL THRESHOLD: 1501:0.0000000									
GRAPH X-AXIS: 1501:FRACTIONS									
Y-AXIS: 1501:NORM ACT									
HALF LIFE(DAYS): 1501:IN									
QUENCH MODE(H): QUENCH RANGE LOW:31.00 HIGH:377.0									
CALCULATE DEPTH: CONSTANT QUENCHIN									
QUENCH LIMITS: LOW:31.00									
QUENCH CURVE COEFF: 1501:CHI AT 4.401595 B1-0.0010090 C10.00000597 D1-0.0000000224									
BASELINE CORRECTIONIN									
SAM	POS	CH	CPM	ZSIGMA	TIME	EL TIME	AVG HW	ERR	
1	16-1	1	9.00 470.9	1.00	1.42	112.0		9.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
2	16-2	1	-7.00 ****	1.00	3.02	112.0		108	
			1501:CPMC						
3	16-3	1	-10.00 ****	1.00	4.39	113.0		108	
			1501:CPMC						
4	16-4	1	-9.00 ****	1.00	4.18	113.0		108	
			1501:CPMC						
5	16-5	1	-1.00 ****	1.00	7.76	112.0		108	
			1501:CPMC						
6	16-6	1	4.00 1054.	1.00	9.33	112.0		4.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
7	16-7	1	13388.00	2.02	7.75	10.56	111.0	13392.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
8	16-8	1	23873.00	1.93	0.20	11.43	110.0	64247.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
9	16-9	1	26733.00	1.94	0.40	12.40	112.0	93502.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
10	16-10	1	7902.00	2.31	1.00	13.93	112.0	100904.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
11	16-11	1	3443.00	2.31	1.00	13.35	112.0	104349.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
12	16-12	1	20564.00	4.67	1.00	17.14	117.0	106599.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
13	16-13	1	1071.00	2.28	1.00	18.72	119.0	107670.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
14	16-14	1	415.00	0.33	1.00	20.28	111.0	108255.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
15	16-15	1	219.00	17.32	1.00	21.87	111.0	108604.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
16	16-16	1	165.00	29.44	1.00	23.44	111.0	108770.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
17	16-17	1	59.00	75.73	1.00	25.07	111.0	108829.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
18	16-18	1	30.00	184.3	1.00	26.67	111.0	108859.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
19	1-1	1	19.00	213.3	1.00	28.23	112.0	108878.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
20	1-2	1	13.00	337.4	1.00	29.89	112.0	108991.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		

Tabela 21: Radioatividade das frações correspon-
dente a figura 31b.

USER: 2 10.010 RHW PRESET TIME: 1.00 WED 18 FEB 1987 23:43									
SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRN RES32IN									
HST: 1 ADDIN COFIN									
CHANNEL I-LL: 0 UL: 670 ZSIGMA: 2.00 BKG SUB: 40.00 SKB ZSIGMA: 100.00 LSR: 50									
LSR-TIME: 0.10 INT: 999.95									
SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION									
UNKNOWN ID: 1501:CPMC									
UNKNOWN UNITS: 1501:0 1.00000									
NORM FACTOR: 1501:0.0000000									
INTEGRAL THRESHOLD: 1501:0.0000000									
GRAPH X-AXIS: 1501:FRACTIONS									
Y-AXIS: 1501:NORM ACT									
HALF LIFE(DAYS): 1501:IN									
QUENCH MODE(H): QUENCH RANGE LOW:31.00 HIGH:377.0									
CALCULATE DEPTH: CONSTANT QUENCHIN									
QUENCH LIMITS: LOW:31.00									
QUENCH CURVE COEFF: 1501:CHI AT 4.401595 B1-0.0010090 C10.00000597 D1-0.0000000224									
BASELINE CORRECTIONIN									
SAM	POS	CH	CPM	ZSIGMA	TIME	EL TIME	AVG HW	ERR	
1	16-1	1	78.00 58.34	1.00	1.42	112.0		78.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
2	16-2	1	-1.00 ****	1.00	3.03	112.0		108	
			1501:CPMC						
3	16-3	1	3.05 1493.	1.00	4.61	112.0		3.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
4	16-4	1	-12.00 ****	1.00	6.18	111.0		108	
			1501:CPMC						
5	16-5	1	-12.00 ****	1.00	7.76	110.0		108	
			1501:CPMC						
6	16-6	1	112.00 41.93	1.00	9.34	111.0		112.00	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
7	16-7	1	26107.50	1.93	0.40	10.31	110.0	26219.50	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
8	16-8	1	-43792.00	1.91	0.23	11.12	112.0	70011.50	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
9	16-9	1	22054.00	1.91	0.30	12.18	111.0	92047.50	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
10	16-10	1	8317.00	2.23	1.00	13.77	112.0	100394.50	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
11	16-11	1	3487.00	3.29	1.00	15.23	112.0	103871.50	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
12	16-12	1	2002.00	4.94	1.00	16.93	111.0	102873.50	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
13	16-13	1	1243.00	6.33	1.00	18.51	111.0	107134.50	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
14	16-14	1	497.00	7.46	1.00	20.08	112.0	107835.50	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
15	16-15	1	271.00	18.23	1.00	21.63	111.0	108125.50	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
16	16-16	1	121.00	27.13	1.00	23.24	110.0	108247.50	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
17	16-17	1	48.00	92.04	1.00	24.87	111.0	108295.50	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
18	16-18	1	39.00	133.2	1.00	26.47	110.0	108334.50	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
19	1-1	1	26.00	163.0	1.00	28.08	111.0	108360.50	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		
20	1-2	1	30.00	164.3	1.00	29.68	111.0	108390.50	
			1501:CPMC			INTEGRAL	1501:CPMC		

Tabela 22: Radioatividade das frações correspon-
dente a figura 32b.

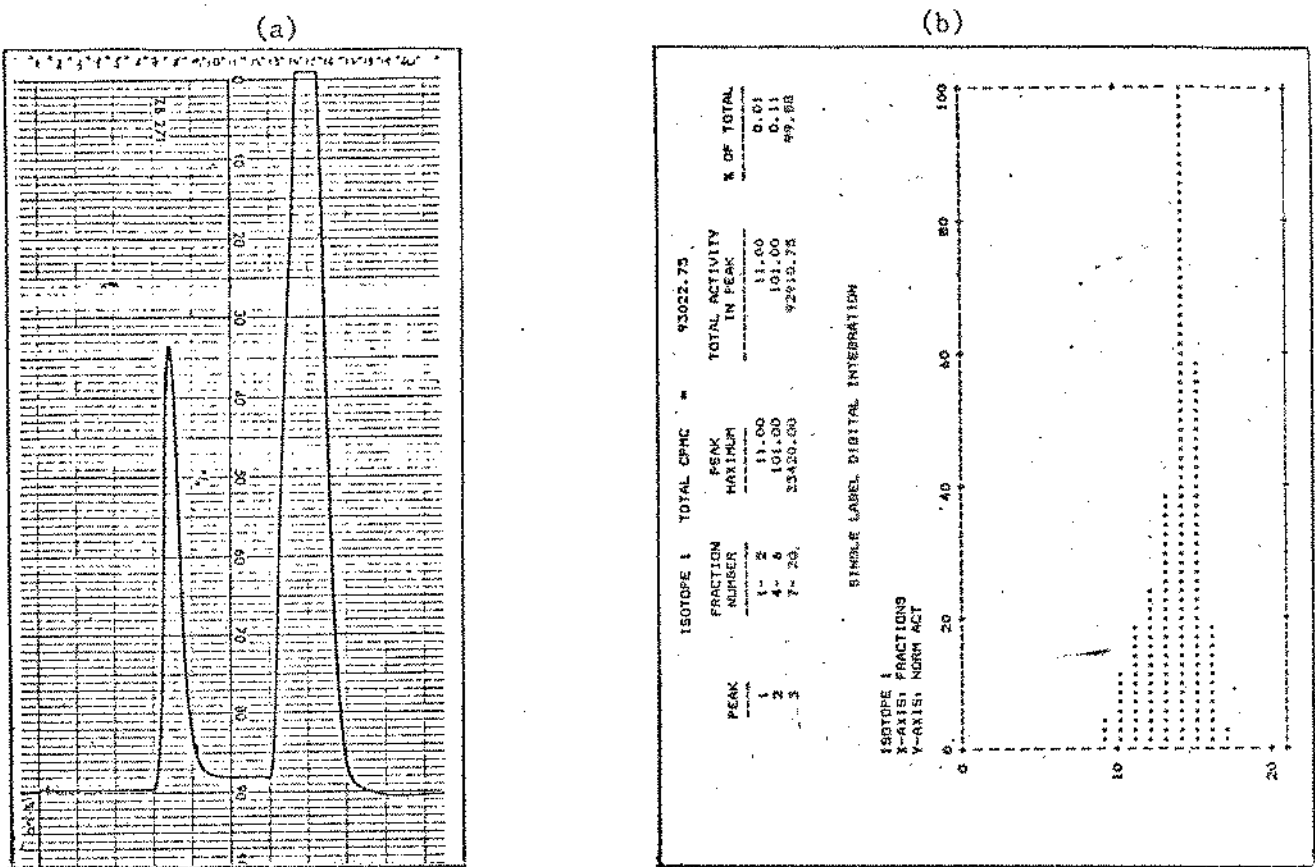


Figura 33: Resultado da reação (sacarose+dextrana-sacarase+pululana) diali- sada, reagida com dextranase. (a) cromatograma; (b) radioativi- dade correspondente ao cromatograma.

USER: 2 ID: DIG RMW PRESET TIME: 1.00 FRI 20 FEB 1987 10:04
SAMPLE REPEAT: 1 CYCLE REPEAT: 1 SCRN RS232C-N
H: 1 ACCIN OFF: N LSR-TIME: 0.10 INT: 999.95
CHANNEL 1-LL: 0 UL: A70 SIGMA: 2.00 BKG SUB: 40.00 BKG SIG: 100.00 LSR: 50

SINGLE LABEL DIGITAL INTEGRATION UNKNOWN REPLICATES: 1
UNKNOWN ID: ISO1:CPMC
UNKNOWN UNITS: ISO1:U 1.00000
NORM FACTOR: ISO1:0.00000000
INTEGRAL THRESHOLD: ISO1:FRACTIONS
GRAPH X-AXIS: ISO1:NORM ACT
Y-AXIS: ISO1:N
HALF LIFE(DAYS): ISO1:N
QUENCH MODE:M QUENCH RANGE LOW:31.00 HIGH:377.0
CALCULATE DPM:Y CONSTANT QUENCH:N
QUENCH LIMITS LOW:31.00 HIGH:377.0
QUENCH CURVE COEFF
ISO1, CH1 AT 4.401583 B:-0.0010090 C:0.000000297 D:-0.0000000224
BASELINE CORRECTION:N

SAM	POS	CH	CPM	SIGX	TIME	EL TIME	AVG Wt	ERR
1	16-1	1	11.00	386.1	1.00	1.42	113.0	
			ISO1 CPMC			11.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	11.00
2	16-2	1	-1.00	****	1.00	3.03	112.0	108
			ISO1 CPMC			-1.00		
3	16-3	1	-10.00	****	1.00	4.62	112.0	108
			ISO1 CPMC			-10.00		
4	16-4	1	-7.00	****	1.00	6.20	112.0	108
			ISO1 CPMC			-7.00		
5	16-5	1	101.00	46.06	1.00	7.78	112.0	
			ISO1 CPMC			101.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	101.00
6	16-6	1	-14.00	****	1.00	9.35	111.0	108
			ISO1 CPMC			-14.00		
7	16-7	1	30.00	144.5	1.00	10.93	111.0	
			ISO1 CPMC			30.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	30.00
8	16-8	1	151.00	32.20	1.00	12.50	112.0	
			ISO1 CPMC			151.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	151.00
9	16-9	1	1239.00	4.61	1.00	14.08	111.0	
			ISO1 CPMC			1239.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	1420.00
10	16-10	1	3823.00	5.42	1.00	15.66	111.0	
			ISO1 CPMC			3823.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	5243.00
11	16-11	1	6087.00	2.85	1.00	17.24	112.0	
			ISO1 CPMC			6087.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	11520.00
12	16-12	1	8311.00	2.25	1.00	18.82	111.0	
			ISO1 CPMC			8311.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	19641.00
13	16-13	1	12903.75	2.00	0.80	20.21	111.0	
			ISO1 CPMC			12903.75	INTEGRAL ISO1 CPMC	72344.75
14	16-14	1	33420.00	2.00	0.30	21.07	111.0	
			ISO1 CPMC			33420.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	85964.75
15	16-15	1	19640.00	1.94	0.55	22.19	111.0	
			ISO1 CPMC			19640.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	95604.75
16	16-16	1	6287.00	2.61	1.00	23.77	111.0	
			ISO1 CPMC			6287.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	91891.75
17	16-17	1	850.00	8.45	1.00	25.39	111.0	
			ISO1 CPMC			850.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	92741.75
18	16-18	1	108.00	43.33	1.00	26.99	112.0	
			ISO1 CPMC			108.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	92847.75
19	1-1	1	28.00	154.5	1.00	28.67	112.0	
			ISO1 CPMC			28.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	92877.75
20	1-2	1	33.00	151.8	1.00	30.20	112.0	
			ISO1 CPMC			33.00	INTEGRAL ISO1 CPMC	92910.75

Tabela 23: Radioatividade das frações correspondente a figura 33b.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES:

Pelo trabalho realizado nos é possível chegar às seguintes conclusões:

- a presença de maltodextrina e pululana não interferiu na cinética de reação da enzima dextrana-sacarase. Sendo que o tempo de 3,5 h de reação foi suficiente para a taxa de síntese desejada.
- o emprego da α -amilase como método para separar a maltodextrina da dextrana, bem como o da pululanase para separar a pululana da dextrana, mostraram-se eficientes.
- o uso do microconcentrador AMICON para concentrar moléculas de peso molecular acima de 10.000 daltons, assim como o uso da diálise, mostrou ser o melhor procedimento de concentração e eliminação de pequenas moléculas radioativas.
- a enzima dextrana-sacarase produzida por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F não efetua a glicosilação de maltodextrina com peso molecular médio de 30000, nem da pululana com peso molecular de 200000
- na presença de pululana e maltodextrina ocorre a síntese de dextrana de baixo peso molecular (<10000).

Como recomendação para trabalhos futuros pode-se sugerir:

- uso de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) como forma de acelerar o andamento das experiências e melhor identificar os produtos de reação
- continuar as experiências de glicosilação com outros polissacarídeos

- verificar mais aprofundadamente a síntese de dextrana de baixo PM em presença de outros oligossacarídeos
- testar dextrana-sacarase provenientes de outras linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* que sejam menos específicos.
- devido a possibilidade detectada de ter ocorrido glicosilação em moléculas de pululana de peso molecular menor que 10000, sugere-se a verificação deste fato utilizando a metodologia de radioatividade associada à HPLC

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ALSOP, R.M. - "Industrial Production of Dextran. Progress in Industrial Microbiology. (Microbial Polysaccharides) vol. 18, 1-44, 1983.
- 2- ASPINALL, G.O. - "Classification of polysaccharides". The polysaccharides, 2, 1-9, Academic Press, N.Y., 1983.
- 3- AURIOL, D. - "Production et Purification en Continu de la Dextrane Saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F". These de Docteur Ingenieur nº 144, INSA - Toulouse, França, 1985.
- 4- BESSIERE, F. - "Etude de la Dextrane saccharase: Potencialité de Transfert sur des Accepteurs proteiques". DEA-INSA, Toulouse, 1986.
- 5- EBERT, K.H. e SCHENKS, G. - "Mechanisms of biopolymer growth: The formation of dextran and levan". Adv. in Enzimol., 30, 179-221.
- 6- GRIER, T.J. e MAYER, R.M. - "Dextranucrase: Studies on Donor Substrate Specificity". Archives of Biochemistry and Biophysics, 212, nº 2, December, 651-659, 1981.
- 7- HEHRE, E.J. - "Polysaccharide Synthesis from disaccharides. I. Dextranucrases". Methods in Enzymology". Colowick S.P. e Kaplan N.O., Academic Press., New York, I, 178-184, 1955.
- 8- ITAYA, K. e YAMAMOTO, T. - "Dextranucrase as an enzyme associating with alkaline earth metal ions". Agr.Biol.Chem., 34, 1187-1192, 1975.
- 9- JEANES, A.R. - "Characterization of dextran from four types of *Leuconostoc mesenteroides*". J. Bacteriol., 71, 167-173, 1956.

- 10- JEANES, A.R. - "Preparation of dextran from growing *Leuconostoc* cultures". *Methods in Carbohydr. Chem.*, 5, 118-127, 1965.
- 11- JEANES, A.R. - "Extracellular Microbial polysaccharides new hydrocolloides of interest to the food industry". *Food Technol.*, 28(5), 34-40, May, 1974.
- 12- JUNG, S.M. e MAYER, R.M. - "Dextranucrase Donor Substrate Reactions". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 208, nº 1, April, 15, 288-295, 1981.
- 13- KABOLI, H. e REILLY, P.I. - "Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextranucrase". *Biotechnol. Bioeng.*, 22(5), 1055-1069, 1980.
- 14- KOBAYASHI, M. e MATSUDA, K. - "Purification and properties of the extracellular dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299". *J. Biochem.* 79, 1301-1308. 1976.
- 15- LAWFORD, G.R.; KLINGERMAN, A. e WILLIAMS, T. - "Dextran biosynthesis and dextranucrase production by continuous culture of *Leuconostoc mesenteroides*". *Biotech. and Bioeng.*, 21, 1121-1131, 1979.
- 16- LOPES, A. - "Production, purification et imobilization de la dextranase-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F". Tese de Deteur Ingenieur nº 26, INSA-Toulouse, França, 1979.
- 17- MARIBONA, J.L. e BELLO, O.M. - "La dextrana" *Asociación de Técnicos azucareros de Cuba-Boletim Oficial*, 21, 65-73, 1966.
- 18- MARTENS, I.S.H. - "Produção, purificação, caracterização e viabilidade de aplicação de dextranase de *Penicillium* sp". Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1986.

- 19- McNEIL, K.E. e INKERMANN, P.A. - "Preliminary studies on the deterioration of long-standing burnt cane". Proc. Queensland Soc. Sugar Cane Technol., 44, 19-27, 1977.
- 20- MILLER, A.W. e ROBYT, J.F. - "Stabilization of dextran-sucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F by nonionic detergents, polyethylene glycol an high molecular weight dextran". Biochem. Biophys. Acta, 785, nº 3, 89-96, 1984.
- 21- MILLER, A.W.; EKLUND, S.H. E ROBYT, J.F. - "Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F". Carbohydr. Res., 147, 119-133, 1986.
- 22- MILLER, A.W. e ROBYT, J.F. - "Activation and inhibition of dextransucrase by calcium". Biochem. Biophys. Acta., 880, nº 1, 32-39, 1986.
- 23- MURPHY, P.T. e WHISTLER, R.L. - "Dextran" in WHISTLER, R.L. e BEMILLER, J.N. (eds.), Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives, 2nd., 513-542, Academic Press, N.Y., 1973.
- 24- NEELY, W.B. - "Dextran: Structure and synthesis". Adv. Carbohydr. Chem., 15, 341-369, 1960.
- 25- NEELY, W.B. e NOTT, J. - "Dextransucrase, an induced enzyme from *Leuconostoc mesenteroides*". Biochem., 1 1140, 1962.
- 26- PAUL, F.; AURIOL, D.; ORIOL, E. e MONSAN, P. - "Production and purification of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F". Enzyme Eng., 7, 267-270, 1984.
- 27- PAUL, F.; ORIOL, E.; WILLEMOT, R.M. e MONSAN, P. - "Effect of maltose in the reaction of highly purified *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase: Kinetic studies and product

characterization". Third European Congress on Biotechnology, 383-388, 1984.

- 28- PAUL, F.; ORIOL, E.; AURIOL, D. e MONSAN, P. - "Acceptor reaction of a highly purified dextransucrase with maltose and oligossaccharides, application to the synthesis of controlled-molecular-weight dextrans". Carbohydr. Res. 149, 433-441, 1986.
- 29- QUEIROZ, J.H. - "Contribuição ao Estudo da Produção de Dextrana-Sacarase por *Leuconostoc mesenteroides*". Tese de Mestrado, Fac. Eng. Alimentos, 1987.
- 30- ROBYT, J.F.; KIMBLE, B.K. e WALSETH, J.F. - "The mechanism of dextransucrase action: direction of dextran biosynthesis". Arch. Biochem. Biophys., 165, 634-640, 1974.
- 31- ROBYT, J.F. e TANIGUCHI, H. - "The mechanism of dextransucrase action: biosynthesis of branch linkages by acceptor reactions with dextran". Arch. Biochem. Biophys., 174, 129-135, 1976.
- 32- ROBYT, J.F. e CORRIGAN, A.J. - "The mechanism of dextransucrase action: activation of dextransucrase from *Streptococcus mutans* OMZ 176 by dextrans and the non existence of the primer requirement for the synthesis of dextran". Arch. Biochem. Biophys., 183, 726-731, 1977.
- 33- ROBYT, J.F. e WALSETH, T.F. - "The mechanism of acceptor reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase". Carbohydr. Res., 61, 443-445, 1978.
- 34- ROBYT, J.F. e WALSETH, T.F. - "Production, purification and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*". Carbohydr. Res., 68, 95-111, 1979.

- 35- ROBYT, J.F. - "Mechanism of action of dextransucrase". Proc. Symp. Mechanism of saccharide polymerisation and dipolymerisation. - Miami Beach, 1978. Publ. Academic Press, 43-45, 1980.
- 36- ROBYT, J.F. e EKLUND, S.H. - "Relative, effect quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase". Carbohydr. Res. 121, 279-286, 1983.
- 37- SANDFORD, P.A. - "Exocellular microbial polysaccharides". Adv. in Carbohydr. Chem. and Biochem., 36, 265-313, 1979.
- 38- SANDFORD, P.A. e BAIRD, J.- "Industrial utilization of polysaccharides". The Polysaccharides, vol.2, Academic Press, N.Y, 412-490, 1983.
- 39- SIDEBOTHAM, R.L. - "Dextran". Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 30, 371-444, 1974.
- 40- TAILLANDER, P. - "Glycosilation de Polyglucanes par la dextran-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F".
- 41- TSUCHIYA, H.M.; KOEPESELL, H.J.; CORMAN, J.; BRYANT, G.; BOGARD, M.O.; FEGER, V.H. e JACKSON, R.W. - "The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*". J. Bacteriol., 64, 521-527, 1952.
- 42- TSUCHIYA, H.M.; HELLMAN, N.N.; KOEPESELL, H.J.; CORMAN, J.; STRINGER, C.S.; ROGOVIN, S.P.; BOGARD, M.O.; BRYANT, G.; FEGER, V.H.; HOFFMAN, C.A.; SENTI, F.R. e JACKSON, R.W.- "Factors affecting molecular weight of enzymatically synthesized dextran". J. Amer. Chem. Soc., 77, 2412-2419, 1955.
- 43- TSUCHIYA, H.M. - "Dextransucrase". Bull. Soc. Chem. Biol., 42, 1777-1787, 1960.

- 44- WELLS, J. - "Extracellular microbial polysaccharides - A critical overview". in Extracellular microbial polysaccharides, 299-313, Ed. by P. SANDFORD and A. LASKIN. Acs. Symp. Series, 45 Am. Chem. Soc. Washington DC, 1977.