

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

*Estudos sobre produção, purificação
e propriedades de glicose isomerase
de Streptomyces bikiniensis.*

571
Yong Kun Park

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Livre-Docente.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A minha família:

Arminia e Marcelo Park

AGRADECIMENTOS

O autor agradece sinceramente ao Professor Dr. André Tosello pelo incentivo e colaboração na execução deste trabalho na Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.

Agradece também, aos colegas do Laboratório de Enzimologia - desta Faculdade, pela execução dos trabalhos experimentais.

O autor também agradece ao Professor José Otamar Falcão de Moraes, Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), pela confirmação de taxonomia de microrganismos.

Í N D I C E

	<u>página</u>
RESUMO	i
SUMMARY	iv
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
MATERIAL E MÉTODOS	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
CONCLUSÕES	40
QUADROS	44
FIGURAS	56
BIBLIOGRAFIA	77

RESUMO

Isolou-se da terra, 650 cepas de microrganismos e examinou-se a atividade que cada uma possuía de isomerizar d-glicose. Encontrou-se uma linhagem de Streptomyces sp., com alta atividade de produção da enzima quando incubada em meio de cultura contendo xilose como indutor. Verificou-se que esta enzima é intracelular, e a cepa em questão foi identificada como Streptomyces bikiniensis (Johnson e Waksman, 1947).

Descobriu-se que a glicose isomerase de Streptomyces bikiniensis é efetivamente induzida por xilose, enquanto que xilana induz a enzima de maneira mais branda. Da mesma forma, d-Arabinose, L-Rhamnose, d-frutose, d-manose e d-ribose, produzem baixa indução da glicose isomerase.

Purificou-se a glicose isomerase de Streptomyces bikiniensis por fracionamento com sulfato de amônio, DEAE-celulose e filtração com Sephadex G-200. Através de eletroforese de gel poli-acrilamida, encontrou-se que a enzima glicose isomerase purificada era homogênea.

As propriedades cinéticas da glicose isomerase, foram estudadas e os resultados obtidos, foram comparados com a glicose isomerase produzida por outros microrganismos. Verificou-se também, que os substratos adequados para a enzima, são: d-xilose, d-ribose e d-glicose, com os respectivos valores de Km:

0,07, 0,11 e 0,26 M. Esta enzima, mostrou possuir maior afinidade para xilose do que para ribose ou glicose. O peso molecular da enzima foi calculado por eletroforese de gel de SDS-poliacrilamida e encontrou-se ser 52.000.

A influência do pH sobre a atividade enzimática, foi verificada usando-se tampão fosfato e tampão tris. Encontrou-se que o pH ótimo para esta enzima se encontra entre 8 e 9. Verificando-se a atividade enzimática em diferentes temperaturas, descobriu-se que sua temperatura ótima é de 80°C. Esta enzima é altamente termoestável.

O estudo sobre o efeito de íons metálicos sobre a atividade da isomerase de Streptomyces bikiniensis, mostrou que a isomerização de glicose foi altamente ativada por Mg^{2+} e Co^{2+} , e que sofreu baixa ativação com Mn^{2+} e Ni^{2+} . Cobalto, manganês e magnésio, ativaram efetivamente a isomerização de xilose e de ribose. Observou-se também, que cobalto e Mg^{2+} , inibiram a desnaturação térmica da enzima.

Descobriu-se ainda, que glicose isomerase também isomeriza eficazmente d-xilose e d-ribose, e, em menor extensão, L-ramnose e d-arabinose para suas respectivas cetoses.

A glicose isomerase de Streptomyces bikiniensis foi testada para a isomerização de glicose a frutose, incubando-se uma mistura da enzima e várias concentrações de glicose em tampão

fosfato 0,05 M, pH 7,2, contendo 5 mM MgSO_4 e 0,05 mM CoCl_2 a várias temperaturas. Verificou-se que a isomerização máxima de glicose a frutose (50%), deu-se incubando-se a 70°C por 70 horas, em concentração de enzima e substrato adequados.

SUMMARY

Six hundred fifty strains of microorganism were isolated from soil and screened for d-glucose isomerizing activity. It was found that a strain of Streptomyces sp. produced high activity of glucose isomerizing enzyme in culture medium containing xylose as inducer. The glucose isomerizing enzyme was intracellular enzyme. This strain was identified as Streptomyces bikiniensis (Johnstone and Waksman, 1947).

It was found that xylose effectively induced glucose isomerase of S. bikiniensis and to a lesser extent, xylan. d-Arabinose, L-Rhamnose, d-fructose, d-Mannose and d-ribose also induced slightly the enzyme.

The glucose isomerase of S. bikiniensis was purified by fractionation with ammonium sulfate, DEAE-cellulose column chromatography and gel filtration on Sephadex G-200. The purified glucose isomerase was found to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis.

Kinetic properties of purified glucose isomerase were studied and the results were compared with glucose isomerase from other strains of microorganism. D-Xylose, d-Ribose and d-glucose served as effective substrates for the enzyme with respective K_m values of 0,07, 0,11 and 0,26 M. This enzyme exhi

bits greater affinity for xylose than for ribose or glucose.-
Molecular weight for the enzyme was measured by SDS-polyacryl
amide gel eletrophoresis and found to be 52.000.

The effect of pH on enzyme activity was examined in posphate-
buffer and tris buffer and the optimum pH was between 8 and 9.
The enzyme activity at various temperatures was examined and-
the optimum temperature was found to be 80°C. The enzyme was
highly thermostable.

The effect of metal ions on S. bikiniensis isomerase activity
shows that isomerization of glucose was activated most effec-
tively by Mg^{2+} and Co^{2+} , and slightly by Mn^{2+} and Ni^{2+} . Isome
rization of ribose was also activated effectively by Mg^{2+} , -
 Mn^{2+} and Co^{2+} . Cobalt and Mg^{2+} also inhibited thermal denatu-
ration of the enzyme.

It was found that the glucose isomerase also effectively iso-
merizes d-xylose and d-ribose, and to a lesser extent L-rham-
nose and d-arabinose to their respective ketoses.

The glucose isomerase from S. bikiniensis was examined for i-
somerization of glucose to fructose in batch system by incuba
ting a mixture of the enzyme and various concentrations of -
glucose in 0,05 M phosphate buffer, pH 7,2 containing 5 mM -
 $MgSO_4$ and 0,5 mM $CoCl_2$ at various temperatures. It was found-

that maximum isomerization of glucose to fructose (50%) was reached when optimum concentration of enzyme and substrate- was incubated at 70°C for 70 hours.

INTRODUÇÃO

Este trabalho tem por objetivo, contribuir para o aproveitamento do amido para a alimentação humana, e fornecer esclarecimentos sobre as características bioquímicas da glicose isomerase de Streptomyces bikiniensis.

A enzima que produz a isomerização de glicose a frutose, foi descoberta por Marshall e Kooi em 1957 (6) e posteriormente, outros pesquisadores encontraram vários microrganismos também produtores dessa enzima.

A glicose isomerase, foi recentemente empregada para a produção de frutose a partir do amido, através de processos enzimáticos. Portanto, é uma enzima de significativa importância sob o ponto de vista alimentício.

Isolamos do solo uma nova cepa de microrganismo produtor de glicose isomerase, com atividade bastante elevada. Identificamo-na como Streptomyces bikiniensis. Utilizando esta cepa, estudamos a produção, purificação e as características bioquímicas da enzima glicose isomerase.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Cohen (1) pesquisou a pentose isomerase de Escherichia coli. A pentose isomerase, cataliza a interconversão entre d-arabinose e ribulose. A produção de pentose isomerase foi conseguida, inoculando-se uma cepa de Escherichia coli em meio de cultura - contendo d-arabinose, sem a presença da qual não há possibilidade de se produzir a enzima pentose isomerase. O produto final que se obtém de d-arabinose pela ação da enzima, é determinado através de reações de cisteína-carbazol, e também por cromatografia de papel. Cohen verificou ainda, que, usando-se borato ou íons hidroxila, pode-se estimular a isomerização de d-arabinose e ribulose.

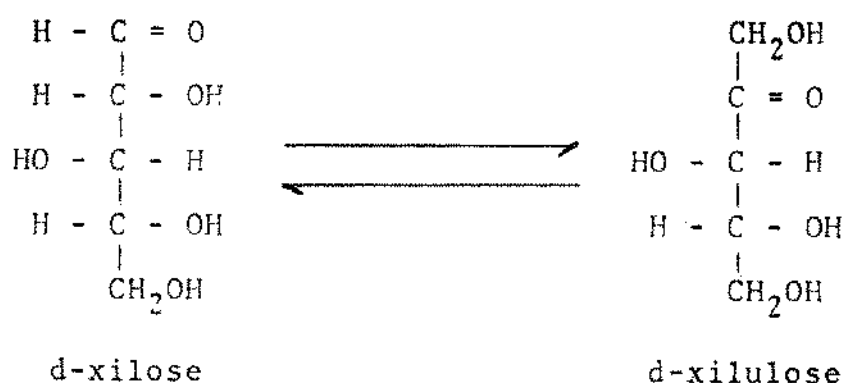
Mitsubishi e Lampen (2), relataram sobre a conversão de d-xilose a d-xilulose por extrato de Lactobacillus pentosus que, quando cultivados em meio de cultura que contenha d-xilose, produzem a enzima. No entanto, se houver ausência de d-xilose no meio de cultivo, o microrganismo não fabrica a enzima. A enzima de Lactobacillus pentosus atua especificamente com d-xilose, portanto, denominaram-na xiloisomerase. A velocidade de isomerização de xilose por esta enzima, é da mesma ordem que aquela de fosforilação de xilose pela mesma enzima. Relataram também, que em presença de ATP, a fosforilação de xilulose se dá mais rapidamente que a fosforilação de xilose.

Hochster e Watson (3) relataram que xilose isomerase de Pseudomonas hydrophila cataliza a interconversão de d-xilose e d-xilulose. Estudaram algumas propriedades desta enzima, tais como: resistência térmica, solubilidade, especificidade de substrato e pH ótimo. Após a isomerização de d-xilose a d-xilulose pela ação desta enzima, a mistura de reação (substrato + enzima), continha 84% de d-xilose e 16% de d-xilulose. Ao se adicionar borato à mistura de enzima e substrato, conseguiu-se a máxima isomerização, ou seja, 81,5% de xilulose. Verificou-se também, que não houve formação de d-ribulose nesta experiência.

Slein (4) pesquisou a enzima que cataliza a isomerização de d-xilose a d-xilulose e chamou-a xiloseisomerase. Esta enzima foi encontrada em extrato de Pasteurella pestis, que foi cultivado em meio de cultura que continha d-xilose. A xiloseisomerase, para mostrar atividade enzimática, requer grupos -SH e íons metálicos como Mg^{2+} e Mn^{2+} , e o seu pH ótimo foi encontrado como sendo, aproximadamente, 8. Esta enzima foi inibida, não competitivamente, por tampão (+tris(hidroxi-metil)-aminometano). Extrato bruto de Pasteurella pestis A-1122, cultivado em meio de cultura contendo d-xilose, produziu também xilulo-quinase, que pode produzir a fosforilação de d-xilulose, se em presença de Adenosinatrifosfato (ATP). Entretanto, não pode catalizar a fosforilação de d-xilose.

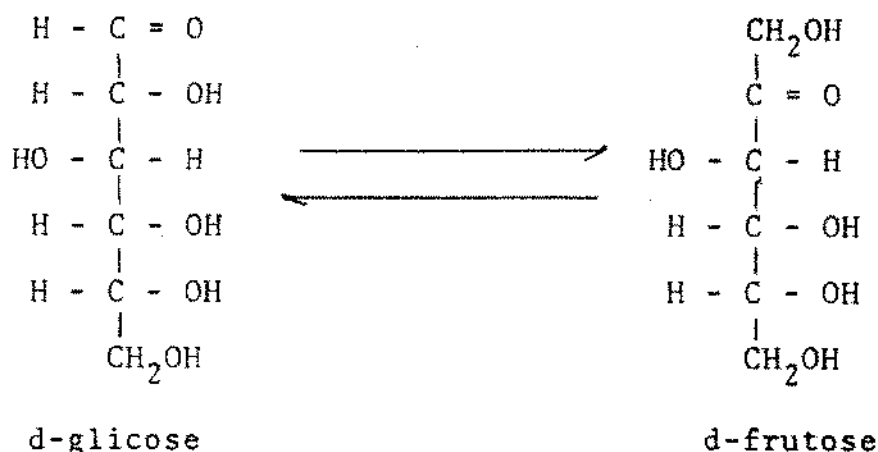
Palleroni e Doudoroff (5) encontraram a enzima manose isomerase de Pseudomonas saccharophila mutante F-1, que desperta muito interesse, visto ser a primeira enzima que possui alta afinidade com hexoses livres. Verificaram também, que a cepa original de Pseudomonas saccharophila não produz manose isomerase, quando se utiliza meio de cultura que contenha sacarose ou frutose. Palleroni e Doudoroff purificaram a manose isomerase de Pseudomonas saccharophila, mutante F-1, e estudaram suas propriedades enzimáticas. Puderam relatar também, que esta enzima não somente cataliza a interconversão de d-manose a d-frutose, como também de d-lixose a d-xilulose, e d-ramnose a d-ramnulose (6-deoxi-d-frutose).

Xilose isomerase (d-xilose cetol isomerase) (EC.5.3.1.5.), é a enzima que cataliza a interconversão de d-xilose a d-xilulose.



Até o momento, xilose isomerase foi encontrada em extratos de Lactobacillus pentosus (2), Pseudomonas hydrophila (3) e Pasteurella pestis (4), os quais foram cultivados em meio de cultura contendo xilose, que age como indutor da enzima.

Marshall e Kooi (6) relataram que o extrato de Pseudomonas hydrophila ou células de Pseudomonas hydrophila liofilizadas, - crescidas em meio de cultura contendo xilose, produziu não somente a isomerização de xilose, mas também d-glicose a d-frutose, e que a enzima apresenta melhor afinidade para d-xilose - ($k_m = 3.10^{-3}M$, $pH = 7,5$, $30^{\circ}C$), do que para d-glicose ($k_m = 0,5 M$, $pH = 8,0$, $40^{\circ}C$).



Takasaki e outros (7) isolaram uma cepa de Bacillus megaterium que produz enzima especificamente intracelular, durante a incubação em meio de cultura contendo glicose. Após um estudo - das propriedades da enzima, concluíram que a glicose isomerase de Bacillus megaterium, necessita de um cofator, que é a Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo (NAD).

Uma cepa de Aerobacter aerogenes, isolada do solo por Nataka e outros (8), apresentou produção de enzima intracelular para isomerização de glicose a frutose, quando o microrganismo é incubado em meio de cultura que contém xilose. Eles estudaram -

as propriedades da enzima e puderam relatar o pH ótimo da atividade da enzima (6,5 - 7,0), e que a ação enzimática é inibida pelo reagente -SH.

Takasaki e outros (9) isolaram do solo uma bactéria, e identificaram-na como Paracolobacterium aerogenoides. Foi estudada por eles, a produção de enzima extracelular para isomerização de glicose a frutose, utilizando-se meio de cultura contendo NH_4Cl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , NaCl , polipetona e glicose. Além da isomerização de glicose a frutose, a enzima extracelular de Paracolobacterium aerogenoides, produziu também a transformação de d-manose a d-frutose. A enzima requer Nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD) e Mg^{2+} como cofatores.

A produção de enzima para isomerização de glicose a frutose por Aerobacter cloacae, isolado da terra, foi estudada por Tsumura e outros (10). Verificaram que a enzima é intracelular e que requer xilose como indutor. A máxima atividade enzimática foi alcançada em pH 8 e temperatura de 42 a 43°C. Observaram ainda, que a enzima produz a isomerização da glicose, mas não reage com outras aldohexoses. Estes pesquisadores também relataram (11), que a enzima produzida por Aerobacter cloacae, necessita de certos ativadores metálicos, tais como: manganês, magnésio e cobalto.

Tsumura e outros (12) também estudaram a conversão enzimática de d-glicose a d-frutose pelo extrato de Streptomyces phaeochromogenus, cultivado em meio de cultura que continha d-xilo

se. A enzima produzida pelo Streptomyces phaeochromogenus catalizou, não somente glicose, como também catalizou a isomerização de d-xilose a d-xilulose. Verificaram que a enzima requer como ativador metálico Mg^{2+} e Co^{2+} , que o pH ótimo está entre 9,3 e 9,5 e que a temperatura ótima é de 80°C. Com relação ao cobalto, relataram que produz um aumento da resistência térmica da enzima.

Takasaki (13) estudou a interconversão enzimática de d-glicose e d-frutose por extrato de uma cepa de Streptomyces isolado da terra. A enzima para isomerização de glicose a frutose pode ser produzida com a inoculação do microrganismo em meio de cultura que contenha xilose ou xilana. Foi também estudada a reação cinética da glicose isomerase e encontrou-se que a conversão de glicose a frutose é uma reação endotérmica. Ele calculou então, o valor de ΔH (+2220 cal/mol), energia livre do padrão ($\Delta F = + 180$ cal/mol) e entropia ($\Delta S = +6,8$ cal/deg. mol) à temperatura de 25°C (14). Posteriormente, os mesmos pesquisadores (15), identificaram o microrganismo estudado como Streptomyces albus. Purificaram glicose isomerase usando acetona, cromatografia em coluna de DEAE-celulose e cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex.

Danno e outros (16, 17, 18) relataram que Bacillus coagulans, isolado da terra, quando incubado em meio de cultura contendo xilose, produziu glicose isomerase. Relataram também, o método de purificação de glicose isomerase pela utilização de DEAE-Sephadex A-50, além das propriedades enzimáticas. A gli

cose isomerase de Bacillus coagulans, produziu isomerização de glicose, xilose e ribose. O pH ótimo observado, foi aproximadamente 7,0 e a temperatura ótima entre 75 a 85°C. Conseguiram alta ativação da enzima com Co^{2+} . Entretanto, a enzima foi levemente ativada por Mn^{2+} e Mg^{2+} . Após purificação, a enzima não apresentou atividade para o substrato d-glicose em ausência de íons metálicos.

Yamanaka (19), isolou da terra uma cepa de Lactobacillus brevis, que produz glicose isomerase, quando se inocula o micorganismo em meio de cultura que contenha d-xilose. Posteriormente, relatou (20) o procedimento para purificação de xilose isomerase de Lactobacillus brevis, pela utilização do DEAE-Sephadex. Xilose isomerase purificada, produziu isomerização de d-glicose, d-xilose e d-ribose a cetoses, respectivamente. A constante de Michaelis (k_m) para d-xilose foi de $5.1 \cdot 10^{-3} \text{M}$, para glicose 0,92 M e para d-ribose 0,67 M. Xilose isomerase de Lactobacillus brevis, também requer Mn^{2+} como ativador enzimático.

Strandberg e outros (21) estudaram as propriedades da glicose isomerase de Streptomyces phaeochromogenus NRRL B-3559 e concluíram que a temperatura ótima para atividade enzimática é de 80°C e que o pH ótimo é aproximadamente 8,0. A constante de Michaelis encontrada para glicose foi de 0,25 e a enzima com Mg^{2+} e Co^{2+} , foi fortemente ativada. Pesquisaram também, imobilização de glicose isomerase, usando a técnica de empacotamento com gel de poliacrilamida.

Vieth e outros (22, 23) relataram um processo simples, econômico e eficiente para a imobilização de células inteiras (Streptomyces phaeochromogenus), usando colágeno como material de suporte. As células são envolvidas pelo colágeno, o qual é aderido por mecanismos convenientes. Streptomyces phaeochromogenus, contendo glicose isomerase imobilizada por esta técnica, pode operar 40 dias a 70°C na coluna.

Park e outros (24) pesquisaram a produção de glicose isomerase de Streptomyces phaeochromogenus NRRL B-3559, e encontraram que a indução de glicose isomerase não se verifica quando se utiliza no meio de cultura, somente glicose como fonte de carbono. A glicose isomerase é, no entanto, induzida ao se usar, no meio de cultura, xilose como fonte de carbono, embora aqui, o crescimento celular, em comparação ao primeiro meio de cultura, se apresente bem mais vagaroso. Em meio de cultura contendo glicose e xilose, verificou-se a indução de glicose isomerase e rápido crescimento celular. Observou-se também, que, em cultivo do microrganismo em meio de farelo de trigo e sabugo de milho hidrolizado por ácido, ocorre produção de glicose isomerase, o mesmo não acontecendo quando se usa extrato alcalino de sabugo de milho.

Park e outros (25) isolaram do solo uma nova cepa de Streptomyces sp. Em meio de cultura contendo xilose ou xilana, esta cepa produziu glicose isomerase, sendo que com xilose, verificou-se maior indução da enzima do que com xilana. Posteriormente, identificou-se esta cepa como Streptomyces ostreogri-seus.

Sanches e outros (26) pesquisaram as propriedades de d-xilose isomerase de Streptomyces albus NRRL 5778, parcialmente purificada. Descobriram que d-glicose, d-xilose, d-ribose, L-arabionose e L-ramnose atuam como substrato para d-xilose isomerase, com os respectivos valores de k_m : 86, 93, 350, 153, - 312 mM, e com valores de V_{max} : 1,23, 2,9, 2,63, 0,153 e - 0,048 $\mu\text{mol/min}$ por mg de proteína. A enzima foi fortemente ativada por 1,0 mM de Mg^{2+} e sofreu ativação parcial com 1,0 mM de Co^{2+} . Encontraram que a desnaturação térmica da enzima é protegida com cátions tais como: Mg^{2+} e Co^{2+} , que a temperatura ótima para atividade da enzima se encontra entre 70 e - 80°C e que o pH ótimo está na faixa de 7 a 9.

Park e outros (27) estudaram a produção de glicose isomerase de Streptomyces oestreoigriseus e a imobilização desta enzima. Para a isomerização de glicose a frutose, foram utilizados - três tipos de enzima: glicose isomerase imobilizada, enzima - ligada à célula e a forma livre da enzima. Viu-se que a enzima livre produziu maior isomerização que a enzima ligada à célula, após 70 horas de incubação a 65°C. Glicose isomerase imobilizada com DEAE-celulose, também produziu isomerização de glicose a frutose a 50°C e pH = 7,0. A glicose isomerase na forma livre, mostrou-se mais termoresistente do que a glicose isomerase imobilizada.

Lobry de Bruyn e Alberda van Ekenstein (28), observaram trans formação de açúcares, como a isomerização entre aldose e ceto se por processos não enzimáticos, a qual foi então denominada

transformação de Lobry de Bruyn - Alberda van Ekenstein, Esta transformação pode ser obtida com a utilização de catalizador não biológico, como está indicado na Tabela abaixo:

TRANSFORMAÇÃO NÃO ENZIMÁTICA PARA AÇÚCARES PELO MÉTODO DE
LOBRY DE BRUYN - ALBERDA VAN EKENSTEIN.

<u>AÇÚCAR USADO</u>	<u>CATALIZADOR USADO</u>	<u>PRODUTO CONVERTIDO</u>
D-Allose	Piridina	D-psicose
D-Altrose	Hidróxido de cálcio	D-psicose
D-Arabinose	Piridina	D-eritro-pentulose (D-ribulose)
	Piridina	D-eritro-pentulose o- -nitro-finilhidrazona
L-Arabinose	Piridina	L-Eritro-pentulose, L- -ribose p-bromofenilhi drazona
	Piridina	L-eritro-pentulose ("L-ribulose")
	Hidróxido de sódio	Ácido L-ribônico fenil hidrazida
Celobiose	Hidróxido de cálcio	4-O- β -D-glicopiranosil -D-manose
D-Frutose	Hidróxido de potássio	metil α -D-manopiranosil da, ácido D-glicárico
	Hidróxido de sódio	D-glicose, D-manose e nilhidrazona

<u>AÇÚCAR USADO</u>	<u>CATALIZADOR USADO</u>	<u>PRODUTO CONVERTIDO</u>
	Hidróxido de sódio	D-glicose
	Fosfato de sódio	D-manose fenilhidrazona
	tampão (pH 6,69)	
	Ácido tartárico	D-glicose dietil ditioa cetal
L-Fucose	Piridina	6-deoxi-L-tagatose
D-Galactose	Hidróxido de potássio	D-tagatose, D-sorbose
	Hidróxido de cálcio	ácido D-talônico, D-ta- gatose, D-sorbose
	Piridina	D-tagatose
L-Galactose	Piridina	L-tagatose
D-Glicose	Hidróxido de cálcio	D-frutose, metil α -D-ma nopiranosida
	Hidróxido de cálcio	D-manose fenilhidrazona
	Hidróxido de sódio	D-manose fenilhidrazona, D-frutose
	Piridina	D-frutose
	Quinolina	D-frutose
	Piridina	D-frutose, D-manose
	Hidróxido de cálcio	D-manose-1-d fenilhida zona, D-manose-1,2-d ₂ fe- nilhidrazona, D-frutose- 1-d, D-frutose-1,1-d ₂
	Hidróxido de cálcio	D-frutose-1-d-fenilosa- zona
	Ácido sulfúrico	D-frutose

<u>AÇÚCAR USADO</u>	<u>CATALIZADOR USADO</u>	<u>PRODUTO CONVERTIDO</u>
	Acetato de sódio - - ácido acético	D-frutose metilfenilosa- zona
	Amônia	D-piscose
	Resina; aniônico forte	D-manose fenilhidrazona
D-glicose-1-d	Hidróxido de cálcio	D-frutose-1-d fenilosazo na, D-manose-1-d- fenil- hidrazona
DL-glicerose	Piridina	Dihidroxiacetona
D-glicero-D-ga lacto-Heptose	Hidróxido de bário	D-mano-heptulose, D-gli- co-heptulose
	Piridina	D-mano-heptulose
D-glícero-D-gu lo-heptose	Hidróxido de cálcio	D-glico-heptulose
	Hidróxido de cálcio	D-glico-heptulose, cálcio D-glícero-D-gulo-hep tonato
D-Gulose	Hidróxido de bário	D-sorbose
	Piridina	D-sorbose
D-Idose	Hidróxido de bário	D-sorbose
Lactose	Hidróxido de cálcio	Lactulose
	Amônia	Lactulose
Maltose	Hidróxido de cálcio	Maltulose
	Amônia	Maltulose
D-Manose	Hidróxido de sódio	D-glicose, D-frutose
	Hidróxido de sódio	Metil α -D-glicopiransi- da, D-frutose, Ácido D- -glicárico

<u>ACÚCAR USADO</u>	<u>CATALIZADOR USADO</u>	<u>PRODUTO CONVERTIDO</u>
Melibiose	Amônia	Melibiulose, 6-O- α -D-ga- lacto-piranosil- β -D-mano piranose
3-O-metil-D- -glicose	Hidróxido de cálcio	3-O-metil-D-frutose
D-sorbose	Hidróxido de potássio	D-galactose . N ¹ -metil - -N ¹ -fenilhidrazona
2,3,4,6-Tetra- -O-metil-D-gli cose	Hidróxido de cálcio	2,3,4,6,-tetra-O-metil - -D-manose
2,3,4,6-Tetra- -O-metil-D-ma- nose	Hidróxido de cálcio	2,3,4,6-tetra-O-metil - -D-glicose
	Hidróxido de bário	2,3,4,6-tetra-O-metil - -D-glicose
2,3,4-Tri-O-me til-D-xilose	Hidróxido de cálcio	2,3,4-tri-O-metil-D-ly- xonic ácido fenilhidra- zido
D-Xilose	Hidróxido de cálcio	D-lyxonic ácido fenilhi drazido
	Piridina	D-threo-pentulose. ("D- -xilulose")
	Piridina	D-threo-pentulose, D-li xose (as p-bronofenilhi drazonas)

<u>AÇÚCAR USADO</u>	<u>CATALIZADOR USADO</u>	<u>PRODUTO CONVERTIDO</u>
	Piridina	D-threo-pentulose, D-li- xose
L-Xilose	Piridina	L-threo-pentulose ("L-xi- lulose")

Mendicino (29) pesquisou a isomerização de açúcares por alcali-catalizador. A isomerização de açúcar foi conseguida, utilizando-se uma mistura de açúcar, borato e hidróxido de sódio com aquecimento a 100°C. Borato provocou um aumento no grau de isomerização.

Kainuma e outros (30) e Barker, S.A. e outros (31) estudaram a isomerização de glicose a frutose pela reação de álcali-catalizado e concluíram que a isomerização de açúcares por processos não enzimáticos, não fornece alimentos em condições aceitáveis, pelo fato de produzir aparência, cor e sabor indesejáveis, além de problemas de composição.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. - Materiais

A cepa de microrganismos utilizada para este trabalho, foi Streptomyces bikiniensis. Os meios de cultura utilizados foram da Difco, e os reagentes para eletroforese de gel de poliacrilamida e eletroforese de SDS (Dodecil sulfato de sódio) poliacrilamida, foram produtos da Bio-Rad. Na execução deste estudo, fez-se uso de reagentes químicos para análise, das seguintes marcas: Merck, Carlo Erba e Barker, além dos seguintes aparelhos:

1. Fermentador (mini-ferm, New Brunswick Scientific Co.)
2. Rotary-shaker (Fermentation Design Inc.)
3. Espectrofotômetro Perkin-Elmer Double Beam Coleman, 124 D.
4. Balança analítica (Sauter)
5. Microscópio (Zeiss)
6. pHmetro (Horiba)
7. Coletor de frações (Gilson Co.)
8. Centrífuga (Beckman Model J-21 B)
9. Conjunto para cromatografia de camada delgada, marca "Desaga"
10. Banho termostático de temperatura controlada (Fabbe)
11. Aparelho de eletroforese (feito à mão)

2. - Métodos

2.1. Os microrganismos foram isolados do solo, suspendendo-se em

10 ml de água destilada e esterilizada, aproximadamente 1 g de terra, e, a seguir, inoculou-se em placas contendo solução de Czapek agar, agar batata ou agar nutriente. Após o crescimento das colônias, estas foram transferidas para tubos de ensaio - contendo meio de cultura. Cada linhagem de microrganismo foi inoculada em Erlenmeyer de 250 ml, contendo 20 ml de meio de cultura, cuja composição está descrita no item 2.3. Após 48 horas de incubação com agitação de 250 rpm a 30°C, a massa celular foi obtida pelo método citado no item 2.5. A atividade de glicose isomerase da suspensão da massa celular, foi verificada pelo método citado no item 2.10.

2.2. Foi utilizado neste trabalho, uma cepa de S.bikiniensis, e esta foi cultivada em agar inclinado em um meio contendo- 8 g de agar, 9 g de dextrose, 1 g de xilose e extrato de 25 g de batata para 250 ml de água deionizada. Após o crescimento - do microrganismo, conservaram-se os tubos de ensaio no refrigerador a 4°C. As cepas foram repicadas em intervalos de três meses.

2.3. Produção de massa celular de S.bikiniensis: A escolha do meio de cultura a ser utilizado, baseou-se em relatório - anterior (27). A composição do meio, está abaixo especificada:

peptona	=	10 g/litro
extrato de carne	=	5 g/litro
extrato de levedura	=	2,5 g/litro
NaCl	=	5 g/litro

xilose	=	10 g/litro
MgSO ₄ .7H ₂ O	=	0,5 g/litro
pH	=	7

Colocou-se 100 ml do meio de cultura, em frascos Erlenmeyer de 500 ml, devidamente fechados com tampões de algodão, e autoclavados a 121°C por 15 minutos. Após esterilização, fez-se a inoculação com a cultura de S. bikiniensis e incubou-se em "shaker" rotatório a 250 rpm, durante 30 horas a 30°C. Após incubação, as células foram separadas de 8 litros e meio de cultura, através de centrifugação a 20.000 x g por 15 minutos. O precipitado foi resuspenso em 4 litros de água deionizada e novamente centrifugado a 20.000 x g por 15 minutos. Este processo foi repetido 3 vezes.

2.4. Estudo cinético para produção de glicose isomerase e crescimento de massa celular: Ao final da incubação de S. bikiniensis, em "shaker" rotatório a 250 rpm durante 30 horas a 30°C, utilizou-se 100 ml do meio de cultura para inoculação do mini-fermentador, que continha 700 ml do mesmo meio de cultura e 1 ml de óleo de milho como anti-espumante. Incubou-se, então, a 30°C por 52 horas com agitação, mantendo-se a aeração a 1 vvm (vol/vol/min). Durante a fermentação, coletou-se periodicamente, pequenas amostras para determinação do pH, crescimento celular e atividade da glicose isomerase.

2.5. Preparação de suspensão celular para determinação da atividade enzimática: Através de centrifugação a 20.000 x g

por 15 minutos, as células foram colhidas. O precipitado foi resuspenso em água deionizada e novamente centrifugado a 20.000 x g por 15 minutos. Este procedimento foi repetido - três vezes. As células lavadas, foram resuspensas em água, - com o mesmo volume original do meio de cultura. Esta suspensão foi usada em ensaios enzimáticos.

2.6. Determinação do crescimento celular: O crescimento celular foi determinado pela medida da absorbância de uma - suspensão celular (obtida em método 2.5.) a 660 nm, em espectrofotômetro.

2.7. Preparação de extrato livre de célula: As células obtidas da maneira indicada no item 2.3., foram resuspensas em 1 litro de água deionizada e o pH foi corrigido para 7, e adicionou-se 200 mg de lisozima (Sigma Chemical Co.). Deixou-se incubando durante uma noite a 40°C, e então as células - lizadas foram centrifugadas para a remoção de resíduos insolúveis.

2.8. Purificação de glicose isomerase de S. bikiniensis: O procedimento para purificação de glicose isomerase está mostrado na Figura 21.

2.8.1. Fracionamento com sulfato de amônio: Ao extrato livre de célula obtido como mostra o item 2.7., adicionou-se 50 g de bentonita. A mistura foi agitada por 10 minutos, e centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante -

foi decantado e saturado a 80% com sulfato de amônio, e o precipitado formado após uma noite a 40°C, foi sedimentado por centrifugação, e, o sobrenadante, decantado. O precipitado - foi dissolvido em 50 ml de água deionizada e dializada contra tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0 a 4°C, durante 48 horas.

2.8.2. Cromatografia em coluna de DEAE-celulose: A solução - dializada como no item 2.8.1., foi aplicada na coluna - de DEAE-celulose. Previamente, 50 g de dietilaminoetil celulose (DEAE celulose), foram lavados com 600 ml de HCl 0,5 N e - filtrados com lã de vidro. A seguir, para remoção de todo o HCl, lavou-se com água destilada e depois com solução de NaOH 0,5 N, utilizando-se o mesmo volume que o de ácido usado anteriormente. Fez-se, novamente, lavagem com água destilada, até não haver mais reação alcalina e, finalmente, equilibrou-se o pH a 7,0 com tampão fosfato 0,05 M. A eluição foi carregada - com 120 ml de tampão fosfato 0,05 M, pH 7. Após isto, com gradiente de concentração de NaCl, fez-se a adição de uma solução molar de NaCl, a um reservatório contendo 1000 ml de tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0. Adicionou-se a solução de NaCl - 1 M ao reservatório, com uma velocidade igual à velocidade da solução eluída da coluna. Coletou-se a solução eluída da coluna em tubos na coleteroa, à velocidade de 10 ml cada 30 minutos. Ao fim da eluição, mediu-se as absorbâncias a 280 nm e - construiu-se um gráfico, onde as absorbâncias lidas estavam relacionadas com os números dos tubos.

2.8.3. Filtração em gel de Sephadex G 200: Todas as frações contendo atividade de glicose isomerase, foram obtidas pelo método citado no item 2.8.2. Juntaram-se estas frações, saturou-se a 80% com sulfato de amônio e deixou-se durante uma noite a 4°C. Centrifugou-se então, a 20.000 x g por 15 minutos os precipitados flocculantes, e dissolveu-se os sedimentos com 10 ml de água deionizada e dialisada contra tampão fosfato 0,05 M pH 7,0 a 4°C por 48 horas. A solução de enzima dialisada foi levada a uma coluna de Sephadex gel G.200 (3,5 x 70 cm), equilibrada com o mesmo tampão. Em cada 30 minutos, coletou-se a fração de 5 ml. A preparação de gel de Sephadex G.200, foi feita da seguinte - forma: suspendeu-se por 3 dias, 20 g de Sephadex G.200 em tampão fosfato 0,05 M pH 7,0. Durante este tempo, houve frequentes renovações do tampão, o que se dava sempre que ocorresse a decantação da resina. As frações que mostravam atividade de glicose isomerase, foram juntadas e dialisadas contra água deionizada por 48 horas, e o dialisado foi levado à liofilização. Dissolveu-se este material liofilizado em 5 ml de tampão fosfato - 0,05 M pH 7,0 e levou-se a uma coluna de DEAE-celulose (40 x - 2,5 cm) para novo refractionamento. Em 30 minutos, coletou-se a fração de 5 ml. Repetiu-se então, o procedimento anterior, isto é, juntou-se e dialisou-se contra H₂O deionizada por 48 horas, - as frações que apresentavam atividade de glicose isomerase, e o dialisado foi liofilizado para experiência.

2.9. Determinação da atividade de enzima:

2.9.1. A atividade da glicose isomerase foi determinada do seguinte modo: Incuba-se 1 ml da solução enzimática e 1 ml de substrato (glicose 0,8 M), em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, o qual contém 0,01 M MgSO_4 . Após uma hora, a 70°C, determina-se o ceto açúcar formado pela reação de cisteína - Carbazole (32). Uma unidade de enzima é definida como a quantidade que produz 1 μmol de ceto açúcar sob estas condições.

2.9.2. A determinação da atividade de xilose isomerase, foi realizada da mesma forma que para glicose isomerase, com a única diferença que o substrato utilizado aqui, foi xilose 0,01 M.

2.9.3. A atividade de ribose isomerase foi feita da mesma maneira que para glicose isomerase, utilizando-se como substrato, ribose 0,1 M.

2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida: Utilizou-se na eletroforese em gel de poliacrilamida da glicose isomerase purificada, um procedimento adaptado dos métodos descritos por Davis (33) e Ornstein (34). Fez-se o gel com 10% de cyanogum-41 (95% de acrilamida, 5% de N,N' - metilenobisacrilamida e 0,1% de N,N, N',N' - tetrametiletilenodiamina), 0,1% de persulfato de amônio e uma gota de Tween-80, em 100 ml de tampão tris-HCl, 0,38 M, pH 9,0. O tampão para eletrodo que se utilizou, era constituído de glicina 0,039 M e tris 0,017 M. O pH igual era a 9,0. Aplicou-se então, no topo do gel, uma mistura de 40 μl de enzima purificada e 50 μl de uma solução de sacaro

se 40%. A eletroforese foi feita a uma corrente constante de 5 mA por gel por hora. Após a eletroforese, os géis foram fixados com solução de ácido tricloroacético 50% e coloridos com brilhante de azul de Coomassie. Posteriormente, fez-se a descoloração com ácido acético 7%.

2.11. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida: O procedimento empregado para eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, foi o mesmo método descrito por Weber e Osborn (35) e Guerra e Park (36). Dissolveu-se 22,2 g de acrilamida e 0,6 g de metilenobisacrilamida em água, completando-se o volume a 100 ml. Conseguiu-se assim, uma solução de acrilamida 10%. O tampão de gel foi preparado com 7,8 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 38,6 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2 g de SDS para 1000 ml de água. Em seguida, misturou-se 15 ml do tampão de gel com 13,5 ml de solução de acrilamida, 1,5 ml de solução de persulfato de amônio (15 mg/ml) e 0,045 ml de N,N, N',N' - tetrametiletilenodiamina, que foram imediatamente colocados nos tubos com gel. Antes que o gel se polimerizasse, colocou-se uma gota de água no topo do tubo de gel. Após polimerização do gel, a água no topo deste, foi removida. 50 μ l de amostra de enzima purificada foram colocados no topo do gel. A execução da eletroforese se deu a uma corrente constante de 8 mA/gel/por tubo, durante 4 horas.- Ao término da eletroforese, os géis foram removidos dos tubos e mediu-se o seu comprimento e a distância para onde migrou o corante. Fez-se a fixação dos géis com ácido tricloro acético

50%, por uma noite, e foram deixados então, por 2 horas em azul de Coomassie em 20% de ácido tricloroacético. O comprimento dos géis após descoloração e a posição da fração azul de proteína, foram medidas. A mobilidade das frações protéicas, foram calculadas como se segue:

Mobilidade =

$$\frac{\text{dist. da migração da proteína}}{\text{comp. do gel após descoloração}} \times \frac{\text{comp. antes da coloração}}{\text{dist. da migração do corante}}$$

As mobilidades foram plotadas contra o peso molecular das proteínas padrões (como mostrado na Figura 19), e expressadas em uma escala semilogarítmica, como vemos na Figura 20. A amostra de glicose isomerase para eletroforese, foi purificada da seguinte maneira: Incubou-se a 37°C, durante uma noite, as amostras em tampão sódio-fosfato 0,01 M pH 7,0, o qual continha 1% de SDS e 1% de β -mercaptoetanol. Usou-se a concentração de proteína de 1 mg/ml. Após incubação, misturou-se 0,1 ml da amostra, 10 μ l de azul de bromofenol 0,05% e 0,1 ml de sacarose 40%, e então, procedeu-se à eletroforese.

2.12. Determinação da concentração de proteína: Fez-se esta determinação, utilizando-se o método descrito por Lowry e outros (37).

2.13. Efeito do pH sobre a atividade da glicose isomerase: Usando-se o processo indicado no item 2.9., verificou-se o efeito do pH na atividade enzimática, com tampão fosfato pH

5,7 a 8,0, e com tapão tris com pH variando entre 8,0 e 8,6.

2.14. Estudo sobre a influência da temperatura na atividade da glicose isomerase: A influência da temperatura foi verificada, empregando-se o método citado no item 2.9. para determinação de enzimas, utilizando-se várias temperaturas.

2.15. Efeito de íons metálicos na isomerização de glicose, xilose e ribose às correspondentes cetoses: Fazendo-se emprego do método indicado no item 2.9. e várias concentrações de íons metálicos, estudou-se o efeito destes na isomerização.

2.16. Tolerância térmica da atividade da glicose isomerase em presença de Mg^{2+} e Co^{2+} : Realizou-se este estudo de tolerância térmica, incubando-se a solução de enzima sem a presença de sais e a enzima em soluções de Mg^{2+} , Co^{2+} e Mg^{2+} e Co^{2+} juntos, a várias temperaturas, durante 15 minutos. Após o tratamento térmico, verificou-se a atividade da glicose isomerase como no item 2.9.

2.17. Estudo da estabilidade térmica da enzima: Tubos de ensaio contendo solução de enzima de concentração igual a 1 mg/ml, foram incubados a 50, 60 e 70°C por 24 horas. Realizou-se, periodicamente, para cada tubo de ensaio, a análise da atividade enzimática residual, pelo método citado no item 2.9.

2.18. Efeito da temperatura sobre a isomerização de glicose isomerase: O efeito da temperatura na isomerização de gli

cose a frutose, causada pela ação da enzima, foi estudada, fazendo-se a incubação de uma mistura de 5 mg de enzima e 40 mg de dextrose em 200 ml de tampão fosfato 0,05 M pH 7,2, que continha 5 mM de MgSO_4 e 0,5 mM de CoCl_2 , às temperaturas de 60, 65, 70 e 75°C, durante 70 horas, com agitação constante. Em intervalos de tempos iguais, ia-se retirando pequenas amostras, e fazia-se a determinação da frutose formada pelo método da reação de cisteína-carbazole.

2.19. Efeito da concentração de glicose na isomerização: A isomerização de glicose a frutose pela glicose isomerase, - foi estudada em um sistema descontínuo de 200 ml, o qual continha 5 mg de enzima e substrato (glicose) em concentrações de - 10, 20, 25 e 30%, em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,2, com 5 mM - MgSO_4 e 0,5 mM CoCl_2 . Todo este sistema, permaneceu durante 70 horas a 70°C. A frutose formada, foi determinada periodicamente, pela reação de cisteína-carbazole.

2.20. Determinação da atividade da xilanase: A atividade da xilanase, foi determinada pela quantidade de açúcares redutores, expresso como xilose, que é resultado da ação enzimática sobre o substrato xilana (25). Os tubos de ensaio, contendo 2,5 ml de solução de xilana a 0,5%, 2,5 ml de tampão acetato - 0,05 M, pH 4,0 e 1 ml do sobrenadante obtido pela centrifugação do meio de cultura, foram incubados durante 30 minutos a 50°C. Após a incubação, os açúcares redutores foram examinados pelo método descrito por Nelson (38) e Somogyi (39).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. - Resultados

1.1. Seleção e identificação de microrganismos para produção de glicose isomerase: Fez-se o isolamento de 650 microrganismos do solo, e estes foram analisados para a produção de glicose isomerase pelo método descrito em 2.1. Encontramos uma linhagem de Streptomyces sp., produtor de glicose isomerase intracelular em grande quantidade. A taxonomia do Streptomyces sp., foi realizada, e é a seguinte:

a) Morfologia da cadeia de esporos

Cadeia longa, reta e levemente sinuosa, com mais de 50 esporos por cadeia, como mostrado na Figura 1. Superfície do esporo: não identificada.

b) Cor da colônia

Cinza levemente acastanhada ou cinza amarelada em meio de cultura de agar de malte-levedura, agar-aveia, agar Czapek, etc.

c) Lado inverso da colônia

Pigmentos não distintos de coloração marrom levemente amarelada, amarelo claro ou levemente castanhos, em meios de cultura indicados acima, em outros meios sintéticos comuns ou em meios complexos.

d) Cor do meio

Agar peptona-levedura-ferro, e em agar-tirosina formam-se -

pigmentos escuros, e nos chamados meios orgânicos, ocorre a formação de pigmentos castanho claros.

e) Utilização de carbono

A cepa utiliza para seu crescimento, d-glicose, l-arabinose d-xilose, d-manitol, d-frutose, rhamnose e rafinose, enquanto que sacarose e inositol não são utilizados. (Meio Basal de Pridhan e Gottlieb, ISP meio 9).

f) Gelatina

Forte liquefação. Completa ao décimo segundo dia.

g) Amido

Hidrólise vigorosa.

Sumarizando-se todos os dados citados acima, o diagnóstico da linhagem de microrganismos foi feito como Streptomyces bikiniensis, de acordo com Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (40). Este diagnóstico também confirma com os trabalhos de Johnstone e Waksman (41, 42) e de Shirling e Gottlieb (43).

1.2. Estudo cinético para produção de glicose isomerase e crescimento da massa celular: Empregando-se o método descrito em 2.4., realizou-se este estudo, e os resultados conseguidos, estão apresentados na Figura 2. A máxima atividade de glicose-isomerase por 1 ml de meio de cultura, foi alcançada após 48 horas de incubação, paralelamente ao crescimento celular. Durante a fase de latência, o pH do meio decresce e durante a multiplicação das células, o pH cresce.

1.3. Purificação de glicose isomerase de S. bikiniensis: O fluxograma para purificação de glicose isomerase de S. bikiniensis está mostrado na Figura 21. Verifica-se no Quadro I, - que a atividade de glicose isomerase de extrato livre de célula, obtida através do método descrito em 2.7., foi igual a 1,2 unidades por mg de proteína. A atividade enzimática obtida segundo método de bentonita e precipitação com sulfato de amônio, foi de 6,7 unidades por mg de proteína. Houve um aumento de 8,4 unidades por mg de proteína na atividade da enzima após a purificação por cromatografia em coluna de DEAE-celulose como se observa em 2.8.2. Na Figura 3, vemos os resultados da cromatografia em coluna de DEAE-celulose, onde dentre os seis picos de proteína obtidos, o terceiro deles mostrou atividade enzimática. Com este pico que apresentou atividade, seguiu-se filtração em gel de Sephadex G-200, usando-se método indicado em 2.8.3. Os resultados estão na figura 4. O maior pico de proteína que observa, é o que contém atividade de glicose isomerase. Com este pico de proteína conseguido, fez-se nova purificação por cromatografia em coluna de DEAE-celulose. Os resultados estão na Figura 5. A atividade de glicose isomerase da enzima da proteína, foi analisada e verificada ser de 15 unidades por mg de proteína. A pureza da enzima após purificação, foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os resultados da eletroforese, estão na Figura 6 e foram obtidos a diferentes estágios nos processos de purificação. Uma amostra de enzima tratada com bentonita e submetida a fracionamento com sulfato de amônio (í-

tem 2.8.1.), mostrou numerosas bandas (Fig. 6.A.), enquanto que a amostra obtida pela purificação por cromatografia em gel de DEAE-celulose, seguida de filtração em gel de Sephadex G-200, - mostrou uma banda maior e várias bandas menores (Fig. 6.B.). Como se verifica na Figura 6.C., uma única banda foi observada para a amostra de enzima purificada na última etapa de cromatografia em gel de poliacrilamida.

1.4. Determinação do peso molecular da glicose isomerase purificada por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida: A enzima purificada por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, seguindo-se o método descrito em 2.11., e na Figura 7, verifica-se os resultados da análise. Calculou-se o peso molecular da glicose isomerase, como sendo 52.000, conforme descrita em 2.11.

1.5. Efeito do pH na atividade da glicose isomerase: O pH ótimo encontrado para a atividade da glicose isomerase, foi encontrado como sendo entre 8,0 e 9,0. O efeito do pH na atividade enzimática, foi determinado pelo processo exposto em 2.13., e os resultados estão na Figura 8.

1.6. Temperatura ótima para atividade da glicose isomerase: A temperatura para atividade da glicose isomerase foi examinada como está citado no item 2.14. Como mostra a Figura 9, a temperatura ótima foi de 80°C.

1.7. Especificidade dos substratos para a enzima: Foram testadas várias aldoses para a isomerização, pelo efeito do S.

bikiniensis, usando-se o método citado no item 2.9. Como se ve rifica no Quadro 2, a enzima isomerizou de maneira bastante e-
ficaz d-xilose, d-ribose e d-glicose, e menos ativamente se ve rificou a isomerização de L-ramnose e d-arabinose, para suas -
respectivas cetoses.

1.8. Efeito de íons metálicos sobre a atividade enzimática: Co
mo já apresentado no item 2.15, foram testadas várias con-
centrações de íons metálicos para a atividade enzimática, usan-
do-se glicose, xilose e ribose como substrato. Os resultados -
estão expressos no Quadro 3. A isomerização de glicose pela en-
zima foi eficientemente ativada por Mg^{2+} e Co^{2+} , e sofreu leve
isomerização com Mn^{2+} e Ni^{2+} . Xilose sofreu efetiva isomeriza-
ção com Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} e ribose também efetivamente isomeri-
zou com Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} . O efeito de várias concentra-
ções de íons metálicos, tais como Mg^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} na ativida-
de da glicose isomerase, foi estudado por processo indicado em
2.16., e os resultados encontram-se no Quadro 4. Magnésio (5,0
mM) e Co^{2+} (0,5 a 1,5 mM), produziram efetiva ativação na iso-
merização de glicose a frutose, enquanto que Mn^{2+} (0,25 a 0,5-
mM) e Co^{2+} (0,5 mM) combinados, produziram uma ativação muito-
mais eficiente, em comparação com magnésio e cobalto separada-
mente.

1.9. Tolerância térmica da atividade da glicose isomerase em
presença de magnésio e cobalto: A tolerância térmica da a-
tividade da enzima, foi verificada na presença de Mg^{2+} e Co^{2+} ,

tanto combinados, quanto separadamente pelo método citado no ítem 2.16. Os resultados estão apresentados na Figura 10. O íon de cobalto ou a combinação de cobalto e magnésio, inibiram a desnaturação térmica da atividade da enzima quando comparada - com não cátion.

1.10. Estabilidade térmica da enzima: A estabilidade térmica - da enzima foi estudada segundo método citado em 2.17. Os resultados podem ser verificados na Figura 11. Ao final de 24 horas de pré-incubação a 70°C, a atividade residual da enzima - era 30%, ao passo que a 60°C, era de 77%. Não houve perda da atividade enzimática a 50°C.

1.11. Cinética de reação da glicose isomerase de S.bikiniensis:

A atividade da enzima foi examinada pelo método descrito no item 2.9., usando-se várias concentrações de d-xilose, d-ribose e d-glicose, como substratos. Os valores de Michaelis-Menten (Km), foram calculados aplicando-se a equação modificada - de Lineweaver-Burk (44). Os resultados podem ser verificados - nas Figuras 12, 13 e 14. Os valores de Km encontrados, foram - de 0,07 M xilose, 0,11 M ribose e 0,26 M glicose.

1.12. Efeito da temperatura sobre a isomerização de glicose a frutose pela glicose isomerase: Este estudo foi realiza- do, usando-se o método citado em 2.18. Como mostra a Figura 15, a velocidade inicial das reações catalizadas pela enzima, au- mentou constantemente com o aumento da temperatura. Verificou- -se que a inativação térmica da enzima ocorreu rapidamente du-

rante incubação a 75°C. Observou-se também, que a isomerização de glicose a frutose pela ação da enzima à temperatura elevada, provocou uma coloração marrom, chegando-se a aquecer até decom_{po}sição da cetose.

1.13. Efeito da concentração de glicose na isomerização por glicose isomerase: A isomerização de glicose a frutose - pela glicose isomerase, foi estudada empregando-se processo in_{di}cado em 2.19., e os resultados obtidos encontram-se na Figura 16. Achou-se que a porcentagem relativa de isomerização é - diminuída em altas concentrações de glicose, embora a formação de frutose seja aumentada quando a concentração de substrato - diminui.

1.14. Indução de glicose isomerase de S. bikiniensis por várias pentoses ou hexoses: Este estudo foi feito usando - -se o método citado no item 2.3., substituindo-se xilose por outros açúcares. Como mostra o Quadro 5, encontrou-se que a xilose induz efetivamente a glicose isomerase e que a xilana, - produz uma indução em menor extensão. d-arabinose, L-ramnose, d-frutose, d-manose e d-ribose, produzem ligeira indução da enzima.

2. - Discussão

2.1. Seleção e identificação de microrganismo para produção de glicose isomerase: Como cita o ítem 1.1., uma linhagem de S. bikiniensis dos 650 microrganismos isolados, produziu glicose isomerase intracelular em alta atividade, em meio de cultura contendo xilose ou xilana como indutor. Anteriormente, muitos laboratórios descobriram vários microrganismos produtores de glicose isomerase, como cita o Quadro 6, mas ninguém ainda relatou que S. bikiniensis é produtor desta enzima. Pode-se verificar no Quadro 7, que quase todos os microrganismos requerem indutores como xilose ou xilana, exceto Arthrobacter. Lee e outros (45) relataram que três linhagens de Arthrobacter - (NRRL B-3726, NRRL B-3727 e NRRL B-3728), produzem glicose isomerase em meio de cultura com ausência de xilose como indutor. No Quadro 5, verifica-se que a glicose isomerase pode ser induzida para maior atividade enzimática por xilose ou xilana. É interessante notar, que sendo xilana um composto polímero de xilose, induz glicose isomerase de S. bikiniensis. Park e outros (25 e 52), encontraram que Streptomyces ostreogriseus também produz glicose isomerase em meio de cultura que contenha xilana, ao mesmo tempo que produz xilanase extracelular. Por outro lado, S. ostreogriseus não produz xilanase extracelular em meio de cultura que contenha xilose, mas somente glicose isomerase. Portanto, pode-se dizer que a xilanase hidroliza xilana a xilose, consequentemente, xilose induz glicose isomerase. Soube-se também, que S. bikiniensis, produz xilanase extra

celular e glicose isomerase intracelular, em meio de cultura contendo xilana (Figura 17). No entanto, quando o microrganismo foi cultivado em meio de cultivo que tinha xilose como indutor, somente se notou a produção de glicose isomerase (Figura 18). No ítem 1.14, observa-se que com d-arabinose, L-ramnose, d-frutose, d-manose e d-ribose, também ocorre a produção de glicose isomerase, porém em pequena quantidade.

2.2. Purificação de glicose isomerase de S. bikiniensis: Pu-

rificou-se glicose isomerase de S. bikiniensis pelo método apresentado em 1.3. A enzima purificada mostrou-se homogênea por eletroforese em gel de poliacrilamida. O peso molecular determinado para a glicose isomerase purificada, foi de, aproximadamente, 52.000. O processo aqui descrito para a purificação de glicose isomerase, possui algumas diferenças dos processos utilizados por outros pesquisadores (15, 18 e 20). Neste nosso procedimento, a quantidade total de glicose isomerase intracelular é liberada das células, pela digestão da parede celular com lisozima. Posteriormente, faz-se tratamento do lisado com bentonita, para remover vários materiais celulares, sem a adsorção da glicose isomerase. Após o lisado ter sido tratado com bentonita, o mesmo sofreu fracionamento com sulfato de amônio. A atividade da enzima apresentou-se maior que quando obtida por precipitação com acetona. As glicoses isomerases de Lactobacillus brevis (20), Streptomyces albus (15) e Bacillus coagulans (18), são, até o momento, as enzimas que foram purificadas e cujas propriedades

enzimáticas foram estudadas. Os processos utilizados por outros pesquisadores para a purificação das enzimas produzidas por estes 3 microrganismos, estão apresentadas no Quadro 8. Uma observação interessante que se pode fazer, e que, até hoje, não foi relatada por ninguém, é que células animais ou vegetais, produzem glicose isomerase.

2.3. Efeito do pH e temperatura na atividade de glicose isomerase de S. bikiniensis: Nota-se no Ítem 1.5., que o pH ótimo para a atividade de glicose isomerase, foi determinado como sendo entre 8,0 e 9,0, e que a ótima temperatura é de 80°C. Os resultados obtidos sobre a estabilidade térmica da enzima, foram citados em 1.10, e, em comparação com outras enzimas, a glicose isomerase mostrou-se extremamente termoestável. Além disto, verificando-se os resultados do Ítem 1.9, a tolerância térmica da enzima mostrou-se mais alta em presença de Mg^{2+} e Co^{2+} , do que na ausência de íons metálicos. Sanchez e outros (26), também obtiveram os mesmos resultados para glicose isomerase não purificada de Streptomyces albus. O pH e a temperatura ótimos para a glicose isomerase, foram valores relativamente altos. O pH ótimo e a temperatura ótima para a glicose isomerase de todos os microrganismos estudados por outros pesquisadores, estão comparados no Quadro 9, com a enzima do S. bikiniensis. O pH ótimo para a atividade de glicose isomerase de S. bikiniensis e S. albus é o mesmo, mas diferente para Bacillus coagulans e Lactobacillus brevis. Da mesma forma, as temperaturas ótimas para enzimas de S. bikiniensis e S. albus, bem como o pH, são os mesmos.

Temperatura ótima para atividade de glicose isomerase de Bacillus coagulans e Lactobacillus brevis, não foi relatada pelos autores.

2.4. Especificidade dos substratos para a enzima: A glicose isomerase de S. bikiniensis, não somente isomeriza glicose a frutose, como também produz a isomerização de outros açúcares às suas respectivas cetoses. Como vemos em 1.7, d-xilose, d-ribose, L-ramnose e d-arabinose, também atuam como substrato da enzima. No entanto, entre todos os substratos, d-xilose se apresentou com maior afinidade para com a enzima de S. bikiniensis. Sob este ponto de vista, considera-se, atualmente, que a enzima do S. bikiniensis é xilose isomerase (E.C. 5.3.1.5.), de acordo com o sistema de classificação da Comissão Internacional de Enzimas. Observa-se no Quadro 10, que xilose isomerase foi produzida por vários microrganismos, mas, Marshall e Kooi (6), descobriram e relataram que a xilose isomerase de Pseudomonas hydrophila, cataliza a isomerização de glicose a frutose e que, também 6-deoxi-d-glicose foi convertida a 6-deoxi-d-frutose por esta enzima. Mais tarde, descobriu-se que toda xilose isomerase de microrganismos, produz a conversão de glicose a frutose ou vice-versa. Sabe-se ainda, que mais recentemente, utilizou-se esta enzima para a produção de frutose a partir do amido em escala industrial. Por este motivo, a xilose isomerase é hoje chamada de glicose isomerase pela maioria dos pesquisadores.

2.5. Influência de íons metálicos sobre a atividade de glicose isomerase de S.bikiniensis: Os resultados deste estudo, estão evidenciados no item 1.8., onde pode-se verificar que Mg^{2+} , Co^{2+} foram fatores essenciais para a isomerização de glicose, e que Mg^{2+} , Co^{2+} ou Mn^{2+} mostraram-se essenciais na isomerização da xilose. Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} são essenciais para isomerização de ribose. O Quadro 11, mostra os íons metálicos imprescindíveis para a atividade enzimática de outros microrganismos. Notou-se que a glicose isomerase de quase todos os microrganismos, necessitam de Mg^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} para apresentar atividade enzimática.

2.6. Cinética da reação da glicose isomerase: A cinética da reação de glicose isomerase foi estudada, e os resultados - colhidos estão apresentados no item 1.11. Os mesmos foram comparados com resultados já obtidos anteriormente por outros pesquisadores, como se verifica no quadro 12. d-xilose, d-ribose e d- glicose, atuam como substratos efetivos para enzimas com os respectivos valores de K_m : 0,07, 0,11 e 0,26 M. Descobriu-se que esta enzima possui maior afinidade por xilose do que por ribose ou glicose. As glicose-isomerases de Streptomyces albus (15), ou de outros microrganismos (15, 18 e 20), mostram também, maior afinidade por xilose. Entretanto, Sanchez e outros (26), reportaram que glicose isomerase bruta de Streptomyces albus, exibiram um valor de K_m mais alto para xilose, que para glicose. É também interessante notar, que a enzima produzida - por uma linhagem de S. albus estudada por Takasaki e outros (15), foi ativada com glicose e xilose, entretanto não sofreu ativação com ribose. Apesar disto, Sanchez e outros (26), des-

cobriram que enzimas não purificadas de uma linhagem de S. albus, NRRL.5778, foram ativadas com ribose. Tivemos, portanto, o objetivo de descobrir se a glicose isomerase de S. bikiniensis é também ativa com ribose.

2.7. Efeito da temperatura e influência da concentração de glicose na isomerização de glicose a frutose pela glicose isomerase de S. bikiniensis: Os resultados aqui obtidos, estão mostrados no item 1.12. Após 70 horas de incubação a várias temperaturas, conseguiu-se 50% de isomerização da glicose a frutose, somente à temperatura de 70°C. A partir desta experiência, soube-se que as temperaturas adequadas para a incubação devem ser de 70°C. Há muitas vantagens na isomerização a altas temperaturas, já que se evitam assim, contaminações microbianas. A concentração de glicose adequada, é de 10%, como se observa na Figura 16.

CONCLUSÕES

1. - Foram isolados do solo, um total de 650 microrganismos, os quais foram testados para a produção de glicose isomerase. Selecionou-se uma linhagem de Streptomyces sp., que produz glicose isomerase em alta atividade, em meio de cultura que continha xilose como indutor. Esta linhagem foi identificada como Streptomyces bikiniensis, de acordo com Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
2. - A produção de glicose isomerase de S. bikiniensis, foi induzida por xilose ou xilana. No entanto, a xilose se mostrou mais satisfatória, já que causou indução mais eficiente que xilana. Observou-se também, que este microrganismo produz tanto glicose isomerase, quanto xilana se extracelular, se no meio de cultura houver xilana. - Por outro lado, caso haja no meio de cultura, xilose como indutor, o microrganismo só produzirá glicose isomerase. Portanto, a partir destas observações, concluímos que a xilanase extracelular, primeiramente hidrolisa xilana a xilose no meio de cultura. Posteriormente, a xilose induz glicose isomerase. Foi também verificado, - que d-arabinose, L-ramnose, d-frutose, d-manose e d-ribose, induzem a glicose isomerase em pequenas proporções.

3. - A glicose isomerase intracelular de S. bikiniensis, foi purificada de acordo com os seguintes processos: tratamento da massa celular com lisozima, tratamento do extrato livre de célula com bentonita, fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de coluna em gel de DEAE-celulose, filtração em gel de Sephadex G-200 e cromatografia de coluna em gel de DEAE-celulose. Eletroforéticamente, a glicose isomerase purificada, mostrou-se homogênea, o peso molecular da enzima foi calculado como sendo de 52.000, através de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida.
4. - Determinou-se que o pH ótimo para atividade da glicose isomerase purificada, está na faixa de 8 e 9, e que a temperatura ótima para atividade enzimática é de 80°C.- Foi também provado, que esta enzima é altamente termoes^tável.
5. - Com relação à especificidade dos substratos para a glicose isomerase, encontrou-se que a enzima isomeriza efetivamente d-xilose, d-ribose e d-glicose, e que, L-ramnose e d-arabinose, são também isomerizados às suas respectivas cetoses, porém em menor proporção.
6. - A isomerização de glicose a frutose pela enzima, foi altamente ativada por Mg^{2+} e Co^{2+} , e ocorreu leve isomerização com Mn^{2+} e Ni^{2+} . Xilose foi efetivamente ativada com Co^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} , e ribose também efetivamente iso

merizou com Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} . Encontrou-se que as concentrações adequadas de Mg^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} na atividade da glicose isomerase, devem ser, respectivamente, de 5,0 mM, 0,5 a 1,5 mM e 0,25 a 0,5 mM.

7. - A tolerância térmica da enzima foi verificada na ausência de íons metálicos e na presença de Mg^{2+} e Co^{2+} , tanto combinados, quanto separadamente. Pudemos saber assim, que a tolerância térmica da enzima é maior quando na presença de Mg^{2+} e Co^{2+} .
8. - Estudou-se a cinética da reação da glicose isomerase de S.bikiniensis, e concluiu-se que d-xilose, d-ribose e d-glicose atuam como substratos mais eficientes com os respectivos valores de K_m : 0,07, 0,11 e 0,26 M. Foi evidenciado que a enzima possui maior afinidade por xilose.
9. - A respeito da influência da temperatura na isomerização de glicose a frutose pela glicose isomerase purificada, verificou-se que à altas temperaturas, como $75^{\circ}C$, aumenta-se a velocidade inicial das reações catalizadas pela enzima. Entretanto, a isomerização máxima (50%), não é alcançada. Isto ocorre devido a desnaturação térmica da enzima. A isomerização pode alcançar 50% à temperatura de $70^{\circ}C$.

10. - Estudando-se também o efeito da concentração de glicose na isomerização pela glicose isomerase, concluiu-se que a concentração adequada de glicose é de 10%, tendo como base 5 mg de enzima purificada.

Quadro 1.

Atividade de glicose isomerase em cada estágio de purificação.

Estágios de purificação	Atividade de glicose isomerase por mg de proteína (unidade)
1. Extrato livre de célula	1,2
2. Após tratamento do extrato livre de célula com bentonita e fracionamento com sulfato de amônia.	6,7
3. Após cromatografia em coluna de DEAE-celulose.	8,4
4. Após filtração em gel de Sephadex G-200 e cromatografia em coluna de DEAE-celulose.	15,0

As concentrações de proteínas, foram determinadas pelo método citado no item 2.12 .

Quadro 2.

Especificidade de substrato para glicose isomerase de S.bikiniensis. A atividade da enzima foi determinada como descreve o item 2.9.1. A atividade obtida com d-xilose como substrato foi de 100%.

Substrato	Isomerização relativa (%)
d-xilose	100
d-ribose	70
d-glicose	60
L-ramnose	25
d-arabinose	25

Quadro 3.

Efeito de vários ions metálicos na atividade de isomerasas de S. bikiniensis.

Adição de ions metálicos (0,005 M)	Atividade relativa (%)		
	glicose	xilose	ribose
MgSO ₄	100	87	100
CoCl ₂	70	100	82
MnCl ₂	30	98	90
NiSO ₄	13	36	89
CuSO ₄	3	2	56
CaCl ₂	3	23	68
FeSO ₄	1	18	61
sem ions metálicos	5	57	63

A atividade relativa obtida para glicose e ribose, em presença de MgSO₄, foi considerada 100 %; e na presença de CoCl₂ foi considerada 100%, para xilose.

Quadro 4. Efeito de diferentes concentrações de ions metálicos, na atividade da glicose isomerase. A atividade da glicose isomerase foi determinada em presença de várias concentrações de ions metálicos, pelo método descrito no item 2.10.

Concentração de ions metálicos (mM)	0.12	0.25	0.35	0.50	1.50	2.20	3.50	5.00	15.00	22.00
MnCl ₂	0.08	0.09	0.09	0.09	0.08	0.07	0.07	0.06	0.05	0.03
CoCl ₂	0.12	0.13	0.14	0.15	0.15	0.14	0.14	0.14	0.12	0.11
MgSO ₄	-	-	-	0.05	0.12	0.18	0.19	0.20	0.19	0.18
MgSO ₄ + CoCl ₂	0.23	0.24	0.25	0.26	0.25	0.24	0.22	0.19	0.17	0.11

a. Todos os dados representam μ moles de frutose/min./ mg de proteína.

b. Para a combinação de MgSO₄ e CoCl₂, manteve-se constante a concentração de MgSO₄ (5 mM), e variou-se a concentração de CoCl₂.

c. A atividade enzimática sem ions metálicos, foi determinada como 0.04 .

Quadro 5.

Efeito da fonte de carbono no meio de cultura, na atividade da glicose isomerase: Após 48 horas de incubação de S. bikiniensis, em meio de cultura descrito em 2.3 (exceto xilose), suplementado com várias fontes de carbono; a atividade enzimática foi determinada como descreve o item 2.9.1 . A atividade obtida, usando-se xilose como indutor, foi de 100 %.

Fonte de carbono (1%)	Atividade relativa de glicose isomerase (%)
d-xilose	100
xilana	74
d-arabinose	16
L-ramnose	3
d-frutose	1
d-manose	1
d-ribose	1
d-glicose	0

Quadro 6.

Microorganismos que produzem glicose isomerase.

<u>Microorganismos</u>	<u>Bibliografia</u>
<i>Pseudomonas hydrophyla</i>	Marshall e Kooi (6)
<i>Bacillus megaterium</i>	Takasaki et al. (7)
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Natake et al. (8)
<i>Paracolobacterium aerogenoides</i>	Takasaki et al. (9)
<i>Aerobacter cloacae</i>	Tsumura et al. (10)
<i>Streptomyces phaeochromogenus</i>	Tsumuta et al. (12)
<i>Streptomyces albus</i>	Takasaki et al. (15)
<i>Lactobacillus brevis</i>	Yamanaka et al. (19)
<i>Bacillus coagulans</i>	Danno et al. (16)
<i>Streptomyces ostreogriseus</i>	Park, et al. (25)
<i>Streptomyces wedmorensis</i>	
<i>Streptomyces flavovirens</i>	
<i>Streptomyces achromogenes</i>	
<i>Streptomyces echinatus</i>	Takasaki et al (51)
<i>Arthrobacter nov. sp.</i>	Lee et al. (45)
<i>Streptomyces olivaceus</i>	Brownwell et al (46)
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	Heady et al. (49)
<i>Nocardia asteroides</i>	
<i>Nocardia dassonvillei</i>	
<i>Micromonospora coerula</i>	
<i>Micromonospora rossa</i>	
<i>Microellobospora flavea</i>	Horwath et al. (50)
<i>Streptomyces sp.</i>	Cotter et al. (47) e Dworschack et al. (48)

Quadro 7.

Microorganismos que produzem glicose isomerase e indutores.

<u>Microorganismos</u>	<u>Tipos de indutores que requerem</u>
<i>Pseudomonas hydrophila</i>	xilose (6)
<i>Bacillus megaterium</i>	glicose (7)
<i>Aerobacter aerogenes</i>	xilose (8)
<i>Paracolobacterium aerogenoides</i>	glicose (9), enzima extracelular.
<i>Aerobacter cloacae</i>	xilose (10)
<i>Streptomyces phaeochromogenus</i>	xilose (12)
<i>Streptomyces albus</i>	xilose e xilana (15)
<i>Bacillus coagulans</i>	xilose (16)
<i>Lactobacillus brevis</i>	xilose (19)
<i>Streptomyces ostreogriseus</i>	xilose e xilana (25)
<i>Arthrobacter sp.</i>	não requer xilana ou xilose (45)

Glicose isomerase de todos os microorganismos foi enzima intracelular, exceto para *Paracolobacterium aerogenoides*.

Quadro 8. Esquema para purificação de glicose isomerase de
Lactobacillus brevis, Streptomyces albus, e
Bacillus coagulans.

<u>Yamanaka (20)</u>	<u>Takasaki et. al (15)</u>	<u>Danno (18)</u>
Glicose isomerase de <u>Lactobacillus brevis</u>	Glicose isomerase de <u>Streptomyces albus</u>	Glicose isomerase de <u>Bacillus coagulans</u> .
1. Moagem de massa celular com alumina ↓	Autolise a 40°C, pH 6.5 ↓	Autolise com tolueno e lisozima ↓
2. Tratamento com manganês ↓	Acetona ↓	Tratamento com manganês ↓
3. Sulfato de amônio ↓	DEAE- celulose ↓	Sulfato de amônio ↓
4. Tratamento térmico ↓	DEAE-Sephadex ↓	DEAE-Sephadex ↓
5. Acetona ↓	Cristalização ↓	Segundo DEAE-Sephadex ↓
6. DEAE- Sephadex ↓	Segundo cristalização ↓	Sulfato de amônio ↓
7. Sulfato de amônio ↓	Sephadex G-200 ↓	Cristalização com acetona
8. Cristalização ↓		
9. Segundo cristalização.		

Quadro 9.

O pH ótimo e a temperatura ótima para glicose isomerase purificada de todos os microrganismos estudados por outros pesquisadores, estão comparados.

	pH ótimo para atividade de glicose isomerase	temperatura ótima para atividade de glicose isomerase
Bacillus coagulans (18)	5 a 9	não foi relatada pelo autor
Lactobacillus brevis (20)	6 a 7	não foi relatada pelo autor
Streptomyces albus (15)	8 a 8,5	80°C
Streptomyces bikiniensis	8 a 9	80°C

Quadro 10

Microorganismos produtores de xilose isomerase

microorganismos	Indutores requeridos no meio de cultura	bibliogra fia
Lactobacillus pentosus	xilose	2
Pseudomonas hydrophila	xilose	3 e 6
Pasteurella pestis	xilose	4
Aerobacter aerogenes	xilose	8
Aerobacter cloacae	xilose	11
Streptomyces phaeochromogenus	xilose	12
Streptomyces albus	xilose-xilana	15
Streptomyces ostreogriseus	xilose-xilana	25
Bacillus coagulans	xilose	17

Observação:

Estas informações foram coletadas da Revista Científica, porém não foi possível conseguir os dados da Literatura Patente.

Quadro 11.

Exigencias de ions metálicos para a atividade de isomerase purificada de L. brevis, B.coagulans, S.albus e S. bikiniensis.

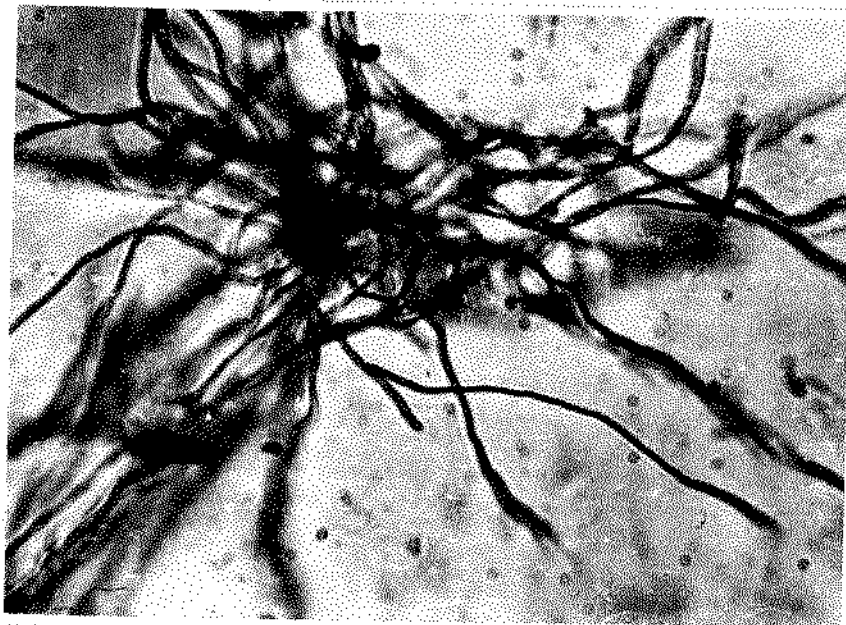
	Atividade de xilose isomerase	Atividade de ribose isomerase	Atividade de glicose isomerase
Bacillus coagulans	Mn ²⁺	Co ²⁺	Co ²⁺
Lactobacillus brevis	Mn ²⁺	não foi relatado	não foi relatado
Streptomyces albus	Mg ²⁺ , Co ²⁺	não há substrato para a enzima	Mg ²⁺ , Co ²⁺
Streptomyces bikiniensis	Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺	Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺	Mg ²⁺ , Co ²⁺

Quadro 12.

Valores de Michaelis Menten (Km) de isomerases purificadas de L.brevis, B.coagulans, S.albus e S.bikiniensis.

substrato	d-xilose (M)	d-ribose (M)	d-glicose (M)
.Lactobacillus brevis (20)	0,005	0,67	0,92
.Bacillus coagulans (18)	0,0011	0,083	0,09
.Streptomyces albus (15)	0,032	não há substrato para a enzima	0,16
.Streptomyces bikiniensis	0,07	0,11	0,26

Figura 1. Microfotografia para cultura de Streptomyces bikiniensis.



Meio de cultura: agar levedura-malte

Tempo de cultura: 16 dias

Temperatura de incubação: 30°C

Aumento: 600 x

Figura 2. Relação entre tempo, crescimento de células e atividade de glicose isomerase.

As células foram lavadas tres vezes com água de-sionizada e então resuspendidas com o volume original de água.

A atividade de glicose isomerase foi examinada , incubando-se 1 ml de suspensão celular e 1 ml de substrato glicose, sob condições ja descritas no texto.

- ▲— Alteração de pH
- Concentração de células
- Atividade de glicose isomerase

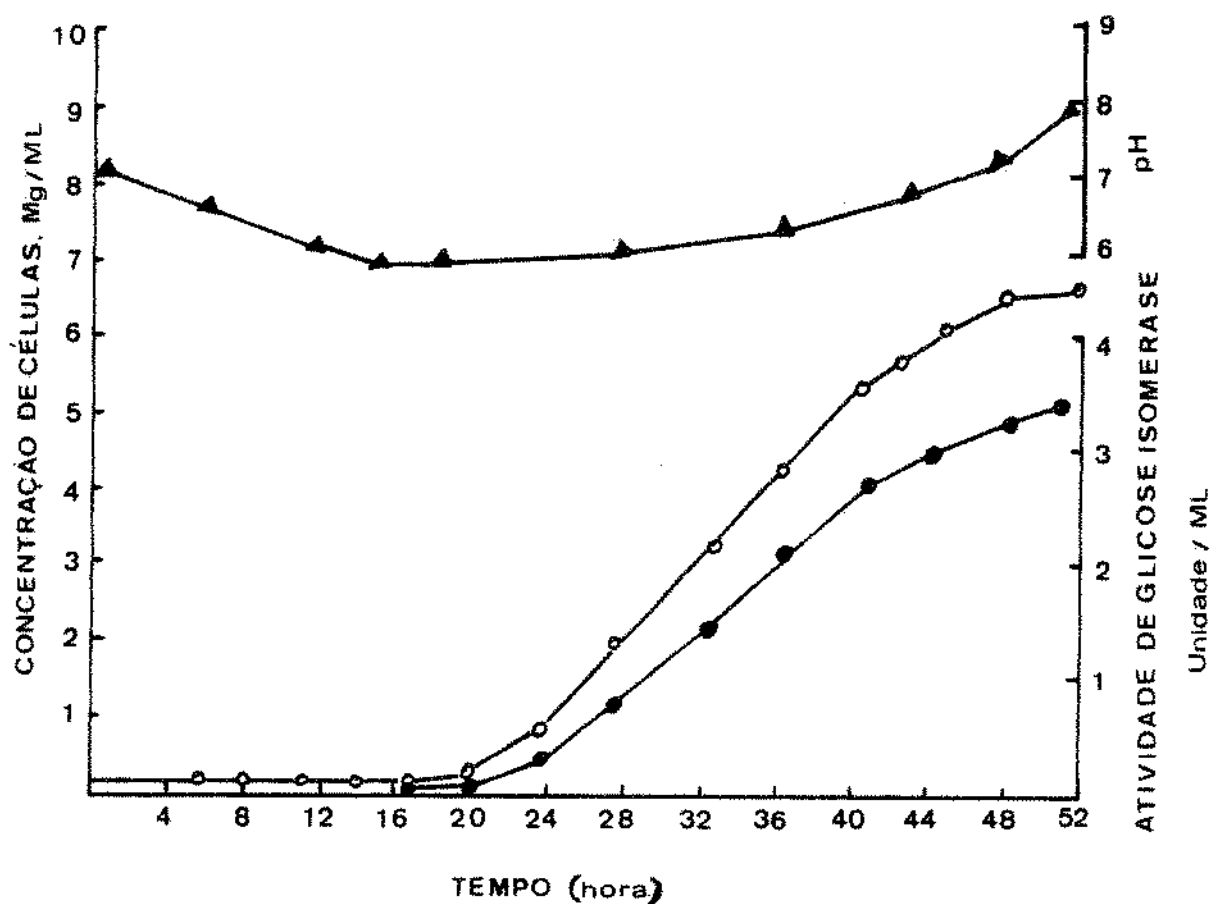


Figura 3. Cromatografia em coluna de DEAE -celulose.

5 ml por fração em 30 minutos

—○— Absorbância a 280 nm
—●— Atividade de glicose isomerase

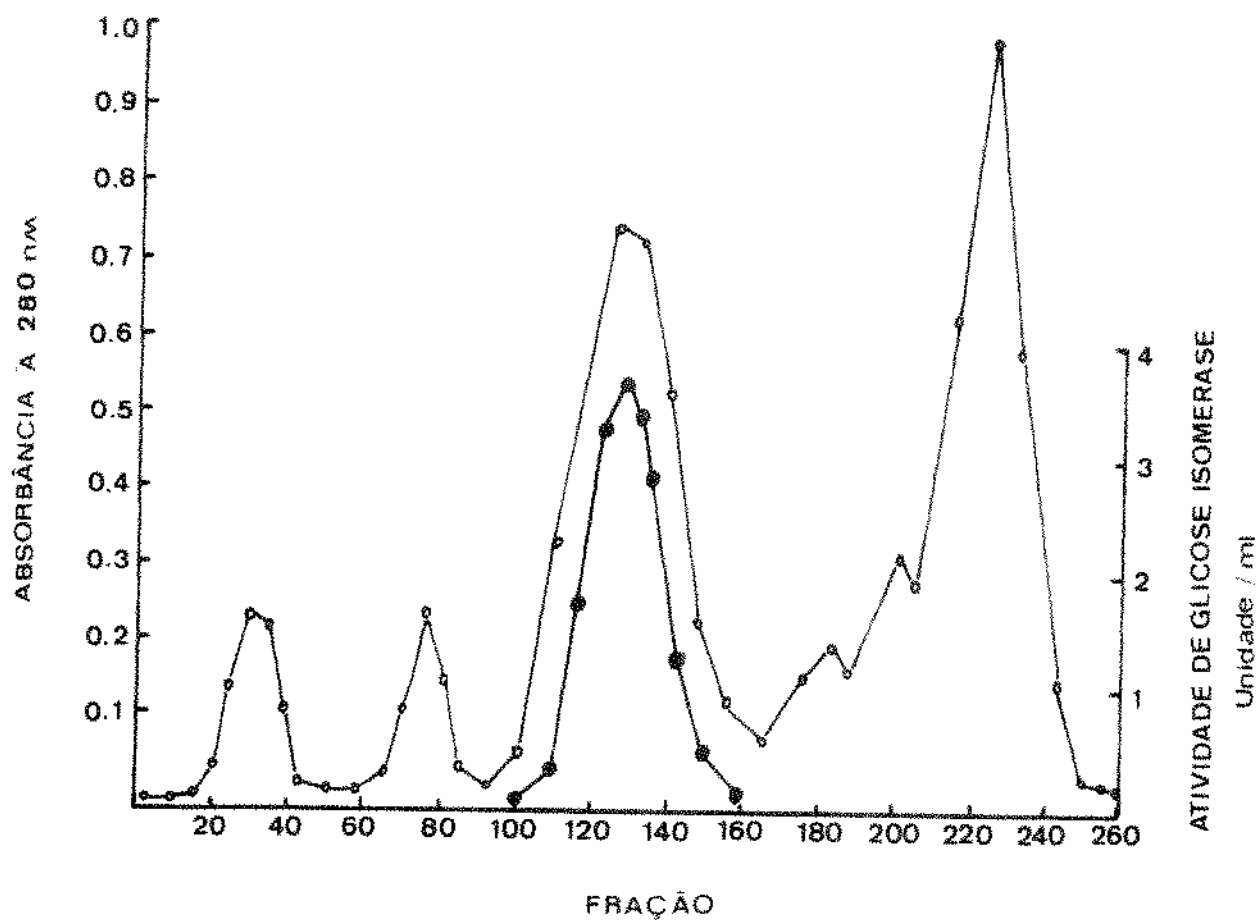


Figura 4. Filtração em gel de Sephadex G-200

5 ml por fração em 30 minutos

—○— Absorbância a 280 nm
—●— Atividade de glicose isomerase

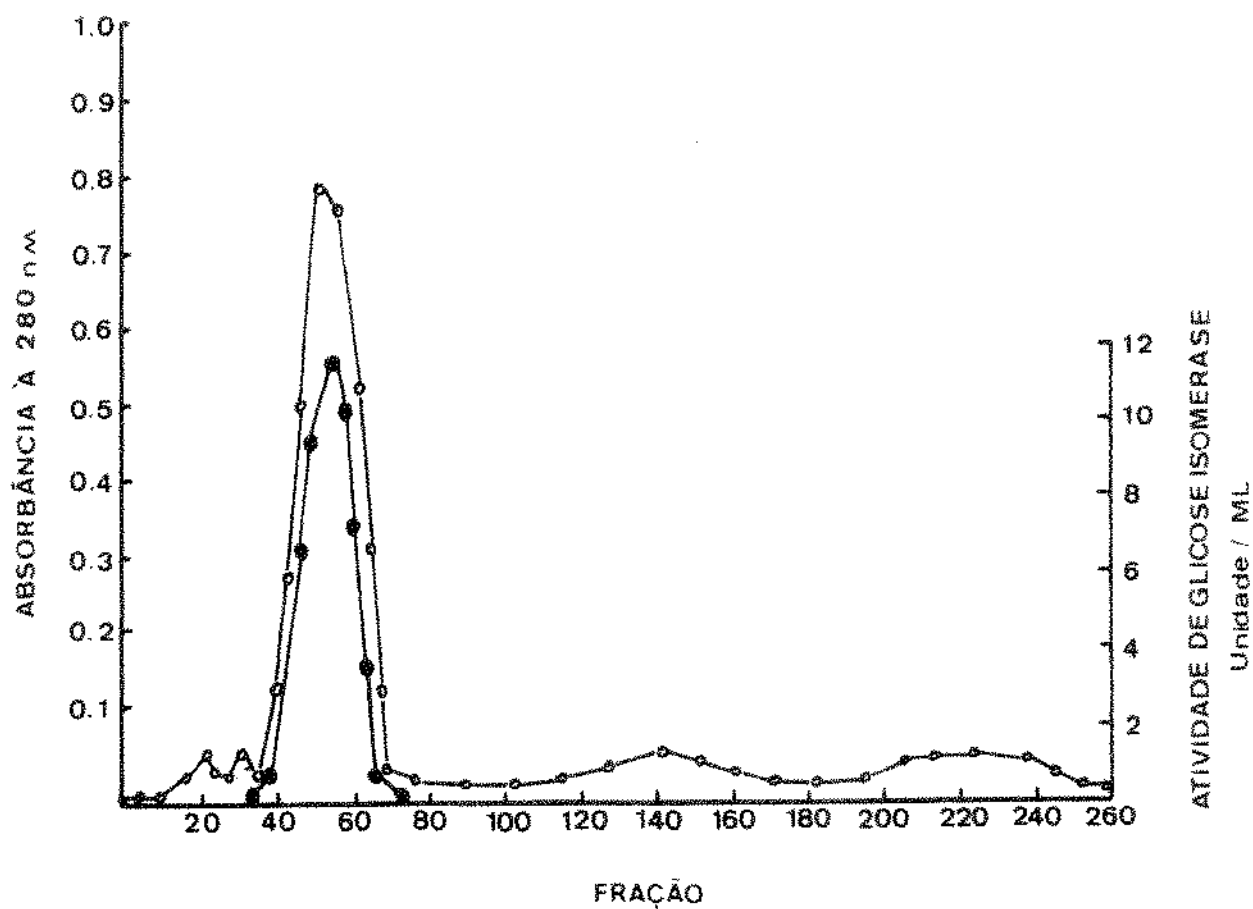


Figura 5. Cromatografia em coluna de DEAE-celulose

5 ml por fração em 30 minutos

—○— Absorbância a 280 nm
—●— Atividade de glicose isomerase

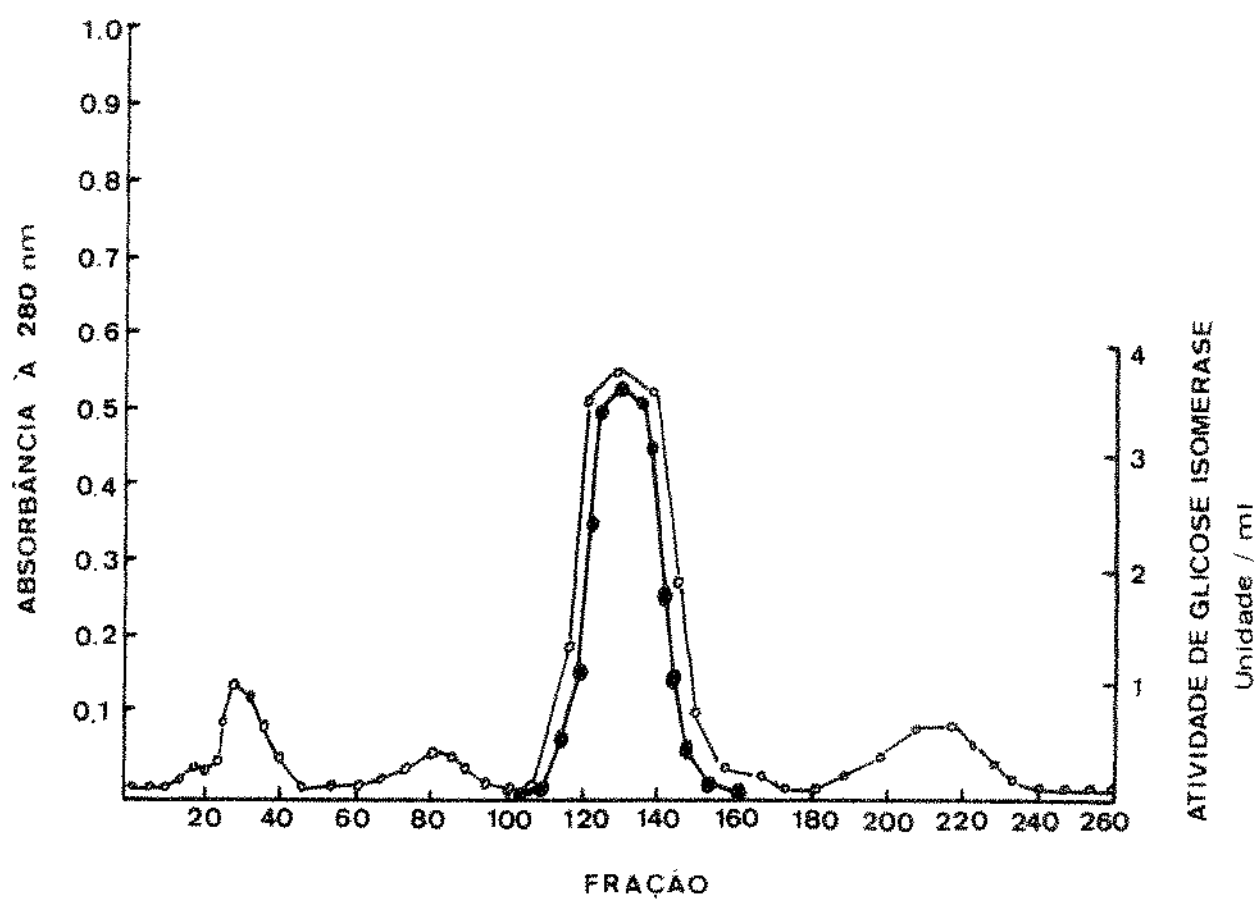
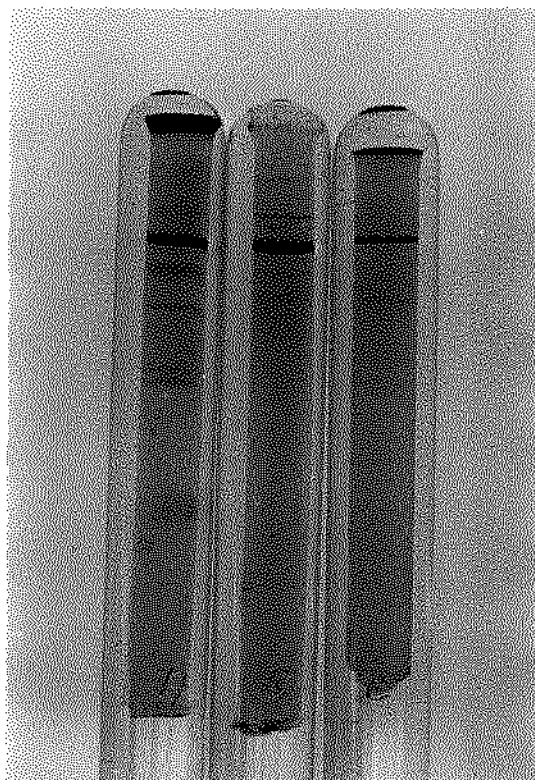
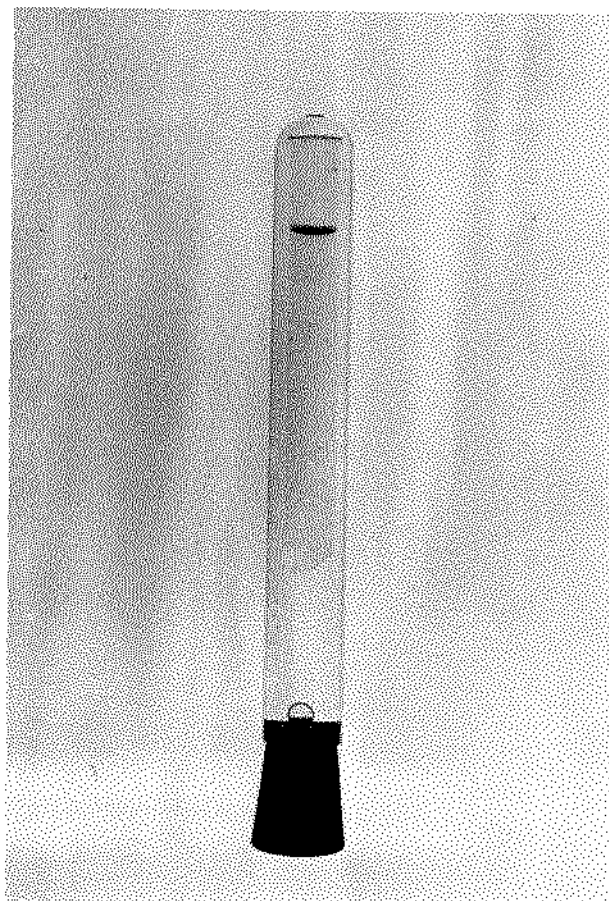


Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida para gli-
cose isomerase purificada.



- A = Amostra tratada com bentonita e submetida a fra-
cionamento com sulfato de amonio.
- B = Amostra obtida pela purificação por cromatogra-
fia em gel de DEAE-celulose seguida de filtração
em gel de Sephadex G-200.
- C = Amostra (obtida da B), purificada na última eta-
pa de cromatografia em gel de poliacrilamida.

Figura 7. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida para
glicose isomerase purificada



Método foi descrito em texto.

Figura 8. Efeito de pH na atividade de glicose isomerase.

A atividade de glicose isomerase foi medida como esta descrito em método, com exceção dos valores de pHs, os quais estão indicados.

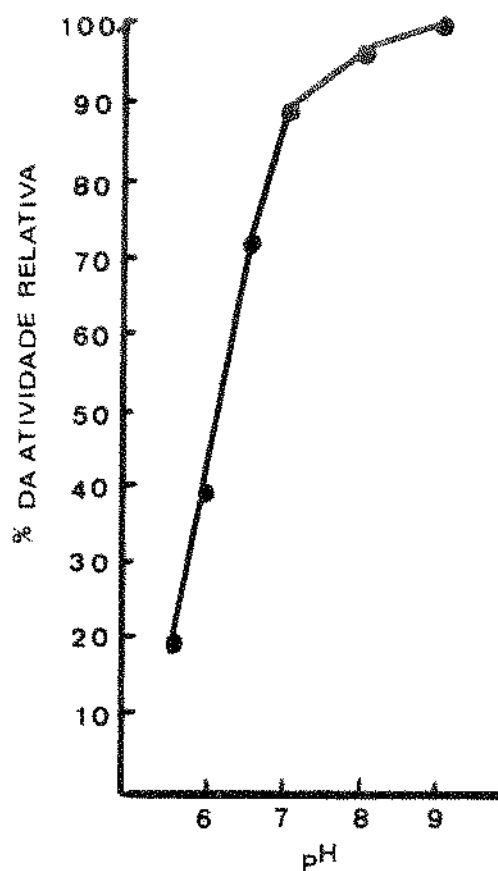


Figura 9. Efeito de temperatura na atividade de glicose isomerase.

A atividade de glicose isomerase foi medida como esta descrita em métodos, com exceção dos valores de temperaturas, os quais estão indicados.

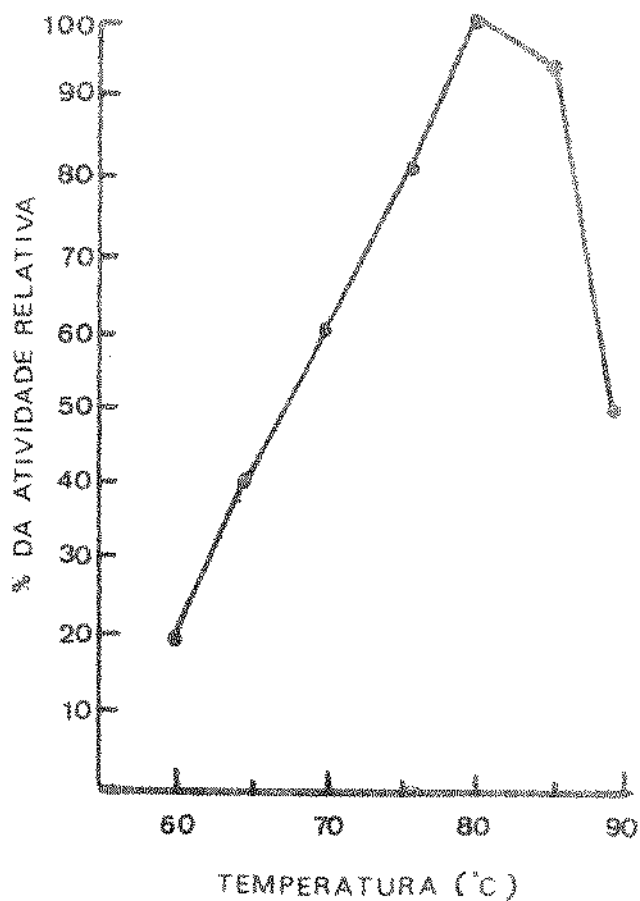


Figura 10. Tolerância térmica na atividade de glicose isomerase em presença de ions metálicos.

A enzima foi tratada durante 15 minutos, sem substrato a várias temperaturas e sob as seguintes condições: Sem cation ($\blacktriangle$); 5mM MgSO_4 ($\blacktriangle$); 5mM CoCl_2 ($\bullet$) e 5 mM CoCl_2 mais 5mM MgSO_4 ($\circ$). Ao final do tratamento térmico; mediu-se a atividade como está descrito no texto.

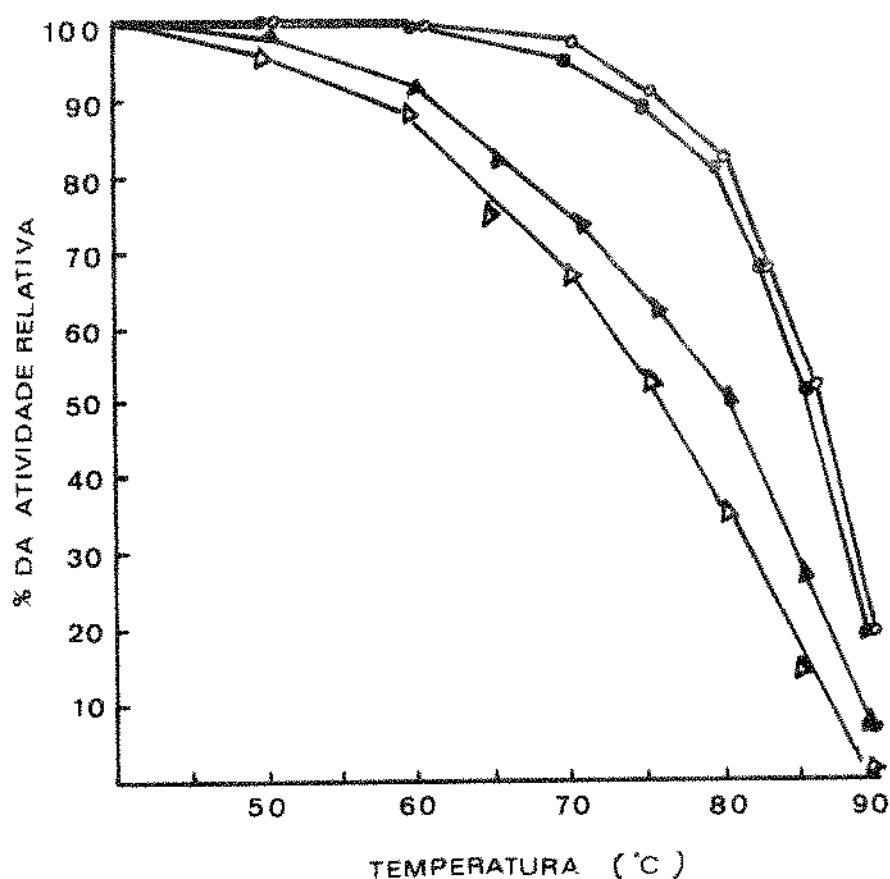


Figura 11. Estabilidade térmica de glicose isomerase.

Os métodos do tratamento térmico e da determinação da atividade enzimática residual, estão descritas no texto.

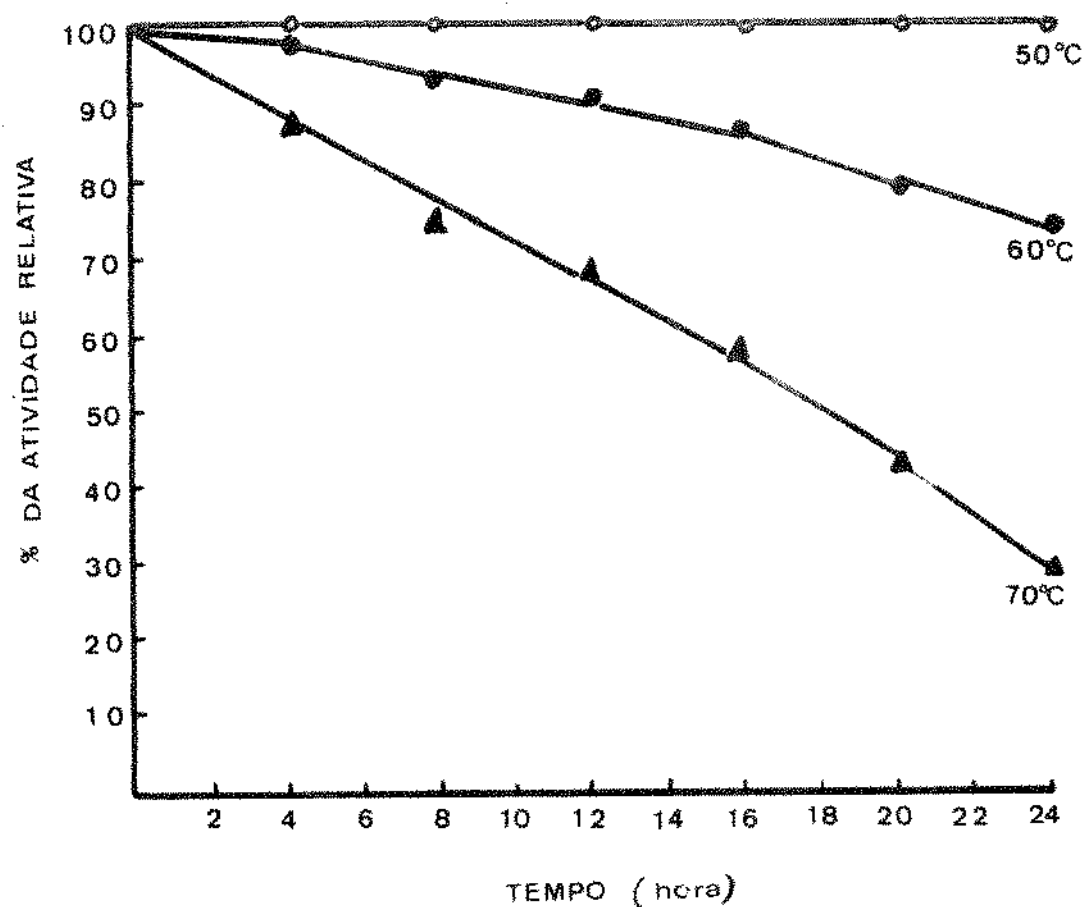


Figura 12. Efeito da concentração de substrato na velocidade de isomerização de D-xilose a D-xilulose.

Valor de K_m foi obtido pelo método gráfico de Lineweaver-Burk.

$K_m = 0,07 \text{ M}$

S = Concentração de substrato

v = Velocidade de reação, $\mu\text{mol/min/mg}$ de proteína da enzima.

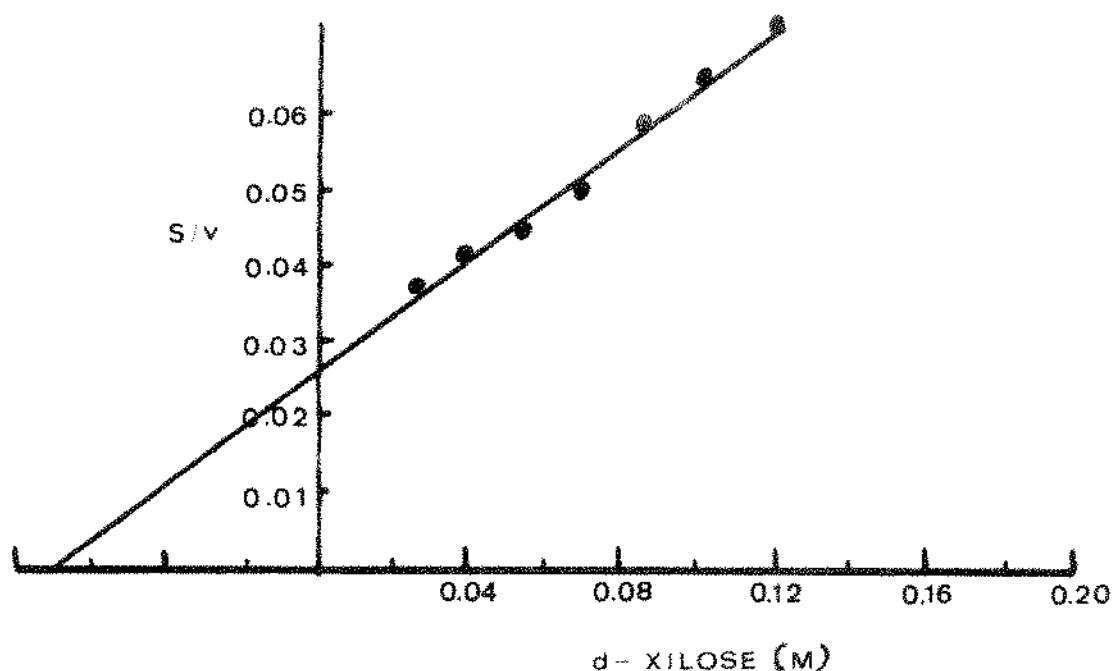


Figura 13. Efeito da concentração de substrato (ribose)
na velocidade de isomerização de D-ribose a
D-ribulose

Valor de K_m foi obtido pelo método gráfico de
Lineweaver-Burk.

$K_m = 0,11 \text{ M}$

S = Concentração de substrato, M.

v = velocidade de reação, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteii
na da enzima

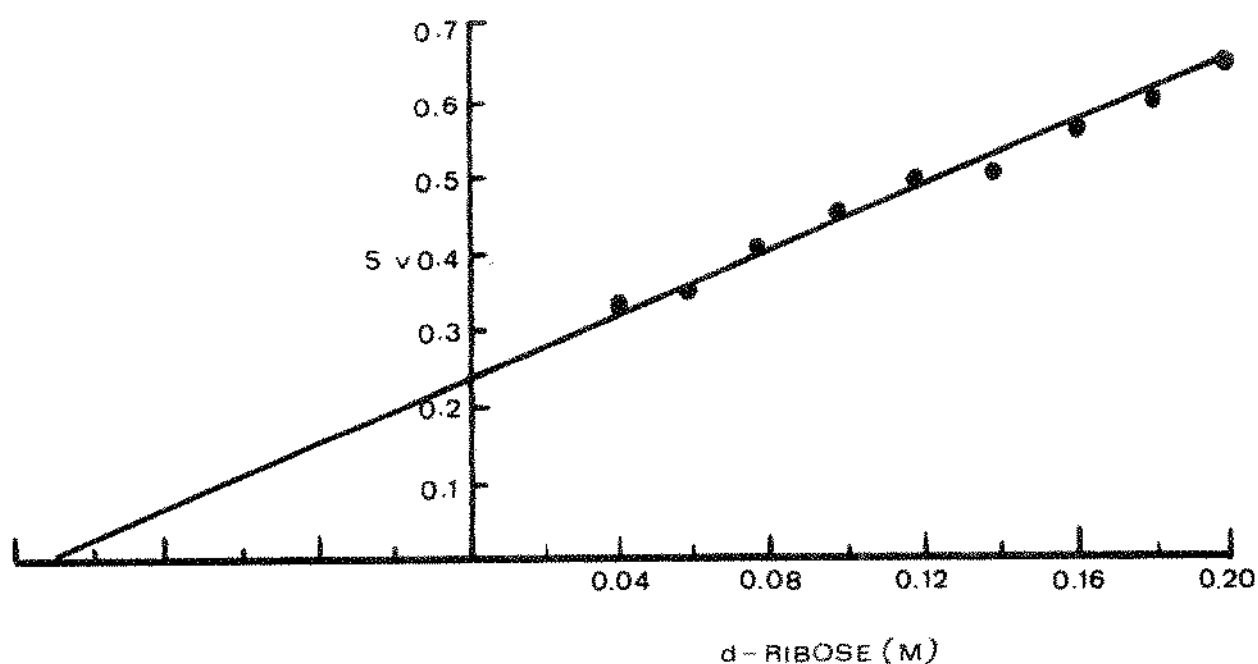


Figura 14. Efeito da concentração de substrato (glicose)
na velocidade de isomerização de D-glicose a
D-frutose.

Valor de K_m foi obtido pelo método gráfico de
Lineweaver-Burk.

$K_m = 0,26 \text{ M}$

S = Concentração de substrato, M.

v = Velocidade de reação, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de pro-
teína da enzima.

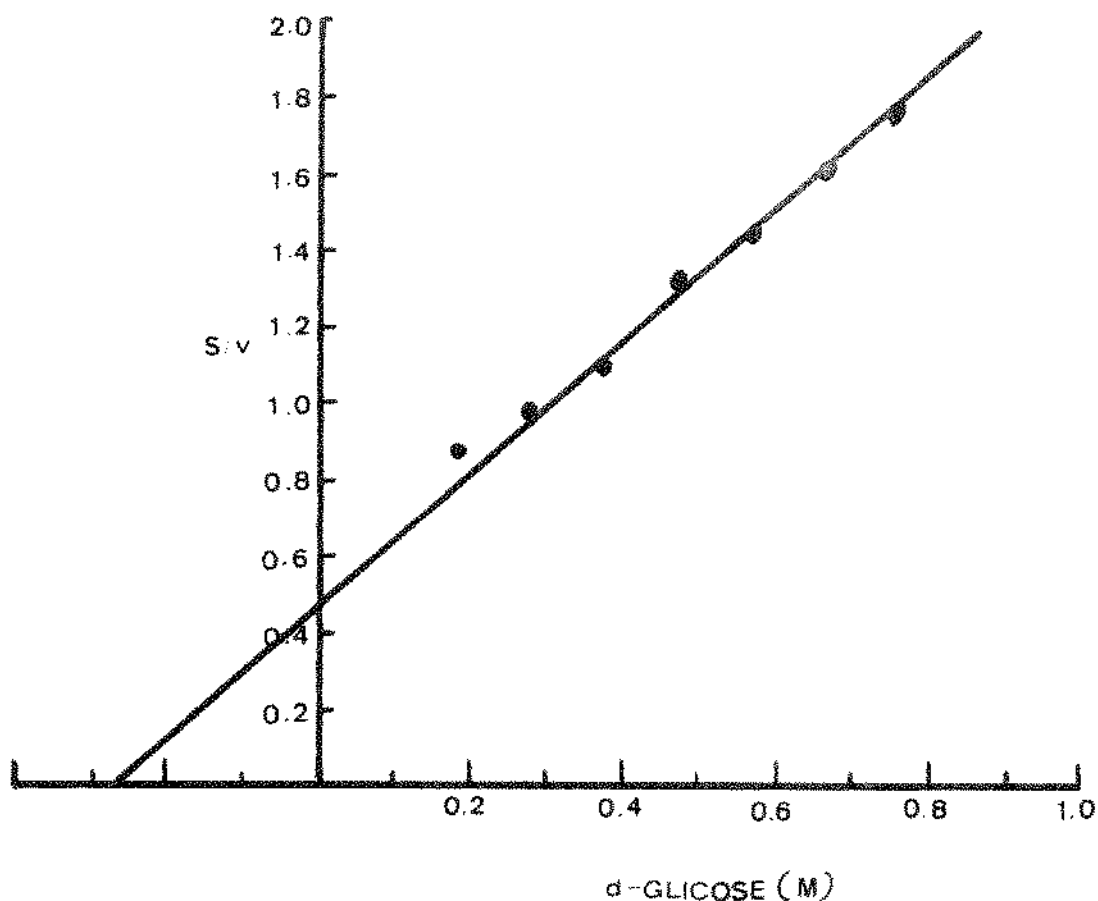


Figura 15. Efeito de temperatura na isomerização de glicose por glicose isomerase.

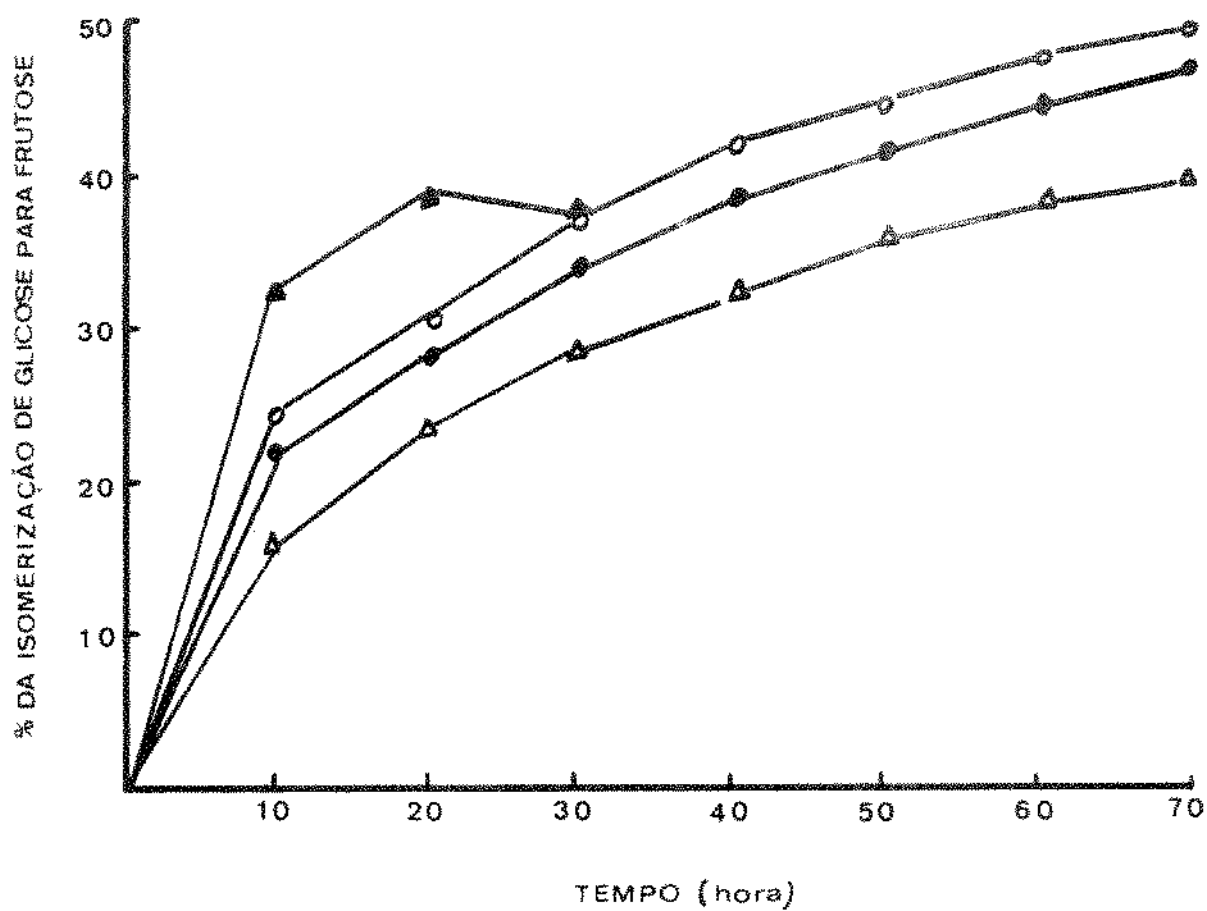


Figura 16. Efeito de concentração de glicose na isomerização relativa por glicose isomerase.

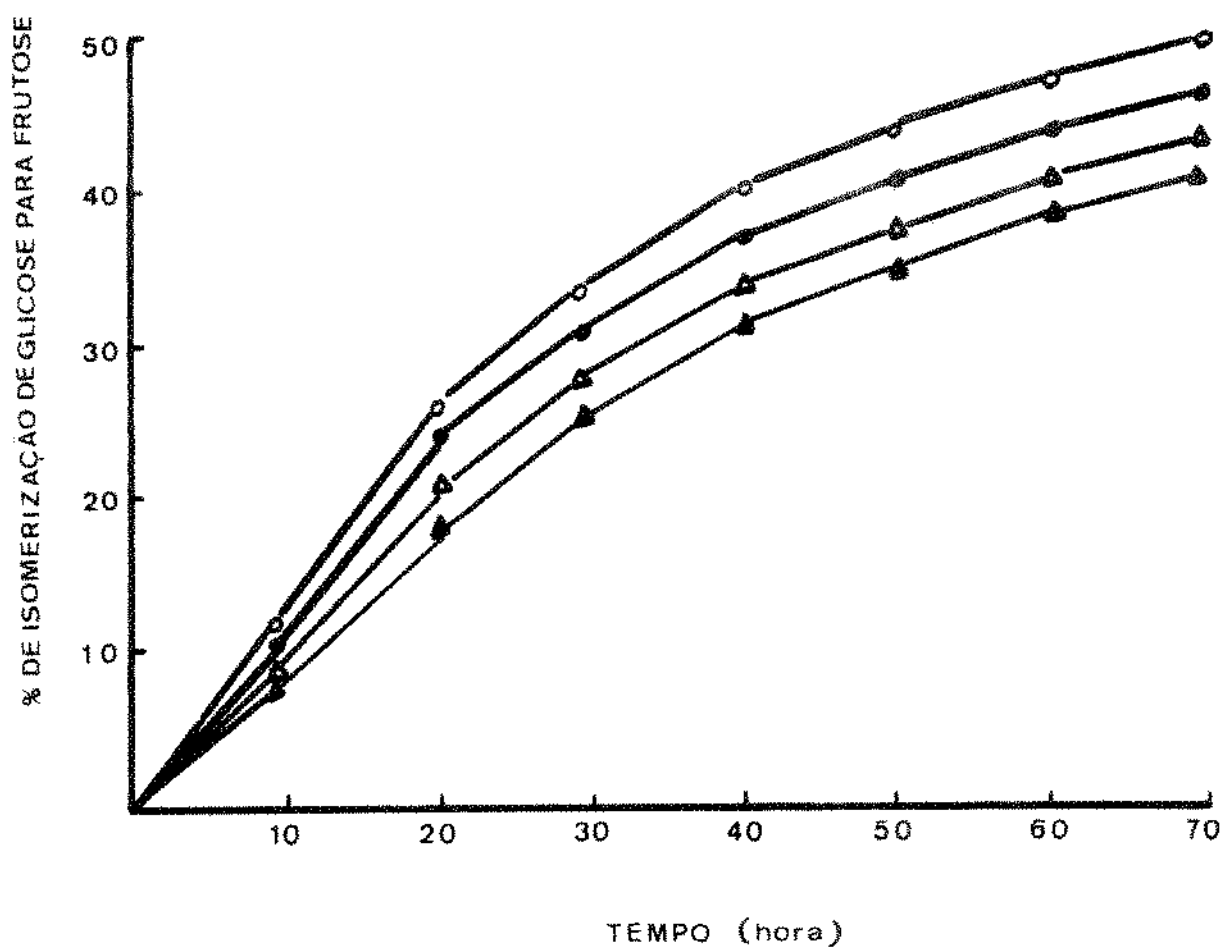
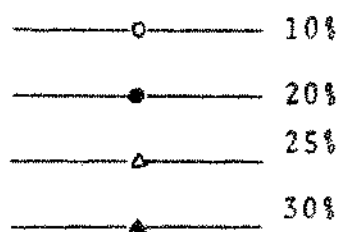
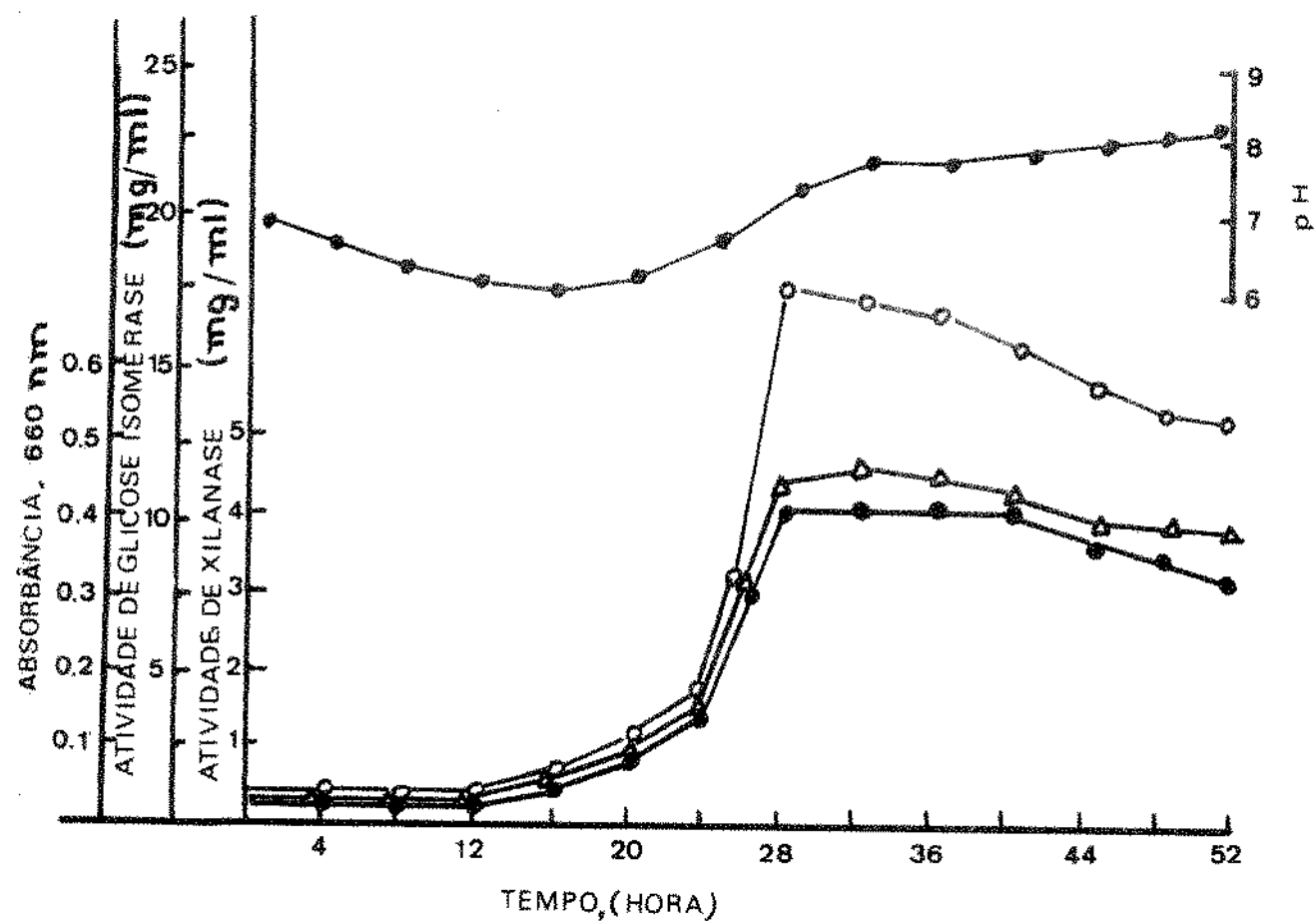
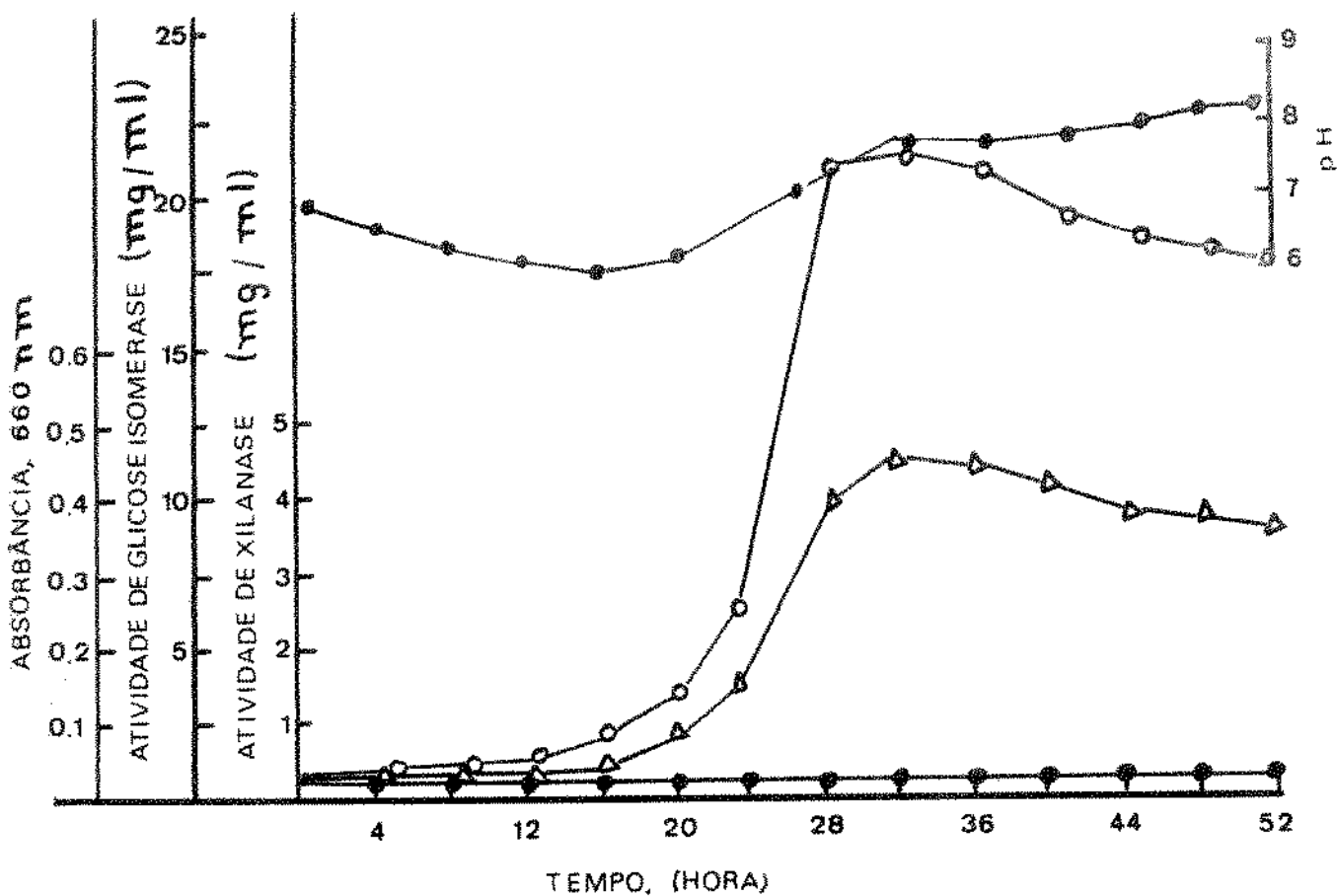


Figura 17. Relação entre tempo de incubação, atividade enzimática e crescimento de células de *S. bikiniensis* em presença de xilana.



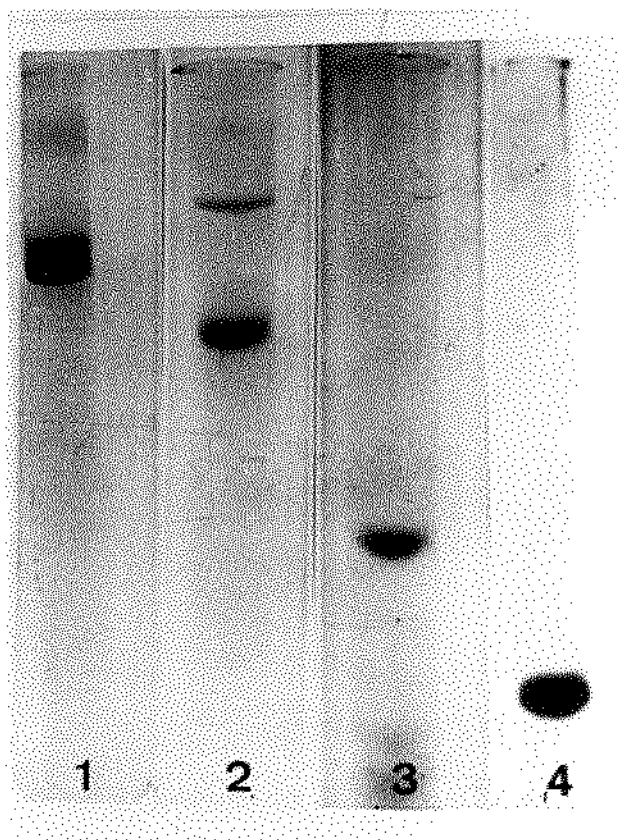
- Atividade de xilanase
- Atividade de glicose isomerase
- △— Crescimento de células de *S. bikiniensis*
- pH

Figura 18. Relação entre tempo de incubação, atividade de xilanase e de glicose isomerase, e crescimento de células de *S. bikiniensis* em presença de xilose.



- Atividade de xilanase
- Atividade de glicose isomerase
- △— Crescimento de células de *S. bikiniensis*
- pH

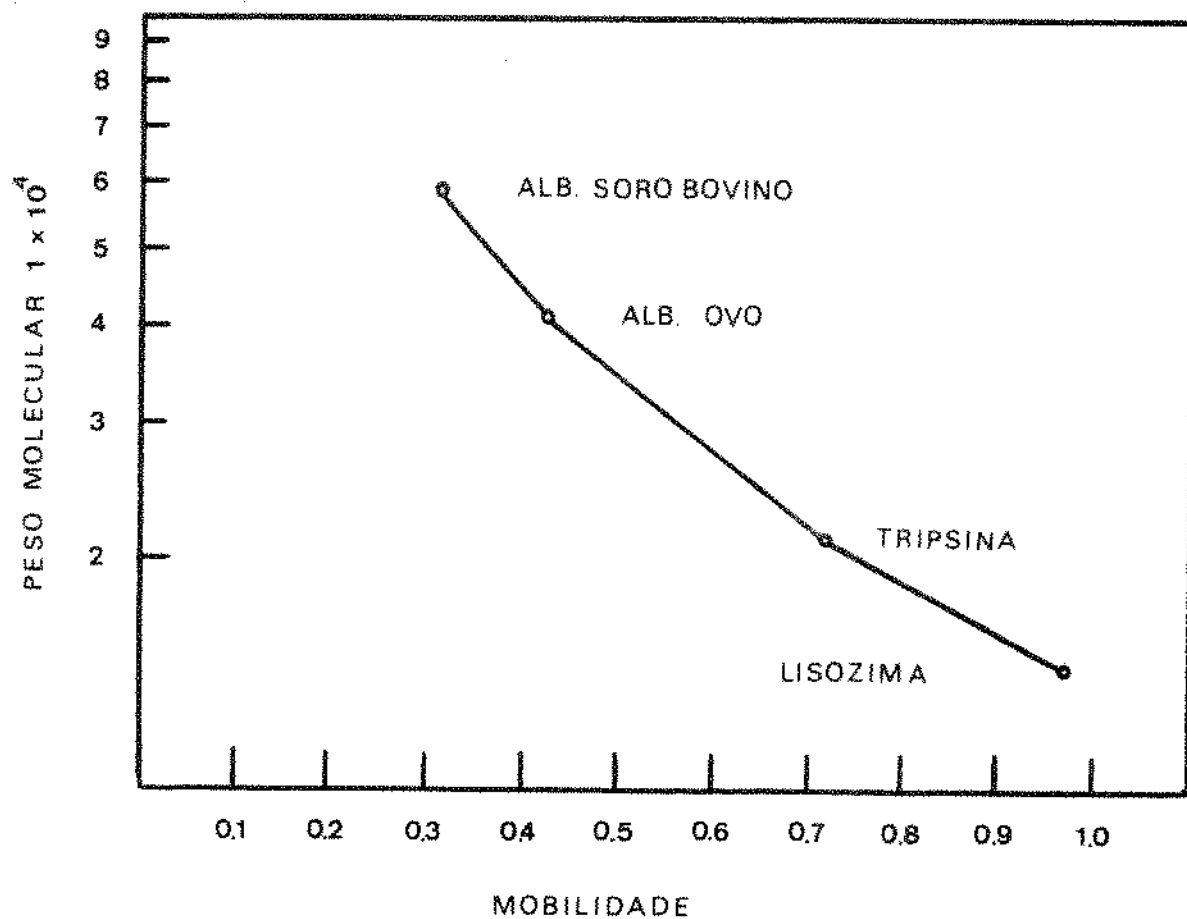
Figura 19. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida para proteínas padrões.



1. Albumina de soro bovino, peso molecular, 69.000
2. Albumina de ovo, 43.000
3. Tripsina, 23.300
4. Lisozima, 14.000

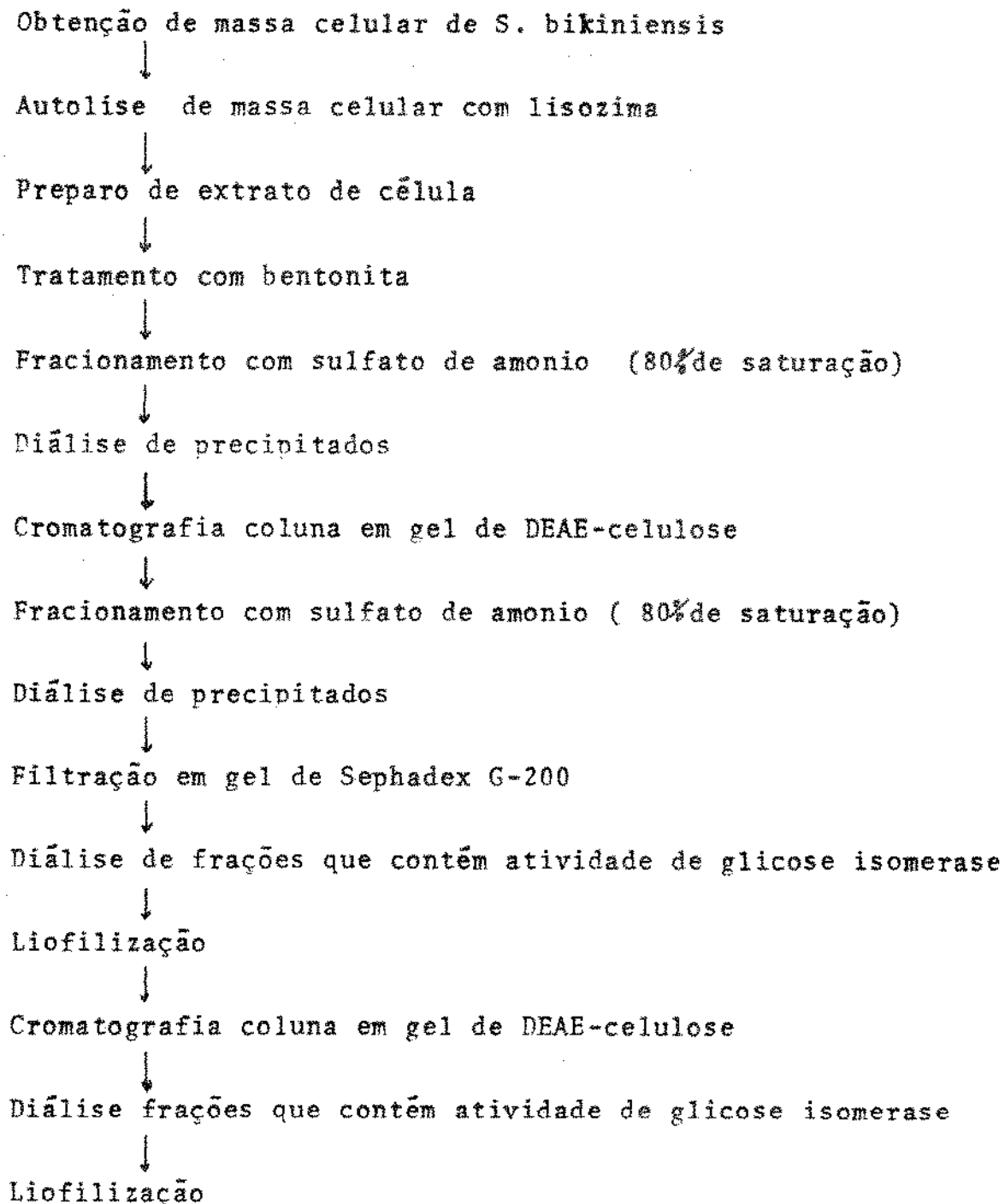
Método de eletroforese foi descrito no texto.

Figura 20. Determinação de peso molecular por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (Curva Padrão)



Método foi descrito em texto.

Figura 21. Fluxograma para purificação de glicose isomerase de S. bikiniensis



B I B L I O G R A F I A

1. COHEN, S. S. Studies on d-ribulose and its enzymatic conversion to d-arabinose. J.Biol.Chem. 201: 71, 1953.
2. MITSUHASHI, S.; LAMPEN, J. O. Conversion of d-xylose to d-xylulose in extracts of *Lactobacillus pentosus*. J. Biol. Chem. 204: 1011, 1953.
3. HOCHSTER, R. M.; WATSON, R. W. Enzymatic isomerization of d-xylose to d-xylulose. J. Biol. Chem. 48: 120, 1954.
4. SLEIN, M. W. Xylose isomerase from *Pasteurella pestis*, Strain A-1122. J. Am. Chem. Soc., 77: 1663, 1955.
5. PALLERONI, N. J.; DOUDOROFF, M. Mannose isomerase of *Pseudomonas saccharophila*. J. Biol. Chem., 218: 535, 1956.
6. MARSHALL, R.O.; KOOI, E. R. Enzymatic conversion of d-glucose to d-fructose. Science, 125: 648, 1957.
7. TAKASAKI, Y.; TANABE, O. Studies on isomerization of sugars by bacteria. Nogeikagaku, 37: 89, 1963.
8. NATAKE, M.; YOSHIMURA, S. Studies on glucose isomerase of bacteria. Part 1. Formation of glucose isomerase by *Aerobacter aerogenes*, strain HN-56, and its relationship to xylose isomerase. Agr. Biol. Chem., 27: 342, 1963.
9. TAKASAKI, Y; TANABE, O. NAD-linked d-glucose-isomerizing and d-mannose-isomerizing enzyme from *Paracolonobacterium aerogenoides*. Agr. Biol. Chem., 28:740, 1964.

10. TSUMURA, N.; SATO, T. Enzymatic conversion of d-glucose to d-fructose. Part I. Identification of active bacterial strain and confirmation of d-fructose formation. Agr. Biol. Chem., 25: 616, 1961.
11. TSUMURA, N.; SATO, T. Enzymatic conversion of d-glucose to d-fructose. Part V. Partial purification and properties of the enzyme from *Aerobacter cloacae*. Agr. Biol. Chem. 29: 1123, 1965.
12. TSUMURA, N.; SATO, T. Enzymatic conversion of d-glucose to d-fructose. Part VI. Properties of the enzyme from *Streptomyces phaeochromogenus*. Agr. Biol. Chem., 29: 1129, 1965.
13. TAKASAKI, Y. Studies on sugar-isomerizing enzyme production and utilization of glucose isomerase from *Streptomyces* sp. Agr. Biol. Chem. 30: 1247, 1966.
14. TAKASAKI, Y. Kinetic and equilibrium studies on d-glucose-d-fructose isomerization catalyzed by glucose isomerase from *Streptomyces* sp. Agr. Biol. Chem., 31: 309, 1967.
15. TAKASAKI, Y.; KOSUGI, Y.; KANBAYASHI, A. *Streptomyces* glucose isomerase. "Fermentation Advances", ed. by D. Perlman, Academic Press Inc., New York, pp.561, 1969.
16. DANNO, G.; YOSHIMURA, S.; NATAKE, M. Studies on d-glucose-isomerizing activity of d-xylose-grown cells from *Bacillus coagulans*, Strain HN- 68. Agr. Biol. Chem., 31: 284, 1967.

17. DANNO, G. Studies on d-glucose-isomerizing enzyme from *Bacillus coagulans*, Strain HN-68. Part IV. Purification, crystallization and some physicochemical properties. *Agr. Biol. Chem.*, 34: 1795, 1970.
18. DANNO, G. Studies on d-glucose-isomerizing enzyme from *Bacillus coagulans*, Strain HN-68. Part V. Comparative study on the three activities of glucose, d-xylose, and d-ribose isomerization of the crystalline enzyme. *Agr. Biol. Chem.* 34: 1805, 1970.
19. YAMANAKA, K. Sugar isomerases: Part II. Purification, and properties of D-glucose isomerase from *Lactobacillus brevis*. *Agr. Biol. Chem.*, 27: 271, 1963.
20. YAMANAKA, K. Purification, crystallization and properties of the d-xylose isomerase from *Lactobacillus brevis*. *Biochimica et Biophysica ACTA.* 151: 670, 1968.
21. STRANDBERG, G. W.; SMILEY, K. L. Free and immobilized glucose isomerase from *Streptomyces phaeochromogenus*. *Appl. Microbiol.* 21:588, 1971.
22. VIETH, W. R.; WANG, S. S.; SAINI, R. Immobilization of whole cells in a membraneous form. *Biotech. Bioeng.* 15: 565, 1973.
23. WANG, S. S.; VIETH, W. R. Collagen-enzyme complex membranes and their performance in biocatalytic modules. *Biotech. Bioeng.*, 15: 93, 1973.
24. PARK, Y. K.; NAKAMURA, I. Produção de glicose isomerase e isomerização de glicose e frutose. 1. Relação entre vários meios de cultura, crescimento celular e

produção de enzima. Revista Brasileira de Tecnologia, 5: 185, 1974.

25. PARK, Y. K.; TOMA, M. Some interrelation between microbial xylanase and glucose isomerase production. J. Gen. Appl. Microbiol. 20: 67, 1974.
26. SANCHES, S.; SMILEY, K.L. Properties of d-xylose isomerase from *Streptomyces albus*. Appl. Microbiol. 29: 745, 1975.
27. PARK, Y.K.; TOMA, M. Isomerization of glucose to fructose by semipurified cell bound and immobilized glucose isomerase from *Streptomyces* sp. J. Food Sci. 40: 1112, 1975.
28. SPECK, J.C.Jr., in M.L. Wolfrom (Editor), Advances in carbohydrate chemistry, Vol 13, Academic Press, Inc. New York, N.Y. 1958, pp 63.
29. MENDICINO, J.F. Effect of borate on the alkali-catalyzed isomerization of sugars. J.Am.Chem.Soc., 82: 4975, 1960.
30. KAINUMA, K.; SUZUKI, S. Isomerization of dextrose into fructose by the alkaline method. Stärke, 19: 66, 1967.
31. BARKER, S.A.; HATT, B.W.; SOMERS, P.J. The effect of areneboronic acids on the alkaline conversion of d-glucose into d-fructose. Carbohydrate Research, 26: 41, 1973.
32. DISCHE, Z.; BORENFREUND, E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. J.Biol.Chem. 192: 583, 1951.

33. DAVIS, B.J. Disc Electrophoresis-II, Method and application to human serum proteins. Annals of the New York Academy of Sciences. 121: 404, 1964.
34. ORNSTEIN, L. Disc Electrophoresis-I, Background and theory. Annals of the New York Academy of Sciences. 121: 321, 1964.
35. WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J.Biol.Chem. 244: 4406, 1969.
36. GUERRA, M.J.; PARK, Y.K. Extraction of sesame seed protein and determination of its molecular weight by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J.Am. Oil Chem.Soc., 52: 73, 1975.
37. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193: 265, 1951.
38. NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J.Biol.Chem., 153: 375, 1944.
39. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. J.Biol.Chem., 160: 61, 1945.
40. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 773, 1957.
41. JOHNSTONE, D.B.; WAKSMAN, S.A. Streptomycin II, an antibiotic substance produced by a new species of Streptomyces. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 65: 294, 1947.

42. JOHNSTONE, D.B.; WAKSMAN, S.A. The production of Streptomycin by *Streptomyces bikiniensis*. J.Bacteriol. 55: 317, 1948.
43. SHIRLING, E.B.; GOTTLIEB, D. Cooperative description of type strains of *Streptomyces*. V. Additional descriptions. International Journal of Systemic Bacteriology, 22: 265, 1972.
44. LINEWEAVER, H.; BURK, O. The determination of enzyme dissociation constants. J.Am.Chem.Soc., 56: 658, 1934.
45. LEE, C.K.; HAYES, L.E. & LONG, M.E. (to R.J. Reynolds Tobacco Company), "Process of Preparing Glucose Isomerase", U.S. Patent nº 3.645.848 (Fevereiro 29, 1972).
46. BROWNEWELL, C.E.; STREETS, B.W. (to Miles Laboratories Inc.) "Glucose Isomerase", German Patent 2,219,713 (26 de Outubro de 1972).
47. COTTER, W.P.; LLOYD, N.E. & HINMAN, C.W. (to Standard Brand, Inc.) "Method for isomerizing glucose syrups", U.S. Patent 3,623,953 (30 de Novembro de 1971).
48. DWORSCHACK, R.G.; CHEN, J.C., KHWAJA, A. & WHITE, W.H. (to Standard Brands Inc.) "stabilization of enzymes", German patent 2,251,855 (26 de Abril de 1973).
49. HEADY, R.E.; JACAWAY, W.A. (to CPC International Inc.) "Glucose isomerase", German patent 2,223,864 (30 de Novembro de 1972).
50. HORWATH, R.O.; COLE, G.W. (to Standard Brands Inc.), "Glucose Isomerase", German patent 2,247,922 (19 de Abril de 1973).

51. TAKASAKI, Y.; TANABE, O. (to the Agency of Industrial Science and Technology, Tokyo), "Enzymatic method for converting glucose in glucose syrups to fructose", U.S. Patent 3,616,221 (16 de Outubro de 1971)