

FABIANO DE PAULA PEREIRA MACHADO

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA
DEXTRANASE DE *Paecilomyces marquandii***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

FABIANO DE PAULA PEREIRA MACHADO

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA
DEXTRANASE DE *Paecilomyces marquandii***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 18 de Dezembro de 2009.

Prof.^a Maria Eliana L. R. de Queiroz

Prof.^a Marli Lourdes de Oliveira

Prof. George Henrique Kling de Moraes

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

Prof. José Humberto de Queiroz

(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, cuja presença foi decisiva nos momentos difíceis pelos quais passei, quando compreendi que fundamental é sermos guiados sempre por Ele, pois nenhuma vontade humana é suficiente para que sejamos verdadeiramente felizes e repletos de paz, justiça, sabedoria e bondade.

À Universidade Federal de Viçosa, onde realizei meus cursos de Graduação, Mestrado e Doutorado.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar meu treinamento em nível de Doutorado no curso de Bioquímica Agrícola.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do projeto e pela bolsa de estudos concedidos.

Ao Prof. José Humberto de Queiroz, pela orientação, com quem aprendi muito durante o Doutorado.

Aos conselheiros Prof. Sebastião Tavares de Rezende, Prof.^a Maria Goreti de Almeida Oliveira e Prof. José Ivo Ribeiro Júnior, pela valiosa colaboração para a realização dos experimentos.

Ao Prof. Carlos Augusto Rosa do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e ao Prof. Robert Weingart Barreto do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela atenção e colaboração na identificação do fungo.

Ao Prof. Everaldo Gonçalves de Barros e Prof. Luciano Gomes Fieto, pela atenção e colaboração para utilização de equipamentos.

Aos demais docentes do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelos ensinamentos transmitidos em sala de aula.

Aos amigos do Laboratório de Metabolismo e Fermentações, Larissa, Lucas, Rafael, Karina, Maria Roméria, Livia e Aline, pelos momentos de alegria e também pela ajuda.

Aos amigos Fernando Santos e Wilton Cardoso, com quem tenho compartilhado vários desafios e reflexões.

Aos amigos Jacir Gomes e Serafim (*in memoriam*), pelos momentos agradáveis de conversas realmente edificantes.

Ao amigo Délio Duarte, pelo ombro amigo e suporte nos momentos difíceis.

Aos amigos Claudete Freitas, Flaviane Ferreira, Denilce Menezes, Mauro Leite, Ernandes Rodrigues, Thiago Costa, Fernando Laércio e João Thomaz pelos bons momentos que compartilhamos.

E, principalmente, a minha maravilhosa família: meus pais, meus avós, minha irmã, minha sobrinha e meus tios, em especial João Aurélio e Shirley, pelo apoio de sempre, participando de minha vida e contribuindo para minha felicidade.

BIOGRAFIA

FABIANO DE PAULA PEREIRA MACHADO, filho de Vicente de Paula Martins Machado e Marlene Pereira Machado, nasceu dia 11 de outubro de 1977, em Muriaé, Minas Gerais.

Iniciou o curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa em Março de 1998, pelo qual se graduou Engenheiro de Alimentos em Janeiro de 2003.

Ingressou no curso de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, em Agosto de 2003, defendendo tese em Julho de 2005.

Em Agosto de 2005, iniciou o curso de Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em dezembro de 2009.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO GERAL	2
2.1. Dextranases	2
2.2. Estrutura e mecanismos de reação de dextranases	4
2.3. Aplicações de dextranases	7
2.4. Metodologias para a determinação da atividade de dextranases	10
2.5. Produção de dextranases	11
2.5.1. Otimização da produção de processos fermentativos por planejamentos fatoriais	14
2.5.2. Experimentos fatoriais na metodologia de superfície de resposta	17
2.5.3. Delineamentos de Plackett-Burman (PB)	19
2.5.4. Delineamentos Fatoriais Fracionados	20
2.5.5. Delineamentos de Box-Behnken	21
2.5.6. Delineamentos Composto Central (DCC)	22
2.6. Purificação e caracterização bioquímica de dextranases	22
3. OBJETIVOS	27
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

CAPÍTULO 1: PRODUÇÃO DA DEXTRANASE DE *PAECILOMYCES* *MARQUANDII*

RESUMO	38
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1. Reagentes	40
2.2. Medida da atividade enzimática	40
2.3. Microrganismo e preparo do inóculo	40
2.4. Fontes de carbono e seleção dos níveis das variáveis	41
2.5. Delineamentos experimentais	43

2.5.1. Delineamento de Plackett-Burman	43
2.5.2. Delineamento fatorial completo	45
2.6. Análises estatísticas	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1. Fontes de carbono e seleção dos níveis das variáveis	46
3.2. Delineamento de Plackett-Burman	49
3.3. Delineamento fatorial completo	52
4. CONCLUSÃO	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

CAPÍTULO 2: PURIFICAÇÃO DA DEXTRANASE DE *PAECILOMYCES MARQUANDII*

RESUMO	63
1. INTRODUÇÃO	63
2. MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1. Reagentes	64
2.2. Microrganismo e condições de crescimento	64
2.3. Medida da atividade de dextranase	65
2.4. Quantificação de proteína	66
2.5. Purificação da dextranase	66
2.5.1. Cromatografias de troca aniônica	66
2.5.2. Cromatografia de troca catiônica	67
2.6. Eletroforeses	67
2.7. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da dextranase	68
2.8. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da dextranase	68
2.9. Efeito de íons sobre a atividade da dextranase	68
2.10. Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M) e da velocidade máxima de reação (V_{max})	69
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.1. Purificação da dextranase	69
3.2. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da dextranase	73
3.3. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da dextranase	74

3.4. Efeito de íons sobre a atividade da dextranase	76
3.5. Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M) e da velocidade máxima de reação (V_{max})	78
4. CONCLUSÃO	78
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

RESUMO

MACHADO, Fabiano de Paula Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2009. **Produção, purificação e caracterização bioquímica de dextranase de *Paecilomyces marquandii***. Orientador: José Humberto de Queiroz. Co-orientadores: Maria Goreti de Almeida Oliveira, Sebastião Tavares de Rezende, José Ivo Ribeiro Júnior.

Dextranases (EC 3.2.1.-) catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$ em polissacarídeos de dextrana e são produzidas por fungos, bactérias e algumas leveduras. São utilizadas na eliminação de dextranas produzidas por bactérias que podem ocasionar sérios problemas ao longo de todo o processamento de açúcar, na prevenção e tratamento de cáries, produção de isomaltooligossacarídeos e oligodextranas com funções pré-bióticas, elaboração de produtos de limpeza e síntese de dextranas para aplicações clínicas. O objetivo desse trabalho foi produzir, purificar e caracterizar bioquimicamente a dextranase produzida pelo fungo *Paecilomyces marquandii*. Os efeitos de vários componentes do meio de cultura, pH e temperatura de incubação foram estudados sobre a produção da dextranase utilizando o delineamento de Plackett-Burman. Dextrana, nitrato de amônio e extrato de levedura apresentaram efeito positivo significativo sobre a produção da dextranase, enquanto o efeito de triptona foi negativo. De acordo com o experimento fatorial completo, as condições de maior produção da dextranase estão dentro do espaço experimental utilizado nesse trabalho. Isso permite a modelagem da superfície de resposta e a determinação dos níveis desses fatores para a produção máxima da dextranase. A dextranase de *Paecilomyces marquandii* foi purificada utilizando cromatografias em resinas DEAE-Sepharose e CM-Sepharose, com rendimento de 24% e atividade específica de 1.036 U.mg^{-1} . A massa molecular foi estimada em 73 kDa por SDS-PAGE. A dextranase apresentou maior atividade em pH 6,0 e estabilidade na faixa de pH de 5 a 7 a 40°C durante 30 minutos. A temperatura de maior atividade foi 55°C e durante 4 horas a 37°C a enzima foi estável. A meia-vida foi de 55 horas a 37°C e 14 minutos a 55°C . O reagente SDS e os íons Ag^+ , Cu^+ e Pb^{2+} reduziram a atividade enzimática em 80%, 40%, 51% e 53%, respectivamente. O aumento da atividade da dextranase na presença de Fe^{2+} foi de 20% e Mn^{2+} foi de 15%. Esses efeitos foram medidos utilizando 10 mM de cada reagente. O valor de K_M foi de $0,59 \text{ g.L}^{-1}$ e V_{\max} foi de $0,89 \text{ mmol glicose.min}^{-1}$ a 40°C para dextrana (massa molecular entre 60.000 e 90.000).

ABSTRACT

MACHADO, Fabiano de Paula Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, december, 2009. **Production, purification and biochemical characterization of dextranase from *Paecilomyces marquandii***. Adviser: José Humberto de Queiroz. Co-advisers: Maria Goreti de Almeida Oliveira, Sebastião Tavares de Rezende, José Ivo Ribeiro Júnior.

Dextranases (EC 3.2.1.-) catalyses the hydrolysis of α -1,6-glycosidic linkages on dextran polysaccharides. They are produced by fungi, bacteria and some yeasts. Its main application is in the elimination of dextrans produced by bacteria which can cause serious problems in sugar processing. Other potential applications for dextranases are in the prevention and treatment of dental plaques, production of isomaltooligosaccharides and oligodextrans with prebiotic functions, elaboration of cleaning products and synthesis of dextrans for clinical applications. The objective of this study was to produce, purify and characterize dextranase produced by the fungi *Paecilomyces marquandii*. The effects of various components of culture medium and incubation temperature were studied on the production of dextranase using a Plackett-Burman design. Dextran, ammonium nitrate and yeast extract showed a significant positive effect on dextranase production, while triptone presented a negative effect. According to the full factorial design, dextranase maximum production conditions are within the experimental region utilized in this study. It appeared to be adequate for modeling of the surface response and determination of the value ranges of these variables for dextranase maximum production. Dextranase was purified using chromatographies in DEAE-Sepharose and CM-Sepharose resins, yielding of 24% and specific activity of 1036 U.mg⁻¹. Molecular mass was estimated to be 73 kDa by SDS-PAGE. Dextranase presented greatest activity in pH 6.0 and stability in the pH range of 5 to 7 at 40 °C for 30 min. The optimal temperature was 55 °C and during 4 h at 37 °C the enzyme was stable. Half-life of dextranase was 55 hs at 37 °C and 14 min at 55 °C. Reduction of enzymatic activity was 40%, 80%, 51% and 53% in the presence of Ag⁺, SDS, Cu⁺ and Pb²⁺, respectively. Increase in dextranase activity in the presence of Fe²⁺ and Mn²⁺ was 20% and 15%, respectively, all at the concentration of 10 mM. The determined values of K_M and V_{max} were 0.59 g.L⁻¹ and 0.89 mmol glucose.min⁻¹, respectively, at 40 °C for dextran (molecular mass between 60,000 and 90,000).

1. INTRODUÇÃO GERAL

Dextranases (EC 3.2.1.-) catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$ em polissacarídeos de dextrana. Esses polissacarídeos são constituídos por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$, mas podem conter pontos de ramificação em ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ e $\alpha(1\rightarrow4)$. Dependendo da origem, os principais produtos das dextranases são fragmentos de dextranas, oligossacarídeos, D-glicose, β -D-glicose, isomaltose e isomaltotriose. São produzidas por diversos fungos, bactérias e poucas leveduras, destacando-se os primeiros como os principais microrganismos produtores.

A principal aplicação para dextranases é na redução de viscosidade de produtos intermediários gerados durante o processo de produção de açúcar. Esse aumento de viscosidade é causado pela presença de dextranas, produzidas principalmente por *Leuconostoc* sp, e pode ocasionar diversos problemas como perda da sacarose desviada para a síntese de dextranas, falhas nos processos de cristalização, clarificação e evaporação, além da perda do caldo da cana de açúcar provocada pelo bloqueio dos filtros. Entretanto, temperatura elevada limita a utilização industrial de dextranases. Estudos envolvendo mutações, a identificação de microrganismos produtores de dextranases com termoestabilidade superior e a otimização da utilização dessas enzimas na indústria sucroalcooleira têm sido uma alternativa para superar essa limitação.

Outra aplicação proposta para dextranases é na prevenção e tratamento de placas bacterianas, pois dextranas são componentes estruturais fundamentais da matriz polissacarídica, que é essencial para a formação dessas placas e facilitam a adesão de bactérias cariogênicas durante sua formação. Dextranases também apresentam aplicação na elaboração de composições de limpeza, produção de isomaltooligossacarídeos e oligodextranas com função de agentes pré-bióticos, e na síntese de dextranas para aplicações clínicas.

As condições de cultura utilizadas para a produção de dextranases são muito diferentes, dependendo do microrganismo utilizado para sua produção. Isso implica uma grande variação na produção de dextranases. Os estudos realizados para aumentar sua produção têm avaliado um número reduzido de fatores, utilizando dois tipos diferentes de planejamentos experimentais: o delineamento fatorial fracionado e a técnica em que se estuda um fator de cada vez. A segunda é questionada, entre outros motivos, por não considerar o sinergismo entre dois ou mais fatores sobre a variável resposta. Novos es-

tudos de otimização da produção de dextranases, em que se avaliem um maior número de fatores, podem ser uma alternativa mais promissora.

Esse trabalho é o primeiro estudo sobre a dextranase produzida pelo fungo *Paecilomyces marquandii*. Os objetivos desse estudo foram avaliar os efeitos de pH, temperatura e vários componentes do meio de cultura sobre a produção da dextranase, e também purificar e caracterizar bioquimicamente essa enzima.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dextranases

Dextranases (EC 3.2.1.-) pertencem ao grupo das enzimas glicosil hidrolases e catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$ em polissacarídeos de dextrana. Dextranas são constituídas por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$, mas podem conter pontos de ramificação em ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ e $\alpha(1\rightarrow4)$ (Figura 1).

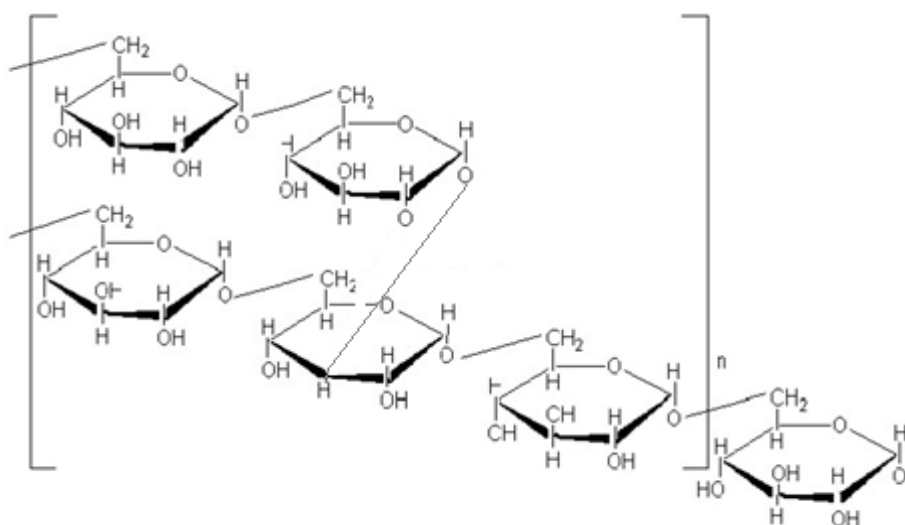


Figura 1. Estrutura química de dextrana (Adaptado de Eggleston et al., 2009)

Dextranases podem ser classificadas em grupos que se diferem basicamente em relação à especificidade de substrato e produtos gerados pela hidrólise, segundo o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB, 2007). De acordo com esse sistema, dextranases são classificadas em endodextranases (EC 3.2.1.11), exodextranases formadoras de glicose (EC 3.2.1.70), de isomaltose (EC 3.2.1.94), de isomaltotriose (EC 3.2.1.95) e desramificadora (EC 3.2.1.115).

Em outra classificação, as dextranases são divididas em famílias com base em similaridades de seqüências de aminoácidos. A relação direta entre similaridades de seqüência e enovelamento de proteínas permite a esse sistema de classificação indicar características estruturais de enzimas, auxiliar a estabelecer relações evolucionárias entre elas e fornecer informações importantes para se determinar mecanismos de reação (CAZy, 2007). Nessa classificação, as endodextranases (EC 3.2.1.11) são divididas nas famílias

49 e 66. As exodextranases formadoras de glicose (EC 3.2.1.70) são divididas nas famílias 13 e 15, enquanto as exodextranases formadoras de isomaltose (EC 3.2.1.94) e de isomaltotriose (EC 3.2.1.95) pertencem às famílias 27 e 49, respectivamente.

Endodextranases ou dextranases (EC 3.2.1.11) hidrolisam ligações internas α -1,6-D-glicosídicas de dextranas em pontos aleatórios, gerando fragmentos de dextrana e oligossacarídeos (Brenda, 2007 a).

Exodextranases formadoras de glicose (EC 3.2.1.70), também denominadas glicano 1,6- α -glicosidase, são capazes de hidrolisar ligações α -1,6-D-glicosídicas em extremidades redutoras de dextranas e derivados oligossacarídeos, produzindo apenas D-glicose ou β -D-glicose como produto principal, dependendo do microrganismo produtor (Brenda, 2007 b).

Exodextranases formadoras de isomaltose (EC 3.2.1.94), ou glicano 1,6- α -D-isomaltosidase, hidrolisam ligações α -1,6-D-glicosídicas em extremidades não redutoras de dextranas, removendo sucessivamente unidades de isomaltose. Para isso, são capazes de hidrolisar também ligações glicosídicas α -1,2, α -1,3 e α -1,4 (Brenda, 2007 c).

Exodextranases formadoras de isomaltotriose (EC 3.2.1.95), ou dextrana 1,6- α -isomaltotriosidase, hidrolisam ligações α -1,6-D-glicosídicas em extremidades não redutoras de dextranas e isomaltodextrinas para remover unidades de isomaltotriose (Brenda, 2007 d).

Uma dextranase em particular foi classificada como exodextranase desramificadora (EC 3.2.1.115), ou dextrana ramificada exo-1,2- α -glicosidase. Essa enzima hidrolisa apenas ligações α -1,2-D-glicosídicas em pontos de ramificação de dextranas e polissacarídeos relacionados, produzindo D-glicose como único açúcar redutor (Brenda, 2007 e).

2.2. Estrutura e mecanismos de reação de dextranases

Comparando-se os diversos genes de dextranase seqüenciados, constata-se significativa variação no tamanho desses genes e no tamanho das dextranases expressas. Os genes variam de 1.818 a 3.891 pb e as dextranases de 66 a 140 kDa, respectivamente (Li et al., 2006; Hatada et al., 2004; Igarashi et al., 2004, 2001; Ohnishi et al., 1995).

A análise da estrutura primária de dextranases de algumas bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* revelou que essas enzimas são constituídas por uma região conservada central e duas regiões variáveis. Um peptídeo sinal e um domínio para ligação à

membrana (exceto no caso de *Streptococcus salivarius*) estão localizados nos lados N-terminal e C-terminal da enzima, respectivamente. As regiões variáveis apresentam tamanhos diferentes e menor homologia entre essas espécies. Por outro lado, o comprimento da região conservada é constante e apresenta de 49 a 90% de homologia entre as bactérias estudadas (Igarashi et al., 2004, 2001). O domínio catalítico formado pela sequência FDGWQGDITIGDN foi idêntico entre as espécies de *Streptococcus* estudadas, embora sua localização na região conservada tenha sido diferente entre elas (Igarashi et al., 2004). Os sítios catalíticos e de ligação ao substrato estão presentes na região conservada (Morisaki et al., 2002; Igarashi et al., 2001). Ao comparar a sequência de aminoácidos de dextranase produzida por essas espécies constatou-se homologia variando entre 41% e 63%. Quando a comparação foi realizada apenas em relação à região conservada das enzimas, os valores obtidos variaram entre 55% e 83%, sendo que para duas espécies em particular a homologia foi de 90% (Igarashi et al., 2004, 2001).

A dextranase de *Penicillium minioluteum* é formada por dois domínios. O primeiro consiste de duzentos resíduos de aminoácidos formando treze cadeias β , sendo que nove delas estão enoveladas formando uma estrutura tipo sanduíche β e apresentam orientação antiparalela, com exceção da interseção entre duas dessas cadeias. Todos os *loops* estendidos estão localizados no lado N-terminal da estrutura sanduíche β . O outro domínio consiste de uma hélice β paralela, orientada à direita, contendo três folhas β paralelas. Essa estrutura em hélice contém dez voltas completas. Interações entre grupos laterais de resíduos aminoacídicos alifáticos e aromáticos auxiliam na estabilização dessa estrutura. Resíduos de cisteína nas posições 9, 14, 484, 488, 337 e 415 também contribuem para a estabilização da enzima. Os dois domínios estão unidos por uma sequência de quatorze aminoácidos localizados no lado N-terminal da hélice β (Larsson et al., 2003).

A dextranase produzida por *Arthrobacter globiformis* I42 é composta por quatro domínios: N, A, B e C. O primeiro é formado por dezessete cadeias β antiparalelas divididas em duas folhas β , enquanto o segundo é uma estrutura em barril $(\alpha/\alpha)_6$. O domínio B é constituído por oito folhas β antiparalelas e o domínio C por dezessete cadeias β antiparalelas que formam três folhas β . Os domínios N, A e C possuem dois, um e três sítios de ligação de íons cálcio, respectivamente (Mizuno et al., 2004).

Dois mecanismos estão envolvidos na atividade de dextranases. O primeiro é utilizado por dextranases pertencentes às famílias 15 e 49 e promove a inversão da configu-

ração anomérica dos resíduos de glicose. O segundo é utilizado por dextranases das famílias 13, 27 e 66, resultando na manutenção da configuração anomérica (CAZy, 2007).

Em ambos os mecanismos, a hidrólise ocorre através de catálise ácida e requer um resíduo catalítico ácido (doador de próton) e um resíduo catalítico básico (nucleofílico), sendo que a posição do primeiro resíduo é idêntica nos dois mecanismos. Esses resíduos catalíticos são aspartato ou glutamato, dependendo da família a que a enzima pertence. No caso de manutenção da configuração anomérica, o resíduo nucleofílico está próximo ao carbono anomérico do carboidrato e distante aproximadamente 5 Å do doador de próton. Em dextranases que invertem a configuração anomérica, o resíduo nucleofílico está cerca de 10 Å do doador de prótons devido à presença de uma molécula de água entre ele e o carboidrato (Davies e Henrissat, 1995).

No mecanismo de manutenção, o oxigênio da ligação glicosídica é protonado pelo doador de prótons seguido pelo ataque do resíduo nucleofílico ao carbono anomérico e da formação de um intermediário glicosil enzima. Uma molécula de água, ativada pelo primeiro resíduo catalítico, hidrolisa esse produto intermediário. Este segundo ataque nucleofílico ao carbono anomérico gera um produto com a mesma configuração anomérica do substrato (Davies e Henrissat, 1995).

O mecanismo de inversão também envolve a protonação do oxigênio da ligação glicosídica, embora o resíduo nucleofílico ative uma molécula de água que realizará o ataque nucleofílico ao carbono anomérico. Esse único ataque nucleofílico resulta na formação de um produto cuja configuração anomérica é invertida (Davies e Henrissat, 1995).

O conhecimento da estrutura de dextranase pode gerar informações importantes para estudos envolvendo engenharia de enzima e permitir o aumento de sua eficiência catalítica para aplicações industriais. Nesse sentido, esforços têm sido direcionados para se resolver a estrutura tridimensional dessa enzima, possibilitando investigar resíduos aminoácidos que sejam fundamentais a sua atividade.

Em dextranase de *Arthrobacter globiformis* I42, o resíduo de ácido glutâmico 458 atua como catalisador ácido e protona o átomo de oxigênio da ligação glicosídica, enquanto o resíduo de ácido glutâmico 656 ativa a molécula de água que hidrolisa o intermediário formado, liberando β-glicose (Morimoto et al., 2004).

Por outro lado, no mecanismo de catálise proposto para dextranase de *Arthrobacter globiformis* T6 ocorre a manutenção da configuração anomérica. O resíduo de aspartato

266 atua como catalisador ácido e o grupo carboxilato do aspartato 198 promove o ataque nucleofílico ao carbono anomérico com formação do intermediário isomaltosil-enzima. Na seqüência, o resíduo de aspartato 266 atua como base geral para ativar a molécula de água que atuará como agente nucleofílico e promoverá a hidrólise desse intermediário e liberação de isomaltose (Nihira et al., 2005).

A dextranase de *Penicillium minioluteum* também promove a inversão da configuração anomérica. O grupo carboxilato do resíduo de aspartato 395 é o catalisador doador de prótons, enquanto os resíduos de aspartato das posições 376 e 396 estejam ligados por pontes de hidrogênio à molécula de água cujo posicionamento permite o ataque nucleofílico ao carbono anomérico (Larsson et al., 2003).

Mutações sítio-dirigida em resíduos de ácido aspártico 198 e 313 de isomaltodextranase de *Arthrobacter globiformis* T6 resultaram na redução da capacidade de formação do complexo enzima-substrato e perda da atividade catalítica, enquanto a mutação do resíduo do ácido aspártico 266 resultou apenas em perda da atividade (Nihira et al., 2005). Em outro estudo, resíduos de ácido aspártico 227 e 342 foram fundamentais à catálise enzimática e quando foram substituídos por ácido glutâmico ocorreu a perda de atividade enzimática (Tochihara et al., 2004). Os resíduos de ácido aspártico 227 e 342 atuaram como agentes nucleofílico e ácido/base geral, respectivamente, bem como aqueles nas posições 198 e 313 (Nihira et al., 2005).

Embora diferentes dextranases apresentem diferenças em relação a sua estrutura tridimensional e mecanismo de reação, resíduos de ácido aspártico mostraram ser conservados no sítio catalítico dessas enzimas e, portanto, imprescindíveis para a catálise.

2.3. Aplicações de dextranases

A principal aplicação para dextranase relatada na literatura é na redução de viscosidade de produtos intermediários gerados durante o processo de produção de açúcar. Esse aumento de viscosidade é causado pela presença de dextranas produzidas principalmente por *Leuconostoc* sp. A produção de dextranas ocasiona problemas como perda da sacarose, que é desviada para a síntese de dextranas, aumento da viscosidade de xaropes gerados durante a produção de açúcar e redução da recuperação de sacarose devido à inibição da cristalização (Khalikova et al., 2005). O aumento da viscosidade, devido à presença de dextranas com elevada massa molecular, também bloqueia os filtros

provocando perda do caldo da cana de açúcar. Além disso, ocorre a diminuição na eficiência dos processos de clarificação e evaporação (Jiménez, 2005).

Desde a década de 70, algumas empresas têm estudado e disponibilizado preparações enzimáticas de dextranase para uso comercial na indústria de açúcar, pois o uso de dextranase é a maneira mais eficiente para a eliminação de dextranas. Entre diversos microrganismos avaliados, fungos apresentaram os melhores resultados, principalmente duas espécies do gênero *Chaetomium* (Jiménez, 2005). Embora alguns avanços tenham sido relatados na tentativa de se aumentar a eficiência de dextranases nas indústrias de açúcar, a utilização dessas enzimas ainda não foi otimizada, tendo em vista a dificuldade de melhorar suas condições operacionais. Estudos de otimização para melhorar as condições operacionais de dextranases representam a melhor solução, em curto prazo, na tentativa de aumentar a eficiência da utilização industrial dessas enzimas (Eggleston et al., 2009; Eggleston e Monge, 2005).

Grandes avanços podem ser alcançados, a longo prazo, a partir de estudos de identificação de microrganismos com maior capacidade de produção de dextranases (Szczo-drak et al., 1994), ou de estudos de engenharia genética para obtenção de mutantes com maior atividade de dextranase (Talkhan et al., 2008; Hatada et al., 2004) ou ainda produção de dextranases com elevada termoestabilidade (Hild et al., 2007; Jiménez et al., 1997). O aumento da atividade de dextranase pode ser o resultado do aumento da expressão da enzima ou da alteração em sua estrutura (Szczo-drak et al., 1994).

A temperatura é o principal parâmetro operacional que limita a utilização industrial de dextranases. Com isso, vários microrganismos produtores de dextranases que hidrolisam dextranas em temperaturas superiores a 60 °C já foram identificados (Hoster et al., 2001; Wynter et al., 1997, 1996, 1995). Entretanto, a atividade catalítica dessas enzimas com superior termoestabilidade foi muito inferior àquelas utilizadas em formulações comerciais (Hoster et al., 2001; Wynter et al., 1995).

Outra promissora aplicação para dextranases é na prevenção e tratamento de placas bacterianas em diversos produtos comerciais como pastas de dente, antisséptico bucais e gomas de mascar (Hamakawa e Uenosono, 2006; Wiater et al., 2004; Marotta et al., 2002; Eiji et al., 2001; Rie et al., 2000). Dextranas destacam-se como componentes estruturais fundamentais da matriz polissacarídica que é essencial para a formação dessas placas e facilitam a adesão de bactérias cariogênicas durante sua formação (Marotta et al., 2002). Portanto, dextranases influenciam a síntese e estrutura de polímeros de glico-

se, podendo alterar a formação, propriedades físicas e sítios de ligação de bactérias da matriz polissacarídica em placas bacterianas (Hayacibara et al., 2004). Esse efeito pode ser otimizando quando a dextranase é utilizada em combinação com glicosidasases capazes de hidrolisar ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow3)$, $\alpha(1\rightarrow4)$ e $\alpha(1\rightarrow6)$, sendo possível até mesmo impedir a síntese de polímeros de glicose e a adesão de bactérias cariogênicas à placa bacteriana, como também a remoção desses polímeros a partir de biofilmes já produzidos (Hayacibara et al., 2004; Wiater et al., 2004; Marotta et al., 2002).

Dextranases também podem ser utilizadas na elaboração de composições de limpeza mais eficientes devido à capacidade de duas formas dessa enzima, produzidas por *Streptomyces anulatus*, apresentarem satisfatória atividade catalítica mesmo quando expostas a pH na faixa de 8 a 9 (Decker et al., 1999; Herbots et al., 1997).

A hidrólise controlada de dextranas por endodextranases permite a produção de isomaltooligossacarídeos e oligodextranas (Mountzouris et al., 2001). Esses oligossacarídeos atuam como agentes pré-bióticos, função esta influenciada pela massa molecular dos oligômeros com diferentes graus de polimerização (Olano-Martin et al., 2000). A síntese de isomaltooligossacarídeos também é possível a partir de sacarose utilizando dextranasacarase e dextranase (Goulas et al., 2004).

A síntese de dextranas para aplicações clínicas é outro exemplo da utilização de dextranases. A utilização de dextranas na área médica é possível devido a sua compatibilidade, lenta biodegradabilidade e facilidade para a incorporação de agentes terapêuticos em sua estrutura (Khalikova et al., 2005). Entre os diversos agentes terapêuticos que podem ser utilizados estão agentes anticancerígenos, antiinflamatórios, antibióticos, imunossuppressores, metais, enzimas, proteínas e peptídeos. Essa incorporação proporciona melhorias como aumento do tempo de meia vida plasmática desses agentes, diminuição de sua toxicidade, liberação controlada e diminuição da antigenicidade de proteínas (Mehvar, 2000). A combinação de dextrana e poliaspartamida para síntese de hidrogéis não tóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis e mucoadesivos pode ser utilizada como sistemas de administração de medicamentos, revelando-se uma estratégia promissora para o tratamento de doenças intestinais inflamatórias (Pitarresi et al., 2007). Em outra aplicação clínica, o uso combinado de solução hipertônica de cloreto de sódio e dextrana 70 com soluções de eletrólitos apresentou melhores resultados para o tratamento de novilhas desidratadas apresentando quadro clínico de diarreia (Sentürk, 2003).

Mutações visando à expressão de dextranases para aplicações industriais específicas, bem como a otimização da produção dessas enzimas poderiam reduzir os custos e ampliar sua utilização industrial.

2.4. Metodologias utilizadas para a determinação da atividade de dextranases

O método mais utilizado para a determinação da atividade de dextranases é a medida da quantidade de açúcares redutores formados a partir da hidrólise de dextranas de diferentes massas moleculares (Goulas et al., 2004; Abdel-Naby et al., 1999; Pleszczynska et al., 1996; Ramos e Spencer-Martins, 1983). Esses açúcares redutores são determinados, principalmente, pela reação com o ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Arnold et al., 1998) e, menos freqüentemente, com o ácido *p*-hidroxibenzóico hidrazida (PAHBAH) (Wynter et al., 1996) e *o*-toluidina (Das e Dutta, 1996). Outros métodos colorimétricos como o de Somogyi-Nelson (Shimizu et al., 1998), glicose-oxidase (Wynter et al., 1996) e glicose oxidase-peroxidase (Wiater et al., 2004; Ramos e Spencer-Martins, 1983) também são utilizados para a determinação dos açúcares redutores, que podem ser expressos como equivalentes de D-glicose (García e Rodríguez, 2000), isomaltose (Abdel-Naby et al., 1999), isomaltotriose (Mizuno et al., 2004) ou maltose (Simonson et al., 1975).

A atividade de dextranase pode ser medida também com base na liberação de *p*-nitrofenol a partir da hidrólise do substrato *p*-nitrofenil α -D-glicopiranosídeo (*p*NPG) (Marotta et al., 2002) e na liberação dos produtos solúveis da hidrólise de Sephadex ligada ao corante Remazol Brilliant Blue-R (RBB) (Khalikova e Usanov, 2002). Nesses casos, os açúcares redutores foram expressos como base na formação de *p*-nitrofenol e dextrinas solúveis ligadas ao corante RBB, respectivamente.

Zhou et al. (1998) propuseram duas metodologias para medida da atividade de dextranase. Na primeira utilizou-se como substrato dextrana ligada a um corante verde fluorescente (BODIPY), avaliando-se a atividade da dextranase diretamente a partir do aumento da fluorescência. A vantagem desse método em relação aqueles baseados na liberação de um cromóforo, é que o primeiro constitui-se de apenas um passo e não requer a separação do substrato não hidrolisado do produto fluorescente. A segunda metodologia proposta baseia-se na utilização de um reagente fluorescente muito estável e sensível a H₂O₂ (Amplex Red), acoplado ao ensaio glicose oxidase-peroxidase. Nesse caso, a gli-

cose proveniente da hidrólise é indiretamente medida com base no aumento da fluorescência proveniente da oxidação do indicador Amplex Red. Ambas as metodologias mostraram-se muito sensíveis, sendo possível detectar 4×10^{-5} U.mL⁻¹ de atividade de dextranase.

2.5. Produção de dextranases

Fungos destacam-se como os principais microrganismos produtores de endodextranases extracelulares, com atividade enzimática superior às de bactérias e leveduras (Khalikova et al., 2005). Entre os diversos fungos estão *Paecilomyces lilacinus* e alguns pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Chaetium* (Khalikova et al., 2005; García e Rodríguez, 2000; Abdel-Naby et al., 1999). Bactérias pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Bacteroides*, *Flavobacterium*, *Thermoanaerobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Streptococcus* também são produtoras de endodextranases (Khalikova et al., 2005). Algumas bactérias são capazes de produzir dextranases estáveis a temperaturas elevadas (Hoster et al., 2001; Wynter et al., 1996). As leveduras pertencentes ao gênero *Lipomyces* também produzem dextranases (Brenda, 2007 a; Khalikova et al., 2005).

Entre os poucos microrganismos capazes de sintetizar exodextranases formadoras de glicose, destacam-se *Arthrobacter globiformis* I-42 e algumas espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* (Brenda, 2007 b; Khalikova et al., 2005). Exodextranases formadoras de isomaltose são produzidas por *Flavobacterium johnsoniae* UW101, *Arthrobacter dextranolyticus*, *Arthrobacter globiformis* T-6 e *Actinomyces* (Brenda, 2007 c; Khalikova et al., 2005). Posteriormente, *Arthrobacter globiformis* T6 foi reidentificado como *Arthrobacter dextranolyticum* (Hatada et al., 2004). Apenas *Brevibacterium fuscum* e *Brevibacterium fuscum* var. *dextranolyticum* produzem exodextranases formadoras de isomaltotriose (Brenda, 2007 d), e *Flavobacterium* sp. produzem exodextranase desramificadora (Brenda, 2007 e).

As dextranases provenientes desses diferentes microrganismos apresentam diferenças em relação à especificidade de substrato e produtos de hidrólise, massa molecular, ponto isoelétrico, pH e temperatura de maior atividade, estabilidade a pH, termoestabilidade, e sensibilidade a efetores químicos.

A composição do meio de cultura e as condições de cultivo utilizadas para a produção de dextranases são muito diferentes, dependendo do microrganismo usado como

fonte da enzima. Conseqüentemente, a produção de dextranase também apresenta uma grande variação.

Amido, glicose, frutose, maltose, celulose, glicerol, lactose, sorbitol, amilopectina, dextrina e dextranas foram avaliados para a indução de dextranases, mas produção significativa ocorreu apenas quando dextranas foram utilizadas como fonte de carbono (Obara-Doi et al., 2003; García e Rodrigues, 2000; Abdel-Naby, 1999; Szczodrak et al., 1994). No entanto, quando dextrana e maltose foram utilizadas simultaneamente constatou-se produção superior de dextranase em comparação à utilização de apenas dextrana como única fonte de carbono (García e Rodrigues, 2000; Das e Dutta, 1996). A expressão de dextranase mostrou ser regulada em nível transcricional pela fonte de carbono disponível no meio de cultura, sendo reprimida por outras fontes de carbono que não as dextranas (Garcia et al., 1996). A produção da dextranase por *Penicillium notatum* praticamente não foi alterada quando dextranas de massas moleculares variando entre 4.000 e 40.000.000 foram utilizadas como fonte de carbono (Szczodrak et al., 1994). Entre as fontes de nitrogênio utilizadas estão nitrato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de sódio, sulfato de amônio, extrato de levedura, peptona, triptona e hidrolisado de caseína (Hoster et al., 2001; Abdel-Naby et al., 1999).

A composição do meio de cultura utilizado para a produção de dextranases de uma espécie de *Bacillus* foi 0,5% de dextrana T-40, 0,89% de Na₂HPO₄, 0,05% de KH₂PO₄, 0,3% de peptona, 0,3% de extrato de levedura e 0,3% de água de maceração de milho. O pH inicial foi 7,4-7,6 e o meio inoculado foi submetido à agitação a 200 rpm durante 3 dias a 37 °C, com produção de 448 U.mL⁻¹ (107 U.mg⁻¹) (Khalikova et al., 2003).

Para a produção de dextranase de *Penicillium notatum* utilizou-se meio contendo 1,5% de dextrana (massa molecular de 110 kDa), 0,2% de KH₂PO₄, NaNO₃ e extrato de levedura. O pH foi ajustado para 5,5 e o meio, aerado a uma taxa de 2 L de ar por minuto e agitado a 300 rpm durante 3 dias a 30 °C. A produção foi de 17,86 U.mg⁻¹ (Pleszczynska et al., 1996). Entretanto, para a produção de dextranase de *Penicillium lilacinum* o meio de cultura utilizado continha 0,75% de dextrana, 0,25% de maltose como fonte de carbono, pH ajustado entre 5,6 e 6,0, com agitação de 150 rpm durante 3 dias a 26 °C. A produção de dextranase foi 288 U.mg⁻¹ (273 U.mL⁻¹) (Das e Dutta, 1996), bem superior àquela observada para *Penicillium notatum*. Uma produção de dextranase semelhante à anterior, 265 U.mL⁻¹, foi observada para *Penicillium funiculosum* quando as condições de cultura foram 1,5% de dextrana, 0,2% de NaNO₃, 0,25% de

MgSO₄.7H₂O, 0,25% de extrato de levedura, pH 7 e incubação em 150 rpm durante 8 dias a 30 °C (Abdel-Aziz et al., 2007).

Shimizu et al. (1998) observaram uma produção de 35 U.mL⁻¹ da dextranase de *Fusarium* sp quando utilizaram meio de cultura contendo 1% de dextrana (Meito 70), 0,2% de NH₄NO₃, 0,1% de KH₂PO₄, 0,05% de MgSO₄.7H₂O, 0,04% de CaCl₂.2H₂O, 0,3% de polipeptona, e 0,3% de extrato de levedura D-3, com pH 5,5 e agitação a 25 °C durante 7 dias.

Por outro lado, uma produção de dextranase muito inferior, de aproximadamente 0,35 U.mL⁻¹ (6,4 U.mg⁻¹), foi constatada para *Lipomyces lipofer* quando Ramos e Spencer-Martins (1983) utilizaram meio mineral suplementado com vitaminas e 0,5% de dextrana e incubação a 25 °C.

A cepa Rt364 de uma bactéria termofílica anaeróbica não identificada foi cultivada a 68 °C em meio TYE (extrato de levedura e triptona), suplementado com 0,5% de dextrana T-2000, 0,1% de extrato de levedura, 0,2% de tripeptona e sais Zeikus (produção de dextranase não relatada) (Wynter, 1997). O meio líquido utilizado para a produção de dextranase de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* FH1 continha 0,6% de dextrana, 0,05% de K₂HPO₄, 0,1% de NH₄Cl, 0,02% de MgSO₄.7H₂O, 0,001% de CaCl₂.2H₂O, 2 mL de uma solução vitamínica, pH 6,8 e incubação a 65 °C (produção de dextranase não relatada) (Hoster et al., 2001).

A expressão de dextranase de *Arthrobacter* T6 em *Bacillus subtilis* produziu aproximadamente 4,6 g.L⁻¹. A composição do meio de cultura foi 12% de água de maceração de milho, 0,2% de extrato de carne Lab-Lemco, 0,1% de extrato de levedura, 0,1% de KH₂PO₄, 0,02% de MgSO₄.7H₂O, 0,05% de CaCl₂, 6% de maltose e 15 µg.mL⁻¹ de tetraciclina, incubação a 30 °C (Hatada et al., 2004).

Quantidade de dextranase superior, 5,14 g.L⁻¹, foi obtida quando a expressão de dextranase de *Penicillium minioluteum* foi realizada em *Pichia pastoris*. As condições iniciais utilizadas foram 10 mM de (NH₄)HPO₄, 6,8 mM de (NH₄)SO₄, 8,3 mM de uréia, 4% de açúcares redutores de melão de cana-de-açúcar como fonte de carbono inicial, 1 vvm de taxa de aeração, pH 5,5 a 30 °C e 250 rpm. A melhor estratégia foi aquela em que o fluxo de metanol foi aumentado para manter a tendência de diminuição do oxigênio dissolvido entre 20 e 15% de saturação (Jiménez et al., 1997).

Apesar dos dois trabalhos citados anteriormente relatarem uma expressão heteróloga elevada de dextranase, os estudos sobre a otimização da produção dessa enzima ainda são escassos.

A produção de dextranase de *Penicillium funiculosum* 258 foi maior, 40 U.mL⁻¹, em meio de cultura sólido constituído por 3,5% de dextrana (massa molecular de 260 kDa), 1% de NaNO₃, 0,2% de extrato de levedura, 0,4% de K₂HPO₄, 0,06% de MgSO₄.7H₂O, 0,02% de KCl e 0,0001% de FeSO₄.7H₂O, com pH inicial 8 e incubação a 30 °C (Abdel-Naby et al., 1999).

A produção de dextranase de *Fusarium* sp. foi máxima, 0,945 U.mL⁻¹, quando amilopectina, dextrana e extrato de levedura foram utilizadas nas concentrações de 0,8%, 1% e 0,9%, respectivamente, em meio contendo 0,2 % de K₂HPO₄, 0,05% de MgSO₄, 0,05% de KCl e 0,001% de FeSO₄, com pH inicial 6 e incubação a 28 °C e 180 rpm durante 4 dias (Obara-Doi et al., 2003).

Uma maior produção da dextranase de *Penicillium notatum* foi observada entre 14 e 16 U.mL⁻¹, quando 1,5% de dextrana, 0,2% de extrato de levedura, NaNO₃ e KH₂PO₄, pH 5,5 e 100 mL de meio de cultura foram utilizados (Szczo drak et al., 1994).

São necessários novos estudos de otimização da produção de dextranases em que se investigue um número maior de fatores, pois os estudos já realizados ficam restritos quase que exclusivamente a testes de algumas fontes de carbono e nitrogênio e valores de pH inicial. E conforme relatado, vários outros componentes também são utilizados nos meios de cultura para a produção da enzima e precisam ser investigados. Além disso, pode ser mais promissor investigar vários desses fatores em um mesmo experimento devido à possibilidade de efeito sinérgico entre os fatores estudados.

2.5.1. Otimização da produção de processos fermentativos por planejamentos fatoriais

A composição e condições do meio de crescimento são de extrema importância por afetarem não somente o rendimento do processo como também os custos de produção. Um grande número de estudos relata a otimização da produção de vários compostos biológicos de interesse, bem como a redução dos custos de sua produção com o objetivo de tornar sua utilização mais econômica. Para isso, a aplicação de planejamentos fatoriais tem sido fundamental, pois permite que a otimização seja possível com uma quanti-

dade reduzida de experimentos e tempo. Diferentes tipos de delineamento são utilizados nesses estudos de otimização, sendo que o planejamento experimental é determinado de acordo com os objetivos do experimento e o conhecimento inicial sobre o processo.

A produção de dextranase de *Fusarium* sp. foi aumentada oito vezes com a utilização de um experimento fatorial fracionado 2^{9-5} , ou seja, nove fatores com 2 níveis cada, para selecionar as melhores fontes de carbono e nitrogênio, seguido de experimento fatorial fracionado em três níveis para determinar as concentrações ideais dos fatores selecionados (Obara-Doi et al., 2003).

O aumento de quatorze vezes na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* foi obtido após a seleção dos fatores mais importantes em experimento fatorial Plackett-Burman (P-B), seguida da utilização do experimento fatorial Box-Behnken e obtida superfície de resposta para determinação dos níveis ótimos dos fatores pré-selecionados. O experimento fatorial composto central (CCD) foi utilizado para determinar os melhores níveis dos fatores pH inicial, taxa de aeração e temperatura de fermentação para a produção de ácido cítrico (Lotfy et al., 2007).

A produção de α -amilase foi aumentada de 31,3 para 148 U.mL⁻¹ com a determinação dos níveis dos fatores relevantes em experimento fatorial Taguchi, posterior à aplicação de experimento fatorial Plackett-Burman. Os parâmetros temperatura, agitação e quantidade de inóculo foram avaliados em experimento fatorial Box-Behnken (Kammoun et al., 2008). Aumento de quatro vezes na produção de exopolissacarídeo de *Fomes fomentarius* foi obtido com a otimização da composição do meio de cultura utilizando também experimento fatorial Taguchi (Chen et al., 2008 a).

Aumento de nove vezes na produção de fitase de *Kodamaea ohmeri* BG3 com redução de custos foi obtida com a utilização de experimento fatorial Plackett-Burman para seleção dos fatores relevantes seguida de experimentação em delineamento composto central (Li et al., 2009). Singh e Satyanarayana (2008) conseguiram aumentar aproximadamente quatro vezes a produção de fitase de *Sporotrichum thermophile* utilizando essa mesma seqüência de experimentos fatoriais. Da mesma maneira, a produção da protease de *Bacillus* sp. foi aumentada duas vezes, com a redução de custos, durante a elaboração de um novo meio de cultura (Reddy et al., 2008). Aumento superior, de trinta vezes, foi observado para a produção de quitosanase de *Microbacterium* sp. OU01 (Sun et al., 2007).

A utilização de experimento fatorial composto central rotacional (CCRD) permitiu determinar o nível dos fatores do meio de crescimento de *Bacillus subtilis* para dobrar a produção da enzima natoquinase (Deepak et al., 2008).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é a uma estratégia seqüencial muito utilizada para otimizar processos e baseia-se em técnicas estatísticas e matemáticas. Além da otimização da produção de um processo, essa metodologia permite também prever se determinadas alterações nos níveis dos fatores (variáveis) modificarão os valores otimizados das respostas, os limites dos níveis dos parâmetros do processo sem perda dos resultados maximizados e até mesmo selecionar as condições operacionais (níveis dos fatores) para obter produtos com especificações de interesse (Myers e Montgomery, 1995).

Essa metodologia é composta por três fases distintas. Inicialmente, é necessário identificar dentre os vários fatores envolvidos no processo aqueles que de fato influenciam significativamente a resposta, pois na maioria das vezes pouco se conhece sobre o processo e geralmente as condições iniciais estão longe daquelas ideais. Isso permite eliminar os fatores irrelevantes e reduzir o número de ensaios a ser realizado posteriormente. A segunda fase, conhecida como deslocamento, consiste em ajustar os níveis dos fatores selecionados para aumentar os valores da resposta de interesse o mais próximo possível da região ótima. Isso acontece quando se alcança um ponto máximo das respostas, observando-se uma curvatura desses valores, indicando que a região ótima está próxima ou dentro dessa nova faixa de níveis das variáveis. O deslocamento nem sempre é utilizado, embora seja uma valiosa ferramenta, pois, geralmente, as condições do início do experimento estão distantes da região ótima. Na terceira fase, o objetivo é ajustar um modelo matemático aos resultados dentro de uma região relativamente pequena em torno do ótimo. Quase sempre um modelo matemático de segunda ordem é ajustado, pois a superfície de resposta exibe uma curvatura próxima do ótimo. Estabelecido o modelo matemático significativo, as condições ótimas são determinadas, ou seja, os níveis dos fatores anteriormente selecionados e importantes ao processo (Myers e Montgomery, 1995). Finalmente, o modelo matemático obtido é testado com a realização de experimentos nas condições otimizadas e os resultados determinados em análises são comparados com os valores preditos pela equação do modelo (Zhuang et al., 2006).

Dependendo da fase do processo de otimização, diferentes planejamentos fatoriais podem ser utilizados, em função das informações pretendidas em cada caso. Os experi-

mentos fatoriais de Plackett–Burman, fatoriais fracionados e a abordagem em que se testa um fator de cada vez são muito utilizados na etapa de triagem dos fatores. Delineamento composto central (DCC), Box-Behnken e, em menor número de vezes, Taguchi, são utilizados na etapa de ajuste do modelo matemático.

2.5.2. Experimentos fatoriais na metodologia de superfície de resposta (RSM)

Experimentos fatoriais são aqueles que envolvem combinações entre os níveis de cada fator, de modo que cada combinação constitui um tratamento diferente. Isso não significa que sejam delineamentos experimentais, mas sim, delineamentos de tratamentos. Dessa forma, é possível realizar experimentos fatoriais em delineamentos inteiramente casualizados, blocos casualizados, quadrado latino, entre outros. Caso todas as combinações possíveis entre todos os níveis de cada fator estiverem presentes em um mesmo experimento, este é denominado completo. Dessa forma, considerando k o número de fatores em estudo contendo N níveis cada, o esquema fatorial completo recebe a denotação N^k . Nos demais casos é um esquema fatorial incompleto ou fracionado.

Em experimentos fatoriais de 2 níveis (2^k) o número de ensaios necessários para a execução de um planejamento fatorial completo aumenta rapidamente com o número de fatores investigados (k), o que torna mais evidente a vantagem de se utilizar experimentos fatoriais fracionados nesse caso. Por exemplo, a execução de um fatorial fracionado 2_{IV}^{7-3} , ou seja, 7 variáveis em 2 níveis cada com resolução 4, requer a realização de apenas 16 ensaios para se obter as mesmas informações em comparação ao experimento fatorial completo 2^7 totalizando 128 ensaios (Rodrigues et al., 1993).

Essa redução do número de ensaios em experimentos fatoriais fracionados é possível por dois motivos. Primeiro, quando o número de fatores for maior, aumentam a probabilidade de uma ou mais variáveis não afetarem significativamente a resposta, seja por meio de efeitos principais, ou por meio de efeitos de interações. Se os efeitos desses fatores não precisam ser determinados, é desnecessário realizar todos os ensaios do fatorial completo. Em segundo lugar, o número de efeitos de interação de ordem alta aumenta consideravelmente com o número de fatores. E muitas vezes, esses efeitos apresentam valores pequenos e são destituídos de importância, pois os efeitos principais tendem a ser maiores que as interações de dois fatores que, por sua vez, são mais importantes que as interações entre três fatores, e assim por diante. Naturalmente essa tendên-

cia acentua-se para efeitos de ordem mais alta. Como esses efeitos geralmente não são significativos, não há necessidade de realizar todos os ensaios de um planejamento completo apenas para determiná-los (Neto et al., 1995).

Entretanto, o número de ensaios em experimentos fatoriais não deve ser arbitrariamente reduzido, a fim de não comprometer a qualidade das informações. Esse extremo pode ocorrer em alguns planejamentos fatoriais em que se chega a realizar N ensaios para $N-1$ fatores. Esse tipo de experimento é denominado saturado por utilizar um número muito reduzido de ensaios. De modo geral, o número de ensaios realizados deve ser no mínimo igual ao número de variáveis mais quatro para que os confundimentos das interações de primeira e segunda ordem não sejam tão grandes nos efeitos principais, o que pode ocasionar dúvidas se o resultado é proveniente do efeito do fator ou do conjunto das interações (Rodrigues e Iemma, 2005).

Planejamentos fatoriais fracionados e, principalmente, delineamentos de Plackett-Burman, discutidos posteriormente, apresentam notável aplicação na primeira etapa de estudos de otimização de processos (“screening”), quando é possível avaliar um grande número de fatores em um mesmo experimento com uma quantidade reduzida de ensaios para selecionar apenas aqueles significativamente importantes. Isso é de grande utilidade, pois como muitas vezes não se conhece o processo, evita-se eliminar arbitrariamente fatores que possam ser relevantes ou estudar fatores não significativos, além de reduzir o consumo desnecessário de tempo e recursos (Kammoun et al., 2008).

Durante essa fase de triagem, a recomendação é utilizar delineamento Plackett-Burman quando o número de fatores for superior a nove, enquanto o delineamento DC-CR pode ser vantajoso para dois a quatro fatores. Nos demais casos, recomendam-se Plackett-Burman ou fatorial fracionado, dependendo principalmente do número de fatores e da disponibilidade de tempo e recursos (Rodrigues e Iemma, 2005). Os fatoriais fracionados têm sido mais utilizados para seis a nove variáveis (Luo et al., 2009; Chen et al., 2002; Zhuang et al., 2006). Alguns relatos ainda mostram a utilização de delineamento Plackett-Burman para triagem de apenas seis fatores (Vaidya et al., 2003), de um delineamento fatorial completo de dois níveis (Mahat et al., 2004) e delineamento de Taguchi para triagem de quatro fatores (Wang et al., 2008).

Vários estudos demonstraram a aplicação do método “um fator por vez” (uma tradução aproximada da expressão “one-at-a-time”) na fase de triagem dos fatores (Wang et al., 2008; Souza et al., 2006), para selecionar seus níveis a serem utilizados nos deli-

neamentos para otimização (Fang et al., 2007), ou até mesmo para otimização do processo (Singh e Satyanarayana, 2008). Nessa técnica, os níveis de apenas um dos fatores estudados são variados, enquanto os demais são fixos em determinado nível. Posteriormente, o melhor nível encontrado para esse primeiro fator é fixado e os níveis dos demais fatores são variados até que todos eles sejam avaliados. A desvantagem em realizar essa abordagem em comparação aos delineamentos fatorial fracionado ou Plackett-Burman é quando se investiga um número maior de fatores, podendo levar ao consumo desnecessário de tempo e recursos para se obter muitas vezes as mesmas informações. Existe também a possibilidade de estudar fatores não significativos ao processo. Ainda menos aconselhável é utilizar apenas essa técnica para realizar a otimização, pois, nesse caso, a ocorrência de interações entre as variáveis não é considerada. Dessa forma, exclui-se a possibilidade de sinergismo entre elas, podendo resultar em produção inferior àquela quando se utiliza a metodologia de superfície de resposta (Vohra e Satyanarayana, 2002).

A escolha do planejamento experimental mais adequado depende do número de fatores envolvidos no estudo, da resolução desejada no delineamento, do conhecimento sobre o processo que se pretende otimizar, do número de ensaios que podem ser realizados e dos custos para a execução do experimento. É recomendado evitar o consumo de tempo e recursos além do necessário em uma primeira etapa do processo de otimização, pois, muitas vezes, as condições ótimas ainda podem estar distantes. Ao mesmo tempo, o número de ensaios a ser realizado deve garantir a qualidade das informações necessárias para estabelecer a superfície de resposta.

2.5.3. Delineamentos de Plackett-Burman

Propostos por Plackett e Burman (1946), estes delineamentos consistem de planejamentos fatoriais de dois níveis para estudar até $K = N - 1$ variáveis em N ensaios, sendo N múltiplo de 4.

Cada variável independente é representada em dois níveis, superior (+1) e inferior (-1), sendo que o número de vezes em que cada variável está presente nos níveis superior e inferior é o mesmo. O nível intermediário é codificado como (0).

O efeito principal de cada variável independente é a diferença entre a média das determinações realizadas em seu nível superior e a média das determinações realizadas em seu nível inferior dividida pelo número de ensaios do experimento:

$$E(VI) = \frac{2(\sum VI_{(+1)} - \sum VI_{(-1)})}{N} \quad (1)$$

Em que $E(VI)$ é o efeito da variável testada, $VI_{(+1)}$ e $VI_{(-1)}$ são os valores das respostas para a variável nos níveis superior e inferior, respectivamente, e N é o número de ensaios no experimento.

Este delineamento baseia-se em um modelo de primeira ordem para descrever o efeito das variáveis independentes:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i, (i = 1, \dots, k) \quad (2)$$

Em que Y é a resposta, β_0 é a constante do modelo, β_i são os coeficientes da regressão linear e x_i é o nível da variável independente. Este delineamento assume que não há interações entre os fatores e, portanto, deve ser utilizado apenas para selecionar os fatores significativamente importantes para a resposta. Não é possível inferir quais são as condições em que a resposta é máxima apenas com base nesse delineamento.

Apesar de em vários estudos o delineamento de Plackett-Burman ter sido utilizado em sua forma clássica saturada, $K = N - 1$ variáveis em N ensaios (Kammoun et al., 2008; Bari et al., 2009), recomenda-se que o número de ensaios exceda em pelo menos quatro o número de variáveis independentes estudadas para a estimativa do erro experimental.

2.5.4. Delineamentos fatoriais fracionados

São delineamentos formados por uma fração de seu delineamento fatorial completo correspondente. Os delineamentos fracionados de dois níveis são utilizados para a seleção das variáveis significativas durante o estudo de otimização. Como exemplo, os delineamentos fatoriais fracionados 2^{7-3} (Luo et al., 2009), 2^{6-2} (Chen et al., 2002), 2^{9-5}

(Zhuang et al., 2006) são utilizados para avaliar sete, seis e nove fatores, respectivamente. Portanto, esses delineamentos podem conter, mais freqüentemente, a metade, um quarto e um oitavo das frações dos delineamentos fatoriais completos de dois níveis (2^k) (Rodrigues e Iemma, 2005). As variáveis independentes são estudadas no nível inferior (-1) e superior (+1) e codificadas para cálculo estatístico de acordo com a seguinte relação:

$$X_i = (x_i - x_{i0}) / \Delta_i \quad (i = 1, 2, 3, \dots, k) \quad (3)$$

Em que X_i é o valor codificado adimensional da variável independente x_i , x_i é o valor real da variável independente, x_{i0} é o valor real da variável independente x_i no ponto central (0) e Δ_i é o incremento de x_i correspondente a uma unidade de X_i .

É aconselhável realizar ao menos três replicatas contendo em que as variáveis pontos centrais, ou seja, as variáveis no nível intermediário (0) devem ser utilizadas para a estimativa do erro.

Este delineamento também se baseia em um modelo de primeira ordem para a estimativa do efeito das variáveis independentes (equação 2).

2.5.5. Delineamentos de Box-Behnken

É um delineamento fatorial incompleto obtido pela combinação de delineamentos fatoriais de dois níveis com delineamentos em blocos incompletos (Kammoun et al., 2008). Neste delineamento as variáveis são estudadas nos níveis inferior (-1), central (0) e superior (+1). Ao menos três replicatas contendo o ponto central devem ser utilizadas para a estimativa do erro. Um modelo de segundo grau é utilizado para estimar o efeito de cada variável e interações (Vaidya et al., 2003):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad (4)$$

Em que Y é a resposta predita, β_0 é o termo constante, β_i é o coeficiente linear da regressão, β_{ii} é o coeficiente quadrático da regressão, β_{ij} é o coeficiente de interação da regressão e x_i é o valor codificado da variável X_i .

2.5.6. Delineamentos Composto Central (DCC)

O delineamento composto central completo baseia-se em três princípios básicos de um delineamento experimental ideal e consiste de (1) um delineamento fatorial completo 2^k , sendo k o número de variáveis, (2) pontos centrais ($k_0 \geq 1$) e (3) dois pontos axiais no eixo de cada variável a uma distância de $2^{k/4}$ do centro do delineamento (ponto central). Portanto, o número de ensaios necessários é $N = 2^k + 2k + k_0$ (Techapun et al., 2002), sendo comumente utilizados ao menos três pontos centrais. Dessa maneira, as variáveis são estudadas em cinco diferentes níveis e codificadas pela seguinte relação:

$$x_i = (X_i - X_{i0})/\Delta_i \quad (i = 1,2,3,\dots,k) \quad (5)$$

Em que x_i é o valor codificado, X_i é o valor real da variável, X_{i0} é o valor real da variável no ponto central e Δ_i é o valor da mudança de passo.

Os pontos axiais, também denominados pontos estrelas, dispostos em torno do ponto central, permitem o ajuste de um modelo de segundo grau aos resultados observados (equação 4) e, conseqüentemente, determinar os níveis para a obtenção da resposta de interesse máxima.

2.6. Purificação e caracterização bioquímica de dextranases

Diversas técnicas de concentração e separação de proteínas têm sido utilizadas para a purificação de dextranases, com recuperação de 12 a 53% da enzima (Shimizu et al., 1998; Arnold et al., 1998; Das e Dutta, 1996). As dextranases purificadas apresentaram atividade específica variando entre 10 e 78.500 U.mg⁻¹, revelando grande diferença de produtividade da enzima decorrente do microrganismo produtor, do meio de cultura e das condições de cultura utilizados e dos processos de purificação empregados (Khlikova et al., 2003; Arnold et al., 1998; Wynter et al., 1997).

Precipitação com sulfato de amônio concentrou dextranase com eliminação de parte de contaminantes presentes no extrato, com recuperação de 93% da enzima presente no extrato. (Arnold et al., 1998). Precipitação com polietileno glicol (PEG), isopropanol ou fracionamento com etanol apresentaram efeito similar, com maior recuperação da enzi-

ma no caso de precipitação com isopropanol em comparação com os outros reagentes (Khalikova et al., 2003; Shimizu et al., 1998; Koenig e Day, 1989).

A utilização de sistema bifásico formado por polietileno glicol e sulfato de amônio promoveu o fracionamento da dextranase, embora tenha ocorrido grande perda da enzima nessa etapa (Das e Dutta, 1996). Ultrafiltração também é uma alternativa para a concentração de dextranases, destacando sua eficiência em promover a dessalinização de amostras a serem aplicadas em cromatografias de troca iônica (Khalikova et al., 2003; Koenig e Day, 1989).

As técnicas cromatográficas combinadas a essas técnicas de fracionamento de proteínas permitem a purificação de dextranases. Para isso, diferentes resinas de exclusão molecular, troca iônica, interação hidrofóbica e cromatofocalização têm sido utilizadas (Mizuno et al., 2004; Khalikova et al., 2003; Arnold et al., 1998; Shimizu et al., 1998; Wynter et al., 1997; Wynter, 1997; Pleszczynska et al., 1996; Das e Dutta, 1996; Koenig e Day, 1989; Ramos e Spencer-Martins, 1983). No entanto, em um estudo de expressão de dextranase de *Arthrobacter globiformis* T6 em *Bacillus subtilis*, uma única etapa cromatográfica do extrato bruto em resina DEAE-Toyopearl foi suficiente para a purificação dessa enzima (Hatada et al., 2004).

Em outro relato, a resina Sephacryl S-300 funcionou de modo similar a uma resina de afinidade quando a dextranase produzida por uma bactéria foi purificada parcialmente. A rede de dextrana dessa resina permitiu a ligação da dextranase, enquanto seu grupamento N,N'-metilenobisacrilamida impediu sua hidrólise pela enzima (Wynter, 1997).

Dextranases produzidas por diferentes microrganismos apresentaram grandes diferenças em relação a suas propriedades físico-químicas. Considerando ainda a quantidade bastante variável de proteínas presentes no extrato bruto e o nível de purificação desejado, a combinação das diferentes técnicas de fracionamento de proteínas, necessária à purificação de dextranases, varia conforme a origem da dextranase que se deseja purificar.

A faixa de massa molecular relatada na literatura para dextranases varia de 26 kDa a 200 kDa (Hoster et al., 2001; Shimizu et al., 1998; Das e Dutta, 1996). Três formas de dextranases foram purificadas a partir de *Bacillus* sp, com massas moleculares de 76, 89 e 110 kDa (Khalikova et al., 2003), enquanto para outras três dextranases produzidas por *Penicillium funiculosum* a estimativa da massa molecular foi de 67 kDa (Abdel-Aziz et al., 2007).

Valores de ponto isoelétrico de dextranases apresentaram maior variação entre bactérias, de 4,0 a 7,7, seguido por fungos, de 4,0 a 6,2, e leveduras, de 5,4 a 7,0 (Khalikova et al., 2005). A maioria das dextranases produzidas por fungos apresentaram maior atividade na faixa de pH 5 a 6, enquanto a maioria das dextranases bacterianas apresentaram pH de maior atividade próximo à neutralidade (Khalikova et al., 2005, Jiménez, 2005). As dextranases de leveduras possuem pH de maior atividade em faixa bastante restrita de 4,5 a 5,3 (Chen et al., 2008 b; Khalikova et al., 2005).

A faixa de pH em que se observa estabilidade de dextranases é muito variável. A estabilidade da dextranase de *Lipomyces lipofer* foi na faixa de pH 4,5 e 6,0 à temperatura ambiente por 15 h (Ramos e Spencer-Martins, 1983), enquanto a dextranase produzida por *Lipomyces starkeyi* foi muito estável entre pH 2,5 e 8,0 (Koenig e Day, 1989). As dextranases produzidas por *Fusarium* sp. e *Penicillium funiculosum* foram estáveis em faixa mais ampla de pH, entre 4,5 e 11,8 a 4 °C por 24 h (Shimizu et al., 1998) e entre 3 e 10 após 1 hora (Abdel-Aziz et al., 2007), respectivamente. Por outro lado, a dextranase produzida por *Sporothrix schenckii* foi estável em faixa restrita de pH entre 4,5 e 4,75 (Arnold et al., 1998). No caso da dextranase de *Arthrobacter globiformis* I42 expressa em *E. coli*, cerca de 80% de atividade residual foi mantida na faixa de pH 5,5 a 7,4 após incubação a 4 °C durante 20 h (Morimoto et al., 2004).

A maior parte das dextranases já purificadas e caracterizadas, inclusive aquelas disponíveis comercialmente para aplicação industrial, não apresentam atividade catalítica e/ou estabilidade satisfatórias quando submetidas a temperaturas superiores a 60 °C. Em média, a temperatura ótima de dextranases produzidas por fungos é de aproximadamente 53 °C, enquanto para as dextranases produzidas por bactérias é cerca de 44 °C. No caso de dextranases produzidas por leveduras, a maior atividade ocorre em temperatura muito próxima a 50 °C (Khalikova et al., 2005; Jiménez, 2005). Uma exceção é o fungo *Chaetomium gracile*, cuja dextranase possui temperatura ótima de 65 °C (Hattori et al., 1981) e que tem sido utilizada comercialmente em indústrias de açúcar, assim como a dextranase de *Chaetomium erraticum* (Eggleston et al., 2009; Jiménez, 2005). A procura por microrganismos produtores de dextranases com maior estabilidade térmica resultou na identificação de algumas bactérias termofílicas. As dextranases produzidas por essas bactérias possuem temperatura ótima de até 80 °C e com estabilidade muito superior a de outras dextranases (Hoster et al., 2001; Wynter et al., 1997, 1996). Entretanto,

essas dextranases apresentaram atividade específica muito reduzida, inviabilizando sua aplicação industrial (Hoster et al., 2001; Wynter et al., 1995).

As quatro formas de dextranase produzidas por *Lipomyces starkeyi* apresentaram o mesmo valor de K_M , embora tenham apresentado diferenças em relação à massa molecular e ponto isoelétrico (Koenig e Day, 1989). Para a dextranase de *Penicillium funiculosum* 258, o valor de K_M foi de 25 μM e V_{max} de 22,2 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Abdel-Naby et al., 1999). A dextranase produzida por *Brevibacterium fuscum* var. *dextranlyticum* 0407 apresentou valor de K_M de 0,26 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e V_{max} de 59,6 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Mizuno et al., 2004), superior ao valor de K_M de 0,06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a dextranase de *Penicillium lilacinum* (Das e Dutta, 1996).

A expressão heteróloga de dextranase de *Arthrobacter globiformis* I42 em *E. coli* não alterou significativamente os valores de K_M (0,031 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e V_{max} (39,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) da dextranase nativa. A estabilidade da enzima à temperatura e pH também não foi alterada (Morimoto et al., 2004). Resultado semelhante foi obtido com a expressão heteróloga de dextranase de *Arthrobacter globiformis* T6 em *E. coli*, quando se obteve o valor de K_M de 0,28 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Iwai et al., 1994). Por outro lado, Hatada et al. (2004) relataram que a dextranase de *Arthrobacter globiformis* T6 expressa em *Bacillus subtilis* apresentou diferenças significativas em relação a K_M e K_{cat} , efeito do pH e alguns efetores químicos na atividade catalítica quando comparada à enzima nativa.

A comparação direta dos parâmetros cinéticos deve ser realizada com cuidado, devido às diferentes condições utilizadas nos ensaios enzimáticos bem como às diferentes unidades utilizadas para expressar os resultados.

O efeito de íons na atividade de dextranases é bastante variado, embora os íons Hg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} tenham sido os principais inibidores de dextranases relatados (Khalikova et al., 2005). Segundo Arnold et al. (1998) Hg^{2+} , $(\text{UO}_2)^{2+}$, Pb^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} inibiram a dextranase produzida por *Sporothrix schenckii*, enquanto Fe^{2+} , Al^{2+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} não exerceram efeito inibitório. A dextranase de *Fusarium* sp. foi parcialmente inibida por Cu^{2+} e inativada por Fe^{3+} , Hg^{2+} , Ag^+ e NBS (Shimizu et al., 1998). A dextranase de *Arthrobacter dextranlyticum* também foi inibida por Hg^{2+} e Fe^{3+} , além de *p*-cloromercuriobenzoato, contrários a Li^+ , Co^{2+} e Mn^{2+} que aumentaram a atividade enzimática (Hatada et al., 2004). Além de Hg^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , os íons Fe^{2+} , Ni^+ , Ba^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} também inibiram a atividade da dextranase de *Lipomyces starkeyi* (Koenig e Day, 1989).

A caracterização bioquímica de dextranases fornece importantes informações sobre as condições que podem afetar sua atividade catalítica e estabilidade, o que pode ser considerado em estudos cujo objetivo seja a utilização dessas enzimas em processos industriais ou no desenvolvimento de novos produtos.

2. OBJETIVOS

CAPÍTULO 1

Investigar o efeito de diversos fatores na produção da dextranase de *Paecilomyces marquandii*, incluindo fontes de nitrogênio e de minerais, pH e temperatura de incubação.

CAPÍTULO 2

Purificar e caracterizar bioquimicamente a dextranase produzida por *Paecilomyces marquandii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Naby, M., Ismail, A.-M. S., Abdel-Fattah, A.M., Abdel-Fattah, A.F. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. **Process Biochemistry**, v.34, n.4, p.391-398, 1999.
- Abdel-Aziz, M. S.; Talkhan, F.N.; Janson, J.-C. Purification and characterization of dextranase from a new strain of *Penicillium funiculosum*. **Journal of Applied Sciences Research**, v.3, n.11, p.1509-1516. 2007.
- Arnold, W., Nguyen, T.B.P., Mann, L.C. Purification and characterization of a dextranase from *Sporothrix schenckii*. **Archives in Microbiology**, v.170, n.2, p.91-98, 1998.
- Bari, Md. N., Alam, Md. Z., Muyibi, S.A., Jamal, P., Mamun, A.-Al. Improvement of production of citric acid from oil palm empty fruit bunches: Optimization of media by statistical experimental designs. **Bioresource Technology**, v.100, n.12, p.3113–3120, 2009.
- Brenda. The Comprehensive Enzyme Information System. Entry of glucan 1,6-alpha-glucosidase (EC-Number 3.2.1.11), 2007, a. http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.11, acessado dia 15/07/2007.
- Brenda. The Comprehensive Enzyme Information System. Entry of glucan 1,6-alpha-glucosidase (EC-Number 3.2.1.70), 2007, b. http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.70, acessado dia 15/07/2007.
- Brenda. The Comprehensive Enzyme Information System. Entry of glucan 1,6-alpha-isomaltosidase (EC-Number 3.2.1.94), 2007, c. http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.94, acessado dia 15/07/2007.
- Brenda. The Comprehensive Enzyme Information System. Entry of glucan 1,6-alpha-isomaltotriosidase (EC-Number 3.2.1.95), 2007, d http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.95, acessado dia 15/07/2007.
- Brenda. The Comprehensive Enzyme Information System. Entry of branched-dextran exo-1,2-alpha-glucosidase (EC-Number 3.2.1.115), 2007, e. http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.115), acessado dia 15/07/2007.
- CAZy - Carbohydrate Active Enzymes, 2007. http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html, acessado dia 16/07/2007.

- Chen, W., Zhao, Z., Chen, S.-F., Li, Y.-Q. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. **Bioresource Technology**, v.99, n.8, p.3187–3194, 2008 a.
- Chen, L.; Zhou, X.; Fan, W.; Zhang, Y. Expression, purification and characterization of a recombinant *Lipomyces starkeyi* dextranase in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v.58, n.1, p.87–93, 2008 b.
- Chen, Q.H., Hea, G.Q., Alib, M.A.M. Optimization of medium composition for the production of elastase by *Bacillus* sp. EL31410 with response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, n.5, p.667–672, 2002.
- Das, D.K., Dutta, S.K. Purification, biochemical characterisation and mode of action of an extracellular endo-dextranase from the culture filtrate of *Penicillium lilacinum*. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.28, n.1, p.107-113, 1996.
- Davies, G., Henrissat, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v.3, n.9, p.853-859, 1995.
- Decker; S.R., Adney; W.S., Vinzant; T.B., Himmel; M.E. Alkaline tolerant dextranase from *Streptomyces anulatus*. Patent number 6509184, 1999.
- Deepak, V., Kalishwaralal, K., Ramkumarpandian, S., Babu, S.V., Senthilkumar, S.R., Sangiliyandi, G. Optimization of media composition for nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v.99, n.17, p.8170-8174, 2008.
- Eggleston, G., Monge, A., Montes, B., Stewart, D. Application of dextranases in sugarcane factory: Overcoming practical problems. **Sugar Technology**, v.11, n.2, p.135-141, 2009.
- Eggleston, G.; Monge, A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. **Process Biochemistry**, v.40, n.5, p.1881-1894, 2005.
- Eiji, N., Hiroshi, S., Yasuo, K., Masaaki, I. Dextranase-containing oral care compositions. Patent number 0180817, 2001.
- Fang, H.Y., Chang, S.M., Hsieh, M.C., Fang, T.J. Production, optimization growth conditions and properties of the xylanase from *Aspergillus carneus* M34. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.49, n.1-4, p.36–42, 2007.

- García, B., Rodríguez, E. Carbon source regulation of a dextranase gene from the filamentous fungus *Penicillium minioluteum*. **Current Genetics**, v.37, n.6, p.396-402, 2000.
- García, B., Margolles, E., Roca, H., Mateu, D., Raices, M., Gonzáles, M.E., Herrera, L., Delgado, J. Cloning and sequencing of a dextranase-encoding cDNA from *Penicillium minioluteum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.143, n.2-3, p.175-183, 1996.
- Goulas, A.K., Fisher, D.A., Grimble, G.K., Grandison, A.S., Rastall, R.A. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextransucrase and dextranase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, n.4, p.327-338, 2004.
- Hamakawa, H., Uenosono, T. Oral care product for animal and method for producing the same. Patent numer 2006055050, 2006.
- Hatada, Y., Hidaka, Y., Nogi, Y., Uchimura, N.K., Katayama, K., Li, Z., Akita, M., Ohta, Y., Goda, S., Ito, H., Matsui, H., Ito, S., Horikoshi, K. Hyper-production of an isomalto-dextranase of an *Arthrobacter* sp. by a proteases-deficient *Bacillus subtilis*: sequencing, properties and crystallization of the recombinant enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.65, n.5, p.583-592, 2004.
- Hattori, A.; Ishibashi, K.; Minato, S. The purification and characterization of the dextranase of *Chaetomium gracile*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.45, n.11, p.2409-2416, 1981.
- Hayacibara, M.F., Koo, H., Smith, A.M.V., Kopec, L.K., Scott-Anne, K., Cury, J.A., Bowen, H.B. The influence of mutanase and dextranase on the production and structure of glucans synthesized by streptococcal glucosyltransferases. **Carbohydrate Research**, v.339, n.12, p.2127-2137, 2004.
- Herbots, I.M.A.J., Moese, R.L., Busch, A. Cleaning compositions comprising endo-dextranase. Patent number 9731999, 1997.
- Hild, E., Brumbley, S.M., O'Shea, M.G., Nevalainen, H., Bergquist, P.L. A *Paenibacillus* sp. dextranase mutant pool with improved thermostability and activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, n.5, p.1071-1078, 2007.
- Hoster, F., Daniel, R., Gottschalk, G. Isolation of a new *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain (FH1) producing a thermostable dextranase. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.47, n.4, p.187-192, 2001.

- Igarashi, T., Morisaki, H., Goto, N. Molecular characterization of dextranase from *Streptococcus rattus*. **Microbiology and Immunology**, v.48, n.3, p.155-162, 2004.
- Igarashi, T., Yamamoto, A., Goto, N. Nucleotide sequence and molecular characterization of a dextranase gene from *Streptococcus downei*. **Microbiology and Immunology**, v.45, n.5, p.341-348, 2001.
- Iwai, A., Ito, H., Mizuno, T., Mori, H., Matsui, H., Honna, M., Okada, G., Chiba, S. Molecular cloning and expression of an isomalto-dextranase gene from *Arthrobacter globiformis* T6. **Journal of Bacteriology**, v.176, n.24, p.7730-7734, 1994.
- Jiménez, E.R. The dextranase along sugar-making industry. **Biotechnologia Aplicada**, v.22, n.1, p.20-27, 2005.
- Jiménez, E.R., Sánchez, K., Roca, H., Delgado, J.M. Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level of dextranase. **Biotechnology Techniques**, v.11, n.7, p.461-466, 1997.
- Kammoun, R., Naili, B., Bejar, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresource Technology**, v.99, n.13, p.5602-5609, 2008.
- Khalikova, E., Susi, P., Korpela, T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.69, n.2, p.306-325, 2005.
- Khalikova, E., Susi, P., Usanov, N., Korpela, T. Purification and properties of extracellular dextranase from *Bacillus* sp. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.796, n.2, p.315-326, 2003.
- Khalikova, E. F., Usanov, N. G. An Insoluble Colored Substrate for Dextranase Assay. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.38, n.1, p.89-93, 2002.
- Koenig, D., Day, D. The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*. **European Journal of Biochemistry**, v.183, n.1, p.161-167, 1989.
- Larsson, A.M., Andersson, R., Stahlberg, J., Kenne, L., Jones, T.A. Dextranase from *Penicillium minioluteum*: reaction course, crystal structure and product complex. **Structure**, v. 11, n.11, p. 1111-1121, 2003.
- Li, X., Millson, S.H., Coker, R.D., Evans, I.H. Cloning and expression of *Penicillium minioluteum* dextranase in *Saccharomyces cerevisiae* and its exploitation as a re-

- porter in the detection of mycotoxins. **Biotechnology Letters**, v.28, n.24, p.1955-1964, 2006.
- Li, X., Ouyang, J., Xu, Y., Chen, M., Song, X., Yong, Q., Yu, S. Optimization of culture conditions for production of yeast biomass using bamboo wastewater by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v.100, n.14, p.3613–3617, 2009.
- Lotfy, W.A., Ghanem, K.M., El-Helow, E.R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. **Bioresource Technology**, v.98, n.18, p.3470–3477, 2007.
- Luo, J., Liu, J., Ke, C., Qiao, D., Ye, H., Sun, Y., Zeng, X. Optimization of medium composition for the production of exopolysaccharides from *Phellinus baumii* Pilát in submerged culture and the immuno-stimulating activity of exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v.78, n.3, p.409–415, 2009.
- Mahat, M.K., Illias, R.M., Rahman, R.A., Rashid, N.A.A., Mahmood, N.A.N., Hassan, O., Aziz, S.A., Kamaruddin, K. Production of cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1: media optimization using experimental design. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, n.5, p.467–473, 2004.
- Marotta, M., Martino, A., de Rosa, A., Farina, E., Carteni, M., de Rosa, M. Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes. **Process Biochemistry**, v.38, n.1, p.101-108, 2002.
- Mehvar, R. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. **Journal of Controlled Release**, v.69, n.1, p.1-25, 2000.
- Mizuno, M., Tonozuka, T., Suzuki, S., Uotsu-Tomita, R., Kamitori, S., Nishikawa, A., Sakano, Y. Structural insights into substrate specificity and function of glucodextranase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.11, p.1575-1583, 2004.
- Morimoto, N., Yasukawa, Y., Watanabe, K., Unno, T., Ito, Y., Matsui, H. Cloning and heterologous expression of a glucodextranase gene from *Arthrobacter globiformis* I42, and experimental evidence for the catalytic diad of the recombinant enzyme. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.97, n.2, p.127-130, 2004.
- Morisaki, H., Igarashi, T., Yamamoto, A., Goto, N. Analysis of a dextran-binding domain of the dextranase of *Streptococcus mutans*. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, n.3, p.223-227, 2002.

- Mountzouris, K.C., Gilmour, S.G., Rastall, R.A. Continuous production of oligodextrans via controlled hydrolysis of dextran in an enzyme membrane reactor. **Journal of Food Science**, v.67, n.5, p.1767-1771, 2001.
- Myers, R., Montgomery, D.C. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. New York: John Wiley & Sons, 1995.
- Neto, B.B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. Como estudar muitas variáveis de uma só vez. In: Planejamento e otimização de experimentos. Segunda edição. Campinas: Editora da Unicamp, São Paulo, Brasil. 278p. 1995.
- Nihira, T., Mizuno, M., Tonozuka, T., Sakano, Y., Mori, T., Okahata, Y. Kinetic studies of site-directed mutational isomalto-dextranase-catalyzed hydrolytic reactions on a 27 MHz quartz-crystal microbalance. **Biochemistry**, v.44, n.27, p.9456-9461, 2005.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), 2007. <http://www.expasy.org/enzyme/>, acessado dia 15/07/2007.
- Obara-Doi, S. M.; Dekker, R.F.H.; Castro-Gómez, R.J.H. Otimização da produção de dextranase de *Fusarium* sp utilizando Metodologia de Superfície de Resposta. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. Anais do XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003.
- Olano-Martin, E., Mountzouris, K.C., Gibson, G.R., Rastall, R.A. In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. **British Journal of Nutrition**, v.83, n.3, p.247-255, 2000.
- Ohnishi, Y., Kubo, S., Ono, Y., Nozaki, M., Gonda, Y., Okano, H., Matsuya, T., Matsuhiro, A., Morita, T. Cloning and sequencing of the gene coding for dextranase from *Streptococcus salivarius*. **Gene**, v.156, n.1, p.93-96, 1995.
- Pitarresi, G., Casadei, M.A., Mandracchia, D., Paolicelli, P., Palumbo, F.S., Giammona, G. Photocrosslinking of dextran and polyaspartamide derivatives: a combination suitable for colon-specific drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v.119, n.3, p.328-338, 2007.
- Plackett, R.L., Burman, J.P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v.33, n.4, p. 305-325, 1946.

- Pleszczynska, M., Rogalski, J., Szczodrak, J., Fiedurek, J. Purification and some properties of an extracellular dextranase from *Penicillium notatum*. **Mycological Research**, v.100, n.6, p.681-686, 1996.
- Ramos, A., Spencer-Martins, I. Extracellular glucose-producing exodextranase of the yeast *Lipomyces lipofer*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.49, n.2, p.183-190, 1983.
- Reddy, L.V.A., Wee, Y.-J., Yun, J.-S., Ryu, H.-W. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. **Bioresource Technology**, v.99, n.7, p.2242–2249, 2008.
- Rie, T., Holk, N.P., Dorrit, A. An oral care composition comprising a bacillus pullulanase and a dextranase. Patent number 9857653, 2000.
- Rodrigues, M.I., Iemma, A.F. Estratégia experimental para fatoriais fracionados e delineamento composto central rotacional (DCCR). In: Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Campinas: Editora Casa do Pão, São Paulo, Brasil. 618p. 2005.
- Rodrigues, M.I., Filho, R.M., Maugeri, F. Optimization of a process of continuous enzyme purification by surface response methodology. **Food Control**, v.4, n.3, p.144-148, 1993.
- Szczodrak, J., Pleszczynska, M., Fiedurek, J. *Penicillium notatum* 1 a new source of dextranase. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.13, n.5, p.315-320, 1994.
- Sentürk, S. Effects of a hypertonic saline solution and dextran 70 combination in the treatment of diarrhoeic dehydrated calves. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v.50, n.2, p.57–61, 2003.
- Shimizu, E., Unno, T., Ohba, M., Okada, G. Purification and characterization of an isomaltotriose-producing endo-dextranase from a *Fusarium* sp. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.62, n.1, p.117-122, 1998.
- Simonson, L.G.; Liberta, A.E.; Richardson, A. Characterization of an extracellular dextranase from *Fusarium moniliforme*. **Applied Microbiology**, v.30, n.5, p.855-861, 1975.
- Singh, B., Satyanarayana, T. Improved phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in submerged fermentation due to statistical optimization. **Bioresource Technology**, v.99, n.4, p.824–830, 2008.

- Souza, C.F.V., Flôres, S.H., Ayub, M.A.Z. Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. **Process Biochemistry**, v.41, n.5, p.1186–1192, 2006.
- Sun, Y., Han, B., Liu, W., Zhang, J., Gao, X. Substrate induction and statistical optimization for the production of chitosanase from *Microbacterium* sp. OU01. **Biore-source Technology**, v.98, n.8, p.1548–1553, 2007.
- Szczodrak, J., Pleszczyńska, M., Fiedurek, J. *Penicillium notatum* 1 a new source of dextranase. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.13, n.5, p.315-320, 1994.
- Talkhan, F.N., El-Marsy, H.G., Hassanein, S.M., El-Beih, F.M., Abdel-Aziz, M.S. Genetic Improvement of Dextranase Production by *Penicillium funiculosum* via Mutation Induction and Protoplast Fusion. International **Journal of Agriculture and Biology**, v.10, n.1, p.42-46, 2008.
- Techapun, C., Charoenrat, T., Watanabe, M., Sasaki, K., Poosaran, N. Optimization of thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase production from agricultural waste by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106, using the central composite experimental design. **Biochemical Engineering Journal**, v.12, n.2, p.99–105, 2002.
- Tochihara, T., Sasaki, K., Araki, O., Morimoto, N., Watanabe, K., Hatada, Y., Ito, S., Ito, H., Matsui, H. Site-directed mutagenesis establishes aspartic acids-227 and -342 as essential for enzyme activity in an isomalto-dextranase from *Arthrobacter globiformis*. **Biotechnology Letters**, v.26, n.8, p.659-664, 2004.
- Vaidya, R., Vyas, P., Chhatpar, H.S. Statistical optimization of medium components for the production of chitinase by *Alcaligenes xylosoxydans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, n.1, p.92–96, 2003.
- Vohra, A., Satyanarayana, T. Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*. **Process Biochemistry**, v.37, n.9, p.999–1004, 2002.
- Wang, D., Xu, Y., Shan, T. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, v.41, n.1, p.30–37, 2008.

- Wiater, A., Szczodrak, J., Rogalski, J. Hydrolysis of mutan and prevention of its formation in streptococcal films by fungal α -D-glucanases. **Process Biochemistry**, v.39, n.11, p.1481–1489, 2004.
- Wynter, C. Partial purification of a thermostable dextranase using Sephacryl S-300 adsorption. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, n.5, p.321-324, 1997.
- Wynter, C.V.A., Chang, M., De Jersey J., Patel, B., Inkerman, P.A., Hamilton, S. Isolation and characterization of a thermostable dextranase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.20, n.4, p.242-247, 1997.
- Wynter, C., Patel, B.K.C., Bain, P., De Jersey, J., Hamilton, S., Inkerman, P.A., A novel thermostable dextranase from a *Thermoanaerobacter* species cultured from the geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia. **FEMS Microbiology Letters**, v.140, n.2-3, p.271-276, 1996.
- Wynter, C.V.A.; Galea, C.F.; Cox, L.M.; Dawson, M.W.; Patel, B.K.; Hamilton, S.; De Jersey, J.; Inkerman, P.A. Thermostable dextranases: screening, detection and preliminary characterization. **Journal of Applied Microbiology**, v.79, n.2, p.203-212, 1995.
- Zhou, M., Zhang, C., Upson, R.H., Haugland, R.P. Two fluorometric approaches to the measurement of dextranase activity. **Analytical Biochemistry**, v.260, n.2, p.257-259, 1998.
- Zhuang, Y.P., Chen, B., Chu, J., Zhang, C. Medium optimization for meilingmycin production by *Streptomyces nanchangensis* using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v.41, n.2, p.405–409, 2006.

CAPÍTULO 1

Produção de dextranase de *Paecilomyces marquandii*

Produção de dextranase por *Paecilomyces marquandii*

Resumo

O efeito de vários componentes do meio de cultura e temperatura de incubação foram estudados sobre a produção da dextranase de *Paecilomyces marquandii* utilizando o delineamento de Plackett-Burman. Dextrana, nitrato de amônio, extrato de levedura e peptona apresentaram efeito significativo sobre a produção da dextranase. Os três primeiros mostraram efeito positivo, enquanto peptona apresentou efeito negativo sobre a produção da enzima. A técnica de deslocamento utilizada para aproximação do ótimo de produção da dextranase mostrou que ele está dentro ou bem próximo do espaço experimental utilizado. Essa condição parece ser adequada para a modelagem da superfície de resposta e determinação da faixa de valores dos níveis dessas variáveis para a produção máxima da dextranase.

Palavras-chave: Dextranase, *Paecilomyces marquandii*, Produção

1. Introdução

Dextranases (EC 3.2.1.11; α -1,6-D-glicano-6-glicanohidrolase) catalisam a hidrólise de ligações α -(1,6)-D-glicosídicas em polímeros de dextrana, sendo produzidas por diversos fungos, bactérias e algumas espécies de leveduras (Khalikova et al., 2005; Finnegan et al., 2004). A principal aplicação de dextranases é para eliminar dextranas que podem ocasionar diversos problemas operacionais durante o processo de produção de açúcar, inclusive queda de rendimento (Eggleston et al., 2009; Jiménez, 2005). Devido ao envolvimento de dextranas na formação de placas bacterianas, dextranases também são eficazes na remoção dessas placas, tendo sido utilizadas na formulação de produtos de higiene bucal (Hiroshige and Takashi, 2006; Hayacibara et al., 2004; Eiji et al., 2001). Outras aplicações de dextranases são na elaboração de produtos de limpeza (Decker et al., 1999; Herbots et al., 1997) e na produção de agentes pré-bióticos (Goulas et al., 2004; Mountzouris et al., 2001). A otimização da produção de dextranases poderia tornar sua utilização economicamente viável, ampliando sua utilização em nível industrial.

O método clássico de otimização consiste em variar níveis de cada variável, mantendo as demais em nível constante. Esse procedimento pode ser oneroso e demandar muito tempo quando for necessário estudar muitas variáveis, devido ao grande número de ensaios para se determinar seus níveis ótimos. Além disso, o efeito combinado das variáveis estudadas é negligenciado. Avaliar o efeito de todos os parâmetros de interesse em um número reduzido de experimentos através do delineamento de Plackett-Burman (Plackett and Burman, 1946), seguido de um estudo de metodologia de superfície de resposta, pode eliminar essas limitações. O delineamento Plackett-Burman permite selecionar apenas as variáveis significativamente importantes em um determinado processo, com base somente em seus efeitos principais (Sun et al., 2007). A determinação dos níveis ótimos das variáveis então selecionadas tem sido realizada principalmente pelo delineamento fatorial Box–Behnken (Lotfy et al., 2007), delineamento fatorial composto central (DCC) (Fu et al., 2009), delineamento fatorial composto central rotacionado (DCCR) (Deepak et al., 2008) e delineamento fatorial de Taguchi (Azin et al., 2007). Esses delineamentos avaliam não somente o efeito principal das variáveis como também as interações entre elas.

O objetivo desse trabalho foi avaliar fatores que interferem na produção de dextranase de *Paecilomyces marquandii*, tendo em vista os poucos relatos existentes sobre a otimização da produção de dextranases, bem como o número relativamente reduzido de variáveis estudadas em um mesmo experimento.

2. Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo e Fermentação, Laboratório de Biotecnologia Molecular, localizados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, e na Clínica de Doenças de Plantas, do Departamento de Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Reagentes

Dextrana (massa molecular de 60.000-90.000) foi adquirida de USB Co. (Cleveland, USA). Ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), dodecilsulfato de sódio (SDS) e 2-mercaptoetanol foram adquiridos de Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Ágar-ágar e trip-tona foram adquiridos de Himedia (Mumbai, Índia). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.1. Medida da atividade enzimática

A atividade de dextranase foi medida com base na quantidade de açúcares redutores produzidos a partir da hidrólise da dextrana, e medidos por sua reação com o ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). O ensaio enzimático consistiu de 750 µL de solução tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,2), 200 µL de solução de dextrana 1% e 50 µL de amostra enzimática. O sistema de reação foi incubado a 40 °C durante 15 min. Após esse tempo, a reação foi paralisada pela adição de 1 mL do reativo de DNS. As amostras foram fervidas durante 5 min e esfriadas à temperatura ambiente. As leituras de absorbância foram realizadas em comprimento de onda de 540 nm. Os valores de absorbância das amostras foram subtraídos da leitura de absorbância dos controles preparados pela adição do reagente DNS antes da amostra enzimática. A transformação dos valores de absorbância em quantidade de açúcar redutor foi realizada utilizando uma curva padrão construída com 0,111 a 0,888 µmol de glicose. Uma unidade (U) de dextranase foi definida como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 mmol de açúcar redutor, expresso como equivalentes de glicose, por minuto, nas condições de ensaio utilizadas. Todas as medidas de atividade foram realizadas em triplicata.

2.3. Microrganismo e preparo do inóculo

O fungo *Paecilomyces marquandii*, isolado a partir de amostras de solo, foi utilizado para a produção de dextranase. O microorganismo foi identificado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa e no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. O meio de cultura sólido utilizado para crescimento do fungo continha, em cada litro, 8 g de dextrana, 2,5 g de NaNO₃, 0,75 g

de KH_2PO_4 , 0,125 g de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g de KCl , 0,05 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,054 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 17 g de ágar-ágar. O pH desse meio foi ajustado para 7. O fungo foi repicado nesse meio de cultura e incubado a 28 °C durante 10 dias.

O meio de cultura líquido padrão utilizado para a produção de dextranase continha, em cada litro, 10 g de dextrana, 10 g de NaNO_3 , 4 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de KCl , 0,178 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,18 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O pH do meio de cultura foi ajustado para 7 e autoclavado a 121 °C durante 20 min. Cada ensaio consistiu de frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio líquido inoculados com 1 mL de suspensão, contendo 10^7 esporos. mL^{-1} , recolhidos a partir do meio sólido. Os frascos foram incubados a 28 °C durante 5 dias e submetidos a 180 rpm. A composição do meio líquido e a temperatura de incubação variaram com o delineamento experimental descrito a seguir.

2.4. Fontes de carbono e seleção dos níveis das variáveis (fatores)

Dextrana, farelo de trigo, amido e de bagaço de cana-de-açúcar foram avaliados, na concentração de 1%, como fontes de carbono para a produção de dextranase em meio líquido. Os meios de cultura foram incubados a 30 °C, durante 7 dias, em agitador de frascos Erlenmeyer, e submetidos a 180 rpm.

Após a seleção da melhor fonte de carbono indutora de dextranase, avaliou-se o efeito de algumas variáveis na produção da enzima (Tabela 1). Cada fator foi estudado em níveis selecionados a partir de estudos realizados envolvendo a produção de dextranases por fungos (Abdel-Aziz et al., 2007; Obara-Doi et al., 2003; Abdel-Naby et al., 1999; Shimizu et al., 1998; Szczodrak et al., 1994; Hattori et al., 1981).

O efeito de cada uma das fontes de minerais e nitrato de sódio presentes no meio de cultura padrão foi avaliado, uma por vez, na produção da enzima. Em seguida, avaliou-se o efeito de Mn^{2+} , Na^+ e Ca^{2+} , um de cada vez, mantendo fixa a composição do meio de cultura padrão. O efeito das outras fontes de nitrogênio foi avaliado, substituindo o nitrato de sódio por cada uma dessas e mantendo os demais constituintes do meio de cultura padrão. Diferentes níveis de temperatura e pH também foram estudados.

Tabela 1. Níveis das variáveis avaliados em relação à produção de dextranase de *Paecilomyces marquandii*.

Variável	Nível	Variável	Nível
	0		0
KH ₂ PO ₄ (%)	0,1	MnSO ₄ (%)	0,005
	0,2		0,010
	0,3		0,015
	0		0
MgSO ₄ (%)	0,05	NH ₄ Cl (%)	0,5
	0,1		1,0
	0,15		1,5
	0		0
KCl (%)	0,02	NH ₄ NO ₃ (%)	0,5
	0,05		1,0
	0,1		1,5
	0		0
FeSO ₄ (%)	0,003	Extrato de levedura (%)	0,25
	0,01		0,5
	0,02		1
	0		0
ZnSO ₄ (%)	0,003	Triptona (%)	0,5
	0,010		1,0
	0,020		1,5
	0		4
NaNO ₃ (%)	0,5	pH	5
	1,0		6
	1,5		7
	0		0
CaCl ₂ (%)	0,015	NaCl (%)	0,025
	0,025		0,05
	0,045		0,1
	20		
Temperatura (°C)	26		
	30		

2.5. Delineamento experimental

2.5.1. Plackett-Burman

Dextrana, fontes de nitrogênio, minerais, pH e temperatura foram estudados no delineamento de Plackett-Burman. As dezesseis variáveis foram investigadas em vinte ensaios, sendo cada uma delas representada em dois níveis codificados como superior (+1) e inferior (-1) (Tabela 2). Nesse tipo de delineamento, o número de vezes em que cada variável está presente nos níveis superior e inferior é o mesmo.

O efeito principal estimado de cada variável é a diferença entre a média das determinações realizadas em seu nível superior e a média das determinações realizadas em seu nível inferior, dividida pelo número de ensaios do experimento:

$$E(V_i) = \frac{2(\sum V_{i(+1)} - \sum V_{i(-1)})}{N} \quad (1)$$

O delineamento Plackett-Burman é de resolução três, ou seja, considera não haver efeitos de interação entre as variáveis estudadas, sendo estimados apenas os efeitos principais. Com isso, sua utilização deve ser restrita à triagem de variáveis significativas ao processo.

Tabela 2. Matriz do delineamento de Plackett-Burman (PB) para as dezesseis variáveis experimentais estudadas.

Ensaio	Variável															
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14	X15	X16
1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1
2	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1
3	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1
5	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1
7	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
8	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1
9	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1
10	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1
11	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
12	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1
13	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1
14	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1
15	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1
16	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1
17	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
18	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
19	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1
20	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1

2.5.2. Delineamento fatorial completo

Dextrana, nitrato de amônio, extrato de levedura e triptona, selecionados a partir do delineamento Plackett-Burman, por afetarem significativamente a produção da dextranase ($p < 0,1$), foram estudados nessa etapa. Como se desconhece os níveis dessas quatro variáveis que proporcionem uma produção otimizada da dextranase de *Paecilomyces marquandii*, um delineamento fatorial $2^k + 1$ foi realizado na tentativa de se aproximar das condições experimentais que permitam uma produção elevada da enzima (deslocamento). Esse planejamento consistiu em realizar um experimento fatorial completo de dois níveis para os quatro fatores (2^4). Nesse experimento, a inclusão de três pontos centrais (nível 0) para os quatro fatores significativos, no mesmo ensaio, foram utilizados para estimar o erro. Ao término do deslocamento, a realização de um delineamento que permita a modelagem de uma superfície de resposta para a determinação dos níveis ótimos dos fatores selecionados torna-se viável. A matriz do delineamento fatorial $2^k + 1$ utilizado nesse trabalho é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3. Matriz do delineamento fatorial $2^4 + 3$ com as quatro variáveis selecionadas a partir do delineamento de Plackett-Burman.

Ensaio	Variável				Ensaio	Variável			
	X1	X12	X13	X14		X1	X12	X13	X14
1	+1	-1	+1	-1	11	+1	+1	+1	-1
2	-1	+1	+1	-1	12	+1	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1	+1	13	+1	-1	-1	+1
4	-1	-1	-1	+1	14	0	0	0	0
5	-1	+1	-1	-1	15	+1	-1	-1	-1
6	+1	+1	-1	+1	16	-1	-1	-1	-1
7	+1	+1	+1	+1	17	-1	-1	+1	-1
8	-1	+1	+1	+1	18	0	0	0	0
9	0	0	0	0	19	+1	-1	+1	+1
10	-1	-1	+1	+1					

2.6. Análises estatísticas

O software estatístico MINITAB® Release 14.1 foi utilizado para gerar e analisar os delineamentos de Plackett-Burman e fatorial completo. Os efeitos das variáveis estudadas foram considerados significativos ao nível de 10% de probabilidade ($p < 0,1$).

3. Resultados e discussão

3.1. Fontes de carbono e seleção dos níveis das variáveis

Entre as fontes de carbono avaliadas nesse estudo, dextrana foi a mais eficiente na produção de dextranase de *Paecilomyces marquandii*. Farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e amido induziram muito pouco a produção da dextranase (Figura 1). Portanto, dextrana foi mantida como fonte de carbono durante os experimentos nesse estudo. Efeito semelhante foi relatado em outro trabalho (Szciodrak et al., 1994) quando diferentes fontes de carbono foram avaliadas.

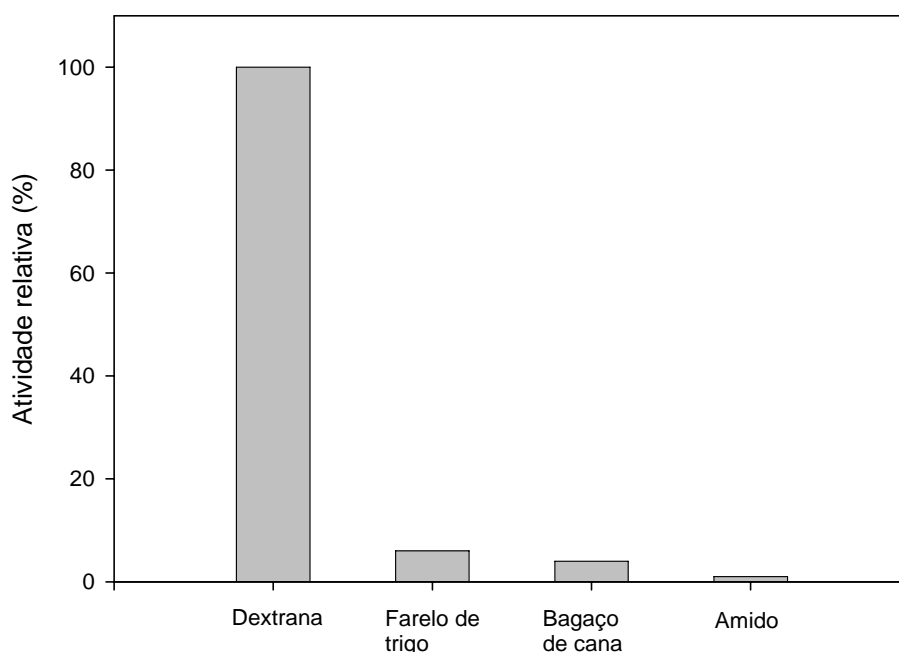


Figura 1. Efeito de fontes de carbono sobre a produção de dextranase de *Paecilomyces marquandii*

De um modo geral, dextranas são utilizadas como a única fonte de carbono indutora de dextranase, com exceção de estudos envolvendo a expressão heteróloga de dextrana-

ses (Hatada et al., 2004; Jiménez et al., 1997). Em outros trabalhos, amilopectina (Obara-Doi et al., 2003) e maltose (Das e Dutta, 1996) apresentaram sinergismo sobre a produção da enzima quando utilizadas com dextranas como fonte de carbono.

A variação observada de atividade de dextranase quando cloreto de potássio, sulfato de zinco e sulfato ferroso foram adicionados ao meio de crescimento, na faixa de concentrações utilizadas, não foi significativa. Os demais fatores apresentaram efeito na produção de dextranase quando adicionados ao meio de crescimento, nos níveis utilizados (Tabela 4). Os níveis inferior e superior de cada variável estudada no delineamento de Plackett-Burman é mostrado na Tabela 5. Os níveis das variáveis utilizados no delineamento de Plackett-Burman foram selecionados com base no efeito sobre a produção da dextranase.

Tabela 4. Efeitos dos níveis das variáveis estudadas na produção de dextranase de *Paecilomyces marquandii*.

Variável	Nível	AD (U.mL ⁻¹) ^a	Variável	Nível	AD (U.mL ⁻¹) ^a
KH ₂ PO ₄ (%)	0	0,27	MnSO ₄ (%)	0	6,69
	0,1	0,52		0,005	6,13
	0,2	1,65		0,010	6,61
	0,3	4,62		0,015	8,87
MgSO ₄ (%)	0	5,73	NH ₄ Cl (%)	0	0
	0,05	4,98		0,5	13,74
	0,1	6,99		1,0	14,17
	0,15	7,74		1,5	10,05
KCl (%)	0	5,31	NH ₄ NO ₃ (%)	0	0
	0,02	4,95		0,5	9,77
	0,05	5,04		1,0	11,40
	0,1	4,11		1,5	7,92
FeSO ₄ (%)	0	6,97	Extrato de levedura (%)	0	0
	0,003	7,15		0,25	6,50
	0,010	6,10		0,5	4,33
	0,020	6,77		1,0	0

^a AD - 1U é quantidade de enzima que produz 1 mmol de açúcar por minuto

Tabela 4. Efeito dos níveis das variáveis estudadas na produção de dextranase de *Paecilomyces marquandii*. (Continuação).

Variável	Nível	AD ^a (U.mL ⁻¹)	Variável	Nível	AD ^a (U.mL ⁻¹)
ZnSO ₄ (%)	0	5,28	Tryptona (%)	0	0
	0,003	6,52		0,5	7,28
	0,01	5,18		1,0	4,50
	0,02	6,18		1,5	0
NaNO ₃ (%)	0	4,83	pH	4	0
	0,5	6,37		5	3,70
	1,0	8,25		6	4,03
	1,5	8,25		7	6,29
CaCl ₂ (%)	0	7,11	NaCl (%)	0	5,84
	0,015	4,48		0,025	7,67
	0,025	3,01		0,05	7,68
	0,045	3,47		0,1	7,20
Temperatura (°C)	20	2,47			
	26	6,95			
	30	2,16			

^a Atividade de dextranase - 1U é quantidade de enzima que produz 1 mmol de açúcar redutor por minuto.

Tabela 5. Níveis das variáveis experimentais estudados no delineamento de Plackett-Burman

Variável	Símbolo	Unidade	Nível inferior	Nível superior
			(-1)	(+1)
Dextrana	X1	%	0,5	2
KH ₂ PO ₄	X2	%	0,05	0,3
KCl	X3	%	0,001	0,1
FeSO ₄	X4	%	0,001	0,02
MgSO ₄	X5	%	0,002	0,15
CaCl ₂	X6	%	0,002	0,025
NaCl	X7	%	0,002	0,025
ZnSO ₄	X8	%	0,001	0,02

Tabela 5. Níveis das variáveis experimentais estudados no delineamento de Plackett-Burman (Continuação).

Variável	Símbolo	Unidade	Nível inferior	Nível superior
			(-1)	(+1)
MnSO ₄	X9	%	0,005	0,015
NaNO ₃	X10	%	0	1,5
NH ₄ Cl	X11	%	0	1
NH ₄ NO ₃	X12	%	0	1
Extrato de levedura	X13	%	0	0,25
Triptona	X14	%	0	0,5
pH	X15		5	7
Temperatura	X16	°C	26	31

3.2. Delineamento de Plackett-Burman

Pelo delineamento de Plackett-Burman foi possível observar a influência da composição do meio na produção da dextranase de *Paecilomyces marquandii* (Tabela 6), com valores de atividade da enzima variando entre 0,29 U.mL⁻¹ e 21,80 U.mL⁻¹. Essa variação reflete a importância da otimização do meio de cultura para aumentar a produção da enzima.

Tabela 6. Matriz do delineamento Plackett-Burman e os resultados de produção de dextranase (AD). 1U é quantidade de enzima que produz 1 mmol de açúcar redutor por minuto.

Ensaio	Variáveis																AD (U.mL ⁻¹)
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14	X15	X16	
1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	3,13
2	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	19,88
3	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	0,29
4	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	6,72
5	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	11,44
6	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	21,80
7	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	5,13
8	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	7,85
9	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	4,82
10	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	17,93
11	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	4,27
12	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	0,34
13	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	7,66
14	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	0,44
15	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	5,95
16	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	0,33
17	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	7,91
18	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,38
19	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	0,29
20	+1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	4,27

Entre as dezesseis variáveis analisadas, a fonte de carbono dextrana exerceu o maior efeito significativo sobre a produção da dextranase, seguida de extrato de levedura e nitrato de amônio. Triptona apresentou efeito negativo sobre a produção da enzima, enquanto as demais variáveis estudadas não exerceram efeito ($p>0,1$) nos níveis estudados (Tabela 7).

Tabela 7. Efeitos estimados das variáveis estudadas no delineamento de Plackett-Burman na produção de dextranase de *Paecilomyces marquandii*.

Variável	Efeito	P valor
Dextrana	6,841	0,028*
KH ₂ PO ₄	1,423	0,465
KCl	-2,299	0,270
FeSO ₄	-1,365	0,482
MgSO ₄	0,441	0,813
CaCl ₂	3,461	0,135
NaCl	0,311	0,867
ZnSO ₄	-2,771	0,203
MnSO ₄	1,931	0,340
NaNO ₃	1,717	0,388
NH ₄ Cl	0,633	0,735
NH ₄ NO ₃	4,355	0,084*
Extrato de levedura	4,925	0,063*
Triptona	-4,355	0,084*
pH	-2,727	0,208
Temperatura	-2,013	0,323

*Efeitos significativos ($p<0,1$)

No estudo sobre a otimização da produção da dextranase de *Fusarium sp.*, o delineamento fatorial fracionado 2⁹⁻⁵ mostrou que dextrana, amilopectina, extrato de levedura e peptona afetaram positivamente a produção da enzima, enquanto as fontes de nitrogênio inorgânico sulfato de amônio e nitrato de sódio exerceram efeito negativo sobre a mesma (Obara-Doi et al., 2003). Quando dextrana, amilopectina e extrato de levedura foram utilizadas nas concentrações de 1%, 0,8% e 0,9%, respectivamente, a produção

máxima de dextranase de $0,945 \text{ U.mL}^{-1}$ foi alcançada, muito inferior à produção de aproximadamente 20 U.mL^{-1} observada nos ensaios 2 e 6 desse trabalho.

Utilizando-se a técnica em que se avalia um fator por vez, a maior produção da dextranase de *Penicillium notatum* foi observada entre 14 e 16 U.mL^{-1} , quando 1,5% de dextrana, 0,2% de extrato de levedura, NaNO_3 e KH_2PO_4 , pH 5,5 e 100 mL de meio de cultura foram utilizados (Szciodrak et al., 1994). A indução para a produção dessa dextranase não foi influenciada pela massa molecular de dextrana utilizada como fonte de carbono.

Uma produção de dextranase de $41,8 \text{ U.mL}^{-1}$ foi obtida para *Penicillium funiculosum* quando foi utilizado o meio de cultura otimizado constituído de 3,5% de dextrana, 1% de NaNO_3 , 0,2% de extrato de levedura, 0,4% de KH_2PO_4 , 0,06% de MgSO_4 , 0,02% de KCl , 0,001% de FeSO_4 e pH inicial 8. Neste caso, o efeito sinérgico de NaNO_3 e extrato de levedura foi significativo (Abdel-Naby et al., 1999).

Conforme observado neste trabalho, a utilização do delineamento Plackett-Burman permitiu reduzir o número de fatores estudados de dezesseis para apenas quatro, o que implica redução significativa de custos. Embora esse tipo de planejamento seja indicado para triagem quando o número de fatores for superior a quatro (Rodrigues e Iemma, 2005), sua principal utilização ocorre em planejamentos em que são avaliados ao menos nove fatores (Fu et al., 2009; Ma et al., 2008; Kammoun et al., 2008; Sun et al., 2007). Outros delineamentos fatoriais fracionados com até nove variáveis têm sido uma alternativa satisfatória na etapa de triagem de fatores em estudos de otimização (Zhuang et al., 2006; Tang et al., 2004).

Quando o estudo de otimização partir de um número reduzido de variáveis já no início do experimento, a aplicação direta de um delineamento composto central (Deepak et al., 2008; Techapun et al., 2002) ou até mesmo de um delineamento fatorial completo (Mahat et al., 2004; Bocchini et al., 2002) pode ser viável, seja para realizar a triagem dos fatores ou modelar a superfície de resposta com as variáveis em estudo.

3.3. Delineamento fatorial completo

Para realizar o deslocamento nesse trabalho, com o objetivo de se aproximar do ótimo da produção da dextranase de *Paecilomyces marquandii*, os níveis superiores de dextrana, nitrato de amônio e extrato de levedura, no delineamento Placett-Burman, foram utilizados como os níveis inferiores no delineamento 2^4+1 . Por outro lado, o nível superior (+1) de triptona nesse segundo delineamento foi 0%, pois o seu efeito na produção da dextranase foi negativo. As demais variáveis foram mantidas no nível inferior (-1) utilizado no delineamento Plackett-Burman (Tabela 8). Triptona e os fatores cujo efeito não foi significativo foram mantidos no estudo de modo a evitar a perda de eventual sinergismo sobre a produção da dextranase.

Tabela 8. Níveis das variáveis experimentais estudados no delineamento fatorial completo.

Variável	Símbolo	Nível das variáveis (%)		
		(-1)	(0)	(+1)
Dextrana	X1	2	3,5	5
NH ₄ NO ₃	X12	1	1,75	2,5
Extrato de levedura	X13	0,25	0,50	0,75
Triptona	X14	0,25	0,125	0

Há diferenças entre alguns trabalhos em relação aos níveis das variáveis não significativas utilizados na seqüência do delineamento Placett-Burman. Esses níveis foram selecionados como o nível central (Zhuang et al., 2006) ou o nível inferior (Tang et al., 2004) utilizado no delineamento Placett-Burman. Em outro estudo, os níveis dos fatores não significativos foram aqueles utilizados nos ensaios do delineamento Placett-Burman em que os resultados foram os melhores (Sun et al., 2007). De modo diferente, os níveis das variáveis não significativas com efeito positivo sobre a resposta foram utilizadas em seu nível superior, enquanto o nível inferior foi adotado para aquelas cujo efeito foi negativo (Wang et al., 2009).

Os resultados de atividade de dextranase no delineamento fatorial completo são mostrados na Tabela 9. A variação de atividade de dextranase foi menor que aquela observada no primeiro delineamento. Nenhum dos efeitos principais ou interações foi significativo ($p>0,1$) (Tabela 10). Por outro lado, a falta de ajuste foi significativa (Ta-

bela 11). Isso implica que os resultados não foram ajustados a um modelo linear, pois o delineamento $2^k + 1$ baseia-se em modelo de primeiro grau.

Tabela 9. Efeitos dos níveis das variáveis estudadas no delineamento fatorial $2^k + 1$ na produção de dextranase.

Ensaio	Variável				AD ^a (U.mL ⁻¹)
	X1	X12	X13	X14	
1	+1	-1	+1	-1	10,41
2	-1	+1	+1	-1	3,64
3	-1	+1	-1	+1	2,39
4	-1	-1	-1	+1	15,76
5	-1	+1	-1	-1	5,26
6	+1	+1	-1	+1	2,72
7	+1	+1	+1	+1	4,25
8	-1	+1	+1	+1	4,55
9	0	0	0	0	14,40
10	-1	-1	+1	+1	7,97
11	+1	+1	+1	-1	3,59
12	+1	+1	-1	-1	10,21
13	+1	-1	-1	+1	2,39
14	0	0	0	0	16,46
15	+1	-1	-1	-1	6,06
16	-1	-1	-1	-1	4,04
17	-1	-1	+1	-1	6,93
18	0	0	0	0	9,29
19	+1	-1	+1	+1	3,59

^a Atividade de dextranase - 1U é quantidade de enzima que produz 1 mmol de açúcar redutor por minuto.

Tabela 10. Estimativa dos efeitos principais e de interações das variáveis estudadas na produção de dextranase.

Termo	Efeito	P valor
Constante		0,028
Dextrana	-0,915	0,824
NH ₄ NO ₃	-2,567	0,545
Extrato de levedura	-0,486	0,906
Triptona	-0,814	0,843
Dextrana x NH ₄ NO ₃	2,146	0,609
Dextrana x Extrato de levedura	0,602	0,883
Dextrana x Triptona	-3,517	0,419
NH ₄ NO ₃ x Extrato de levedura	-0,648	0,874
NH ₄ NO ₃ x Triptona	-1,382	0,738
Extrato de levedura x Triptona	-0,238	0,954
Dextrana x NH ₄ NO ₃ x Extrato de levedura	-2,011	0,631
Dextrana x NH ₄ NO ₃ x Triptona	2,298	0,585
Dextrana x Extrato de levedura x Triptona	1,489	0,719
NH ₄ NO ₃ x Extrato de levedura x Triptona	3,222	0,455
Dextrana x NH ₄ NO ₃ x Extrato de levedura x Triptona	-0,392	0,924

Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) de efeitos principais e interações das variáveis estudadas na produção de dextranase.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Efeitos principais	4	33,297	8,324	0,15	0,953
Interações de 2ª ordem	6	78,892	13,149	0,23	0,939
Interações de 3ª ordem	4	87,672	21,918	0,39	0,81
Interações de 4ª ordem	1	0,615	0,615	0,01	0,924
Erro residual	3	170,36	56,787		
Falta de ajuste	1	143,089	143,089	10,49	0,084*
Erro puro	2	27,271	13,636		
Total	18				

GL é grau de liberdade; SQ é soma de quadrados; QM é quadrado médio.

*Significativo a 10% de probabilidade.

O objetivo do deslocamento consiste em alterar os níveis das variáveis em estudo de modo a aumentar a resposta de interesse até atingir um ponto máximo, a partir do qual o valor da resposta diminui. Essa condição experimental é então utilizada como base para modelar a superfície de resposta (Zhuang et al., 2006).

Logo, a falta de ajuste do modelo observada neste trabalho pode ser devido ao fato de que um ponto máximo tenha sido alcançado na faixa de concentração dos níveis utilizados no delineamento Plackett-Burman, ou seja, os resultados possam ser ajustados a um modelo quadrático. Isso fica mais claro quando se observa o valor de aproximadamente 20 U.mL⁻¹ no primeiro delineamento, e diminuindo já com o deslocamento. Entretanto, não significa que a produção da dextranase esteja otimizada, pois somente com a modelagem de uma superfície de resposta é possível determinar as condições em que isso é estabelecido.

Nesse estudo, os níveis das variáveis no ponto central do delineamento 2⁴+1 foram aqueles utilizados no nível superior do Plackett-Burman, com exceção de triptona cuja concentração usada foi 0,25% por ter apresentado um efeito negativo sobre a produção da dextranase (Tabelas 2 e 4). Ao contrário, os níveis selecionados em outros trabalhos como base para o início do deslocamento foram aqueles do ponto central do delineamento anterior (Zhuang et al., 2006; Tang et al., 2004). Essa diferença pode ter promovido uma redução na atividade de dextranase observada com o deslocamento, sendo que o ótimo parece estar mais próximo à faixa de concentrações utilizadas no primeiro delineamento.

Segundo Tang et al. (2004), se a média dos pontos centrais (0) for superior à média dos pontos fatoriais (-1 e +1), é provável que o ótimo esteja próximo ou dentro do espaço do delineamento experimental. Por outro lado, se a média dos pontos centrais for inferior à média dos pontos fatoriais, é provável que o ótimo esteja fora do espaço do delineamento experimental. No segundo caso, é necessário realizar deslocamentos.

Sendo assim, o fato da média dos pontos centrais (13,38 U.mL⁻¹) ter sido superior à média dos pontos fatoriais (5,86 U.mL⁻¹) neste trabalho, reforça a possibilidade de que o ótimo para a produção da dextranase de *Paecilomyces marquandii* esteja próximo ou dentro da faixa de concentrações utilizadas no delineamento experimental (Tabela 5).

4. CONCLUSÃO

Nesse trabalho, em que foi estudado o efeito de dezesseis variáveis na produção da dextranase de *Paecilomyces marquandii*, dextrana, nitrato de amônio, extrato de levedura e triptona foram selecionados por afetarem significativamente a produção da enzima. A concentração desses fatores utilizados no nível superior do delineamento Plackett-Burman parece adequado para servir de base a um delineamento para modelagem da superfície de resposta e determinação dos níveis ótimos para a produção da dextranase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Naby, M., Ismail, A.-M. S., Abdel-Fattah, A.M., Abdel-Fattah, A.F. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. **Process Biochemistry**, v.34, n.4, p.391-398, 1999.
- Abdel-Aziz, M. S.; Talkhan, F.N.; Janson, J.-C. Purification and characterization of dextranase from a new strain of *Penicillium funiculosum*. **Journal of Applied Sciences Research**, v.3, n.11, p.1509-1516. 2007.
- Azin, M., Moravej, R., Zareh, D. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, n.4, p.801-805, 2007.
- Bocchini, D.A., Alves-Prado, H.F., Baida, L.C., Roberto, I.C., Gomes, E., Da Silva, R. Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v.38, n.5, p.727-731, 2002.
- Chen, Q.H., Hea, G.Q., Alib, M.A.M. Optimization of medium composition for the production of elastase by *Bacillus* sp. EL31410 with response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, n.5, p.667-672, 2002.
- Das, D.K., Dutta, S.K. Purification, biochemical characterisation and mode of action of an extracellular endo-dextranase from the culture filtrate of *Penicillium lilacinum*. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.28, n.1, p.107-113, 1996.

- Decker; S.R., Adney; W.S., Vinzant; T.B., Himmel; M.E. Alkaline tolerant dextranase from *Streptomyces anulatus*. Publicação de patente US 6,509,184. 1999.
- Deepak, V., Kalishwaralal, K., Ramkumarpandian, S., Babu, S.V., Senthilkumar, S.R., Sangiliyandi, G. Optimization of media composition for nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v.99, n.17, p.8170-8174, 2008.
- Eggleston, G., Monge, A., Montes, B., Stewart, D. Application of dextranases in sugarcane factory: Overcoming practical problems. **Sugar Technology**, v.11, n.2, p.135-141, 2009.
- Eiji, N., Hiroshi, S., Yasuo, K., Masaaki, I. Dextranase-containing oral care compositions. Publicação de patente WO 0180817, 2001.
- Finnegan, P.M., Brumbley, S.M., O'Shea, M.G., Nevalainen, K.M.H., Bergquist, P.L. *Paenibacillus* isolates possess diverse dextran-degradating enzymes. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, n.3, p.477-485, 2004.
- Fu, X.T., Lin, H., Kim, S.M. Optimization of medium composition and culture conditions for agarase production by *Agarivorans albus* YKW-34. **Process Biochemistry**, v.44, n.10, p.1158–1163, 2009.
- Goulas, A.K., Fisher, D.A., Grimble, G.K., Grandison, A.S., Rastall, R.A. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextransucrase and dextranase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, n.4, p.327-338, 2004.
- Hatada, Y., Hidaka, Y., Nogi, Y., Uchimura, N.K., Katayama, K., Li, Z., Akita, M., Ohta, Y., Goda, S., Ito, H., Matsui, H., Ito, S., Horikoshi, K. Hyper-production of an isomalto-dextranase of an *Arthrobacter* sp. by a proteases-deficient *Bacillus subtilis*: sequencing, properties and crystallization of the recombinant enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.65, n.5, p.583-592, 2004.
- Hattori, A.; Ishibashi, K.; Minato, S. The purification and characterization of the dextranase of *Chaetomium gracile*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.45, n.11, p.2409-2416, 1981.
- Hayacibara, M.F., Koo, H., Smith, A.M.V., Kopec, L.K., Scott-Anne, K., Cury, J.A., Bowen, H.B. The influence of mutanase and dextranase on the production and structure of glucans synthesized by streptococcal glucosyltransferases. **Carbohydrate Research**, v.339, n.12, p.2127–2137, 2004.

- Herbots, I.M.A.J, Moese, R.L., Busch, Cleaning compositions comprising endo-dextranase. Publicação de patente WO9731999. 1997.
- Hiroshige; H., Takashi, U. Oral care product for animal and method for producing the same. Publicação de patente JP 2006055050, 2006.
- Jiménez, E.R. The dextranase along sugar-making industry. **Biotechnologia Aplicada**, v.22, n.1, p.20-27, 2005.
- Jiménez, E.R., Sánchez, K., Roca, H., Delgado, J.M. Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level of dextranase. **Biotechnology Techniques**, v.11, n.7, p.461-466, 1997.
- Kammoun, R., Naili, B., Bejar, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresource Technology**, v.99, n.13, p.5602-5609, 2008.
- Khalikova, E., Susi, P., Korpela, T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.69, n.2, p.306-325, 2005.
- Lotfy, W.A., Ghanem, K.M., El-Helow, E.R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. **Bioresource Technology**, v.98, n.18, p.3470–3477, 2007.
- Ma, F.-X., Kim, J.H., Kim, S.B., Seo, Y.-G., Chang, Y.K., Hong, S.-K., Kim, C.-J. Medium optimization for enhanced production of Rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei* S699: Combining a full factorial design and a statistical approach. **Process Biochemistry**, v.43, n.9, p.954–960, 2008.
- Mahat, M.K., Illias, R.M., Rahman, R.A., Rashid, N.A.A., Mahmood, N.A.N., Hassan, O., Aziz, S.A., Kamaruddin, K. Production of cyclodextrin glucoamylase (CGTase) from alkalophilic *Bacillus* sp. TS1-1: media optimization using experimental design. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, n.5, p.467–473, 2004.
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- Mountzouris, K.C., Gilmour, S.G., Rastall, R.A. Continuous production of oligodextrans via controlled hydrolysis of dextran in an enzyme membrane reactor. **Journal of Food Science**, v.67, n.5, p.1767-1771, 2001.

- Obara-Doi, S. M.; DEKKER, Robert F H ; Castro-Gómez, R. J. H. . Otimização da produção de dextranase de *Fusarium* sp. utilizando Metodologia de Superfície de Resposta. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis. Anais do XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003.
- Plackett, R.L., Burman, J.P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v.33, n.4, p. 305-325, 1946.
- Rodrigues, M.I., Iemma, A.F. Estratégia experimental para fatoriais fracionados e delineamento composto central rotacional (DCCR). In: Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Campinas: Editora Casa do Pão, São Paulo, Brasil. 618p. 2005
- Shimizu, E., Unno, T., Ohba, M., Okada, G. Purification and characterization of an isomaltotriose-producing endo-dextranase from a *Fusarium* sp. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.62, n.1, p.117-122, 1998.
- Sun, Y., Han, B., Liu, W., Zhang, J., Gao, X. Substrate induction and statistical optimization for the production of chitosanase from *Microbacterium* sp. OU01. **Bioresource Technology**, v.98, n.8, p.1548–1553, 2007.
- Szczodrak, J., Pleszczyńska, M., Fiedurek, J. *Penicillium notatum* 1 a new source of dextranase. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.13, n.5, p.315-320, 1994.
- Tang, X.-J., He, G.-Q., Chen, Q.-H., Zhang, X.-Y., Ali, M.A.M. Medium optimization for the production of thermal stable b-glucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v.93, n.2, p.175–181, 2004.
- Techapun, C., Charoenrat, T., Watanabe, M., Sasaki, K., Poosaran, N. Optimization of thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase production from agricultural waste by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106, using the central composite experimental design. **Biochemical Engineering Journal**, v.12, n.2, p.99–105, 2002.
- Wang, H., Jiang, P., Lu, Y., Ruan, Z., Jiang, R., Xing, X.-H., Lou, K., Wei, D. Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, n.2-3, p.119-124, 2009.
- Zhuang, Y.P., Chen, B., Chu, J., Zhang, C. Medium optimization for meilingmycin production by *Streptomyces nanchangensis* using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v.41, n.2, p.405–409, 2006.

CAPÍTULO 2

Purificação e caracterização bioquímica de dextranase de *Paecilomyces marquandii*

Purificação e caracterização bioquímica de dextranase de *Paecilomyces marquandii*

Resumo

A dextranase de *Paecilomyces marquandii* foi purificada em colunas cromatográficas utilizando resinas de troca iônica DEAE-Sepharose e CM-Sepharose. O rendimento foi 24% com atividade específica de 1.036 U.mg⁻¹. A massa molecular foi estimada em 73 kDa por SDS-PAGE. A dextranase apresentou maior atividade em pH 6.0 e estabilidade na faixa de pH 5 a 7 a 40 °C durante 30 min. A enzima foi mais ativa a 55 °C e estável a 37 °C durante 4 h. A meia vida da dextranase foi de 55 h a 37 °C e de 14 min a 55 °C. A dextranase foi inibida por Ag⁺, SDS, Cu⁺ e Pb²⁺ em 40%, 80%, 51% e 53%, respectivamente; e ativada na presença de Fe²⁺ em 20% e de Mn²⁺ em 15%; todos a 10 mM. O valor de K_M foi 0,59 g.L⁻¹ e de V_{max} 0,89 mmol glicose.min⁻¹, a 40 °C para dextrana (massa molecular de 60.000-90.000).

Palavras-chave: Dextranase, Purificação, Caracterização, *Paecilomyces marquandii*

1. Introdução

Dextranases (EC 3.2.1.11; α -1,6-D-glicano-6-glicanohidrolase) catalisam a hidrólise de ligações α -(1,6)-D-glicosídicas em polímeros de dextrana, sendo produzidas por diversos fungos, bactérias e algumas espécies de leveduras (1,2). A principal aplicação de dextranases é para reduzir a viscosidade de produtos intermediários gerados durante o processo de produção de açúcar, de modo a minimizar diversos problemas operacionais que podem reduzir o rendimento de açúcar (3). Entretanto, temperaturas operacionais elevadas durante a produção de açúcar limitam a utilização de formulações comerciais de dextranases (4). Nesse sentido, estudos envolvendo a identificação de novos microrganismos produtores de dextranases com termoestabilidade superior (5-7) e mutações capazes de aumentar a atividade e/ou a termoestabilidade dessa enzima (8) poderiam ampliar sua utilização na indústria de açúcar. Devido ao envolvimento de dextranas na formação de placas bacterianas, dextranases são eficazes na remoção dessas placas, tendo sido utilizadas na formulação de produtos de higiene bucal (9,10). Outras

aplicações de dextranases são na elaboração de produtos de limpeza (11,12) e na produção de agentes pré-bióticos (13,14).

Este trabalho é o primeiro relato sobre a purificação e caracterização bioquímica da dextranase produzida por *Paecilomyces marquandii* e fornece informações importantes para estudos posteriores envolvendo esta dextranase. O fungo *Paecilomyces marquandii* foi isolado a partir de amostras de solo e identificado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa e no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

2. Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Análises Bioquímicas, Laboratório de Enzimologia e Laboratório de Proteínas, localizados no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, e no Laboratório de Metabolismo e Fermentação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Reagentes

Resinas cromatográficas DEAE-Sepharose Fast Flow e CM-Sepharose Fast Flow, e dextrana (massa molecular de 60.000-90.000) foram adquiridas de Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). Ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), poliacrilamida, N,N-metilenobisacrilamida, dodecilsulfato de sódio (SDS), N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED), persulfato de amônio, 2-mercaptoetanol e marcadores de massa molecular foram adquiridas de Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Microrganismo e condições de crescimento

O fungo *Paecilomyces marquandii*, isolado a partir de amostras de solo, foi utilizado para a produção de dextranase. O microorganismo foi identificado no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa e no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. O meio de cultura sólido utilizado para

crescimento do fungo continha, em cada litro, 8 g de dextrana, 2,5 g de NaNO₃, 0,75 g de KH₂PO₄, 0,125 g de MgSO₄.H₂O, 0,25 g de KCl, 0,05 g de ZnSO₄.7H₂O, 0,054 g de FeSO₄.7H₂O e 17 g de ágar-ágar. O pH desse meio foi ajustado para 7. O fungo foi repicado nesse meio de cultura e incubado a 28 °C durante 10 dias.

O meio de cultura líquido padrão utilizado para a produção de dextranase continha, em cada litro, 10 g de dextrana, 10 g de NaNO₃, 4 g de KH₂PO₄, 0,5 g de MgSO₄.H₂O, 0,5 g de KCl, 0,178 g de ZnSO₄.7H₂O e 0,18 g de FeSO₄.7H₂O. O pH do meio de cultura foi ajustado para 7 e autoclavado a 121 °C durante 20 min. Cada ensaio consistiu de frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio líquido inoculados com 1 mL de suspensão, contendo 10⁷ esporos/mL, recolhidos a partir do meio sólido. Os frascos foram incubados a 28 °C durante 5 dias e submetidos a 180 rpm. O extrato obtido foi filtrado e utilizado para purificação.

2.3. Medida da atividade enzimática

A atividade de dextranase foi medida com base na quantidade de açúcares redutores produzidos a partir da hidrólise da dextrana, e medidos por sua reação com o ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). O ensaio enzimático consistiu de 750 µL de solução tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,2), 200 µL de solução de dextrana 1% e 50 µL de amostra enzimática. O sistema de reação foi incubado a 40 °C durante 15 min. Após esse tempo, a reação foi paralisada pela adição de 1 mL do reativo de DNS. As amostras foram fervidas durante 5 min e esfriadas à temperatura ambiente. As leituras de absorbância foram realizadas em comprimento de onda de 540 nm. Os valores de absorbância das amostras foram subtraídos da leitura de absorbância dos controles preparados pela adição do reagente DNS antes da amostra enzimática. A transformação dos valores de absorbância em quantidade de açúcar redutor foi realizada utilizando uma curva padrão construída com 0,111 a 0,888 µmol de glicose. Uma unidade (U) de dextranase foi definida como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 mmol de açúcar redutor, expresso como equivalentes de glicose, por minuto, nas condições de ensaio utilizadas. Todas as medidas de atividade foram realizadas em triplicata.

2.4. Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas foi estimada pela leitura de absorvância a 280 nm em cada fração proveniente das colunas cromatográficas. A determinação de proteínas no extrato bruto e nos pools provenientes de cada coluna cromatográfica foi realizada pelo método de Bradford (16).

Os ensaios consistiram de 20 a 550 μL de amostra enzimática, 250 a 780 μL de água destilada e 200 μL do reagente de Bradford 5X. Após 15 min de reação à temperatura ambiente, a leitura de absorvância das amostras foi realizada a 595 nm. O branco foi preparada com 800 μL de água destilada e 200 μL do reagente de Bradford 5X. Os valores de absorvância foram convertidos em μg de proteína utilizando curva padrão contendo de 0,22 a 20 μg de albumina sérica bovina (BSA). O teor de proteína foi expresso como mg de proteína por mL de amostra.

2.5. Purificação da dextranase

Todas as etapas do protocolo de purificação e diálises foram realizadas sob refrigeração (5 °C).

2.5.1. Cromatografias de troca aniônica

Volume de 58 mL de extrato foram dialisados em solução tampão citrato-fosfato 10 mM (pH 5) e aplicados em coluna DEAE Sepharose Fast Flow (C = 5 cm x D = 2,3 cm) previamente equilibrada nessa mesma solução tampão. O fluxo utilizado foi de 48 mL/h e volumes de 3 mL foram coletados em cada fração. Cinquenta mililitros da solução tampão citrato-fosfato 10 mM (pH 5) foram utilizados para eluir as proteínas que não se ligaram à resina, enquanto a eluição das demais proteínas foi realizada em gradiente linear formado por 50 mL da solução tampão e 50 mL de NaCl 500 mM na solução tampão. As frações com atividade de dextranase foram reunidas e dialisadas em solução tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8). Em seguida, o pool dialisado foi aplicado em resina DEAE Sepharose Fast Flow (C = 5 cm x D = 2,3 cm) previamente equilibrada em solução tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8). Após aplicação de 50 mL da solução tampão, as proteínas adsorvidas à resina foram eluídas com 50 mL de NaCl 40 mM e 50 mL de

NaCl 70 mM na solução tampão. Frações de 2 mL foram coletadas em fluxo de 36 mL/h e aquelas com maior atividade de dextranase e menor quantidade de proteínas foram reunidas. Esse pool foi dialisado em solução tampão acetato de sódio 10 mM (pH 5).

2.5.2. Cromatografia de troca catiônica

O pool dialisado foi aplicado em coluna CM Sepharose Fast Flow (C = 3 cm x D = 1,2 cm) previamente equilibrada em solução tampão acetato de sódio 10 mM (pH 5). Após aplicação de 50 mL da mesma solução tampão, as proteínas adsorvidas à resina foram eluídas com gradiente linear formado por 50 mL da solução tampão e 50 mL de NaCl 650 mM na solução tampão. Frações contendo 1,2 mL foram coletadas em fluxo de 36 mL/h e aquelas contendo atividade de dextranase foram utilizadas para os estudos de caracterização.

2.6. Eletroforeses

Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE) e condição nativa (PAGE) foram realizadas conforme descrito por Laemmli (17) para a verificação da pureza e estimativa da massa molecular da dextranase. Os géis de empilhamento e separação foram utilizados na concentração de 4% (m/v) e 10% (m/v), respectivamente. As amostras foram preparadas misturando-se o tampão de amostra 3X e a enzima purificada na razão de 1:3 (v/v), seguido de fervura durante 5 min. A eletroforese foi realizada em aparato Mini-protein 3 (Bio-Rad Laboratory) com 90 V. Após a eletroforese, os géis foram corados com prata (18). A massa molecular da enzima foi estimada com base na comparação de sua mobilidade relativa em gel SDS-PAGE (R_f) com a das proteínas padrão: anidrase carbônica (29 kDa), ovoalbumina (45 kDa), albumina bovina (66 kDa), fosforilase b (97 kDa), β -galactosidase (116 kDa) e miosina (200 kDa). Eletroforese em gel nativo de poliacrilamida foi realizada conforme descrito anteriormente, sem tratamento térmico, 2-mercaptoetanol e SDS.

2.7. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da dextranase

A determinação do pH de maior atividade para a dextranase foi realizada nas condições descritas no item 3.3, utilizando-se as seguintes soluções tampão na concentração de 100 mM: citrato-fosfato (pH 2,2 a 4), acetato de sódio (pH 4 a 6), fosfato de sódio (pH 6 a 8), Tris-HCl (pH 8 e 9) e glicina-NaOH (pH 9 e 10). A estabilidade da dextranase foi estudada incubando-se a enzima em cada solução tampão durante 30 min a 40 °C e, em seguida, determinando-se a atividade enzimática residual nas condições descritas no item 3.3.

2.8. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da dextranase

A temperatura de maior atividade para dextranase foi determinada incubando a dextranase em temperaturas de 25 °C a 70 °C, mantendo-se as demais condições de ensaio padrão. A atividade residual foi determinada após incubar a enzima a 37 °C e 55 °C, e o ensaio realizado nas condições de ensaio padrão. A meia vida da enzima foi calculada a 37 °C e 55 °C, a partir de regressão não linear com software SigmaPlot (versão 9.01, 2004).

2.9. Efeito de íons sobre a atividade da dextranase

Na_2SO_4 , CaCl_2 , CuSO_4 , MgSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , FeSO_4 , AgNO_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, PbSO_4 , BaSO_4 , EDTA, SDS e 2-mercaptoetanol foram utilizados em concentrações finais de 1 e 10 mM na solução tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,2). Volume de 750 μL dessa solução tampão e 50 μL da dextranase foram incubados a 40 °C durante 30 min. Em seguida, 200 μL de solução de dextrana 1% foram adicionados e a atividade residual determinada nas condições de ensaio padrão. A atividade da enzima na ausência de qualquer íon foi adotada como 100%.

2.10. Determinação da constante de Michealis-Menten (K_M) e velocidade de reação máxima (V_{max})

A atividade da dextranase foi avaliada sob as condições de ensaio padrão descritas no item 3.3, utilizando concentrações de dextrana (massa molecular de 60.000-90.000) no meio de reação de 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2, 3, 4, 5 e 6 g.L⁻¹. Os parâmetros cinéticos K_M and V_{max} foram calculados a partir do ajuste da equação de Michaelis-Menten aos dados que relacionam a velocidade de hidrólise em função da concentração de dextrana, utilizando o software SigmaPlot (versão 9.01, 2004).

3. Resultados e Discussão

3.1. Purificação da dextranase

A dextranase foi purificada à homogeneidade (Figura 2A) com rendimento de 24% e atividade específica de 1.036 U.mg⁻¹. O resumo dos resultados obtidos em cada etapa é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Etapas do processo de purificação da dextranase de *Paecilomyces marquandii*

Etapa	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	247,66	1,28	193,31	1	100
DEAE Sepharose	196,20	0,61	321,22	2	79
DEAE Sepharose	94,74	0,22	422,28	2	38
CM Sepharose	59,68	0,057	1.039	5	24

1U é quantidade de enzima que produz 1 mmol de açúcar redutor por minuto.

A primeira cromatografia realizada em resina DEAE-Sepharose permitiu a purificação parcial da dextranase, que foi eluída durante a aplicação da solução tampão citrato-fosfato 10 mM (pH 6) (Figura 1A). Na segunda cromatografia realizada também em resina DEAE-Sepharose, a eluição em passos com 40 mM e 70 mM de NaCl na solução tampão Tris-HCl 10 mM (pH 8) (Figura 1B) permitiu a separação da enzima e foi mais eficiente que a eluição em gradiente de NaCl (0-250 mM) testada anteriormente (dados não mostrados). Na terceira cromatografia, realizada em resina CM-Sepharose equili-

brada em solução tampão acetato de sódio 10 mM (pH 5), a dextranase foi eluída durante a aplicação do gradiente de NaCl (0-650 mM) no tampão de equilíbrio (Figura 1C). A dextranase apresentou uma única banda em gel SDS-PAGE e nativo, com massa molecular estimada em 73 kDa em gel SDS-PAGE (Figura 2A e 2C), dentro da faixa de valores relatados para dextranases de fungos, que varia entre 26.5 kDa e 79 kDa (1,19).

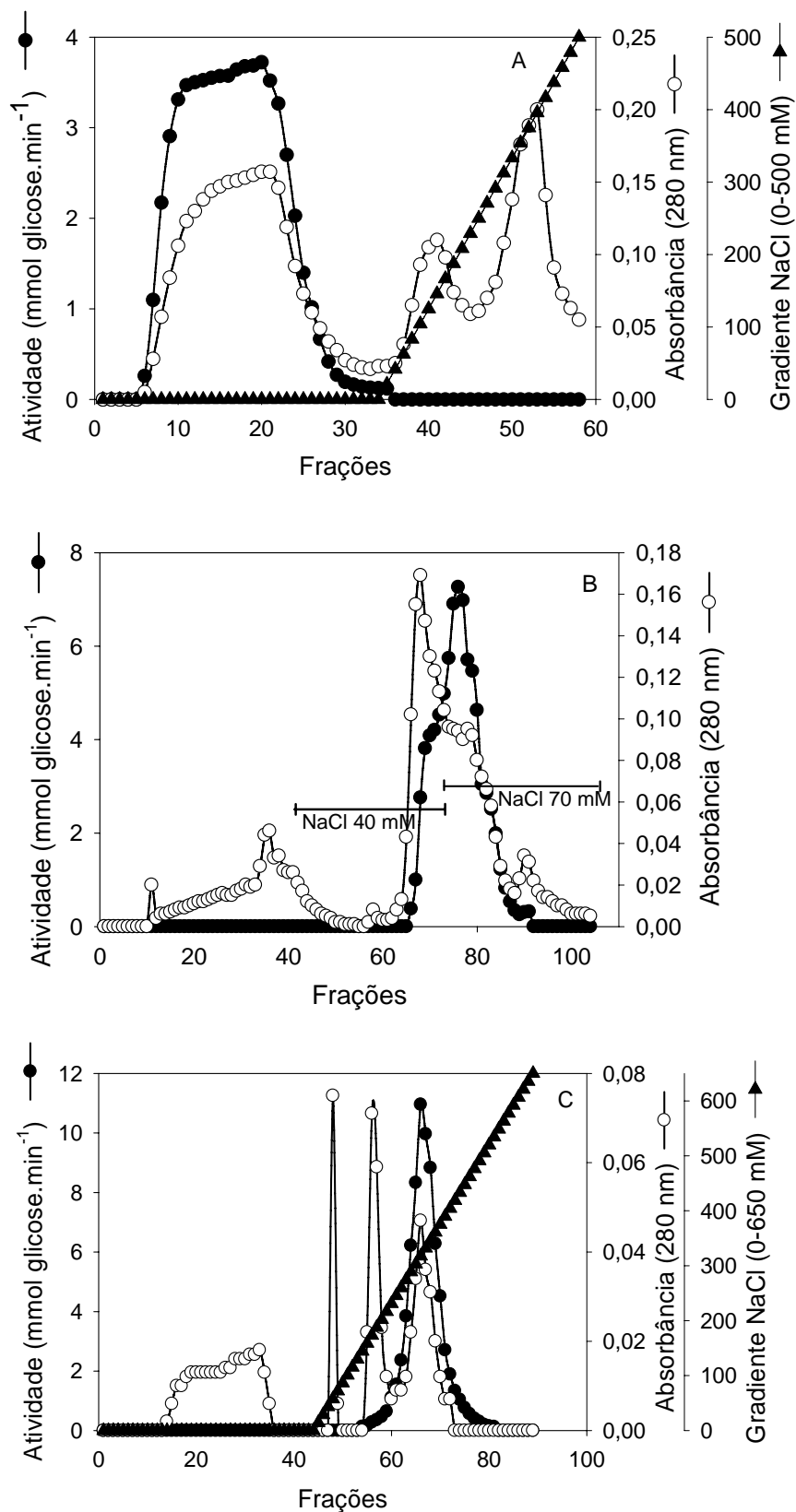


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato bruto contendo dextranase de *Paecilomyces marquandii* em resina DEAE-Sepharose (A). Segunda cromatografia em resina DEAE-Sepharose, de frações contendo atividade de dextranase provenientes da etapa anterior (B). Perfil cromatográfico de dextranase parcialmente purificada na segunda cromatografia em resina CM-Sepharose (C).

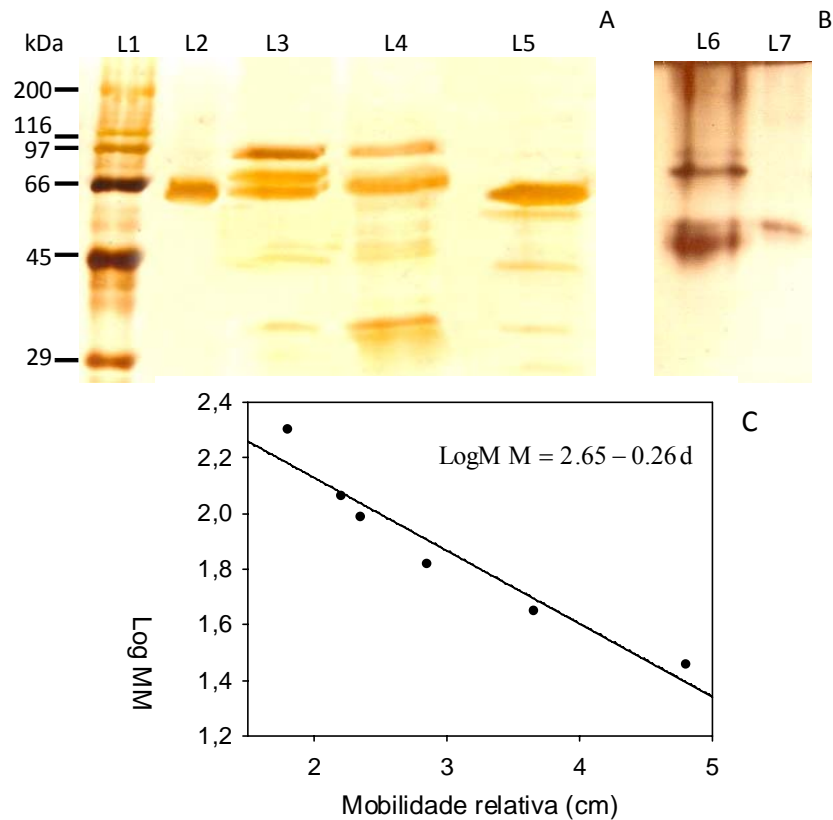


Figura 2. Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE), corado com prata, de padrões de massa molecular (L1), da dextranase purificada (L2), do extrato bruto (L3), do poll proveniente da primeira cromatografia (L4) e do pool proveniente da segunda cromatografia (L5) (A). Gel nativo (PAGE) do extrato bruto corado com prata (L6) e da dextranase purificada (L7) (B). Estimativa da massa molecular da dextranase por SDS-PAGE (C).

Técnicas cromatográficas com diferentes resinas têm sido as mais utilizadas para a purificação de dextranases de diferentes fontes (19-26). Outras técnicas também foram utilizadas como precipitação por adição de sulfato de amônio (24,27), alteração do pH (26,27), etanol ou isopropanol (23,28), acetona (26) e polietileno glicol (22). Um sistema bifásico formado por polietileno glicol e sulfato de amônio foi uma das técnicas utilizadas para purificar a dextranase de *Bacillus* sp. (22). Em outro estudo em que se purificou parcialmente a dextranase produzida por uma bactéria, observou-se que a resina Sephacryl S-300 funcionou de modo similar a uma resina de afinidade. A rede de dextrana dessa resina permitiu a ligação da dextranase, enquanto seu grupamento N,N'-metilenobisacrilamida impediu sua hidrólise pela enzima (29).

Nesse estudo, a utilização de duas resinas de troca iônica (DEAE-Sepharose e CM-Sepharose) em três etapas de cromatografia foi suficiente para purificar a homogeneidade da dextranase de *Paecilomyces marquandii*.

3.2. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da dextranase

A dextranase de *Paecilomyces marquandii* apresentou maior atividade em pH 6 (Figura 3A), o que corrobora com a maioria das dextranases estudadas produzidas por fungos e que apresentaram maior atividade na faixa de pH 5 a 6. Por outro lado, muitas dextranases bacterianas apresentaram pH de maior atividade próximo à neutralidade (1,3), enquanto aquelas produzidas por leveduras possuem pH de maior atividade em faixa bastante restrita de 4,5 a 5,3 (1,20).

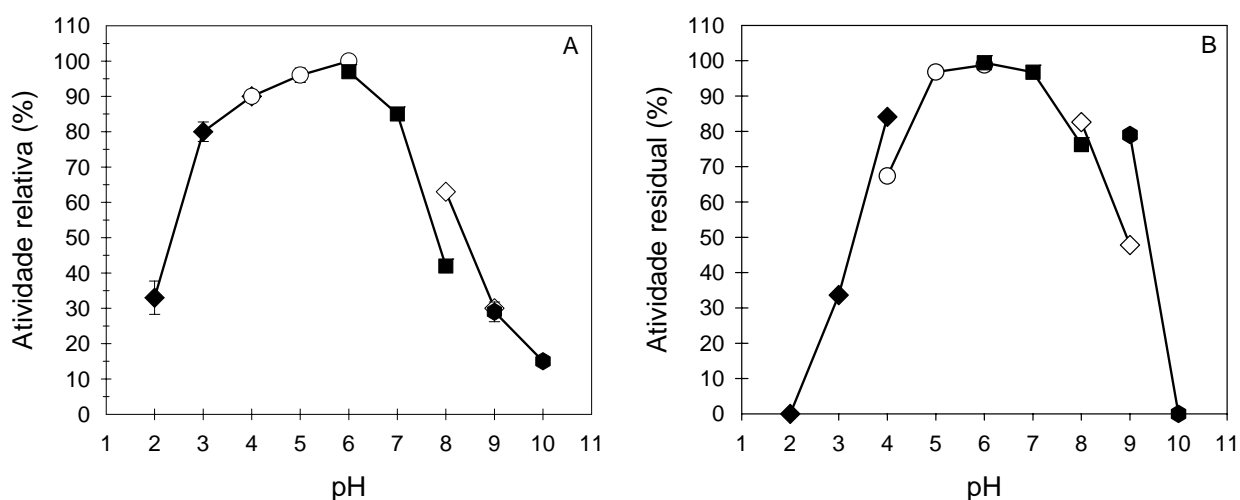


Figura 3. Efeito do pH sobre a atividade da dextranase de *Paecilomyces marquandii* (A). Efeito do pH sobre a estabilidade da dextranase após incubação a 40 °C durante 30 min (B). Soluções tampão utilizadas: citrato-fosfato (◆), acetato de sódio (○), fosfato de sódio (■), Tris-HCl (◇) e glicina-NaOH (●). O ensaio enzimático foi realizado em solução tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,2) durante 15 min a 40 °C.

A dextranase caracterizada neste trabalho apresentou atividade relativa superior a 80% a partir de pH 3, semelhante à dextranase de *Penicillium funiculosum* (19) e *Lipomyces starkeyi* (28), e inferior a de *Arthrobacter globiformis* T6 cuja atividade máxima foi observada em pH 3,5 (21). Conforme já relatado para *Chaetomium gracile* (25) e *Bacillus* sp. (22), a atividade da dextranase de *Paecilomyces marquandii* foi bastante

reduzida em meio alcalino. Redução ainda mais acentuada foi constatada para dextranases produzidas por *Penicillium funiculosum* (19) e *Lipomyces starkeyi* (28), inativas entre pH 6 e 7. Por outro lado, dextranases produzidas por *Streptomyces anulatus* foram mais ativas também em pH 8, o que possibilitaria sua utilização na formulação de detergentes (11).

A larga faixa de pH de atividade observada para a dextranase de *Paecilomyces marquandii* aumenta as possibilidades de aplicações comerciais desta enzima.

A dextranase de *Paecilomyces marquandii* foi completamente estável na faixa de pH 5 a 7 a 40 °C durante 30 min e apresentou estabilidade superior a 80% em solução tampão citrato-fosfato (pH 4), Tris-HCl (pH 8) e glicina-NaOH (pH 9) (Figura 3B). No caso de *Lipomyces lipofer* (30) e *Sporothrix schenckii* (24) a estabilidade foi de pH 4 a 5 e pH 4,5 a 4,75, respectivamente. Estabilidade na faixa de pH 3 a 10 foi constatada para as três formas de dextranase produzidas por *Penicillium funiculosum* (19), e de pH 4,5 a 11,8 para dextranase de *Fusarium* sp. (23).

A faixa de pH em que a dextranase de *Paecilomyces marquandii* apresentou maior atividade e estabilidade corresponde aos valores de pH encontrados nas etapas de produção de açúcar, o que reforça a possibilidade de aplicação dessa enzima nesse segmento.

3.3. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da dextranase

A temperatura de maior atividade da dextranase de *Paecilomyces marquandii* foi 55 °C (Figura 4A), e a 60 °C apresentou cerca de 80 % de sua atividade máxima. A maioria das dextranases fúngicas apresenta temperatura de maior atividade na faixa de 50 °C a 60 °C, com exceção de algumas produzidas por um restrito número de fungos (1,19). Temperaturas elevadas durante a produção de açúcar limitam a utilização de formulações comerciais de dextranases (4). Uma alternativa adotada é reduzir a temperatura para 60 °C, implicando a ocorrência de problemas durante o processamento (7). Em contrapartida, algumas cepas bacterianas isoladas produziram dextranases com maior estabilidade em temperaturas variando entre 65 °C e 80 °C (5-7,31), muito superior àquelas de outras bactérias já estudadas (1,19). No entanto, a atividade enzimática dessas dextranases mais estáveis foi muito baixa devido a sua pequena produção ou catálise ineficiente (7,31). Alternativas ao isolamento de novos microrganismos para a obtenção

de dextranases com maior atividade e/ou estabilidade em temperaturas elevadas são mutações em microrganismos produtores da enzima (8,32) e imobilização de dextranases (33).

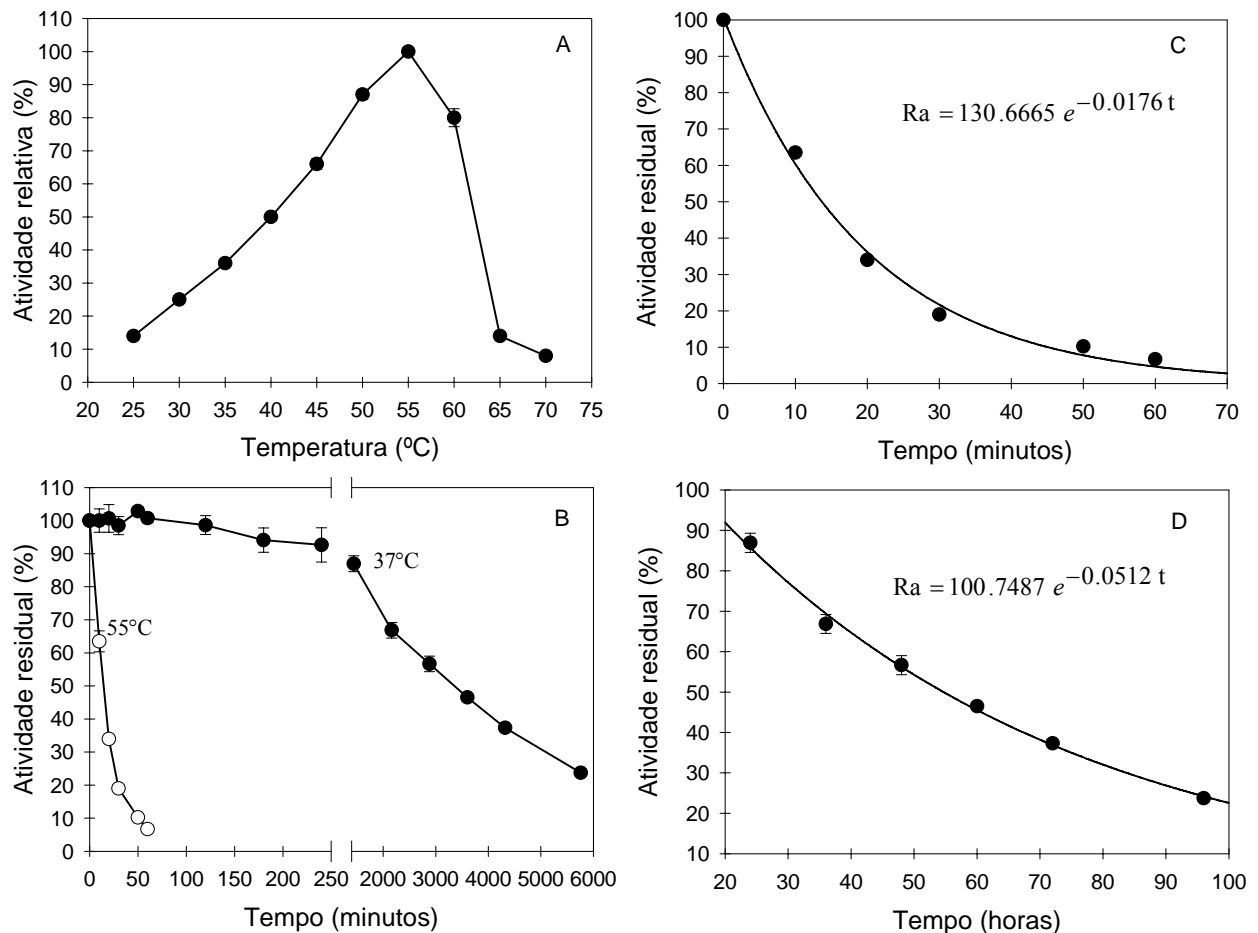


Figura 4. Efeito da temperatura sobre a atividade da dextranase de *Paecilomyces marquandii* (A). Efeito da temperatura sobre a estabilidade da dextranase após incubação a 37 °C e 55 °C (B). Meia vida da dextranase a 37 °C (C) e 55 °C (D). O ensaio enzimático foi realizado em solução tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5.2) durante 15 min a 40 °C.

A dextranase de *Paecilomyces marquandii* foi muito estável a 37 °C durante 4 h, mantendo 85% da atividade inicial após 24 h (Figura 4B). Aproximadamente 65 % de atividade residual foi observada a 55 °C após 10 min. A dextranase de *Penicillium lilacinum* também apresentou boa estabilidade até 37 °C após 24 h (27). As dextranases de *Penicillium funiculosum* foram estáveis até 40 °C após 30 min, mas nenhuma atividade

foi encontrada a 55 °C após esse tempo (19). Por outro lado, a dextranase de uma cepa de *Paenibacillus* manteve mais de 70% da atividade após 9,5 h a 57 °C (2), e a dextranase de uma bactéria termofílica não apresentou perda de atividade após 12 h a 75 °C (6).

A meia-vida da dextranase de *Paecilomyces marquandii* foi de aproximadamente 55 h a 37 °C (Figura 4C) e de 14 min a 55 °C (Figura 4D). A dextranase de *Sporothrix schenckii* manteve 50% de sua atividade após 18 min a 55 °C (24). Outras dextranases apresentaram meia vida muito superior, 6,5 h a 75 °C e 2 h a 80 °C para a dextranase de *Thermoanaerobacter* AB11Ad (7) e 6 h a 75 °C para a dextranase de *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (5). Contrapondo-se a essa excelente estabilidade em temperatura operacional do processamento de açúcar, a aplicação dessas enzimas é inviável devido a sua atividade bastante reduzida (5,31).

A dextranase de *Paecilomyces marquandii* apresentou estabilidade intermediária quando comparada às demais. No entanto, a produção é elevada, obtendo-se já no extrato bruto atividade superior a 4 U.mL⁻¹ nas condições utilizadas para a produção da enzima. A quantidade da dextranase produzida pode ser ainda maior através de um estudo de otimização.

3.4. Efeito de íons sobre a atividade da dextranase

Constatou-se pouco efeito dos reagentes estudados sobre a atividade da dextranase. Os íons Fe²⁺ e Mn²⁺, ambos na concentração de 10 mM, aumentaram a atividade enzimática em 20% e 15%, respectivamente. Por outro lado, nessa mesma concentração, uma perda de aproximadamente 50% da atividade foi constatada quando a enzima foi ensaiada na presença de Cu²⁺ e Pb²⁺; e de 40%, na presença de Ag⁺. O reagente SDS foi o que mais interferiu na atividade da dextranase, inibindo-a em 80% quando utilizado em 10 mM. Os demais reagentes interferiram menos na atividade enzimática, especialmente Ba²⁺ e Na⁺ (Figura 5).

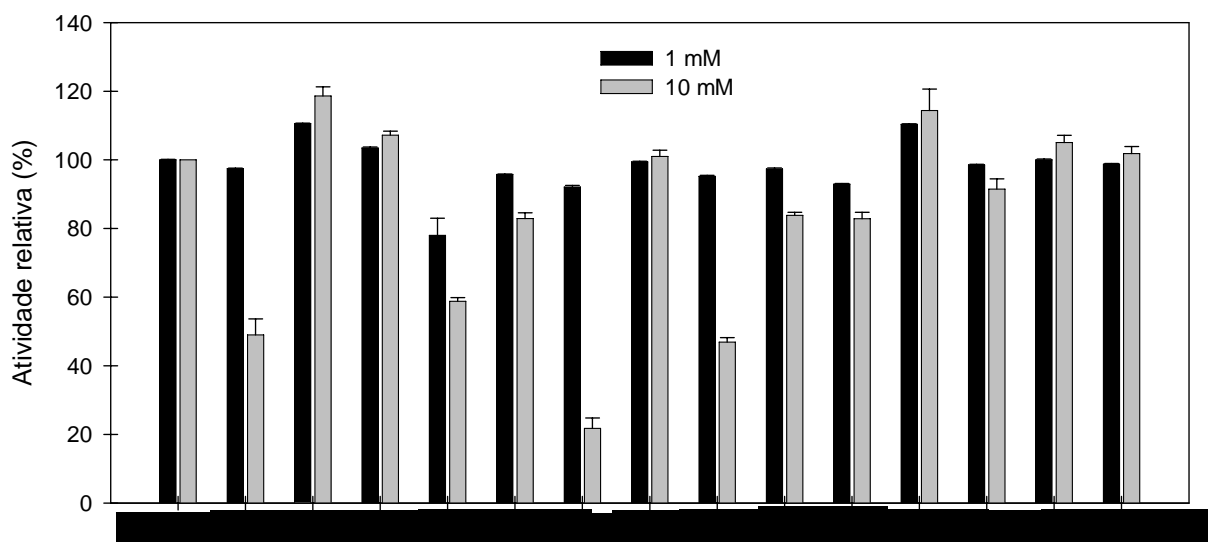


Figura 5. Efeitos de íons e agente redutor sobre a atividade da dextranase de *Paecilomyces marquandii*. A enzima foi incubada na ausência de substrato a 40 °C durante 30 min. A atividade residual foi determinada após adição de dextrana 1% ao meio de reação e incubação a 40 °C durante 15 min. O controle corresponde à incubação da dextranase na ausência dos íons e agente redutor.

A dextranase de *Sporothrix schenckii* (24) foi estável na presença de 2 mM de Mn^{2+} , enquanto a dextranase de *Lipomyces starkeyi* (28) perdeu cerca de 35% de atividade quando incubada com 15 mM desse mesmo íon. Diferentemente da dextranase de *Paecilomyces marquandii*, a dextranase de *Fusarium* sp. sofreu redução de 70% na atividade em 5 mM de Cu^{2+} , e foi completamente inibida em 5 mM de Fe^{3+} e Ag^+ (23). A redução da atividade da dextranase de *Lipomyces starkeyi* (28) foi superior a 90% em 0,13 mM de Cu^{2+} , 1,24 mM de Zn^{2+} , 1,36 mM de Fe^{2+} e 0.5% de SDS e cerca de 50% em 11,4 mM de Ba^{2+} e 13,9 mM de Ca^{2+} . Contrário ao que foi relatado para as dextranases de *Penicillium lilacinum* (27) e *Fusarium moniliforme* (34), que não foram inibidas por EDTA, a atividade da dextranase de *Paecilomyces marquandii* foi reduzida em 15% aproximadamente, o que sugere a necessidade de cátions para ocorrer a hidrólise.

3.5. Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M) e da velocidade de reação máxima (V_{max})

Os valores de K_m e V_{max} para a dextranase de *Paecilomyces marquandii* foram de $0,59 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,89 \text{ mM de glicose.min}^{-1}$, respectivamente, a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (pH 5,2) para dextrana (massa molecular de 60.000-90.000) (Figura 6). Considerando 75.000 a massa molecular média da dextrana utilizada, o valor de K_M corresponde a $7,86 \text{ } \mu\text{M}$. Esse valor está na mesma ordem de grandeza daqueles relatados para outras dextranases, entre $3,94 \text{ } \mu\text{M}$ e $25 \text{ } \mu\text{M}$, embora a comparação direta desses resultados seja difícil devido às diferentes condições utilizadas nos ensaios enzimáticos (24,30,33).

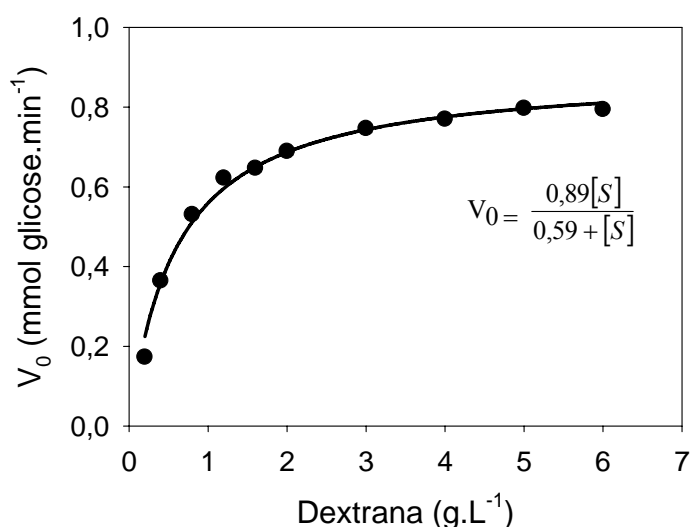


Figura 6. Efeito da concentração de dextrana (massa molecular 60.000-90.000) na velocidade da reação catalisada pela dextranase de *Paecilomyces marquandii*. Os ensaios enzimáticos foram realizados em solução tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,2) a $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

4. Conclusão

Inicialmente, a dextranase de *Paecilomyces marquandii* apresenta-se como alternativa para a formulação de produtos de higiene bucal, considerando sua estabilidade satisfatória a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, bem como sua faixa de pH de maior atividade e estabilidade. Além disso, estudos envolvendo mutações no gene correspondente a essa dextranase, utilização de agentes preservativos ou até mesmo a imobilização dessa enzima poderiam melhorar sua estabilidade a temperaturas elevadas e ampliar sua utilização comercial.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do projeto e pela bolsa de estudos concedidos. Agradecemos aos Professores Carlos Augusto Rosa, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e Robert Weingart Barreto, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela colaboração na identificação do microrganismo. Agradecemos ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa, pelo apoio técnico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Khalikova, E., Susi, P., Korpela, T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.69, n.2, p.306-325, 2005.
- (2) Finnegan, P.M.; Brumbley, S.M.; O'Shea, M.G.; Nevalainen, H.; Bergquist, P.L. Isolation and Characterization of Genes Encoding Thermoactive and Thermostable Dextranases from Two Thermotolerant Soil Bacteria. *Current Microbiology*, v.49, n.5, p.327-333, 2004.
- (3) Jiménez, E.R. The dextranase along sugar-making industry. **Biotecnologia Aplicada**, v.22, n.1, p.20-27, 2005.
- (4) Eggleston, G.; Monge, A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. **Process Biochemistry**, v.40, n.5, p.1881-1894, 2005.
- (5) Hoster, F., Daniel, R., Gottschalk, G. Isolation of a new *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strain (FH1) producing a thermostable dextranase. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.47, n.4, p.187-192, 2001.
- (6) Wynter, C.V.A., Chang, M., De Jersey J., Patel, B., Inkerman, P.A., Hamilton, S. Isolation and characterization of a thermostable dextranase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.20, n.4, p.242-247, 1997.

- (7) Wynter, C., Patel, B.K.C., Bain, P., De Jersey, J., Hamilton, S., Inkerman, P.A., A novel thermostable dextranase from a *Thermoanaerobacter* species cultured from the geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia. **FEMS Microbiology Letters**, v.140, n.2-3, p.271-276, 1996.
- (8) Hild, E., Brumbley, S.M., O'Shea, M.G., Nevalainen, H., Bergquist, P.L. A *Paenibacillus* sp. dextranase mutant pool with improved thermostability and activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, n.5, p.1071-1078, 2007.
- (9) Hiroshige; H., Takashi, U. Oral care product for animal and method for producing the same. **Patente number** 2006055050, 2006.
- (10) Eiji, N., Hiroshi, S., Yasuo, K., Masaaki, I. Dextranase-containing oral care compositions. **Patente number 0180817**, 2001.
- (11) Decker, S.R.; Adney, W.S.; Vinzant, T.B.; Himmel, M.E. Alakline tolerant dextranase from *Streptomyces anulatus*. **Patente number 6509184**, 2003.
- (12) Herbots, I.M.A.J.; Moese, R.L.; Busch, A. Cleaning compositions comprising endo-dextranase. Patent WO 9,731,999. 1997.
- (13) Goulas, A.K., Fisher, D.A., Grimble, G.K., Grandison, A.S., Rastall, R.A. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextranase and dextranase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, n.4, p.327-338, 2004.
- (14) Mountzouris, K.C., Gilmour, S.G., Rastall, R.A. Continuous production of oligodextrans via controlled hydrolysis of dextran in an enzyme membrane reactor. **Journal of Food Science**, v.67, n.5, p.1767-1771, 2001.
- (15) Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- (16) Bradford, M.M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n.1-2, p.248-254, 1976.
- (17) Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.
- (18) Garfin, D.E. Purification Procedures: Electrophoretic Methods. In Guide to Protein Purification (Methods in Enzymology Series), 1st edition; Deutscher, M.P (editor); Academic Process: San Diego, California, 1990; vol.182, 438p.

- (19) Abdel-Aziz, M. S.; Talkhan, F.N.; Janson, J.-C. Purification and characterization of dextranase from a new strain of *Penicillium funiculosum*. **Journal of Applied Sciences Research**, v.3, n.11, p.1509-1516. 2007.
- (20) Chen, L.; Zhou, X.; Fan, W.; Zhang, Y. Expression, purification and characterization of a recombinant *Lipomyces starkeyi* dextranase in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v.58, n.1, p.87–93, 2008 b.
- (21) Hatada, Y., Hidaka, Y., Nogi, Y., Uchimura, N.K., Katayama, K., Li, Z., Akita, M., Ohta, Y., Goda, S., Ito, H., Matsui, H., Ito, S., Horikoshi, K. Hyper-production of an isomalto-dextranase of an *Arthrobacter* sp. by a proteases-deficient *Bacillus subtilis*: sequencing, properties and crystallization of the recombinant enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.65, n.5, p.583-592, 2004.
- (22) Khalikova, E., Susi, P., Usanov, N., Korpela, T. Purification and properties of extracellular dextranase from *Bacillus* sp. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.796, n.2, p.315-326, 2003.
- (23) Shimizu, E., Unno, T., Ohba, M., Okada, G. Purification and characterization of an isomaltotriose-producing endo-dextranase from a *Fusarium* sp. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.62, n.1, p.117-122, 1998.
- (24) Arnold, W., Nguyen, T.B.P., Mann, L.C. Purification and characterization of a dextranase from *Sporothrix schenckii*. **Archives in Microbiology**, v.170, n.2, p.91-98, 1998.
- (25) Hattori, A.; Ishibashi, K.; Minato, S. The purification and characterization of the dextranase of *Chaetomium gracile*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.45, n.11, p.2409-2416, 1981.
- (26) Chaiet, L.; Kempf, A.J.; Harman, R.; Kaczka, E.; Weston, R.; Nollstadt, K.; Wolf, F.J. Isolation of a pure dextranase from *Penicillium funiculosum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.20, n.3, p.421-426, 1970.
- (27) Das, D.K., Dutta, S.K. Purification, biochemical characterisation and mode of action of an extracellular endo-dextranase from the culture filtrate of *Penicillium lilacinum*. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.28, n.1, p.107-113, 1996.

- (28) Koenig, D., Day, D. The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*. **European Journal of Biochemistry**, v.183, n.1, p.161-167, 1989.
- (29) Wynter, C. Partial purification of a thermostable dextranase using Sephacryl S-300 adsorption. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, n.5, p.321-324, 1997.
- (30) Ramos, A., Spencer-Martins, I. Extracellular glucose-producing exodextranase of the yeast *Lipomyces lipofer*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.49, n.2, p.183-190, 1983.
- (31) Wynter, C.V.A.; Galea, C.F.; Cox, L.M.; Dawson, M.W.; Patel, B.K.; Hamilton, S.; De Jersey, J.; Inkerman, P.A. Thermostable dextranases: screening, detection and preliminary characterization. **Journal of Applied Microbiology**, v.79, n.2, p.203-212, 1995.
- (32) Talkhan, F.N., El-Marsy, H.G., Hassanein, S.M., El-Beih, F.M., Abdel-Aziz, M.S. Genetic Improvement of Dextranase Production by *Penicillium funiculosum* via Mutation Induction and Protoplast Fusion. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.10, n.1, p.42-46, 2008.
- (33) Abdel-Naby, M., Ismail, A.-M. S., Abdel-Fattah, A.M., Abdel-Fattah, A.F. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. **Process Biochemistry**, v.34, n.4, p.391-398, 1999.
- (34) Simonson, L.G.; Liberta, A.E.; Richardson, A. Characterization of an extracellular dextranase from *Fusarium moniliforme*. **Applied Microbiology**, v.30, n.5, p.855-861, 1975.